

3
2EJ-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CONSTRUCCION Y PURIFICACION DE DOS
PROTEINAS QUIMERICAS DE TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA.”

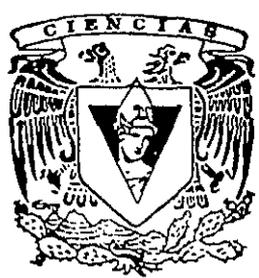
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

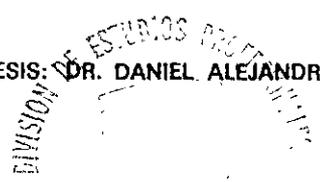
B I O L O G A

P R E S E N T A :

ELIZABETH GABRIELA AGUILETA ESTRADA



DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO



1999

174529

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Construcción y Purificación de dos Proteínas Quiméricas de
Triosa Fosfato Isomerasa.
realizado por Elizabeth Gabriela Aguilera Estrada
con número de cuenta 9350491-9 , pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Propietario Dra. Georgina Garza Ramos
Propietario Dra. Luisa Alba Lois
Suplente Biol. María Elena Cháñez Cárdenas
Suplente Biol. Shaday Michán Aguirre

Consejo Departamental de Biología
Edna María Suárez Díaz
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Índice

Agradecimientos	5
Abreviaturas utilizadas	7
Resumen	8

Capítulo 1: Introducción

Plegamiento de proteínas	10
La Tnosafosfato Isomerasa	13
Estudios de mutagénesis dirigida	16
Tabla comparativa de secuencias de TPI	20

Objetivos Generales	21
---------------------	----

Capítulo 2: Material y Método

Método para la construcción de las quimeras	22
Purificación de los genes silvestres de <i>T.brucei</i> y <i>S.cerevisiae</i>	23
Purificación del DNA en gel de agarosa con bromuro de etidio	24
Utilización de la técnica de PCR para generar las quimeras	24
Primera fase de PCR	28
Segunda fase de PCR	29
Clonación de los genes quiméricos	31
Secuenciación del DNA quimérico	32
Sobrexpresión e inducción	34

Método para la purificación de las quimeras	34
Protocolo de la purificación de la quimera TL	35
Primer lote	35
Determinación de la concentración de proteína	36
Determinación de los puntos isoelectrónicos	36
Medición de la actividad catalítica	37
Segundo lote	38
Protocolo de purificación de la quimera LT	40

Experimentos de caracterización de las quimeras	43
Parámetros cinéticos	43
Estabilidad a la dilución	43
Determinación de la reactividad de la quimera TL con MMTS	44

Capítulo 3: Resultados

Diagrama de flujo de la construcción de las quimeras	45
Diagrama de flujo de la purificación de la quimera TL	47
Purificación de la quimera TL	49
Diagrama de flujo de la purificación de la quimera LT	59
Purificación de la quimera LT	60
Parámetros cinéticos de las quimeras	71
Estabilidad a la dilución de las quimeras	74
Reactividad de la quimera TL con MMTS	76

Capítulo 4: Discusión y Conclusiones

Construcción de las quimeras	78
Purificación de las quimeras	84
Experimentos de caracterización de las quimeras	88
Conclusiones	92
Perspectivas	93
Literatura citada	94

Cuando el orden de nuestras vidas se ha trastocado y no se puede perder de vista el hilo conductor de la adversidad, me acuerdo de la semilla del naranjo de Fuentes y creo verdaderamente que en nuestro jardín se ha plantado ya la semilla de otro fruto igualmente redondo y solar que se encargará de hacer volver el tiempo que hemos dejado escapar. Hay que estar de acuerdo con Voltaire y ver en Cándido y su jardín la mejor enseñanza. Hoy y siempre tenemos que velar por ese pedazo de tierra fértil que nos es prometido.

Esta tesis es para mi madre y mis hermanos. También para Juanpa

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con ayuda de las becas de: CONACYT en el proyecto "Presión Hidrostática y Estructura de Proteínas" Número de proyecto 0150P-N; con la beca de DGPA al proyecto "Caracterización Termodinámica y Cinética del Plegamiento de Proteínas Oligoméricas" No. IN103596FQ; y con la beca de la Institución de asistencia privada FLAG

Quiero agradecer especialmente la dirección de la Dra Emma Saavedra Lira y todo el apoyo del laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para la construcción de las quimeras de Triosafosfato Isomerasa. Sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible. Muchas gracias también a mis compañeros de trabajo en el laboratorio tres del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y sobre todo al Dr. Alejandro Fernández Velasco por permitirme compartir este proyecto y por su gran paciencia. Muchas gracias por todo lo que aprendí con ustedes.

Biuti y Mariana Vucub Maschenka (mis angelitos de la guarda), gracias por la enorme ayuda logística-gelística.

Gracias por la paciencia infinita de mi familia, sobre todo de mi madre y mi abuela, heroínas de mil batallas, pero también a Miguelón y el pequeñajo Gabriel que muchas veces han tenido que soportar la choki-furia. A mis primos y tíos con cariño.

Claramente, gracias forever a los chicos del Madrid: Juanpa (biutiful), Juanmanuelín, Ingrid-Mariana, Edu, Aleko, Sampy, Ian, Leo, Gurst, Amaro, Sapo y Montse. Y por supuesto a mis amiguitos de la generation next: Ek, Valero, Fun, Angelique, Karina la guera, Eduard, Auroris, Paquito y Robert. Al inclasificable y muy querido Danieburor y al Almería, al Azuracentúrix, a la Máquina y al Tricolor.

Y last but not least a Juanpa, María del Mar, Crisa y Raúl por consentirme tantísimo. Muchas gracias, la pirita sí funcionó.

La Quimera:

La quimera se tenía por inconquistable. Era un portento de lo más singular, un león al frente, una serpiente detrás y una cabra en medio
Una criatura de espanto, grande y de pies ligeros y fuertes Su aliento era una llama inextinguible

Hesíodo

La primera noticia de la Quimera está en el libro sexto de la Iliada. Ahí está escrito que era de linaje divino y que por delante era un león, por el medio una cabra y por el fin una serpiente; echaba fuego por la boca y la mató el hermoso Belerofonte, hijo de Glauco, según lo habían presagiado los dioses(...)La incoherente forma desaparece y la palabra queda para significar lo imposible. "Idea falsa, "vana imaginación", es la definición de quimera que ahora da el diccionario

Jorge Luis Borges. El libro de los seres imaginarios.

Literatura y ciencia.

En algunas situaciones, es la literatura la que puede servir indirectamente de fuerza propulsora al científico: como ejemplo de coraje en la imaginación, de llevar a las últimas consecuencias una hipótesis, etc. Así, en otras situaciones puede suceder lo contrario. En este caso, el modelo del lenguaje matemático, de la lógica formal, puede salvar al escritor del ofuscamiento en el que caen algunas palabras o imágenes debido a su mal uso. Con esto, sin embargo, no debe pensar el escritor que ha encontrado algo absoluto, también aquí puede servirle el ejemplo de la ciencia, de la paciente modestia al considerar cada resultado como parte de una serie, quizá infinita, de aproximaciones.

Italo Calvino "Due interviste su scienza e letteratura" en Una pietra sopra

ABREVIATURAS UTILIZADAS

alfa GPDH	alfa Glicerol Fosfato Deshidrogenasa
alfa GP	alfa Glicerol Fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona Fosfato
DNA	Acido desoxiribonucleico
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido Etilendiamino Tetraacético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	Fast Pressure Liquid Cromatography
IPTG	Isopropilthio-beta-D-galactósido
LB	Luria Bertani
MES	ácido 2-N morfolinoetensulfónico
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
µL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimolar
MMTS	Metilmetano tiosulfonato
MOPS	3-(N-ácido morfolinopropanosulfónico)
NaCl	Cloruro de Sodio
NADH	Nicotín de adenosín dinucleótido en su forma reducida
PCR	Reaccion en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fuoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	revoluciones por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TE	Trietanol
TEA	<i>Trietanol amina</i>
TED	Buffer compuesto de TEA+EDTA+DTT
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TP1	Triosafosfato Isomerasa
uv	ultravioleta

RESUMEN

El plegamiento de las proteínas es uno de los problemas sin resolver más importantes de la bioquímica. Se han referido a este problema como la segunda parte del código genético porque se presume que, al menos parte de la solución del mismo, está "codificada" en la secuencia de aminoácidos que conforman a las proteínas. De ahí que los experimentos diseñados por algunos investigadores del campo, intenten descifrar la relación existente entre la secuencia específica de algunos aminoácidos y la forma tridimensional que éstos le confieren a la proteína una vez que se ha plegado. En su forma más sencilla, estos experimentos se basan en la sustitución de un aminoácido por otro para identificar los cambios conformacionales que dicha sustitución genera en la proteína plegada. Este tipo de acercamiento puede ser exhaustivo pero muy costoso en términos de tiempo y recursos, por ello, son preferibles los experimentos de mutagénesis dirigida que se concentran en sustituir aminoácidos clave que puedan responder a preguntas concretas. Un ejemplo de este tipo de experimentos es el de la construcción de proteínas quiméricas, que son aquellas que están modificadas por la presencia de otras proteínas, ya sea que estén ligadas o tengan partes incorporadas de proteínas de distintas especies.

El presente trabajo tiene como finalidad construir dos proteínas quiméricas que nos señalen si en el plegamiento de la Triosafosfato Isomerasa (TPI) existen "módulos de plegamiento" tales que, unas zonas específicas de la proteína adquieran su estructura secundaria definitiva de manera autónoma y que este evento sirva de "guía" para concluir el plegamiento del resto de la proteína. Nos interesa investigar la relación existente entre la estructura de las proteínas y su patrón de plegamiento. Pensamos que existe una "identidad molecular" en el sentido de las características particulares de una proteína, tales como la actividad enzimática, los parámetros cinéticos o el patrón de plegamiento, (que le son conferidas por la secuencia de aminoácidos que la componen) y *queremos saber hasta qué punto, la introducción de alguna mutación en una proteína silvestre, afecta su identidad molecular, y por tanto, su plegamiento*

La TPI es un dímero cuya conformación tridimensional es un barril alfa-beta ya que consta de ocho unidades alfa-beta, plegadas de tal manera que forman un barril de hebras beta paralelas, cubierto en el exterior por ocho alfa hélices. Dado que las dos primeras unidades alfa-beta forman parte de la interfase entre los monómeros y son cruciales porque la TPI sólo es activa en forma dimerica, resulta interesante analizar los cambios, en la estabilidad y la actividad enzimática, que se producirían tras la sustitución de dichas unidades en las quimeras. Hay que mencionar que no se conoce ninguna TPI silvestre monomérica y las mutantes monoméricas tienen poca actividad. Además se ha visto que el plegamiento de los barriles alfa-beta ocurre casi siempre de manera secuencial. al principio se pliegan las seis primeras unidades alfa-beta y al final, las dos últimas (Wilson Miles et al, 1982, Godzik et al, 1992). Quizá esto sugiera que existen módulos de

plegamiento, de ser así, esperamos comprobarlo con las dos quimeras.

En este caso, se hicieron dos proteínas quiméricas mediante la unión de fragmentos de las TPIs silvestres de *Trypanosoma brucei* y *Sacharomyces cerevisiae*

El diseño de las quimeras permitió construir una proteína cuyas dos primeras unidades alfa-beta fueran tomadas de la TPI de *T. brucei* y las otras seis de *S. cerevisiae*; y otra con el arreglo inverso, es decir, las dos primeras unidades son de *S. cerevisiae* y las seis restantes de *T. brucei*.

Se desarrollaron los primeros protocolos de purificación para cada quimera y finalmente se obtuvieron los parámetros cinéticos de cada una.

La quimera LT, cuya construcción consta de las dos primeras unidades de *S. cerevisiae* y las seis restantes de *T. brucei*, tiene una V_{max} de $10.66 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ y una K_m de 0.63 mM y es estable a la dilución. La quimera TL, cuyas dos primeras unidades son de *T. brucei* y las seis últimas de *S. cerevisiae*, tiene una V_{max} de $87.86 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ y una K_m de 0.96 mM , es inestable a la dilución y es inhibida por el MMTS. Las mutaciones introducidas en las quimeras afectan la estabilidad a la dilución y los parámetros cinéticos

Capítulo 1: Introducción.

Plegamiento de proteínas.

A finales de los años cincuenta, Christian B. Anfinsen y sus colegas, descubrieron que la secuencia de aminoácidos de la ribonucleasa, por sí sola, determina su conformación tridimensional (Stryer, 1988). La ribonucleasa es una pequeña proteína de apenas 124 residuos de aminoácidos que en presencia de β mercaptoetanol en 8 M de urea, pierde su conformación original y da lugar a una cadena de aminoácidos sin ninguna estructura aparente, además de que pierde toda actividad enzimática. En esas condiciones, la proteína está desnaturalizada.

Anfinsen descubrió que si dializaba *in vitro* a la proteína desnaturalizada para quitarle todo rastro de urea y β mercaptoetanol, ésta volvía a adquirir su forma original en el espacio así como su función. El β mercaptoetanol había roto los enlaces disulfuro después de que la urea deshizo los enlaces no covalentes. El conjunto de estos enlaces era el responsable de mantener a la proteína bajo su forma activa, así que en cuanto las condiciones fueron favorables, la proteína recuperó su forma original y su actividad. Este resultado lo llevó a concluir que la forma activa de una proteína está determinada únicamente por la secuencia de aminoácidos que la componen ya que estos experimentos se llevaron a cabo *in vitro* y con la proteína purificada.

Al parecer, lo único que bastaba para tener a una proteína correctamente plegada en el espacio acuoso de la célula, era la secuencia de aminoácidos. La interpretación dada por los investigadores era que la conformación activa de una proteína, o su estado nativo, era la única posible porque era la más favorable en términos energéticos, es decir, que es la conformación de mínima energía.

Sin embargo, esto no explicaba por qué razón algunas proteínas sufrían cambios irreversibles que afectaban tanto su forma como su función, aun si los factores desnaturalizantes habían sido retirados.

A finales de los sesenta, Cyrus Levinthal levantó una gran polémica con una pregunta que se convertiría en toda una paradoja: supongamos que tenemos una pequeña proteína de tan sólo 100 residuos de aminoácidos, si cada residuo puede estar en tres distintas posiciones, el número total de estructuras sería de 3^{100} . Si a la proteína le toma 10^{-13} segundos transformar una estructura en otra, la búsqueda conformacional que explorara todas las formas posibles tomaría 1.6×10^{27} años! (Stryer, 1988). ¿Cómo es posible, entonces, que para encontrar la conformación de mínima energía, una proteína explore todas y cada una de las alternativas, si el tiempo en que adquiere su forma nativa es de tan sólo unos segundos por lo general? Además hay que considerar que el tiempo que calculamos es para una pequeña cadena de 100 residuos y que cada uno de ellos puede estar en mucho más de tres conformaciones (Stryer, 1988).

Lo que esta pregunta sugería es que la proteína no sólo debe encontrar la conformación de mínima energía, sino que lo debe hacer muy rápido. Se propuso entonces que debían existir rutas

de plegamiento en vez de búsquedas aleatorias. Lo que es más, si estas rutas existieran, probablemente la proteína atravesaría por varias conformaciones intermedias antes de alcanzar su forma nativa.

El plegamiento se describe según la reacción $U \Leftrightarrow I \Leftrightarrow I \Leftrightarrow \dots \Leftrightarrow I \Leftrightarrow N$, donde U es el estado desnaturalizado o *unfolded*, I son los estados intermedios y N es el estado nativo de la proteína (Richards, 1992). A partir de Levinthal, los investigadores del plegamiento han estado a la caza de estos intermedios y todas, o al menos la gran mayoría de las investigaciones, se han centrado en descubrir la ruta que lleva a las proteínas desde su estado desnaturalizado hasta su conformación nativa (Dill, K and Sun, 1997).

A pesar de que se han hecho enormes progresos, el problema dista de estar resuelto. De resolverse, estaríamos en la posibilidad de predecir la estructura de una proteína con sólo saber su secuencia.

En las últimas dos décadas se han implementado numerosas técnicas que permiten un acercamiento cada vez mejor al problema. Los experimentalistas analizan, por ejemplo, la renaturalización a partir de una proteína desnaturalizada por guanidina o urea, siguiendo el proceso mediante técnicas como la fluorescencia, dicroísmo circular, intercambio de hidrógeno, actividad enzimática, etc. La espectrofotometría, la resonancia magnética nuclear y la cristalografía de rayos X, han sido elementos invaluable en la investigación del plegamiento ya que brindan una idea muy clara acerca de la estructura de la proteína y de su actividad enzimática (Richards, 1992)

Los experimentos que recientemente han aportado datos muy interesantes son los trabajos de mutagénesis, ya que permiten responder a preguntas concretas de manera muy puntual (Kishan et al, 1994; Tanaka et al, 1994, Houbrechts, et al, 1995)

Por otro lado, los teóricos han propuesto numerosos modelos que intentan resolver el plegamiento. Las propuestas incluyen modelos estadísticos sobre el comportamiento de cada aminoácido en solución acuosa (Rose et al, 1993) Simulaciones Monte Carlo, modelos sobre el efecto hidrofóbico, modelos de volumen excluido, de empaquetamiento, de exclusión de áreas, de densidad de empaquetamiento y últimamente el programa LINUS de predicción de estructura a partir de la secuencia (Rose et al, 1995), así como estudios con algoritmos genéticos con una perspectiva evolutiva (Saito et. al, 1997)

Todos estos avances han dado como resultado el surgimiento de lo que se conoce como la nueva visión en el plegamiento. En realidad se trata de conclusiones en cuanto al enfoque en el estudio del plegamiento, contribuidas tanto por experimentalistas como por teóricos.

La nueva visión en el plegamiento de proteínas (Dill, K and Sun, 1997) también implica que existen rutas de plegamiento, pero en vez de ser una única ruta, se trata de un conjunto de varios caminos posibles. Todos ellos llevan a la proteína de un estado desnaturalizado a uno nativo. La

conformación final siempre es aproximadamente la misma y es aquella de mínima energía. También se sabe que existen varios mínimos y máximos locales en un plano energético conformacional (Baldwin, 1994). Que la proteína tome una ruta u otra, depende de que pueda flanquear algunas barreras energéticas. Esto implica que finalmente hay un conjunto de estados de mínima energía a los que se accede desde distintos puntos iniciales. La imagen que es útil para visualizar esto es la de un embudo por el que pasa agua. A este modelo del plegamiento se le conoce como embudo (Figura 1.1 Dill, K and Sun, 1997). Según este modelo, al comienzo del plegamiento existen múltiples rutas posibles y dadas las condiciones el proceso sigue alguno de esos caminos. En cuanto se ha iniciado una ruta de plegamiento, se reduce el número de posibilidades subsecuentes ya que se comienzan a originar estructuras secundarias que servirán como una guía para el plegamiento del resto de la proteína. Así, al final sólo es una ruta, de entre muchas posibles, la que lleva a la estructura final plegada.

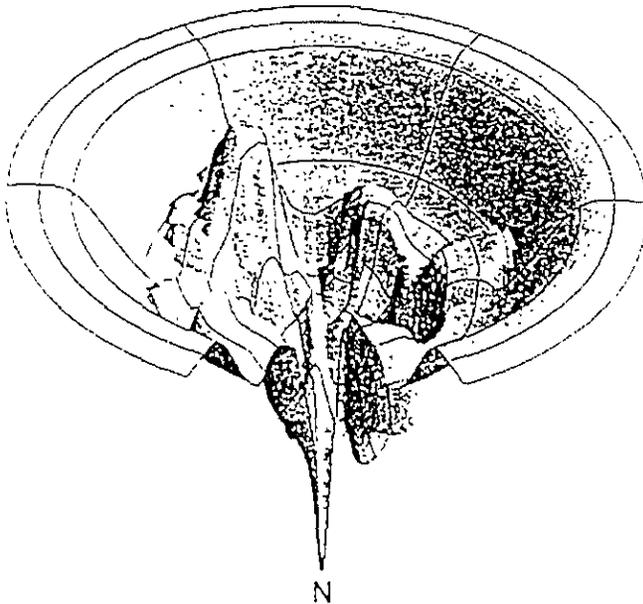


Figura 1.1 Modelo del embudo propuesta por Dill y colaboradores (Dill, K. and Sun, 1997) N se refiere al estado nativo o plegado de una proteína.

La figura 1.1 muestra los máximos y mínimos energéticos locales que se presentan durante el plegamiento de una proteína, es decir del estado desnaturalizado al nativo. No se refiere al estado nativo o plegado de una proteína (Dill, K. And Sun, 1997)

Este modelo también explica por qué algunas veces la ruta del plegamiento no coincide con la ruta de desnaturalización a pesar de que en principio deberían de ser idénticas, bajo el supuesto de que exista una única ruta de plegamiento (Richards, 1992)

Se esperaría que todas las proteínas plegadas de la misma especie molecular mostraran los mismos parámetros cinéticos y la misma actividad enzimática, incluso si como enuncia el modelo del embudo, hay distintas rutas. Sin embargo, en algunos casos parece existir una heterogeneidad estadística entre un grupo de proteínas plegadas del mismo tipo (Rietveld, M Y S Ferreira, 1996)

La Triosafosfato Isomerasa.

La Triosafosfato Isomerasa (TPI) es una enzima glucolítica que cataliza la interconversión de una cetosa, Dihidroxiacetona Fosfato (DHAP), a una aldosa, Gliceraldehído-3-Fosfato (G3P) en la vía metabólica de la glucólisis (Stryer, 1988). La reacción, rápida y reversible, ocurre en el citosol de la célula. En el equilibrio, el 96% de la Triosafosfato es DHAP, sin embargo, la reacción procede en el sentido inverso porque constantemente hay una remoción del G3P.

La TPI es un homodímero de 26000 daltones por monómero y sólo es activa en forma dimerica, ninguna TPI silvestre es monomérica y los monómeros generados por mutagénesis dirigida tienen poca actividad (Borchert, T. et al, 1994; Borchert, T. et al, 1995; Mainfroid, V. et al, 1996 a; Mainfroid, V. et al, 1996 b, Schliebs, W et al, 1997). Esta enzima es una proteína globular cuyo arreglo se conoce como barril α - β porque consiste en un núcleo central de ocho hebras β paralelas rodeadas por ocho α hélices. Las regiones que conectan a las hebras con las hélices son las asas. Hay ocho unidades α - β y cada una tiene una hebra beta al principio y una alfa hélice al final

Las asas 3, 4, 5, 6 y 8 son largas ya que tienen al menos 8 residuos. Algunos residuos de las asas 4, 5 y 8, adoptan forma de hélices. Las asas 3 y 6 son protuberantes y se salen del monómero. El asa 3 cabe en un hueco cercano al sitio activo del otro monómero, mientras que el asa 6 presenta una conformación abierta en el estado desligado y al contacto con el ligando sufre un arreglo conformacional mayor hacia una forma cerrada (Wierenga et al, 1991a) Figura 1.2.

Los residuos que están en la zona de la interfase entre los monómeros se encuentran principalmente en las asas 1, 2 y 3.

En cuanto a las asas 1 y 2 que junto con la 3 participan en la zona de interfase, difieren considerablemente en las TPIs de *T.brucei* y *S.cerevisiae* (de doce aminoácidos, siete son diferentes). Probablemente estos cambios se traduzcan en diferencias a nivel del patrón de plegamiento y la actividad enzimática

Por ahora se cuenta con la secuencia completa de 50 Triosafosfato Isomerasas distintas, (Gene Bank). Se conoce la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de nueve TPIs: TPI de humano (Mande et al, 1994); TPI de pollo (Banner et al, 1975) , TPI de *Sacharomyces cerevisiae* (Lolis et al, 1990); TPI de *Trypanosoma brucei* (Wierenga et al, 1992) ; TPI de *Trypanosoma cruzi* (Maldonado et al, 1997); TPI de *E.coli* (Noble et al, 1993^a); TPI de *Plasmodium falciparum* (Velanker et al, 1997); TPI de *Bacillus stearmophilus* (Delboni et al, 1995) ; la TPI de *Vibrio marinus* y la TPI de una Arquea Hipertermofílica (Kolhoff et al, 1996)

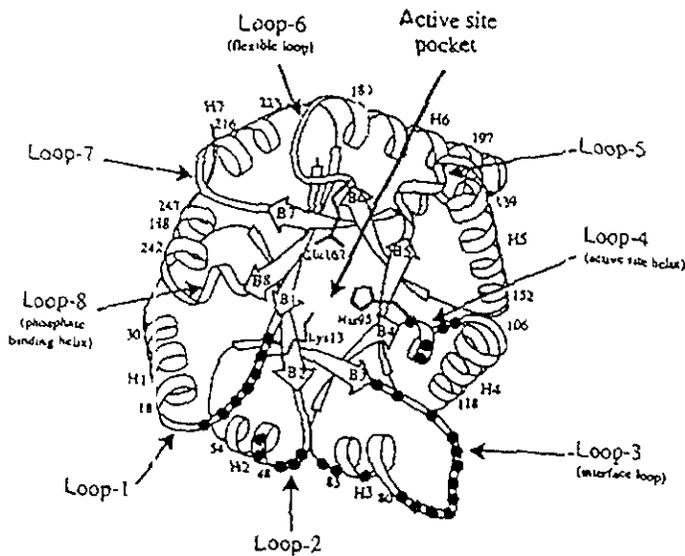


Figura 1.2 Monómero de TPI (Wierenga, 1991).

La figura 1.2 muestra el esquema del monómero de un barril α - β , en este caso de TPI (Wierenga et al, 1991). Se muestran cada una de las asas, el sitio activo y los aminoácidos involucrados en la interfase (en puntos negros) Loop se refiere a las asas y active pocket site al punto en el que se encuentra el sitio activo

La conformación barril α - β es muy recurrente, además de la TPI, por lo menos otras 18 enzimas se han encontrado con dicha forma aunque con función distinta (Brandén, 1991) Entre la mayoría de estas proteínas no hay una identidad significativa en las secuencias, aunque la forma tridimensional sea sorprendentemente similar La mayoría de las proteínas α - β tienen el sitio activo en las asas que conectan la parte carboxilo terminal de las hebras β con la parte amino terminal del α hélice adyacente

Los 150 residuos de aminoácidos que son similares en estructura en todos los barriles alfa-beta forman parte de las hebras β y de cada una de las α hélices. Las asas se podrían clasificar en dos grupos con funciones distintas. Las asas que están en la región carboxilo terminal de las hebras β conforman la mayor parte del sitio activo Las asas que están en la unidad, α hélice-asa-hebra β , son estructuralmente importantes porque mantienen las interacciones hidrofóbicas entre las hélices y las hebras de cada unidad. Se ha observado una tendencia a conservar la estructura tridimensional de este último tipo de asa además de que existen pocos motivos conformacionales en ellas (Brändén, 1991)

La estructura de barril α - β es uno de los mejores ejemplos de una estructura que a la vez es estable y flexible. Los aminoácidos que contribuyen a la estabilidad están conservados y los que están relacionados con la función varían en muchos casos A pesar de que algunos residuos están muy lejos del sitio activo, están conservados porque contribuyen a la estabilidad del barril (Wierenga, 1992) Hasta ahora no hay un acuerdo referente a la historia evolutiva que dio origen a esta estructura Puede ser que diferentes combinaciones de exones que codificaban para pequeñas unidades funcionales y probablemente de plegamiento, hayan dado origen a una forma tridimensional estable que fue modificándose con el paso del tiempo en respuesta a presiones adaptativas. O bien que en algún momento dado se haya originado el barril α - β y luego haya divergido (Brandén, 1991)

La TPI de *T. brucei* tiene 250 aminoácidos, es una enzima inestable a la dilución, tiene una V_{max} de $14230 \pm 8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_m de $0.25 \text{ mM} \pm 0.05$ (Lamber et al, 1987) a diferencia de la TPI de *S. cerevisiae* que tiene 247 aminoácidos, es muy estable a la dilución y sus parámetros cinéticos son, K_m de $1.27 \pm 0.06 \text{ mM}$ y V_{max} de $11536 \pm 979 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Krietsch et al, 1970, Lamber et al, 1987).

Estudios de mutagénesis dirigida.

En las últimas décadas se han implementado técnicas de biología molecular que permiten realizar experimentos de mutagénesis dirigida en proteínas. De esta manera, la sustitución específica de uno o varios aminoácidos es posible y se realiza en tiempos relativamente cortos porque los protocolos están más o menos estandarizados. La ventaja de estos experimentos consiste en que pueden responder de forma muy directa a preguntas concretas acerca de la estructura de las proteínas y su repercusión a nivel funcional (Alberts et al, 1994).

En general, en todos los experimentos de mutagénesis primero se debe trabajar directamente con el gen que codifica para la proteína de interés. Para ello es necesario contar con el gen clonado sobre el cual se pueden introducir los cambios deseados. Esto se logra utilizando principalmente la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, con la cual, se logran amplificar varias copias del gen modificado. Se realizan una o varias reacciones de PCR dependiendo del tipo de mutación que se quiera introducir. Posteriormente el gen quimérico es ligado en vectores de expresión, llamados plásmidos, para poder transformar células bacterianas competentes que lo sobreexpresen y lo traduzcan (Alberts et al, 1994). Una vez traducido el gen, se procede a purificar la proteína. Los protocolos de purificación varían mucho dependiendo del tipo de proteína, pero las técnicas empleadas más comunes son la purificación por precipitación con sales, por ejemplo, sulfato de amonio; por precipitación diferencial en la centrifugación; por cromatografía, por electroforesis (Creighton, 1993).

Es necesario tener una proteína pura para realizar los experimentos de caracterización cinética y/o termodinámica.

Son muchas las aportaciones que hasta ahora han contribuido los estudios de mutagénesis dirigida y van desde resultados sencillos y puntuales, hasta los complicados que involucran grandes cambios arriesgados. Uno de estos últimos experimentos es la generación de proteínas quiméricas. Una quimera es una proteína compuesta por partes de distintas especies. Este tipo de cambios acarrea grandes diferencias, al menos a nivel de secuencia, que no siempre implican cambios drásticos en el arreglo conformacional (Blacklow et al, 1991).

Algunas veces, los experimentos de mutagénesis sirven para generar proteínas *de novo* totalmente diseñadas por el investigador. En 1994, Tanaka y sus colaboradores generaron una proteína *de novo* para investigar el empaquetamiento natural de los barriles α - β . Diseñaron una secuencia de 207 aminoácidos que luego fue sobreexpresada y traducida en un sistema bacteriano de clonación. Su experimento intentaba encontrar la secuencia más apropiada para optimizar el empaquetamiento del barril. Para ello analizaron los barriles naturales en los que había pocas cavidades y descubrieron, por ejemplo, que a pesar de que los sandwiches de hébras β paralelas

no pueden ser empaquetados sin dejar algunas pequeñas cavidades que no cubren los residuos alifáticos, hay una compensación dada por los residuos aromáticos de las mismas hebras β ó de diferentes cadenas laterales de otras partes de la proteína. Así, en su diseño, cuidaron que las cavidades dejadas naturalmente por algunos residuos, fueran compensadas por otros. Los investigadores se apoyaron en un método de alineación en tercera dimensión para diseñar la secuencia más adecuada. Después de varios ciclos de mejoramiento, lograron crear un plegamiento ordenado y significativamente cooperativo, que sin embargo, todavía no está tan bien empaquetado como los barriles naturales (Tanaka et al, 1994)

Algo muy interesante es que las mutaciones pueden sucederse entre sí de manera iterativa, de modo que puedan contestar preguntas cada vez más específicas y puntuales (Blacklow et al, 1991). Un ejemplo de esto lo encontramos en el trabajo de Houbrechts y colaboradores en 1995. Ellos diseñaron *de novo* una proteína con el motivo α - β , de ocho unidades. Analizaron el resultado de dicha secuencia en términos de la simetría, la hidrofobicidad y la distribución de cargas. Dichos análisis, llevaron a los investigadores a diseñar una segunda generación de octarelinas (nombre de sus proteínas) con el fin de comprender la influencia del empaquetamiento de los residuos beta en la estructura del barril α - β . Los resultados indican que las octarelinas de la segunda generación existen en una mezcla de monómeros y dímeros, que tienen un alto contenido de estructura secundaria y los residuos de triptofano están muy bien empaquetados conforme a los propósitos del diseño. Una de las octarelinas de la segunda generación tenía un arreglo en la simetría, en 4, que le proporcionaba una estabilidad mayor al barril (Houbrechts et al, 1995).

Este tipo iterativo de experimentos dan una idea cada vez más detallada acerca del mecanismo del plegamiento, porque se puede afinar el detalle de acercamiento a partir de los datos anteriores.

Del mismo modo, para el diseño de las quimeras TL y LT, de la TPI, se tomaron en cuenta varios datos provenientes de otros experimentos.

En 1982, Edith Wilson Miles y sus colaboradores, obtuvieron evidencias experimentales acerca de la naturaleza secuencial de la desnaturalización por guanidina de la subunidad alfa de la Triptofano Sintasa (un barril α - β) y de dos fragmentos alfa proteolíticos formados según el arreglo 6+2. Esto apuntaba hacia la existencia de unidades de plegamiento (Wilson Miles, E. et al, 1982).

De existir estas unidades, podría decirse que el plegamiento es modular y que algunas partes de la proteína adquieren una estructura secundaria antes que otras, de ahí, por ejemplo, la desnaturalización secuencial de la Triptofano Sintasa.

En 1992, dos equipos de investigación observaron independientemente que, en general, el plegamiento de los barriles α - β ocurría por partes, plegándose primero seis unidades α - β y después las otras dos. Godzik, y colaboradores trabajaron con modelos teóricos de simulación

(Godzik,A et al, 1992) y Eder y Kirschner (Eder,J and K. Kirschner, 1992) lo hicieron experimentalmente.

Por otro lado, en 1993, An-Qiang Sun y colaboradores llevaron a cabo una proteólisis limitada de la TPI de levadura y caracterizaron los péptidos resultantes que mostraban un contenido inherente de estructura secundaria (An-Qiang Sun, A et al, 1993).

Los péptidos caracterizados por Sun son los siguientes:

-los péptidos de mayor peso molecular (superior a 16 KDa) son los mismos que en el dímero nativo y todos tienen la misma secuencia, ARTFFVG...

-los péptidos de bajo peso molecular (6-8 KDa) tienen una secuencia que siempre comienza con Ala 175. Este sitio es interesante porque se encuentra en la tapa que cierra el sitio activo del barril α - β .

-los péptidos de entre 10-16 Kda, contienen la secuencia nativa que va, del aminoácido amino – terminal, a la Leu 53. Este último péptido se puede encontrar plegado en el monómero tanto de forma 6+2, si se pliegan primero las seis últimas unidades y por último las dos restantes; como de la forma 2+6, si primero se pliegan las primeras dos unidades y por último las seis restantes. Este último caso ocurre, por ejemplo, en la TPI (An-Qiang Sun,A. et al, 1993).

En todos estos experimentos, la evidencia señala que de existir los módulos de plegamiento, el primer módulo en plegarse constaría de las primeras seis unidades alfa-beta y el segundo módulo constaría de las dos unidades restantes. Se le podría llamar, pues, modelo 6+2. Sin embargo, nuestras proteínas quiméricas han sido construidas alterando las dos primeras unidades alfa-beta de una TPI silvestre, dicho de otro modo, nuestro modelo se podría llamar 2+6. La razón para esto es que, el plegamiento de la TPI puede ocurrir de forma 2+6 además de que estas dos unidades alfa-beta están presentes en la interfase entre los dos monómeros. Por otro lado, es en estas dos unidades que existen las mayores diferencias en cuanto a la secuencia de aminoácidos.

Considerando los datos anteriores, se planearon dos mutaciones para generar dos quimeras distintas que nos permitieran poner a prueba la existencia de las unidades de plegamiento. Nuestras quimeras tienen dos unidades α - β de una especie y las otras seis de la otra. La quimera TL tiene las dos primeras unidades, es decir, los primeros 53 aminoácidos, de *T. brucei* y las seis faltantes de *S. cerevisiae*. Complementariamente, la quimera LT cuenta con las dos primeras unidades de *S. cerevisiae* y las otras seis de *T. brucei* (Figura 1 3). Utilizamos TPIs de estas dos especies porque ambas están bien caracterizadas y porque eran las de mayor disponibilidad.

Ninguna TPI silvestre conocida es monomérica y las mutantes monoméricas de TPI tienen poca actividad (Wierenga et al, 1992) Por otro lado, el mayor número de diferencias en cuanto a

la secuencia de aminoácidos, entre ambas especies, ocurre precisamente en esas dos unidades. Queremos comprobar si dichas sustituciones pueden ser las responsables de las diferencias en cuanto a estabilidad a la dilución y el patrón de plegamiento de las TPIs silvestres.

Figura 1 3 Tabla comparativa de secuencias de TPI

especie	Extremo amino terminal	Hebra Beta	Asas	Alfa hélice
<i>S.cerevisiae</i>	-- MARTF	FVGGN	FKLNGS	KQSIKEIVERLNT
<i>T.brucei</i>	- MSKPQP	IAAAN	WKCNGS	QQSLSELIDLfNS
TL	- MSKPQP	IAAAN	WKCNGS	QQSLSELIDLfNS
LT	-- MARTF	FVGGN	FKLNGS	KQSIKEIVERLNT
<i>S.cerevisiae</i>	ASIPE --- NV	EVVICP	PATY	LDYSVSL
<i>T.brucei</i>	TSINH --- DV	QCVVAS	TFVH	LAMTKER
TL	TSINH --- DV	QCVVAS	TFVH	LAMTKER
LT	ASIPE --- NV	EVVICP	PATY	LDYSVSL
<i>S.cerevisiae</i>	V --- - KKPQ	VTVGA	QNAYLKASGAFTGENS	VDQIKD
<i>T.brucei</i>	L --- - SHPK	FVIAA	QNAI - AKSGAFTGEVS	LPILKD
TL	V --- - KKPQ	VTVGA	QNAYLKASGAFTGENS	VDQIKD
LT	L --- - SHPK	FVIAA	QNAI - AKSGAFTGEVS	LPILKD
<i>S.cerevisiae</i>	VGAK	WVIL	GH SERRSY FHED	DKFIADKTKFALG
<i>T.brucei</i>	FGVN	WIVL	GH SERRAY YGET	NEIVADKVAAAVA
TL	VGAK	WVIL	GH SERRSY FHED	DKFIADKTKFALG
LT	FGVN	WIVL	GH SERRAY YGET	NEIVADKVAAAVA
<i>S.cerevisiae</i>	QGV	GVILCI	GET LEEKK AGK	TLDVVERQLNAVLE
<i>T.brucei</i>	SGF	MVIAICI	GET LQERE SGR	TAVVVLTQIAAIAK
TL	QGV	GVILCI	GET LEEKK AGK	TLDWVERQLNAVLE
LT	SGF	MVIALCI	GAT LQERE SGR	TAVVVLTQIAAIAK
<i>S.cerevisiae</i>	EV --- K DWTN	VVVAY	EPVWAIGTGLAAT	PEDAQDIHASIRKFLASK
<i>T.brucei</i>	KL -- KK ADWA	VASGF	MVIACIGETLQER	ESGRTAVVVLTQIAAIAK
TL	EV --- K DWTN	VVVAY	EPVWAGTGLAAT	PE:DAQDIHASIRKFLASK
LT	KL -- KK ADWA	VASGF	MVIACIGETLQER	ESGRTAVVVLTQIAAIAK
<i>S.cerevisiae</i>	LG DKAASE L	RILY	GGSAN	G\$NAVTFK
<i>T.brucei</i>	KL K - - - - K	ADWA	GGSVN	GKNARTLY
TL	LG DKAASE L	RILY	GGSAN	G\$NAVTFK
LT	KL K - - - - K	ADWA	GGSVN	GKNARTLY
<i>S.cerevisiae</i>	DKADVD	GFLV	G GASL KP -	Extremo carboxilo terminal SRN----
<i>T.brucei</i>	QQRDVN	GFLV	G GASL KP -	ATQ---
TL	DKADVD	GFLV	G GASL KP -	SRN----
LT	QQRDVN	GFLV	G GASL KP -	ATQ---

En negritas están los aminoácidos hidrofóbicos

Esta tabla muestra de manera comparativa a las secuencias de aminoácidos de las TPIs químicas y las TPIs silvestres de *T.brucei* y *S.cerevisiae*

Objetivos Generales

- Construir las quimeras TL y LT
- Purificar ambas proteínas quiméricas.
- Obtener los parámetros cinéticos de cada quimera.
- Realizar los experimentos de estabilidad a la dilución para ambas quimeras
- Realizar la prueba de reactividad con MMTS para la quimera TL.
- Analizar las diferencias en estabilidad a la dilución y actividad enzimática, entre las dos quimeras y las silvestres, y entre las quimeras entre sí.
- Interpretar el impacto de la mutación introducida en cada una de las quimeras y compararlas con las TPIs silvestres.

Capítulo 2 : Material y Método

I.-Construcción de las quimeras.

Objetivos particulares

- Crear dos proteínas quiméricas a partir de TPI de *S. cerevisiae* y *T. brucei*
- Obtener los genes híbridos mediante PCR
- Ligar en un vector para *E.coli* los fragmentos obtenidos
- Transformar las células competentes de *E coli*
- Secuenciar los genes quiméricos
- Sobrexpresar las quimeras en un sistema de expresión bacteriano

Lista de reactivos utilizados.

Medio de cultivo Luria Bertani:

Ampicilina 100 µg/mL

Reactivos de PCR:

PCR Nucleotide Mix Boehringer Mannheim 100mM de cada dNTP

Expand High Fidelity PCR System(Kit) Boehringer Mannheim

Vent Polymerase BRL

Buffer para Vent Pol. BRL

Reactivos para Clonación e inducción:

TA Cloning Kit. Invitrogen

Ligation Buffer 10X (100mM Tris-HCl,pH7.5, 20mM MgCl₂, 20mM DTT

IPTG GIBCO BRL

Reactivos para extracción de DNA:

Plasmid Midi Protocol (Kit) QIAGEN

Qiagen Spin (Kit) QIAGEN

Miniprep Spin Columns QIAGEN

Reactivos para purificación de DNA en banda de gel de agarosa

GeneClean BIO 101, Inc.

ioduro de sodio(3 volúmenes)

TBE Modificador(1/2 volumen)
Perlas de sílica Glassmilk
New Wash Concentrate
Reactivos para secuenciación:
mezcla de dideoxinucleótidos Perkin Elmer
(T;A,G;C)
Termination Mix Perkin Elmer-Roche
Cycling Mix . Perkin Elmer-Roche
Amortiguadores y soluciones:
TE 10mM Tris-HCl, pH 8.
EDTA 1mM, Tris-HCl, pH8
Acetato de Sodio 3M, pH 5.2
P1 50mM Tris HCl, pH 8 0; 10mM EDTA
P2 200mM NaOH; 1% SDS
P3 3M de acetato de potasio, pH 5.5
SDS 10%
NaCl 4M
Etanol absoluto
Etanol 70%
Isopropanol
Bromuro de Etidio 0.5 µg/mL

Enzimas de restricción:
NdeI GIBCO
Bam HI Boehringer Mannheim
Eco RI GIBCO
XbaI Boehringer Mannheim
Eco R5 GIBCO BRL
SstI GIBCO BRL
Hind III GIBCO BRL

Marcador:
DNA del Fago Lambda cortado con Eco RI y Hind III

Plásmidos:
pEt 3a
pCR II

Método para la construcción de las quimeras

Los genes silvestres de TPI de *T. brucei* y *S. cerevisiae*, donados por el Dr. Ruy Pérez Montfort del Instituto de Fisiología Celular, se utilizaron para construir las quimeras. Para utilizar los genes silvestres de TPI, fue necesario purificar primero los plásmidos.

A partir de un litro de medio de cultivo líquido Luria Bertani, se hizo un cultivo de las células transformadas que contenían los genes de interés y 100 µg/mL de ampicilina. Se dejó en agitación a 37°C toda la noche. Después se colectaron las células mediante una centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos.

Purificación de los genes silvestres de la TPI de *T.brucei* y de *S.cerevisiae*.

Para la purificación de los genes silvestres de TPI se utilizó el kit de extracción de DNA Qiagen.

La extracción de DNA es un proceso estandarizado y existen varios protocolos que varían un poco entre sí. Una forma de hacerlo consiste en cosechar a las células transformadas por centrifugación, resuspenderlas en 4mL de amortiguador de resuspensión que contiene 50mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8. Después agregarles 4 mL de amortiguador de lisis que consta de 200 mM NaOH y 1% SDS. Además se añaden 4mL de acetato de potasio 3M, pH 5.5. Se incubaba en hielo por 15 minutos y posteriormente se centrifuga a 4°C por 15 minutos a 30000 xg.

El sobrenadante que se colecta de la centrifugación se pasa por una columna que ha sido previamente equilibrada con 4mL de una solución compuesta por 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH7.0 ; 15% etanol y 0.5% Triton X-100. se centrifuga a 14000 xg por cinco segundos. La columna, que ya incluye el sobrenadante que contiene el plásmido, se lava dos veces con una solución de 10 M NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0 y 15% etanol.

El DNA extracromosómico se eluye de la columna con 5mL de EDTA-Tris, pH 7.0. Luego se precipita el DNA mediante 0.7 volúmenes de isopropanol. Se centrifuga durante 30 minutos a 15000xg. Por último se lava el DNA con 5mL de etanol frío al 70%, se deja secar por cinco minutos y se resuspende en un volumen adecuado de amortiguador TE (10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA).

Para comprobar que se obtuvo el DNA deseado, se corrieron las muestras del DNA extraído en una cámara de electroforesis, corriendo un gel de agarosa al 0.8%, a 80 volts de poder constante. La electroforesis separa moléculas por su peso, ya que aprovecha la carga de las mismas haciéndolas correr hacia el electrodo con la carga opuesta. En el transcurso, las bandas se separan porque las moléculas más pesadas migran más lentamente en el gel, y las moléculas menos pesadas lo hacen más rápido. Posteriormente el gel se tiñó con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. En el transiluminador de UV, se pueden ver las bandas de DNA. Hay un estándar de pesos moleculares que corren a la par que las muestras. Así, se puede comparar el peso de las bandas observadas en el carril de la muestra, con el estándar y saber si se trata del gen esperado.

Una vez que verificamos que los genes de interés se habían extraído de las células transformadas, se cortaron con EcoRI de GIBCO y purificamos las bandas correspondientes a los genes deseados del gel de agarosa con bromuro de etidio. Esto se hizo siguiendo el protocolo anexo al kit de purificación GeneClean de BIO 101, Inc.

Purificación de la banda de DNA en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Una vez identificada la banda que correspondía a nuestros genes, se procedió a la purificación de las mismas. El protocolo de la purificación es un procedimiento estándar y el kit de extracción fue el GeneClean de BIO 101, Inc. El primer paso consistió en escindir la banda de interés del gel, ésta se cortó del gel con una navaja. Se pesó dicho fragmento y se colocó en un tubo eppendorf. A éste se le agregó 1/3 de volumen de yoduro de Sodio y 1/2 volumen de TBE Modificador, para eliminar el bromuro de etidio del gel. Se incubó en un baño a 45-55 °C hasta que la agarosa se disolvió. Una vez disuelta, se le agregaron 5 µL de perlas de sílica Glassmilk. Se incubaron en hielo por 15 min. Después se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se lavó tres veces con el amortiguador New Wash que consta de 0.2 M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5; 1mM EDTA. Se eluyó el DNA resuspendido en 0.10mL Tris-HCl pH 8 e incubó un minuto a 45-55 °C. Se centrifugó por sesenta segundos a 14000rpm. Se retuvo el sobrenadante. Se hizo otro gel de agarosa y se corrió una alícuota para verificar si se tenía la banda pura de DNA.

El DNA se cortó con Eco RI para obtener a los genes silvestres de TPI mediante una incubación del DNA extracromosómico con 0.5 µg de la enzima de restricción y 1µL del amortiguador de EcoRI GIBCO a 37°C por tres horas.

Utilización de la técnica de PCR para generar las quimeras.

Para generar las quimeras fue necesario amplificar los fragmentos correspondientes de los genes de TPI silvestre de *T brucei* y de *S cerevisiae*, para ello se empleó la técnica de PCR. Esta técnica se define como la amplificación, mediada por un cebador, de secuencias de DNA, específicamente clonadas o genómicas (Innis, M A et al, 1990). El molde o templado de DNA contiene la secuencia a amplificar que puede consistir en decenas o decenas de miles de nucleótidos. Una enzima de DNA polimerasa termoestable, en nuestro caso Vent polimerasa, realiza la reacción en la que un exceso de cebador y cuatro deoxiionucleotidos (dNTPs) se utilizan para hacer millones de copias de la secuencia deseada.

El proceso de PCR consta de la serie repetitiva de tres pasos fundamentales: la desnaturalización de la doble hélice del DNA del templado; el alineamiento de los oligonucleótidos que actúan como cebadores al acoplarse con la hebra sencilla del templado y la extensión enzimática de los cebadores alineados para producir las copias que sirven de templado en los ciclos subsecuentes (Ausubel, F et al, 1997) Figura 2.1.

Conforme procede la reacción tanto el molde original, como las secuencias amplificadas, sirven de sustrato para la desnaturalización, alineamiento de cebadores y la extensión enzimática de los mismos. Como teóricamente, en cada ciclo se duplica la cantidad de secuencias

amplificadas, lo que ocurre es un crecimiento geométrico de las mismas; sin embargo, el proceso llega a un límite y los factores de amplificación son de alrededor de 10^5 y 10^9 veces.

Para que la reacción procediera correctamente se proporcionó una cantidad en exceso de cebador y dNTPs. El amortiguador es generalmente 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 a temperatura ambiente. Además, se agregan 50 mM KCl para proporcionar la fuerza iónica adecuada. El ion Mg^{++} es indispensable como cofactor de la DNA polimerasa (Ausubel et al, 1997).

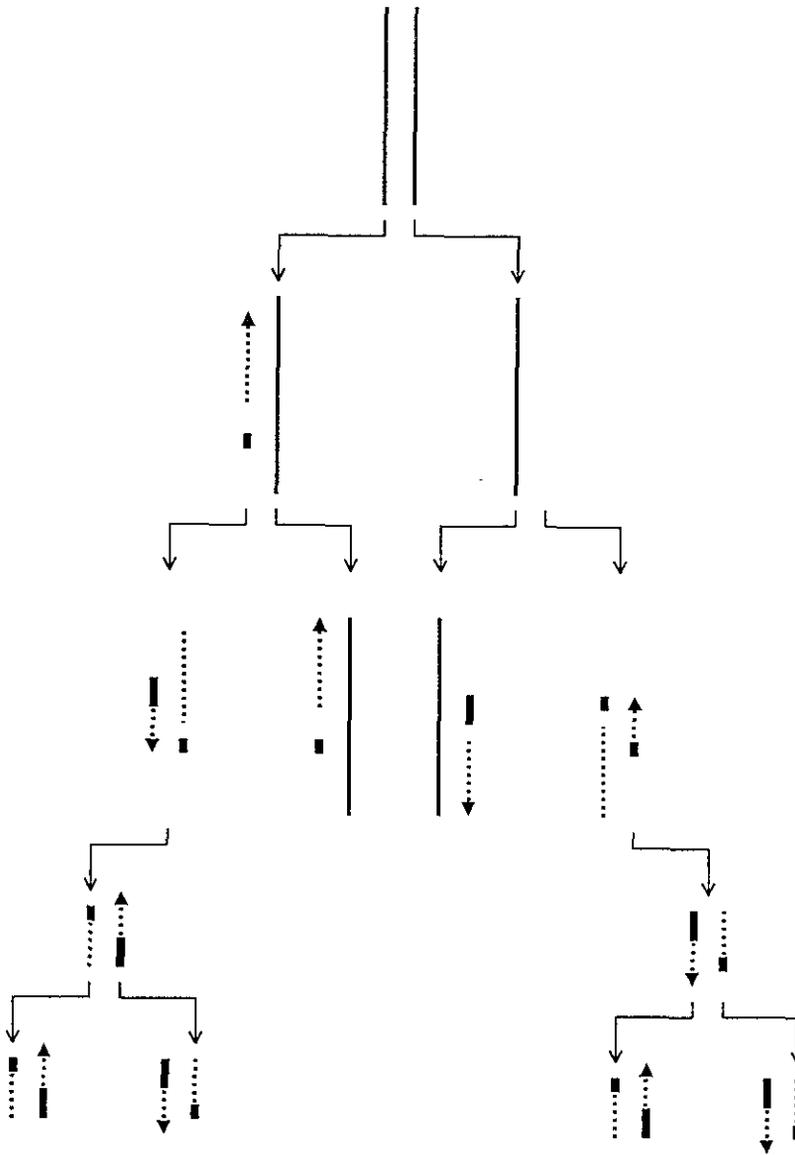


Figura 2 1 Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Las líneas continuas gruesas representan el DNA que sirve como molde, las líneas discontinuas representan al DNA sintetizado durante la reacción de PCR a partir del molde y los rectángulos negros son los oligos a partir de los cuales comienza a polimerizar la DNA polimerasa. En el esquema se ve cómo se suceden los pasos de desnaturación y síntesis del DNA. (Ausubel, F et al, 1997)

Durante la reacción se suceden varios ciclos a distintas temperaturas. La desnaturalización ocurre rápidamente entre los 94°C y los 96°C. El alineamiento depende de la T_m o temperatura de fusión del DNA (melting temperature) que es la temperatura a la que la mitad de las moléculas se han desnaturalizado. Esta temperatura varía de secuencia a secuencia y está relacionada con el contenido de los enlaces entre las bases del DNA, especialmente entre G+C.

Para alcanzar los resultados deseados, la T_m debe optimizarse experimentalmente, en nuestro caso la T_m de los oligonucleótidos utilizados fue en promedio de 30°C.

El programa de PCR utilizado para generar las quimeras fue.

1 vez	94°C durante 5 minutos
25 veces los tres pasos:	94°C durante 30 segundos
	55°C durante 30 segundos
	72°C durante 30 segundos
1 vez	72°C durante 7 minutos
4°C	tiempo indefinido

En nuestro caso, realizamos PCRs para poder llevar a cabo las mutaciones que generaron las quimeras. Para ello, la Dra. Emma Saavedra Lira diseñó ocho cebadores que se emplearon en dos fases de PCR. Estos cebadores u oligos fueron.

A partir del gen de TPI de *T.brucei* :

T7 terminator: para amplificar la cadena de DNA en el sentido 3' - 5'
T7 promoter : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 5' - 3'
LT forward : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 5' - 3'
TL rewind : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 3' - 5'

A partir del gen de TPI de *S.cerevisiae* :

YTIM rewind : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 3' - 5'
TL forward : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 5' - 3'
LT rewind : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 3' - 5'
YTIM forward : para amplificar la cadena de DNA en el sentido 5' - 3'

El hecho de que la cadena de DNA esté compuesta por una doble hebra, y que estas hebras corran de manera antiparalela la una a la otra, hace necesario que se diseñen cebadores en los dos sentidos. Para hacer las quimeras requerimos de dos cebadores por fragmento amplificado o cuatro por gen recombinante.

Primera fase de PCR.

En esta fase se amplificaron los fragmentos correspondientes de los genes silvestres de TPI de *T.brucei* y de *S.cerevisiae*, es decir

- a) un fragmento de los 53 aminoácidos del extremo amino terminal de la TPI de tripanosoma
- b) un fragmento de los 194 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la TPI de levadura
- c) un fragmento de los 53 aminoácidos del extremo amino terminal de la TPI de levadura.
- d) un fragmento de los 197 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la TPI de tripanosoma

Quimera TL:

- a) Para generar el fragmento de los 53 aminoácidos del extremo amino terminal de la TPI de tripanosoma se realizó el PCR con las siguientes condiciones: 10µL amortiguador para la Vent Pol; 2µL dNTPs, 2µL MgSO₄ ; 200 ng del oligo TL rewind; 200ng del oligo T7 promoter; 0.5µL del DNA del tripanosoma, 0.5 µL de Vent Polimerasa y agua hasta tener 100µL totales.
- b) Para generar el fragmento de los 194 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la TPI de levadura se realizó el PCR con las siguientes condiciones: 10 µL del amortiguador de Vent Pol; 2µL de dNTPs; 2µL de MgSO₄, 200ng del oligo TL forward; 200 ng del oligo YTIM rewind, 0.5µL de DNA de levadura; 0.5 µL de Vent Polimerasa y agua hasta tener 100 µL totales.

Quimera LT:

- c) Para generar el fragmento de los 53 aminoácidos del extremo amino terminal de la TPI de levadura se realizó el PCR con las siguientes condiciones: 10µL de amortiguador de Vent Pol; 2µL de dNTPs, 2 µL de MgSO₄, 200ng del oligo LT rewind, 200ng del oligo YTIM forward; 0.5 µL de DNA de levadura; 0.5 µL de Vent Polimerasa y agua hasta tener 100µL totales
- d) Para generar el fragmento de los 197 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la TPI de tripanosoma se realizó el PCR con las siguientes condiciones: 10µL de amortiguador de Vent Pol; 2µL de dNTPs, 2 µL de MgSO₄, 200ng del oligo T7 terminator; 200ng del oligo LT forward; 0.5 µL de DNA de tripanosoma; 0.5 µL de Vent Polimerasa y agua hasta tener 100µL totales.

STD A B C D

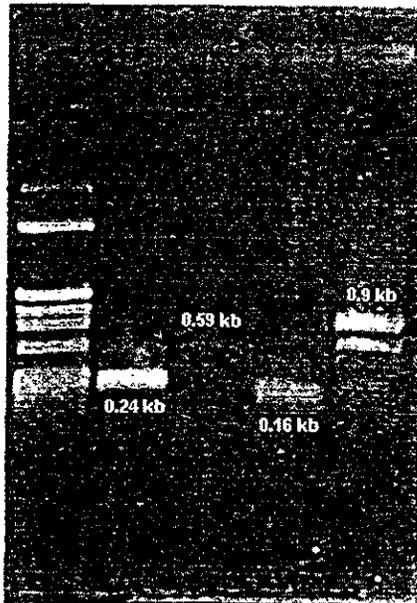


Figura 22 Fotografía del gel de agarosa en el que se observan los cuatro fragmentos creados a partir de los genes silvestres de TP1 de *T. brucei* y *S. cerevisiae*. A es el fragmento de 53 aminoácidos de tripanosoma; B es el fragmento de 194 aminoácidos de levadura; C es el fragmento de 53 aminoácidos de levadura y D es el fragmento de 197 aminoácidos de tripanosoma Std se refiere al estándar de peso molecular. Las marcas oscuras señalan el DNA del fragmento esperado. Los pesos moleculares están dados en kilobases

Segunda fase de PCR.

En la segunda fase de PCR se unieron los fragmentos que se generaron en la primera fase. Se construyeron así, cada uno de los genes híbridos

Quimera TL. Para construir a la quimera TL el PCR que se realizó fue:

10 μ L de amortiguador de Vent Pol, 2 μ L de dNTPs; 2 μ L de MgSO₄, 200ng del oligo T7 promoter; 200ng del oligo YT1M rewind; 8 μ L del producto del primer PCR de los fragmentos a y b; 0.5 μ L de vent polimerasa y agua hasta tener 100 μ L totales.

Quimera LT. Para construir la quimera LT el PCR que se realizó fue:

10 μ L de amortiguador de Vent Pol, 2 μ L de dNTPs; 2 μ L de MgSO₄; 200ng del oligo YT1M forward; 200ng del oligo T7 terminator; 8 μ L del producto del primer PCR de los fragmentos c y d, 0.5 μ L de vent polimerasa y agua hasta tener 100 μ L totales.

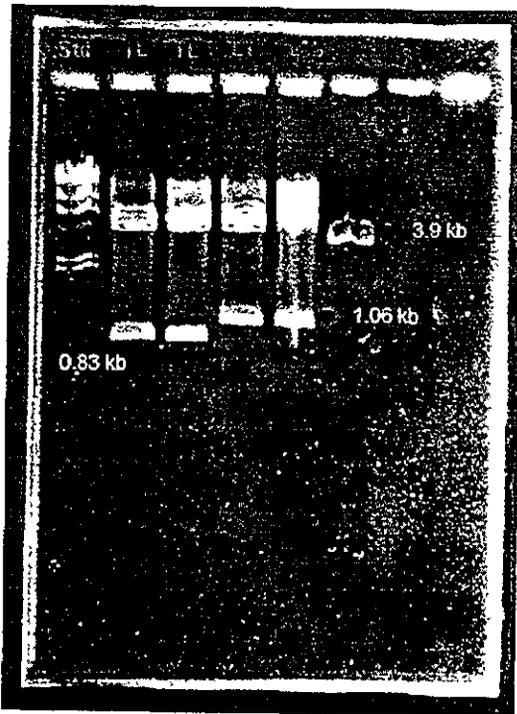


Figura 2.3. Fotografía del gel de agarosa en el que se aprecian los fragmentos correspondientes a las quimeras TL y LT, el peso corresponde a la banda de 26000 daltones. λ se refiere al marcador de DNA del fago lambda cortado con ECO RI. PET es la banda correspondiente al plásmido en el que se insertaron los fragmentos una vez secuenciados (pET 3 a) Los pesos moleculares están dados en kilobases.

Clonación de los genes quiméricos.

Ligación. Una vez contruidos los genes quiméricos, se insertaron en un vector de expresión mediante una técnica llamada ligación. Esta técnica consiste en la inserción de una secuencia dada en un plásmido que permita su manipulación

El producto de PCR tiene una cola de poly A en el extremo 3' y el vector, que es una molécula lineal, tiene una cola de polyT en el extremo 3', por ello es posible insertar el gen de interés en el plásmido ya que las dos colas son complementarias y se acoplan durante la reacción

Nosotros utilizamos el plásmido pCRII porque es un plásmido adecuado para la transcripción del producto de PCR. Cuenta con un sitio específico complementario con el T7 promoter, es resistente a la ampicilina, tiene un sitio para el promotor lac y un fragmento lac Z α , entre otras características.

Para la ligación se utilizó el kit TA Cloning System de Invitrogen. La reacción incluyó: 6 μ L del producto de la segunda fase de PCR, 1 μ L del amortiguador para ligasa 10X Ligation Buffer de Invitrogen que contiene 100mM Tris-HCl, pH 7.5; 20mM MgCl₂; 20mM DTT; 2 μ L del vector, en nuestro caso pCRII (50ng) y 1 μ L de ligasa T4 DNA de Invitrogen.

Esta mezcla se incubó a 12°C toda la noche.

Transformación La transformación es el proceso por medio del cual un plásmido con inserto puede ser introducido en una célula que es transitoriamente permeable al DNA exterior porque ha sido tratada con CaCl₂, lo que provoca que a altas temperaturas la célula acepte el DNA extracromosómico que contiene al gen de interés.

Para la transformación de nuestras células competentes utilizamos el kit TA Cloning de Invitrogen. Se siguió el protocolo ahí descrito.

A la mezcla de ligación se le agregaron los 200 μ L de células competentes TG-1. Se incubó una hora en hielo y después por un minuto en un baño a 42°C. Se sacó del baño caliente y se puso en hielo durante 10 minutos. Se agregaron 25 μ L de IPTG 0.1M y 50 μ L de x-gal (40mg/mL) y se plaquearon cajas de Petri con medio Luria Bertani y agar 2%, además de 100 μ g/mL de ampicilina.

Las cajas se dejaron a temperatura ambiente por diez minutos y finalmente se incubaron a 37°C toda la noche.

El IPTG es agregado para que induzca la síntesis de la proteína β -galactosidasa que está codificada por el gen Lac Z⁺. Este gen es un gen marcador con el que es posible distinguir a las células transformadas con nuestro plásmido y que por lo tanto contienen el gen que nos interesa

Cuando la ligación procede correctamente, se interrumpe en el plásmido el gen que codifica para la β -galactosidasa debido a la inserción del gen de interés, así que incluso en presencia del inductor de la síntesis de proteínas, la β -galactosidasa no se sintetiza. En cambio, si las células competentes no fueron transformadas, el gen marcador se expresa normalmente y reacciona en presencia del x-gal presentando un claro color azul. Así, es fácil distinguir en la caja de Petri a las colonias blancas de las azules.

Secuenciación del DNA quimérico.

Se extrajo DNA de las clonas que resultaron positivas y se secuenciaron para verificar la secuencia.

La técnica utilizada está basada en el protocolo descrito por Sanger (Sanger et al, 1997) modificado de tal modo que se pueden marcar radioactivamente los nucleótidos que se incorporan a la nueva cadena de DNA (Tabor & Richardson, 1989). Usamos un secuenciador de ciclos térmicos o termocycler que varía la temperatura de acuerdo al programa de elección. Para *secuenciar los genes quiméricos se corrieron reacciones en las que una DNA polimerasa sintetizó la cadena de DNA a partir del cebador proporcionado para cada reacción: T7 promoter para la quimera TL y YTIM forward para la quimera LT*. En la mezcla se encuentran los cuatro deoxinucleótidos que conforman al DNA y además se agregaron cuatro 2',3'-dideoxinucleótidos (ddATP; ddCTP; ddGTP; ddTTP) en una proporción 1:100 respecto de los deoxinucleótidos.

Conforme procede la reacción de extensión enzimática de la cadena de DNA es posible que se agreguen a la cadena polimerizada tanto deoxinucleótidos como dideoxinucleótidos, aunque estos últimos en menor proporción. La diferencia estriba en que cuando un deoxinucleótido se incorpora a la cadena siempre queda libre el extremo 3'-OH que permite que exista un enlace fosfodiéster y la cadena prosiga. En cambio, cuando un dideoxinucleótido se incorpora a la cadena de DNA, se detiene la síntesis porque no queda el extremo 3'-OH y por tanto no puede haber enlace fosfodiéster. De este modo se producen fragmentos de distintos tamaños

Los deoxinucleótidos están marcados radioactivamente por eso es posible rastrearlos en un gel de poliacrilamida después de una electroforesis

Se secuenciaron los genes de las dos quimeras y se verificó que la secuencia de nucleótidos fuera la esperada.

Amortiguadores para la secuenciación:

10X amortiguador de secuencia
Mezcla de término para secuencia (termination mix)
Mezcla de secuencia / pirofosfatasa
Dilución de secuencia
Mezclas de deoxinucleótidos marcados ³⁵S
Tinción de término (Stop loading mix)

El protocolo seguido fue el siguiente:

1.) Para cada templado de hebra sencilla de DNA se mezclaron: 2 μL de templado; 200ng de oligo; 1 μL de secuencia y agua hasta tener 10 μL totales

Se mezclaron cuidadosamente, pipeteando arriba y abajo. Se incubaron seis minutos a 65°C, luego a 37°C.

2.) Mientras el oligo se alineó al templado, se marcaron los tubos de la microcentrífuga con las letras de los cuatro deoxinucleótidos: A,C,G,T para cada reacción.

3.) Se agregaron 2.5 μL con cada mezcla de terminación en los tubos respectivos A,C,G,T.

4.) Inmediatamente antes de utilizarlos, se diluyó la mezcla de secuencia/pirofosfatasa en la dilución de secuencia hasta tener 1 a 2 U secuencia/mL y se mantuvo en hielo.

5.) Se agregó la siguiente mezcla al oligonucleótido y al templado:

2 μL de la mezcla marcada; 1.5 μL de ATP deoxi marcado; 2 μL de la mezcla de secuencia/pirofosfatasa. Para dar un volumen total de 15 a 16 μL. Se incubó la mezcla durante cinco minutos a 25°C.

6.) Se agregaron 3.5 μL de la reacción de la mezcla marcada al tubo que contenía la mezcla de término del paso 3. Se mezcló la solución cuidadosamente y se incubaron los tubos durante 10 minutos a 37°C.

7.) Se agregaron 4 μL de la tinción de término y se calentaron las muestras a 95°C en un baño de agua, después se pusieron en hielo. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida. Se corrieron en una cámara de electroforésis y se leyó la secuencia en el transiluminador de UV

Después de comprobar que la secuencia correcta, se clonaron los genes en el plásmido pET3a y se transformaron las células competentes BL21DE3. Tanto el plásmido como las células competentes son de Novagen (pET System Novagen, 1997). El plásmido pET3a es un vector adecuado para la traducción del producto de PCR porque tienen un sitio de unión al ribosoma que es altamente eficiente, obtenido a partir de una proteína de la cápside del fago T7. Este tipo de

plásmidos se usan frecuentemente para el manejo de genes de origen eucarionte, como en nuestro caso. Por su parte, las células competentes BL21DE3 se utilizan en conjunción con los plásmidos pET porque éstas tienen un gene para la RNA polimerasa de T7. Por ello estas células se llaman genéricamente hospedero de expresión.

Sobreexpresión e inducción.

Para obtener las proteínas codificadas por los genes quiméricos, lo primero consistió en crecer células en una cierta cantidad de medio líquido LB en condiciones de esterilidad, aproximadamente 1 litro de cultivo por clona. Para ello se inoculó un precultivo de medio LB estéril, aproximadamente 100 mL, a partir de una alícuota de las células en glicerol que se encontraban a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se le agregó ampicilina (0.10 mg/mL). Este precultivo sirvió para inocular un litro de medio de cultivo estéril LB que se incubó durante toda una noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación hasta que se realizó la inducción.

Para la inducción se esperó hasta tener una densidad óptica de entre 0.6 y 0.9 unidades de absorbencia a 600 nm. En ese momento, fue necesario agregar el inductor, en este caso el IPTG hasta una concentración 0.4 mM. El IPTG induce la síntesis de proteínas. Todo esto en esterilidad. Una vez agregado el inductor se volvió a dejar en la incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación toda la noche.

Método para la purificación de las quimeras.

Objetivos particulares:

- Romper las células transformadas de *E. coli* mediante tres ciclos en la Prensa de French
- Realizar la precipitación por sulfato de amonio
- Correr las columnas de exclusión molecular e intercambio iónico.
- Elaborar geles de acrilamida para verificar la pureza de las muestras

Lista de reactivos utilizados

Amortiguadores:

Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 con PMSF 40 mM disuelto en DMSO

TED 100/10/1, pH 7.4

TED 10/1/1, pH variable

TED 10/1/1, con NaCl 200mM

TE 100/10, pH 7.4

Amortiguador A (MES-NaOH 25mM; 1mMDTT, 1mM EDTA, 0.2mM PMSF, pH6.5)

Amortiguador A con NaCl 1M =Amortiguador B

Amortiguador de lisis (25mM Tris-HCl, 10mM EDTA; 0.2M NaOH; 1% SDS, pH 6.5)

Reactivos para medir actividad enzimática:

TPI quimérica purificada

Sustrato (G3P 2X) 1mM

alfa GPDH 10 µg

NADH 0.2mM

MMTS 5mM

Reactivos para gel de acrilamida:

Amortiguador para el gel separador

Amortiguador para el gel concentrador

Acrilamida al 12%

Persulfato de Amonio 10%

TEMED

Gel para corrida 5X (Tris 7.5g ; Gly 36g ; SDS 2.5g)

Reactivos para corrida:

Estándar de alto peso molecular

Mezcla de digestión

β-mercaptoetanol

Mezcla mágica (0.5 M Tris-HCl, pH6.8; SDS10%, glicerol 1% azul de bromofenol al 0.1%)

Reactivos para teñir geles de acrilamida con plata.

Metanol al 40% y Formaldehído al 5% (fijador)

Agua destilada

Amortiguador de Pretratamiento (0.02% Na₂ S₂ O₃ * 5 H₂O)

Nitrato de plata (0.1 AgNO₃)

Revelador (3% Na₂CO₃ + 0.05% formaldehído + 0.0004%Na₂ S₂ O₃ * 5 H₂O

Formaldehído

Acido Cítrico 2.3M

Se cosecharon las células transformadas, mediante una centrifugación a 5000rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 80 mL de amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 8, 0.2mM PMSF/DMSO

Protocolo de purificación de la quimera TL.

Primer Lote.

Para la purificación de la quimera TL fueron necesarios dos lotes de la misma ya que del primero no se obtuvo proteína pura. La purificación del primer lote no se detalla en la parte de resultados, sin embargo se menciona en este capítulo ya que a partir de la misma se hicieron algunos cambios pertinentes que dieron como resultado la obtención de proteína parcialmente pura en el segundo lote

El protocolo seguido para esta purificación se basó en el utilizado para purificar TPI de *S.cerevisiae* (Vázquez y col, 1998 no publicado), debido a las semejanzas existentes entre ambas proteínas.

Las células transformadas se cosecharon 10 minutos a 5000 rpm. El precipitado obtenido de dicha centrifugación se guardó a -70°C durante 96 horas; posteriormente fue resuspendido en 80 mL del amortiguador Tris-HCl 20mM, PMSF 0.2 mM, pH 8.0. esta suspensión pasó por tres ciclos en la Prensa de French. Se centrifugó el resto de la suspensión (88mL aproximadamente) durante una hora a 45000 rpm. El precipitado se resuspendió en 4mL del amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6

Los 86mL del sobrenadante de 45000 rpm se llevaron a 45% de sulfato de amonio a 4°C en agitación. Se agitó durante una hora y se dejó en reposo toda la noche.

La muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en 2mL de amortiguador TED 10/1/1 pH 7.6

El sobrenadante de 45% de sulfato de amonio se llevó a 65% de sulfato de amonio, se agitó una hora y se dejó en reposo toda la noche. La muestra se centrifugó a 12000rpm durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en 2 mL del amortiguador TED 10/1/1, pH7.6

El sobrenadante de 65% de sulfato de amonio se llevó a 90% de sulfato de amonio. Se agitó una hora y se dejó en reposo toda la noche. La muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en 2mL del amortiguador TED 10/1/1, pH 7.6

Para escoger la fracción que pasaría por las columnas de purificación por cromatografía, se determinó la concentración de proteína y actividad enzimática de todos los pasos de la purificación.

Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína se determina espectrofotométricamente a 280nm utilizando un índice de absorbencia $A_{280}^{1\%} = 1$ (Nickbarg & Knowles, 1988) y como blanco el amortiguador en el que estaba suspendida la enzima.

Determinación de los puntos isoelectrónicos.

Los valores de puntos isoelectrónicos se calcularon sumando los valores individuales de pK de cada aminoácido.

Medición de la actividad catalítica.

La actividad de todas las muestras se determinó siguiendo el decremento en la absorbencia del NADH a 340 nm a 25°C. La mezcla de reacción contenía TED 100/10/1 pH 7.4; 1mM G3P; 20 µg/mL de α-GDH, y 0.2mM NADH en un volumen final de 1mL.

En el caso de la determinación de los parámetros cinéticos se varió la concentración de G3P en intervalos distintos para cada enzima explícitos en los protocolos respectivos.

El cálculo de actividad catalítica es $\Delta OD_{340} \text{ u.a.} / (6.22 E_{280} M^{-1} cm^{-1}) \text{ (mg/mL TPI)}$

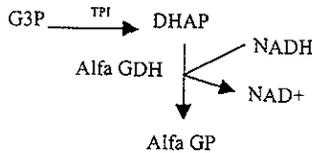


Figura 2.5 Esquema del ensayo acoplado para medir actividad catalítica de TPI

Después de las mediciones de actividad catalítica y determinación de la concentración de proteína, se eligió la fracción que correspondía al precipitado de 65% de sulfato de amonio ya que tenía la mayor actividad específica ($20.91 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) y la mayor concentración de proteína (234.32mg/mL)

Columna de exclusión molecular.

La fracción escogida fue la correspondiente al precipitado de 65% de sulfato de amonio ésta se pasó por la columna de exclusión molecular Sephacryl S-300. La muestra se inyectó con el amortiguador TED 10/1/1, pH 7.6 El eluyente fue el mismo amortiguador de la corrida.

De la columna de exclusión molecular se tomaron las fracciones correspondientes al pico máximo de actividad específica y proteína y con ellas se hizo una mezcla que se pasó por la siguiente columna de la purificación.

Columna de intercambio aniónico Monoq a pH 7.6

La columna Monoq 10/10 está conectada al sistema FPLC (Fast Pressure Liquid Chromatography) que consiste básicamente en una bomba de alta presión que inyecta las muestras a las columnas de cromatografía líquida. Este sistema tiene la ventaja de lograr que las columnas eluyan en tiempos cortos (una a dos horas). En todas las columnas de tipo Monoq se utilizó el sistema FPLC.

En esta primera columna Monoq, se cargó el total de la mezcla de las fracciones de la columna de exclusión molecular, es decir 16 mL. El amortiguador de corrida fue TED 10/1/1 a pH

7.6, el eluyente fue TED 10/1/1, pH 7.6 con un gradiente salino de NaCl de 0-100mM

La columna se saturó y se recuperó la proteína en una mezcla de fracciones a la que denominamos NP1 de 12 mL en total. Esta mezcla se dividió en dos partes, una de 5 mL y otra de 7 mL. La fracción de 5mL se pasó por otra Monoq que se corrió exactamente en las mismas condiciones que la primera. No hubo resultados positivos por lo que decidimos utilizar los 7mL restantes para pasarlos por otra columna.

Columna de intercambio aniónico Monoq a pH 8.0

Los 7 mL sobrantes de la primera columna de intercambio aniónico Monoq a pH 7.6 se pasaron por otra columna Monoq pero esta vez se cambió el pH a 8.0 El amortiguador de corrida fue TED 10/1/1 a pH 8.0, el eluyente fue TED10/1/1, pH 8 0 y se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100m M.

Tampoco esta vez se obtuvieron resultados positivos porque se perdió mucha proteína y la que quedaba tenía muy poca actividad específica. Por ello se decidió empezar la purificación otra vez con un segundo lote de TPI quimérica TL.

Segundo lote de la purificación de la quimera TL.

Se sobreexpresó e indujo la cepa TL5 de células transformadas de *E. Coli* BL21DE3. Las células se cosecharon después de la incubación nocturna mediante una centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 80 mL del Amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 8, al cual se le agregó un inhibidor de proteasa: 0.2mM de PMSF.

La suspensión se pasó por tres ciclos de la Prensa de French. Se colectó una alícuota de 500 μ L y el resto de la muestra se centrifugó a 45000 rpm durante una hora. El precipitado se resuspendió en 3 mL de Amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6 y del sobrenadante se tomó una muestra de 500 μ L para posteriores mediciones. El resto del sobrenadante (82 mL) se llevó a 50% de sulfato de amonio.

Se agitó durante una hora en hielo y se dejó reposando toda la noche. Se centrifugó el sobrenadante de 50% de sulfato de amonio a 12000 rpm durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 2 mL de amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6 Se tomó una alícuota del sobrenadante y los 86 mL restantes se llevaron a 70% sulfato de amonio. Se agitó durante una hora y se dejó reposando toda la noche.

Se centrifugó el sobrenadante 70% de sulfato de amonio a 12000 rpm durante 15 min. El precipitado de esta centrifugación se resuspendió en un mL de amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6 Se tomó una alícuota y el resto se pasó por la columna de exclusión molecular (Sephacryl S-300).

Se determinó la concentración de proteína y se midió la actividad específica de cada fracción. Se escogió la muestra correspondiente al precipitado de 70% de sulfato de amonio porque era la muestra que tenía la mayor actividad específica y la mayor cantidad de proteína.

Columna de exclusión molecular.

Un mL de la fracción del precipitado de 70% de sulfato de amonio se pasó por una columna de exclusión molecular Sephacryl S-300. El amortiguador de corrida fue TED 10/1/1 a pH 7.6. El amortiguador eluyente fue el mismo de la corrida.

De esta columna se hizo una mezcla de las fracciones con mayor actividad específica y mayor concentración de proteína. Los 15 mL totales se dividieron en dos fracciones de 7.5 mL cada una.

Columna de intercambio aniónico Monoq a pH 7.6

Se corrió una sola columna Monoq dos veces. Primero pasaron 7.5 mL de la mezcla de fracciones de la columna de exclusión molecular y después los otros 7.5 mL restantes.

Las muestras se inyectaron en amortiguador TED 10/1/1 pH 7.6. El eluyente fue TED 10/1/1, pH 7.6 con un gradiente salino de NaCl de 0-100 mM.

Se hizo una mezcla a partir de las fracciones de ambas partes de la Monoq con mayor actividad específica y concentración de proteína de 12 mL totales que se dializaron contra un litro de amortiguador TED 10/1/1, pH 7.6.

Columna de intercambio aniónico Monoq a pH 7.6

Los 12 mL de la mezcla dializada de la columna anterior se pasaron por otra columna de intercambio aniónico Monoq. La muestra se inyectó en amortiguador TED 10/1/1, pH 7.6. El eluyente fue TED 10/1/1, pH 7.6 con un gradiente salino de NaCl de 0-100 mM-1M.

Se seleccionaron las dos mejores muestras de las que se hizo una mezcla de 4 mL totales. Los 4 mL se dializaron contra un litro de amortiguador TED 10/1/1 a pH 7.6.

Columna de intercambio aniónico Monoq a pH 8.0

Los 4 mL dializados de la mezcla de fracciones de la columna anterior, se pasaron por una columna de intercambio aniónico Monoq a pH 8.0. El amortiguador de corrida fue TED 10/1/1 a pH 8.0. Se eluyó con TED 10/1/1, pH 8.0 y se hizo un gradiente de 0-100mM-1M con NaCl.

De esta columna obtuvimos las dos fracciones más puras. De ambas se hizo una mezcla cuya concentración fue de 423 $\mu\text{g/mL}$ y su actividad específica fue de 3.8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Purificación de la quimera LT.

El protocolo seguido para purificar a la quimera LT se basó en el de la purificación para TPI de *T. brucei*, (Borchert, T. et al, 1993) dadas las semejanzas existentes entre ambas enzimas.

El gen quimérico de la TPI LT se encontraba en las células transformadas BL21DE3, cepa LT 7. Se cosecharon dichas células mediante una centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 90 mL de amortiguador de lisis a pH 6.5. La suspensión se pasó por tres ciclos de la Prensa de French a 1500 psi. Se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se llevó a 45% de sulfato de amonio.

El precipitado de la centrifugación a 45000 rpm se resuspendió en 100 mL del buffer de lisis al que se agregó 200 mM NaCl. Se dejó agitando por 30 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Este sobrenadante se llevó, a su vez, a 45% de sulfato de amonio. De este paso en adelante sólo se trabajó con la muestra a la que se le habían agregado los 200mM de NaCl, ya que era la que presentaba mayor concentración de proteína y actividad específica.

La purificación por precipitación con sulfato de amonio se realizó para las muestras con sal y sin sal por separado. En general, se utilizó el siguiente protocolo:

Se agitó la muestra durante una hora y posteriormente se dejó reposando toda la noche. Se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se llevó a 60 % de sulfato de amonio. Se agitó por una hora y luego se dejó reposando toda la noche.

Se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se llevó a 90 % sulfato de amonio, se agitó por una hora y luego se dejó reposando toda la noche.

Después del reposo, la muestra se centrifugó 12000 rpm durante 15 min.

Para saber que fracciones se meterían a la columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, se midió la concentración de proteína en cada paso y su actividad catalítica.

Se escogió la muestra correspondiente a la fracción del precipitado de 45-60% de sulfato de amonio con 200mM de NaCl.

Columna de exclusión molecular.

3.6 mL de la fracción del precipitado de 45-60% de sulfato de amonio+200mM NaCl se inyectaron en la columna de exclusión molecular en amortiguador de lisis a pH 7.6

Se escogieron algunas fracciones, se hizo una mezcla con ellas y ésta se pasó por la siguiente columna.

Columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa 1 pH 7.6

La mezcla de fracciones de la columna de exclusión molecular se pasó por una columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa. La mezcla se corrió en amortiguador de lisis a pH 7.6 El eluyente utilizado fue MES 25 mM, pH 7.6. Se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100mM. De esta columna se escogieron las fracciones que correspondían al pico de máxima actividad específica y concentración de proteína.

Columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa 2 pH 7.6

La mezcla de las fracciones de la columna anterior se pasó por otra columna CM-Sepharosa. Se utilizó amortiguador A a pH 7.6 El eluyente fue el amortiguador B (amortiguador A + 200mM NaCl). Se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100mM-1M.

Se escogieron las fracciones las cuatro fracciones con mayor cantidad de proteína y con mayor actividad específica (6mL en total) y esta mezcla se dividió en dos partes. Una de ellas se pasó por dos columnas más, una CM-Sepharosa a pH 7.4 y una Monoq a pH 8. Toda la proteína se perdió en esas columnas

Columna de intercambio aniónico Monoq a pH 7.4

Tres mL de la mezcla de las fracciones de la columna anterior se pasaron por una columna de intercambio aniónico Monoq dos veces. Se utilizó el amortiguador A a pH 7.4 y como eluyente se usó el amortiguador B (amortiguador A+ 200mM NaCl), se hizo una mezcla cuya actividad específica fue de $59.96 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y la concentración de proteína era de 0.085 mg/mL .

Protocolo de geles de acrilamida al 12%

Para los geles de acrilamida se siguió el protocolo de Laemli (Laemli, 1970).

-Gel separador:

0.375 M Tris pH 8.0, 3.35 mL de agua desionizada, 25 μL de 1.5 M Tris HCl, pH 8.8; 100 μL de 10% SDS stock; 4.0 mL de acrilamida bis (30% stock); 50 μL de 10% de persulfato de amonio; 5 μL TEMED; todo en un volumen total de 10 mL.

-Gel concentrador :

6.1 mL de agua desionizada; 2.5 mL de 0.5M Tris-HCl, pH 6.8; 100 μL de 10% SDS; 1.33 mL acrilamida-bis (30% stock); 50 μL de 10% de persulfato de amonio; 10 μL TEMED, en un volumen total de 10 mL.

Ambas mezclas se vertieron en el dispositivo de electroforesis BIO-RAD de modo que los carriles de muestra quedaron en la parte del gel concentrador. Las muestras se prepararon antes de la corrida.

Cada muestra se preparó en un tubo que contenía 1 μL de mezcla mágica-proteína. (Los carriles aceptan un máximo de 20 μg de proteína o un máximo de 40 μL de solución y requieren de un mínimo de 15 μg de proteína por muestra). Los tubos hirvieron a 40°C durante 15 minutos. Las muestras se corrieron a 50 volts de poder constante por una hora, después se subió a 100 volts hasta que finalizó la corrida.

El amortiguador de corrida 5X constaba de: 9g de Tris-Base; 43.2g de glicina y 3g de SDS hasta 600 mL con agua desionizada. Se ajustó el pH a 8.3.

Los geles se tiñeron con la técnica por tinción de plata (Shin-isi-Aizawa, comunicación personal).

Experimentos de caracterización de las quimeras.

Parámetros cinéticos.

Para obtener la V_{max} y la K_m de una enzima se mide la actividad catalítica variando la concentración del sustrato.

-Parámetros cinéticos de TL

Se midió actividad en un ensayo que contenía 0.2 mM NADH, 20 $\mu\text{g/mL}$ α -GDH; 7.7×10^{-4} mg/mL de TPI; el G3P varió en un intervalo de 0.07-2.45 mM de G3P en el experimento y varió entre 0.07-2.76 mM de G3P en el duplicado.

El amortiguador fue TED 100/10/1 2X, pH 8 y se aforó con agua hasta un volumen total de un mL. Los datos se ajustaron a una curva Michaelis-Menten en el programa Grafit

-Parámetros cinéticos de LT

Se midió la actividad en un ensayo que contenía 0.2 mM NADH; 20 $\mu\text{g/mL}$ de α -GDH, 1.7×10^{-4} mg/mL de TPI LT; el G3P en un intervalo entre (0.07-2.19 mM G3P), amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4 y agua hasta tener un volumen total de un mL. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten en el programa Grafit.

Estabilidad a la dilución.

Para medir la estabilidad de la enzima a distintas concentraciones, se incubó a la proteína en varios tubos que difirieron únicamente en la concentración de la enzima y después se midió la actividad de cada muestra.

-Estabilidad a la dilución de la quimera TL

Se hicieron seis muestras con 1.5, 10, 50, 100, 423 $\mu\text{g/mL}$ de TPI de TL respectivamente (estas concentraciones se determinaron a partir de mediciones previas de la actividad específica de la quimera TL). Los ensayos contenían además: 1 mM G3P, 0.2 mM NADH, 20 $\mu\text{g/mL}$ de α -GDH, TED 100/10/1, pH 7.6 y agua en un volumen total de 1 mL

A estas muestras se les midió la actividad específica después de 24 horas de incubación.

-Estabilidad a la dilución de la quimera LT

Se hicieron seis muestras con 5, 10, 20, 40, 60 y 85 $\mu\text{g/mL}$ de TPI de LT respectivamente (estas concentraciones se determinaron a partir de mediciones previas de la actividad específica de la quimera LT). Los ensayos contenían además: 1mM G3P, 0.2 mM NADH, 20 $\mu\text{g/mL}$ de α -GDH, TED 100/10/1, pH 7.4 y agua en un volumen total de 1mL

A estas muestras se les midió la actividad específica después de 24 horas de incubación.

Determinación de la reactividad de la quimera TL con MMTS.

Se midió la actividad específica de la TPI de TL, de la TPI de *T.brucei* y de la TPI de *S.cerevisiae* después de haber sido incubadas en presencia de 5mM de MMTS por 15, 30, 60 y 90 minutos. Como control se incubó a las enzimas sin MMTS, durante el mismo tiempo que las muestras experimentales.

La actividad se midió a los 15, 30, 60 y 90 minutos. Las reacciones contenían 1mM G3P, 0.2 mM NADH, 20 $\mu\text{g/mL}$ de α -GDH, TED 100/10/1, pH 7.4 y agua en un volumen total de 1mL

Las concentraciones de TPI fueron: 1mg/mL de TL, 5ng/mL de *T.brucei* y 2ng/mL de *S.cerevisiae*

Capítulo 3: Resultados.

Diagrama de flujo de la construcción de las quimeras.

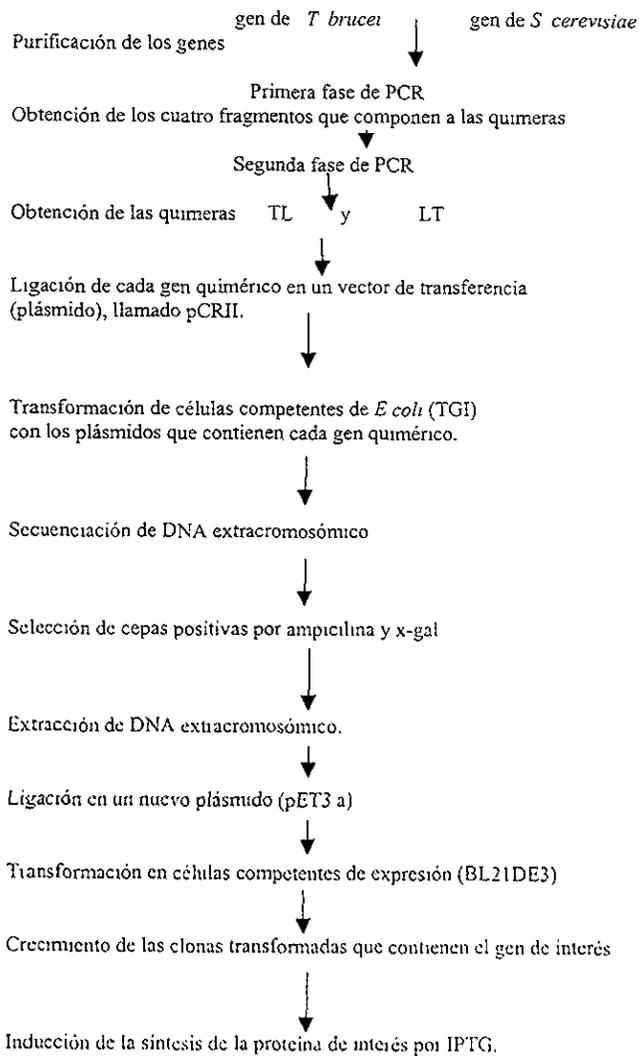


Tabla 3.1 Comparación de las cuatro TPIs

TPI	Tyr	Trp	Phe	Coef.Ext.Mol ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Peso Molecular (daltones)	Punto isoelectrico
<i>T. brucei</i>	5	5	8	1.3020	26834.80	9.8
<i>S. cerevisiae</i>	6	3	11	0.9500	26795.40	5.74
TL	4	4	10	1.0430	26795.30	5.99
LT	7	4	9	1.2100	26833.90	9.13

Con estos datos obtenidos exclusivamente a partir de la secuencia de aminoácidos de cada una de las construcciones, se hicieron los cálculos del coeficiente de extinción molecular de cada quimera (Pace, N. et al, 1995).

Coeficiente de extinción molar=(número de Triptofanos) (5500) + (número de Tirosinas) (1490)

Como se ve en la tabla 3.1, de los puntos isoelectricos, el correspondiente a la quimera TL es muy parecido al de la TPI silvestre de *S. cerevisiae*, lo que es de esperarse dado que el mayor componente de dicha quimera proviene de la TPI de levadura. De la misma forma, el punto isoelectrico de la quimera LT es muy cercano al de la TPI silvestre de *T. brucei* lo que suponemos, se debe a que seis de las ocho unidades alfa-beta que componen a la quimera, provienen de la TPI del tripanosoma. Esto es muy importante ya que los protocolos que se siguieron para la purificación de cada quimera se determinaron según el punto isoelectrico y por lo tanto según su afinidad a las columnas de intercambio iónico. La quimera TL se purificó con un protocolo basado en aquél con el que se purifica la TPI silvestre de *S. cerevisiae* y la quimera LT se purificó según el protocolo de la TPI de *T. brucei* al que se le hicieron algunas modificaciones.

Purificación de la quimera TL.

Diagrama de flujo de la purificación de la quimera TL Segundo Lote.

Amortiguador con células transformadas e inducidas por IPTG.

Se pasó por la Prensa de French a 1500 psi 3 veces

Se centrifugó a 45000rpm

sobrenadante

Se llevó a 50% de sulfato de amonio

Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos

sobrenadante

Se llevó a 70% de sulfato de amonio

Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos

Precipitado

Se resuspendió en 2mL de amortiguador TED 100/10/1, pH 7.6

Columna de exclusión molecular pH 7.6

Mezcla de las fracciones 40-55 (Total 15 mL) $169.23 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m g}^{-1}$ de actividad específica. Se dividió en dos fracciones de 7.5mL cada una.

7.5 mL

Primera parte de la columna
Monoq, pH 7.6
Gradiente salino 0-100mM
TED 10/1/1

7.5mL

Segunda parte de la columna
Monoq, pH 7.6
Gradiente salino 0-100mM
TED 10/1/1

Se hizo una mezcla de las fracciones: Monoq (primera parte) 88-93, Monoq (segunda parte) 93-98; Total 12mL $67.55 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m g}^{-1}$ de actividad específica.

Diálisis (mezcla) $317.31 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m g}^{-1}$ actividad específica

El dializado se pasó por una Monoq pH 7.6 gradiente NaCl 0-100mM-1M.

mezcla de las fracciones, 20 y 21

Diálisis 4mL



Monoq pH 8 (gradiente 0-100mM-1M de NaCl) TPI pura en las fracciones 27 y 28 La mezcla final tiene 423 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y $3.8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m g}^{-1}$ de actividad específica

Purificación de la quimera TL.

Determinación de la concentración de proteína, actividad catalítica y rendimiento de las muestras colectadas después de tres ciclos de Prensa de French; del sobrenadante de 45000 rpm y del precipitado de 50-70% de sulfato de amonio.

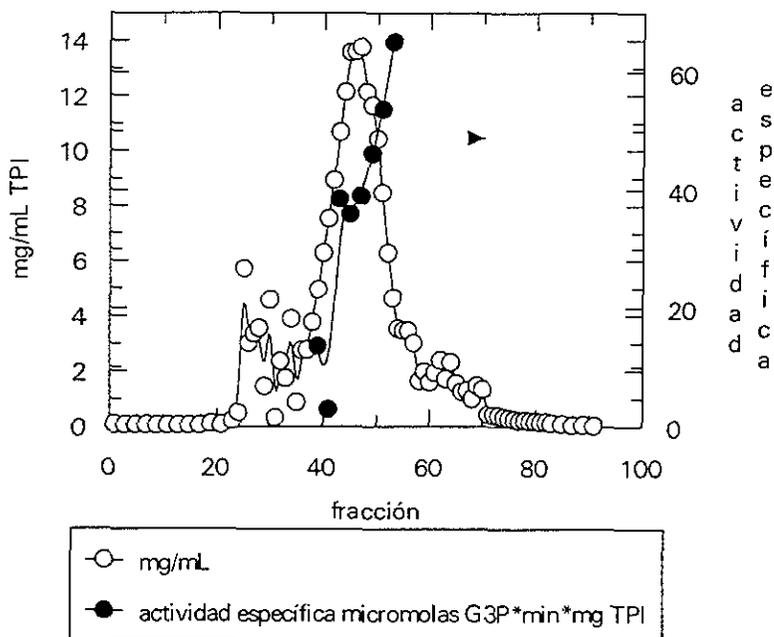
Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg	Rendimiento (%)
extracto de la Prensa de French	12.21	71184	5830	100
sobrenadante de 45000 rpm	0.38	703	1840	0.99
precipitado de 50-70% de sulfato de amonio	5.23	22018	4210	30.93

Tabla 3.5: medición de la concentración de proteína y de la actividad catalítica de la TL después de los tres ciclos de la Prensa de French; la centrifugación y la precipitación por sulfato de amonio.

Esta tabla muestra las medidas de actividad, concentración de proteína y rendimiento de la purificación de las muestras: extracto de la Prensa de French, sobrenadante de 45000 rpm y precipitado de 50-70% de sulfato de amonio. A partir de estos datos, se eligió la muestra del precipitado de 50-70% de sulfato de amonio porque tenía la mayor actividad específica y cantidad de proteína, así como el mejor rendimiento de purificación después de los ciclos de la Prensa de French. La fracción elegida se pasó por una columna de exclusión molecular Sephacryl S-300.

Columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, pH 7.6

Un mL de la fracción del precipitado de 50-70% de sulfato de amonio se pasó por la columna Sephacryl S-300 de exclusión molecular. El amortiguador utilizado fue TED 10/1/1, pH 7.6. El eluyente fue el mismo amortiguador de la corrida. Se obtuvieron 95 muestras de las cuales se determinó la concentración de proteína y la actividad específica de las muestras con mayor cantidad de proteína.



Gráfica 3.1 Perfil cromatográfico de las muestras obtenidas de la columna de exclusión molecular del Lote 2 para la purificación de la quimera TL. Se presenta la concentración de proteína (círculos blancos) y la actividad específica (círculos negros).

En la gráfica 3.1 se observa que hay un pico de máxima concentración de proteína (en círculos blancos), alrededor de las fracciones 40-55. Este pico no coincide con los valores más altos de actividad específica, lo que indica que las fracciones que contienen a la proteína de interés contienen además otras proteínas contaminantes.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
39	13.6	96.7	7.11
41	2.89	31.21	10.8
43	38.5	592.9	15.4
45	35.9	700.05	19.5
47	39.0	772.2	19.8
49	46.1	769.9	16.7
51	53.6	653.92	12.2
53	65.0	434.2	6.68

Tabla 3.3. Lote 2 de la purificación de la quimera TL. Columna de exclusión molecular, Sephacryl S-300.

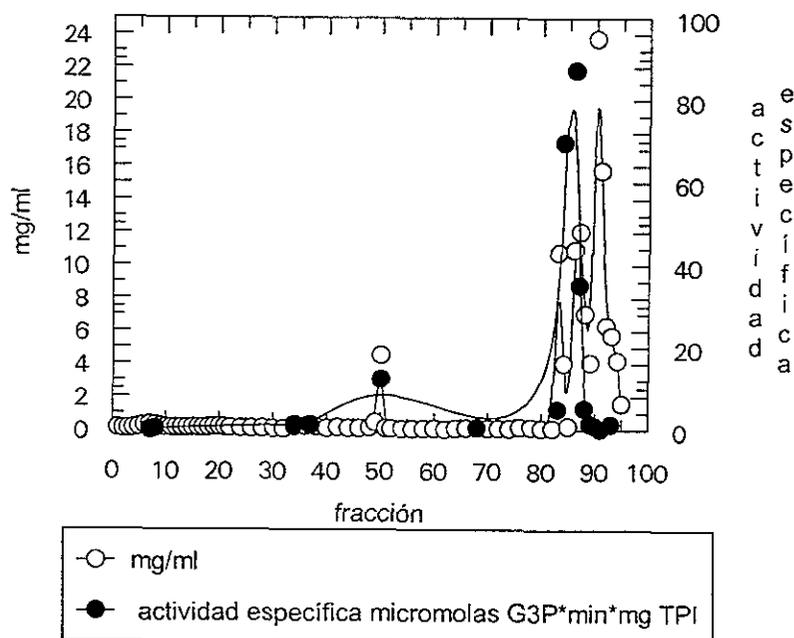
La tabla 3.3 muestra los valores de las mediciones de actividad catalítica y concentración de proteína de cada muestra. Queda claro que los valores de actividad más altos estaban ubicados entre las muestras 40-55, a partir de dichas muestras se hizo una mezcla de 15mL totales

Columna de intercambio aniónico Monoq. pH 7.6 (primera parte)

La mezcla de fracciones 40-55 (15mL totales) de la columna de exclusión molecular se inyectó en una sola columna de intercambio aniónico MonoQ 10/10 dividida en dos partes. Se utilizó buffer TED 10/1/1 a pH 7.6. El eluyente fue TED 10/1/1, pH 7.6. Se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100mM

Los 15 mL se dividieron en dos muestras de 7.5 mL cada una para evitar saturar la columna como había ocurrido en el primer lote. Primero se puso una columna de intercambio aniónico con 7.5 mL y después otra para el resto de la muestra. Ambas columnas se corrieron en idénticas condiciones.

De las muestras que se obtuvieron se hicieron mediciones de concentración de proteína y actividad catalítica.



Gráfica 3.2. Cromatograma de las muestras obtenidas de la primera parte de la columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.6 para el Lote 2 de la quimera TL. En círculos blancos está la concentración de proteína y en círculos negros está la actividad específica.

En la gráfica 3 2 queda claro que la proteína se distribuyó irregularmente en tres distintos máximos locales. La mayor actividad específica, sin embargo, ocurre en las fracciones correspondientes al segundo pico (fracciones 85-90 aproximadamente). Probablemente la proteína que está fuera de ese rango sea contaminación.

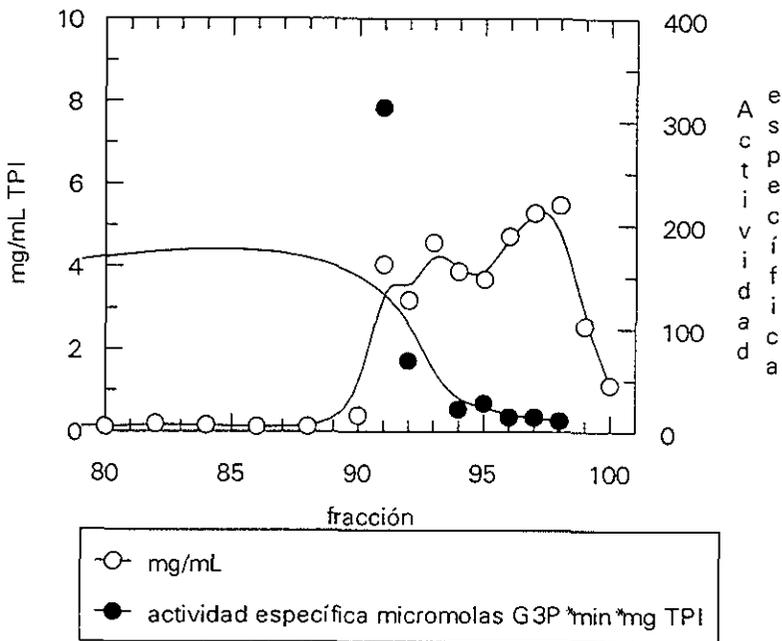
Fracción	actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
7	0.00	0.00	0.420
8	0.305	0.131	0.429
34	1.3	0.362	0.278
37	1.05	0.483	0.461
50	12.2	132	10.9
68	5.07	0.85	0.167
84	9.15	55.5	6.06
90	1.4	12.0	8.61

Tabla 3.4 Lote 2 de la purificación de la quimera TL. Primera parte de la columna de intercambio aniónico, Monoq 10/10 Amortiguador TED 10/1/1 pH 7.6

La tabla 3.4 muestra las medidas de actividad catalítica y concentración de proteína de las muestras obtenidas a partir de la primera parte de la columna de intercambio iónico Monoq, pH 7.6. La actividad específica bajó bastante, incluso, la fracción 7 no presentó actividad. Los valores más altos de actividad se encontraron entre las muestras 50-90, pero es un intervalo muy grande, lo que quiere decir que este paso de purificación no fue muy bueno porque no concentró la proteína de interés en unas pocas fracciones.

Columna de intercambio aniónico Monoq pH 7.6 (segunda parte)

Los 7.5 mL restantes de la mezcla de ambas partes de la Monoq anterior se inyectaron en la misma columna Monoq, pH 7.6 que se corrió en la primera parte. Se utilizó buffer TED 10/1/1 a pH 7.6. El eluyente fue TED 10/1/1, pH 7.6 con un gradiente de NaCl de 0-100mM.



Gráfica 3.3 Cromatograma de las muestras obtenidas de la segunda parte de la columna de intercambio aniónico Lote 2 de la purificación de la quimera T1. En círculos blancos está la concentración de proteína y en círculos negros está la actividad específica

En la gráfica 3.3 se ve que la mayor parte de la proteína se ubicaba en las últimas fracciones (88-100) La máxima actividad se ubicó alrededor de la fracción 90. Esto coincide con los resultados de la primera parte de la columna, lo que era de esperarse ya que ambas partes se corrieron en las mismas condiciones.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
10	1.23	0.84	0.686
12	119.51	40.5	0.339
52	5.91	60.3	10.2
53	0.920	12.1	13.1
91	313	1818.5	5.81
92	68.5	313	4.57
94	21.6	121	5.58
95	27.3	145	5.31
96	14.2	96.5	6.8
97	14.3	108	7.6
98	10.7	84.5	7.88

Tabla 3.5. Lote 2 para la purificación de la quimera TL. Segunda parte de la columna Monoq, pH 7.6. Idénticas condiciones a la anterior.

La tabla 3.5 muestra las mediciones de actividad catalítica y proteína total de las fracciones obtenidas a partir de la segunda parte de la columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.6.

La actividad de la segunda parte de la columna Monoq, pH 7.6 fue mejor que la de la primera parte. Los valores más altos de actividad se encontraron en las fracciones 91 y 92, los cuales tienen valores altos de proteína total.

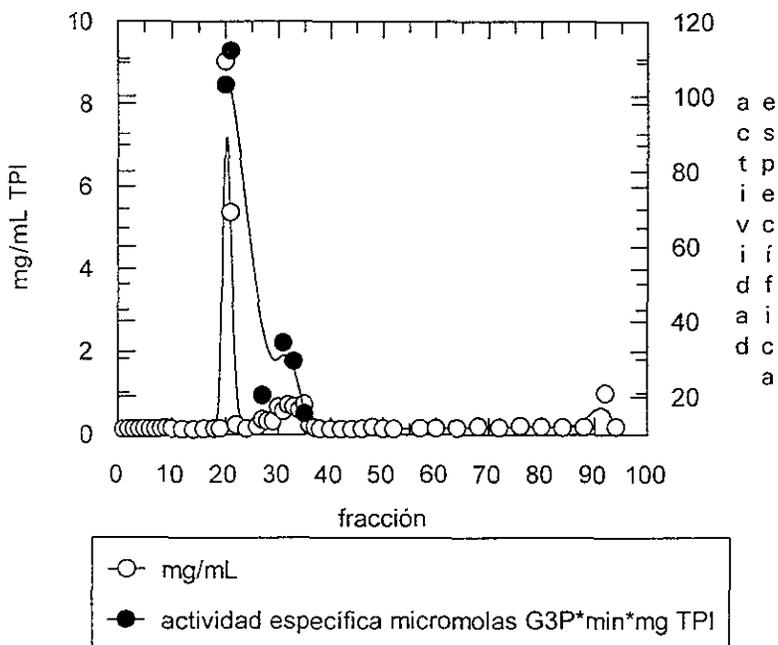
De ambas partes de la Monoq se hizo una mezcla de fracciones que contenía a las siguientes:

- de la primera parte las muestras (83, 84, 86, 87)
- de la segunda parte las muestras (91, 92)

En total habían 12mL. Los cuales se dializaron contra un L de amortiguador TED 10/1/1 pH 7.6 toda la noche.

Columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.6

La mezcla de las fracciones de las dos partes de la Monoq anterior se pasó por otra columna de intercambio aniónico, también a pH 7.6. El amortiguador de corrida fue TED 10/1/1, pH 7.6. El eluyente fue TED 10/1/1, pH 7.6 y se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100mM. Gráfica 3.4



Gráfica 3.4 Cromatograma de las muestras colectadas de la columna Monoq, pH 7.6 para el Lote 2 de la purificación de la quimera TL. En círculos blancos está la concentración de proteína y en círculos negros la actividad específica. El gradiente salino se cambió de 0-100 mM (30mL) y de 100mM-1M (40mL).

Este paso de la purificación de la quimera TL fue muy bueno ya que se logró obtener un intervalo muy estrecho con la mayor parte de la proteína que tenía la máxima actividad específica. Existe un pico máximo en las fracciones 20 y 21. Tabla 3.6.

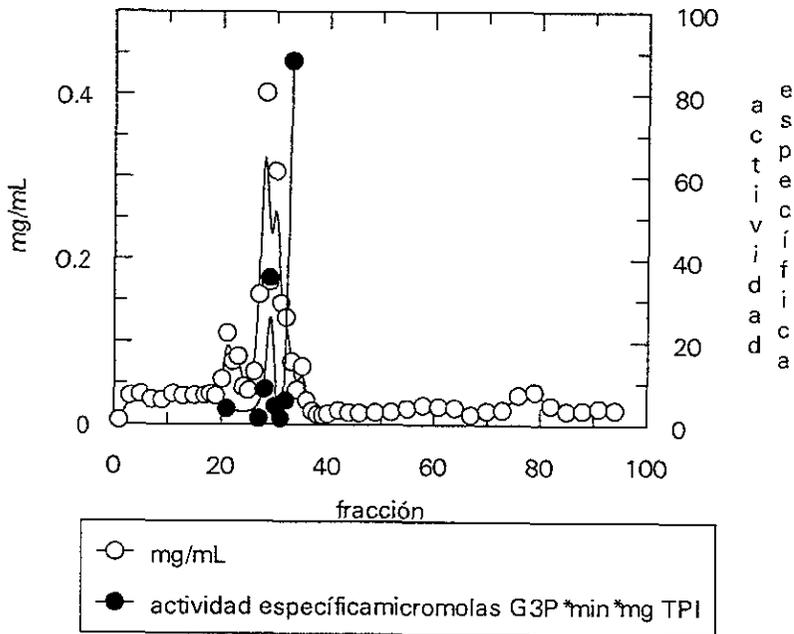
Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1}	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg	Rendimiento (%)
Fracciones mezcladas de la columna de exclusión	84.6	16139.5	191	22.67
mezcla de ambas partes de la Monoq, pH 7.6 sin dializar	67.6	9734.4	144	13.67
mezcla de ambas partes de la Monoq, pH 7.6 dializada	317	3962.5	12.5	5.57
20	103	1339	13	
21	112	866.9	7.74	
27	20.4	10.6	0.52	
31	34.3	28.13	0.82	
33	29.4	28.5	0.968	
35	15.6	16.4	1.052	

. Tabla 3.6 Lote 2 de la purificación de la quimera TL. Columna Monoq, pH 7.6.

Se muestran las mediciones de actividad catalítica y proteína total de las fracciones que se obtuvieron a partir de la Monoq, pH 7.6. Las muestras con mejor actividad fueron la 20 y la 21 que además tienen la mayor cantidad de proteína. Por ello se hizo una mezcla de las fracciones 20 y 21 y se pasó por la siguiente columna.

Columna de intercambio aniónico Monoq, pH 8.0

La mezcla de las fracciones de las fracciones 20 y 21 de la columna Monoq, pH 7.6 se pasó por una columna de intercambio aniónico a pH 8.0. El amortiguador utilizado fue TED 10/1/1, pH 8.0. El eluyente fue TED 10/1/1, pH 8.0 y se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100 mM.



Gráfica 3.5. Cromatograma de las fracciones colectadas de la Columna Monoq, pH 8.0 de intercambio aniónico para el Lote 2 de la purificación de la quimera TL. La concentración de proteína está en círculos blancos y la actividad específica se presenta en círculos negros. El gradiente salino cambió de 0-100 mM (20mL) y de 100mM-1M (30mL).

Aquí existe un pico de máxima concentración de proteína que coincide con el valor más alto de actividad específica. El pico correspondía a las fracciones 28 y 29. Se escogieron las fracciones 27 y 28.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
21	3.81	0.805	0.211
27	1.426	0.429	0.301
28	8.56	6.59	0.770
29	35.5	11.8	0.331
30	4.37	2.57	0.588
31	1.54	0.433	0.281
32	5.83	1.45	0.248
33	88.1	12.9	0.146

Tabla 3.7. Lote 2 de la purificación de la quimera de TL. Columna Monoq, pH 8.0. Amortiguador TEID 10/1/1 a pH 8.

La tabla 3.7 presenta las mediciones de actividad catalítica y concentración de proteína de las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico Monoq, pH 8.0. A pesar de que la actividad es muy baja, se escogieron las fracciones 27 y 28 porque eran las más puras, como se puede ver en el gel 3.1.

La fracción 27, cuya actividad específica es de 1.43 micromolas de sustrato por minuto por mg de enzima; y la fracción 28, cuya actividad específica es de 8.6 micromolas de sustrato por minuto por mg de enzima, se observan en los carriles 3 y 4 del gel 3.1. Se obtuvo un total de 0.5 mg de enzima por mL de solución. Se hizo una mezcla de estas fracciones cuya concentración final es de 423 $\mu\text{g/mL}$ y su actividad específica es de 3.8 micromolas de sustrato por minuto por mg de TPI.



Gel 3.1. Figura que muestra el gel de acrilamida teñido con plata de las fracciones: 1) estándar de alto peso molecular; 2) mezcla de las fracciones 20 y 21 dializadas de la columna Monoq pH 7.6, 3) fracción 27 de la columna Monoq, pH 8; 4) fracción 28 de la columna Monoq, pH 8; 5) fracción 29 de la columna Monoq, pH 8; 6) fracción 30 de la columna Monoq, pH 8; 7) fracción 31 de la columna Monoq pH 8; 8) fracción 32 de la columna Monoq, pH 8, 9) fracción 33 de la columna Monoq, pH 8; 10) TPI pura de *T. brucei* (control).

El gel 3.1 muestra que las fracciones 27 y 28 son fracciones parcialmente puras ya que falta eliminar un contaminante de menor peso molecular (bandas inferiores) y uno de alto peso molecular en el carril tres. Las otras muestras están mucho más contaminadas, lo que se ve en la presencia de varias bandas además de la correspondiente a la TPI

Purificación de la quimera LT.

Diagrama de flujo resumido de la purificación de la quimera LT

Amortiguador de lisis pH 6.5+ células transformadas e inducidas por IPTG.

Se pasó por la Prensa de French a 1500 psi 3 veces

Se centrifugó a 45000rpm por 20 minutos

Precipitado de 45000 rpm

Se le agregaron 200mM NaCl, se agitó 30 min.

Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min

sobrenadante

Se llevó a 45% de sulfato de amonio

Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min

sobrenadante

Se llevó a 60% de sulfato de amonio *

Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min

Precipitado y sobrenadante

Se llevaron a 90% de sulfato de amonio

Sobrenadante de 45000rpm

Se llevó a 45% de sulfato de amonio

Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min

sobrenadante

Se llevó a 60% de sulfato de amonio

Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min

precipitado y sobrenadante

Se llevaron a 90% de sulfato de amonio

*Columna de exclusión molecular Sephacryl S- 300 (3.6 mL) Amortiguador de lisis, pH 7.6

Mezcla de las fracciones 38-51

CM-Sepharosa 1, pH 7.6 Gradiente de NaCl de 0-150mM

Mezcla de las fracciones 8-16

CM-Sepharosa 2 pH 7.6

Gradiente de NaCl 0-100mM-1M

Mezcla de las fracciones 6, 17, 19 y 20

Monoq pH 7.4 primera parte (4mL)

Monoq pH 7.4 segunda parte (2mL) gradiente 0-100mM-1M

IPI pura en las fracciones 22, 23, 24 y 25 de la segunda parte de la columna Monoq, pH 7.4

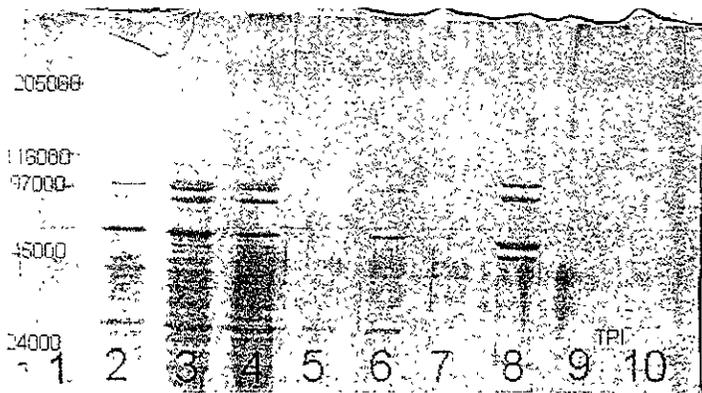
Purificación de la quimera LT.

Determinación de la concentración de proteína, actividad específica y rendimiento de las muestras colectadas después de los tres ciclos de la Prensa de French, las centrifugaciones y las precipitaciones por sulfato de amonio de las muestras con y sin sal.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1}	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg	Rendimiento (%)
extracto de la Prensa de French	6.998	45300	6470	100
sobrenadant de 45000rpm	13.4	43000	3210	94.92
precipitado de 45000 rpm	2.14	548	256	1.21
precipitado de 0-45% de sulfato de amonio	1.17	316	270	0.70
precipitado de 45-60% de sulfato de amonio	3.3	203	61.5	0.45
sobrenadant de 60-90% de sulfato de amonio	0.39	57.7	148	0.13
precipitado de 0-45% de sulfato de amonio +sal	0.58	1430	2460	3.16
Precipitado de 45-60% de sulfato de amonio +sal	9.14	4826	528	10.66
Sobrenadant de 45-60% de sulfato de amonio +sal	1.17	218	186	0.48

Tabla 3.8 Medición de actividad para las fracciones colectadas tras los ciclos de la Prensa de French, la centrifugación y la precipitación por sulfato de amonio

La tabla 3.8 muestra las mediciones de actividad catalítica, concentración de proteína y rendimiento de la purificación de las muestras (con y sin sal) obtenidas después de los ciclos de Prensa de French, centrifugación a 45000rpm y precipitaciones con sulfato de amonio.



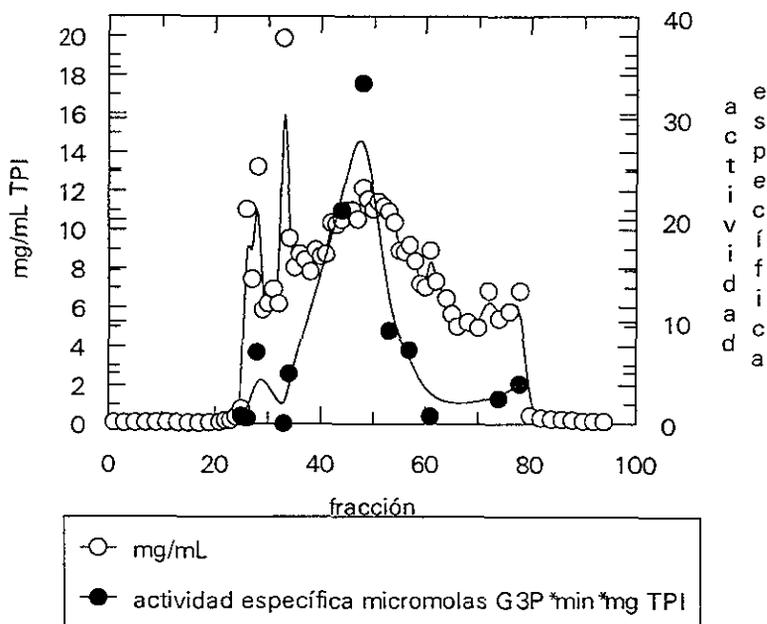
Gel 3.2. Gel de acrilamida teñido con plata que presenta las muestras: 1) estándar de alto peso molecular; 2) fracción de la Prensa de French; 3) sobrenadante de 45000 rpm; 4) precipitado de 45000 rpm; 5) precipitado de 0-45% de sulfato de amonio + 200mM NaCl; 6) precipitado de 45-60% de sulfato de amonio + 200mM NaCl; 7) sobrenadante de 60-90% de sulfato de amonio + 200mM NaCl; 8) precipitado de 0-45% de sulfato de amonio sin sal; 9) sobrenadante de 45-60% de sulfato de amonio sin sal; 10) precipitado de 45-60% de sulfato de amonio sin sal.

El gel muestra que los carriles 2, 3 y 4 están muy contaminados, lo que era de esperarse dado que son fracciones que no han sido purificadas, el extracto de la Prensa de French; el sobrenadante de 45000 rpm y precipitado de 45000 rpm. El carril 5 tiene muchas menos bandas y vemos una en el peso esperado de 26000 daltones pero tiene una actividad específica baja. El carril 6 contiene al precipitado de 45-60% de sulfato de amonio con sal, que además de tener una banda a la altura de la TPI, presenta una alta actividad específica. El carril 8 está muy contaminado y el resto de los carriles no presentan proteína o lo hacen en muy poca cantidad (carriles 7, 9, 10)

A partir de estos resultados, se escogió la fracción del precipitado de 45-60% de sulfato de amonio con NaCl 200mM para pasarlo por la columna de exclusión molecular Sephacryl S-300 ya que era la muestra con mayor concentración de proteína, mayor actividad específica y mejor rendimiento.

Columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, pH 7.6

La muestra del precipitado de 45-60% de sulfato de amonio se pasó por una columna de exclusión molecular, Sephacryl S-300. El amortiguador fue TED de lisis, pH 7.6. El eluyente fue el mismo amortiguador de la corrida. A las muestras que se obtuvieron de esta columna se les midió la concentración de proteína, y la actividad específica a aquellas con más cantidad de proteína.



Gráfica 3.6. Cromatograma de las fracciones colectadas de la columna de exclusión molecular, Quimera LT. En círculos blancos se ve la concentración de proteína y en círculos negros la actividad específica.

En la gráfica 3.6 se ve que la proteína está repartida en varios picos y el máximo de actividad catalítica no coincide con el máximo de actividad específica. Sin embargo, el valor más alto de actividad específica sí se encuentra en una zona de alto contenido de proteína. Esto indica que en el primer paso de la purificación logramos eliminar una gran cantidad de contaminantes y recuperamos a la proteína de interés en las fracciones concentradas alrededor de la muestra 50. Como se trata de un pico muy poco acentuado elegimos un rango grande de fracciones (38-57) para asegurarnos de no perder a la enzima.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
25	0.77	1.45	1.88
26	0.51	31.98	26.7
28	7.03	225	32.0
33	0.00	0.00	48.0
34	4.89	113	23.1
44	20.9	531	25.4
48	33.4	1012	30.3
53	9.13	241	26.4
57	7.24	161	22.2
61	0.74	16.0	21.6
74	2.47	32.4	13.1
78	3.9	64.4	16.5

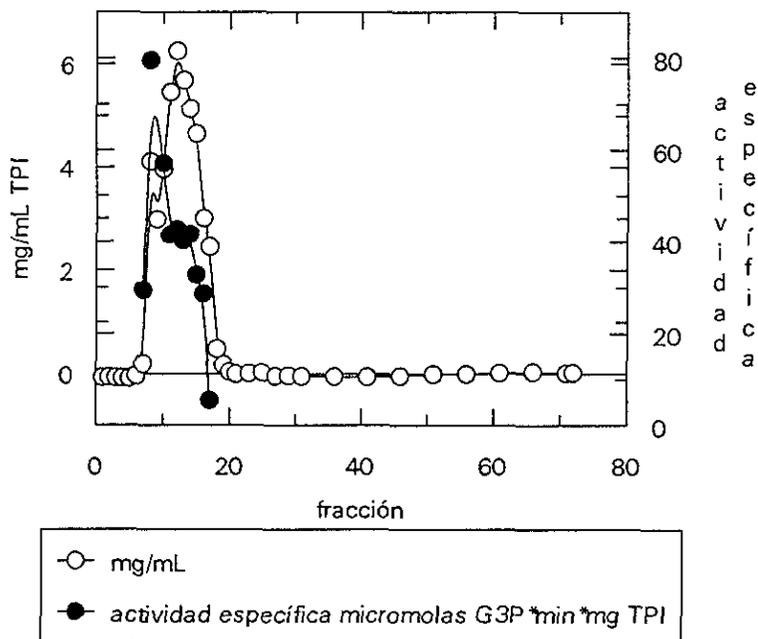
Tabla 3.9. Purificación de la quimera LT. Columna de exclusión molecular. Amortiguador TFD de lisos pH 7.6

La tabla 3.9 muestra la actividad catalítica y la concentración de proteína de las muestras que salieron de la columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, pH 7.6. La actividad en general es baja y los valores más altos coinciden con el rango de fracciones que se eligieron para pasar por la siguiente columna, es decir, las fracciones 38-51.

Se hizo una mezcla de las fracciones 38-51 para pasarla por la columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa.

Columna de intercambio catiónico CM-sepharosa 1, pH 7.6

La mezcla de las fracciones 38-51 de la columna de exclusión molecular se pasó por una columna de intercambio catiónico. El amortiguador de la corrida fue amortiguador A, pH 7.6. Se eluyó con el mismo amortiguador. Se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-150mM. Las muestras obtenidas fueron medidas para determinar su concentración de proteína y su actividad específica.



Gráfica 3.7 Cromatograma de las muestras obtenidas de la columna CM-Sepharosa 1, pH 7.6 de la quimera LT. La concentración de proteína aparece en círculos blancos y la actividad catalítica en círculos negros.

Es claro que la mayor parte de la proteína estaba ubicada en las primeras 20 fracciones. El pico de máxima concentración de proteína coincide con el valor más alto de actividad específica (fracción 8). Se escogió el intervalo de fracciones 8-16 para pasarlo por la columna siguiente.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
7	29.4	13.5	0.460
8	79.6	791	9.94
10	57.1	547	9.58
11	41.4	547	13.2
12	42.6	644	15.1
13	40.2	551	13.7
14	41.5	515	12.4
15	32.7	369.5	11.3
16	28.6	219.4	7.32
17	50.45	32.3	5.92
20	502	40.2	0.08
61	69	2.8	0.04

Tabla 3.10. Purificación de la quimera LT. Columna CM-Sepharosa 1 Amortiguador A pH 7.6.

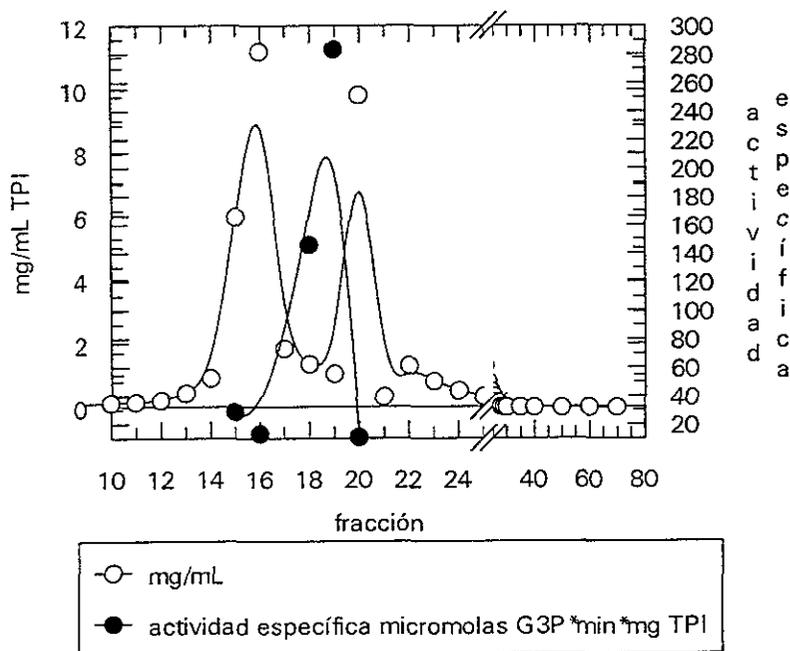
La tabla 3.10 presenta las mediciones de actividad catalítica y la concentración de proteína de las muestras que se obtuvieron de la columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa 1, pH 7.6. Los valores más altos de actividad y concentración de proteína estaban ubicados entre las fracciones 8-16 (8mL totales).

Se hizo una mezcla de esas fracciones, se dividió en dos partes. Una de ellas se utilizó para intentar una purificación alternativa mediante una columna CM-Sepharosa 3, pH 7.0 y una Monoq, pH 8.0, pero dicho intento resultó en la pérdida de la proteína.

La otra parte de la mezcla de fracciones 8-16, se pasó por otra columna CM-Sepharosa 2, pH 7.6.

Columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa 2, pH 7.6

Cuatro mL de la mezcla de fracciones 8-16 de la columna anterior CM-Sepharosa 1, pH 7.6 se pasaron por otra CM-Sepharosa 2, pH 7.6. El amortiguador utilizado fue el A, pH 7.6. El eluyente fue el amortiguador A a pH 7.6 y se hizo un gradiente salino con NaCl de 0-100mM-1M.



Gráfica 3.8. Cromatograma de las muestras obtenidas de la Columna CM-Sepharosa 2, pH 7.6. Se muestran la concentración de proteína (círculos blancos) y la actividad específica (círculos negros). El gradiente salino cambió de 0-100mM (36mL) y de 100mM-1M (90mL).

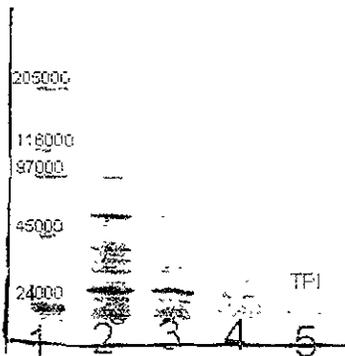
En la gráfica 3 8 queda claro que la muestras con mayor actividad específica (17, 18, 19) tienen muy poca proteína. En este paso de purificación la proteína no se separó adecuadamente y se perdió mucha TPI. A partir de este resultado fue necesario modificar el tipo de columna utilizado y el pH de la corrida. También se modificaron los gradientes salinos de NaCl.

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
15	28.7	413	14.4
16	13.1	354	27.0
18	146	473	3.24
19	283	707	2.5
20	10.7	254	23.7
Mezcla	136	452	3.32

Tabla 3. 11 Purificación de la quimera LT Columna CM-Sepharosa 2, pH 7.6 Amortiguador A pH 7.6. Se muestran las mediciones de actividad catalítica y concentración de proteína de las muestras obtenidas de la columna de intercambio catiónico CM-Sepharosa 2, pH 7.6 Los valores más altos de actividad se encontraron en las fracciones 15-20 ya que tenían la mayor parte de la proteína.

Se decidió hacer una mezcla de las fracciones 16, 17, 19 y 20 (6 mL) totales que se dividieron en dos partes, una de 4 mL y otra de 2mL. Ambas partes se pasaron por una columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.4.

Se hizo un gel con muestras de la última columna, CM-Sepharosa 2



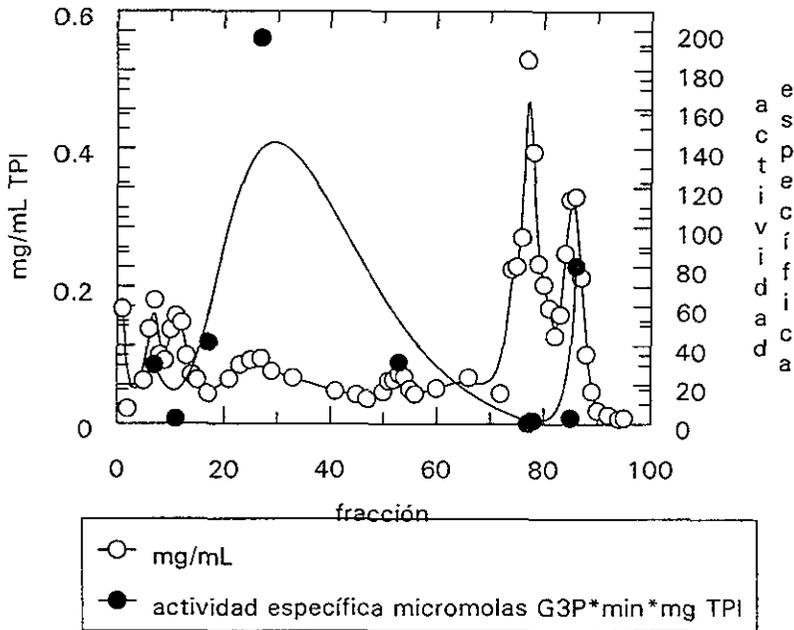
Gel 3.3. figura que muestra el gel de acrilamida teñido con plata de las muestras de la columna CM-Sepharosa 2, pH 7.6 · 1) estándar de alto peso molecular, 2) fracción 16, 3) fracción 17; 4) fracción 19, 5) fracción 20.

El gel 3.3 muestra que las fracciones obtenidas de la columna CM-Sepharosa 2, pH 7.6 estaban contaminadas con otras proteínas (varias bandas por arriba y por debajo de la banda esperada de 26000 daltones). Se hizo una mezcla de las fracciones mostradas en el gel 3.3 y se pasaron por una columna Monoq, pH 7.4 dividida en dos partes.

Columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.4 (primera parte)

Cuatro mL de la mezcla de fracciones 16, 17, 19 y 20 de la columna CM- Sepharosa, pH 7.6 se pasó por una columna Monoq, pH 7.4. Se corrió con amortiguador A y se cluyó con el mismo amortiguador más 200 mM NaCl. Se hizo un gradiente salino de 0-100mM-1M con NaCl

Se les midió concentración de proteína y actividad catalítica a las muestras que salieron de esta columna



Gráfica 3.9. Cromatograma de las muestras colectadas de la Columna Monoq, pH 7.4 (primera parte) para la quimera LT. En círculos blancos está la concentración de proteína y en círculos negros la actividad específica. El gradiente salino cambió de 0-100mM (30mL) y de 100mM-1M (130mL).

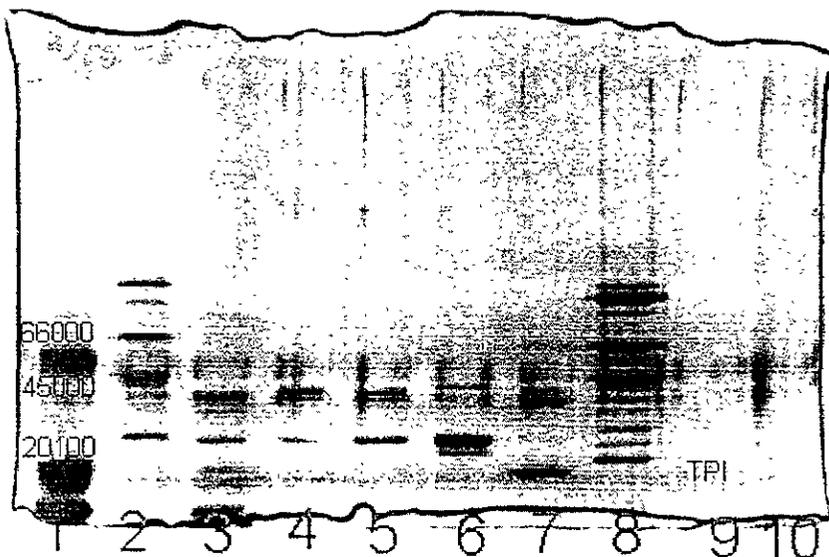
Este paso de purificación tampoco fue muy eficiente y se perdió mucha proteína, lo que se puede verificar en la gráfica 3.9 cuando vemos que el máximo de actividad específica (fracción 27) tiene apenas 0.18 mg de proteína total. Como se ve en la tabla 3.17 las actividades catalíticas también fueron bajas. Ninguna muestra quedó pura, por lo que se retomó la mezcla de fracciones 16, 17, 19 y 20 para poner otra columna de intercambio aniónico Monoq, pH 8.0

Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
7	30	9.9	0.33
11	2.54	0.7	0.29
17	41.7	7.1	0.17
27	196	35.3	0.18
53	313	43.8	0.14
77	0.14	0.13	0.96
78	1.67	1.2	0.72
85	3.09	1.82	0.59
86	80.4	48.2	0.60

Tabla 3.12. Purificación de la quimera LT Columna Monoq (primera parte). Amortiguador A, pH 7.4; Amortiguador B - Amortiguador A + 1M NaCl, pH 7.4

La tabla 3.12 presenta las mediciones de actividad catalítica y concentración de proteína de las muestras obtenidas de la primera parte de la columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.4.

La actividad de todas las muestras fue muy baja, igual que las concentraciones de proteína. Ninguna muestra estuvo pura así que con los 2mL restantes de la mezcla de fracciones 16, 17, 19 y 20 de la columna anterior, se puso la segunda parte de esta columna en las mismas condiciones.



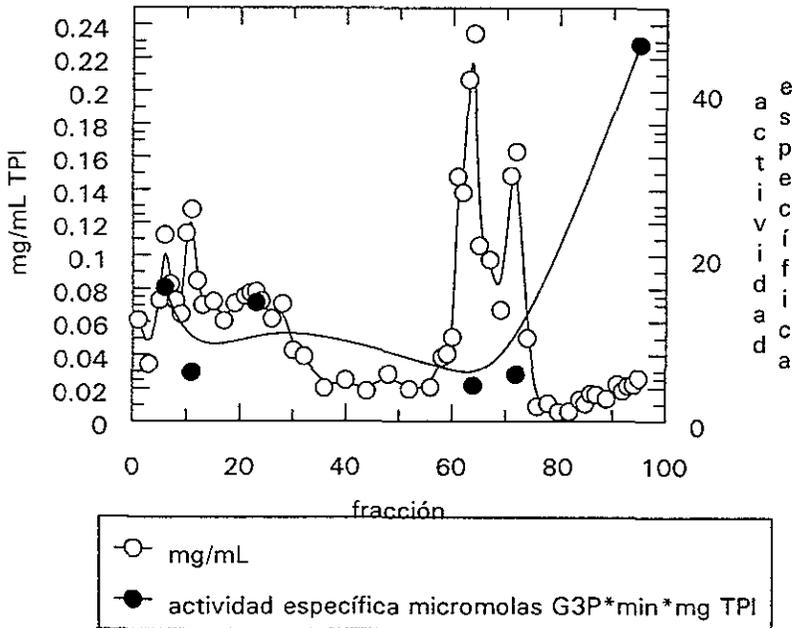
Gel 3.4. Figura que muestra el gel de acrilamida teñido con plata de las muestras de la primera parte de la columna Monoq, pH 7.4: 1) estándar de alto peso molecular; 2) mezcla de las fracciones 16,17,19 y 20 de la columna CM-Sepharosa 2, pH 7.6; 3) fracción 7; 4) fracción 11; 5) fracción 17; 6) fracción 27; 7) fracción 53; 8) fracción 77; 9) fracción 85; 10) fracción 86

En el gel 3.6 se ve que ninguna muestra estaba pura y había muy poca proteína en cada carril (tabla 3.17. Decidimos poner la segunda parte de la columna Monoq, pH 7.4

Columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.4

Los 2mL restantes de la mezcla de las fracciones 16, 17, 19 y 20 de la columna CM- Sepharosa, pH 7.6 , se pasaron por una columna Monoq, pH 7.4 Se corrió con amortiguador A y se cluyó con el mismo amortiguador + 200mM NaCl Se hizo un gradiente salino de 0-100mM-1M con NaCl

Se les midió concentración de proteína y actividad catalítica a las muestras que salieron de esta columna



Gráfica 3.10 Cromatograma de las muestras colectadas de la Columna Monoq, pH 7.4 (segunda parte) para la quimera LT. En círculos negros está la actividad catalítica y en círculos blancos la concentración de proteína. El gradiente salino cambió de 0-100mM (30mL) y de 100mM-1M (130mL).

Aquí se puede ver que hay un máximo de concentración de proteína entre las fracciones 60 y 80, sin embargo tiene una muy baja actividad específica por lo que probablemente se trate de un contaminante. Ha habido una separación de varias proteínas, lo que se aprecia ya que existen varios picos. La máxima actividad se ve al final de la gráfica en la fracción 95, pero corresponde a un valor muy bajo de proteína. Se hizo un gel para verificar la pureza de cada muestra.

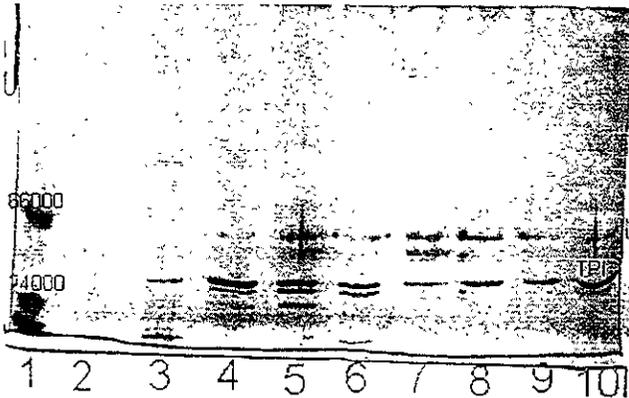
Fracción	Actividad específica $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Actividad total $\mu\text{mol min}^{-1}$	Proteína total mg
6	13.1	2.62	0.20
11	5.89	1.35	0.23
23	14.3	2.0	0.14
64	4.31	1.8	0.42
72	5.63	1.7	0.30
95	45.6	22.8	0.50

Tabla 3.13. Purificación de la quimera LT. Columna Monoq, pH 7.4 (segunda parte). Amortiguador A, pH 7.4; Amortiguador B⁻ Amortiguador A + 1M NaCl, pH 7.4

Esta tabla presenta las mediciones de actividad catalítica y concentración de proteína de las muestras obtenidas de la segunda parte de la columna de intercambio aniónico Monoq, pH 7.4

El rendimiento fue muy bajo lo mismo que la concentración de proteína y la actividad catalítica, pero esta vez sí se tuvieron fracciones parcialmente puras: la 22, la 23, la 24, la 25 (ver gel 3.5) a partir de la cuales, se hizo una mezcla cuya concentración es de 0.0085 mg de proteína por mL de solución. La actividad específica de esta mezcla es de 52.96 micromolas de sustrato por minuto por mg de enzima.

En general, el rendimiento de la purificación fue muy bajo, es necesario depurar el protocolo para obtener más proteína pura.



Gel 3.5. Figura que muestra el gel de acrilamida teñido con plata de las muestras de la primera y segunda parte de la columna Monoq, pH 7.4: 1) estándar de alto peso molecular; 2) TPI pura de *T. brucei*; 3) mezcla de la primera parte de la columna Monoq, pH 7.4; 4) fracción 25 de la primera parte de la Monoq, pH 7.4; 5) fracción 26 de la primera parte de la Monoq, pH 7.4; 6) fracción 27 de la primera parte de la columna Monoq, pH 7.4; 7) fracción 22 de la segunda parte de la Monoq, pH 7.4; 8) fracción 23 de la segunda parte de la columna Monoq, pH 7.4; 9) fracción 24 de la segunda parte de la columna Monoq, pH 7.4; 10) fracción 26 de la segunda parte de la columna Monoq, pH 7.4

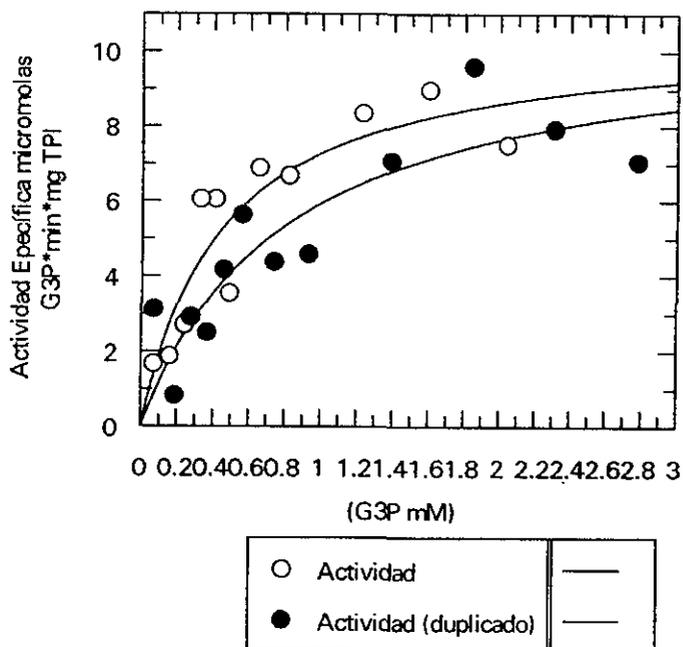
Experimentos de caracterización de las quimeras obtenidas.

Para darnos una idea general de las características de las quimeras, se hicieron varios experimentos. Primero realizamos varias cinéticas enzimáticas para determinar la V_{max} y la K_m de ambas quimeras. También hicimos ensayos de estabilidad a la dilución que nos permitieran observar cómo se comportan estas enzimas en medios cada vez más diluidos. De esa manera conoceríamos indirectamente la afinidad de los monómeros de cada quimera entre sí.

Por otro lado se llevó a cabo un experimento de la reactividad del tiosulfonato MMTS con la quimera TL y comparamos su patrón con el de las dos TPIs silvestres que la componen.

Determinación de los parámetros cinéticos de la quimera TL por duplicado.

Concentración de TPI TL en celda 1.07 μg



Gráfica 3.11. Curva Michaelis-Menten para los datos por duplicado de la cinética enzimática de TL. se midió la actividad específica de la quimera TL con distintas concentraciones de sustrato (0.07-2.45mM G3P par el ensayo y 0.07-2.76mM G3P para el duplicado), además el ensayo contenía 0.02 mM NADH, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -

GDH; 7.7×10^{-4} mg/mL de TPI TL; TED 100/10/1 2X, pH 8.0 Los datos se ajustaron según la ecuación de Michaelis-Menten en el programa Grafit.

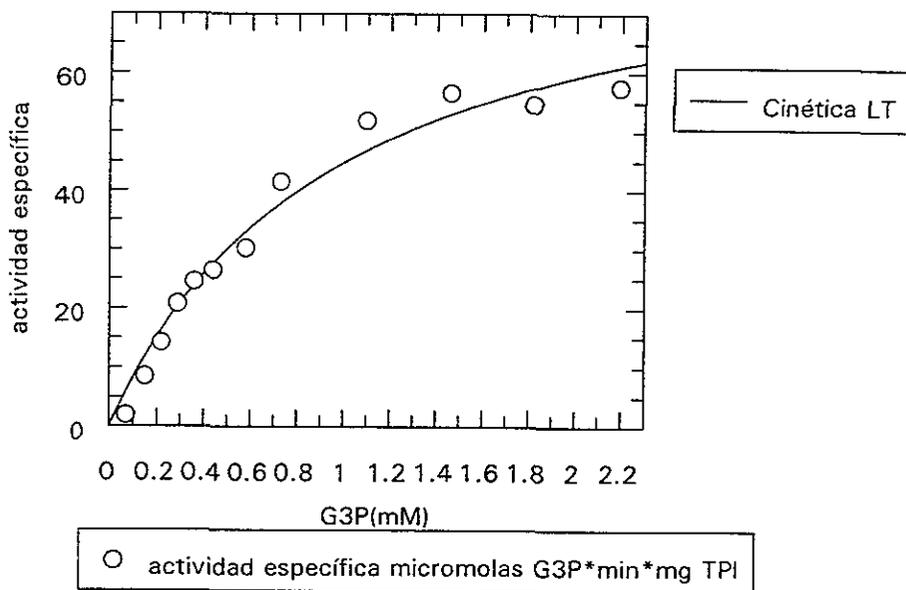
Se obtuvo una V_{max} de $10.75 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_m de 0.811 mM del experimento inicial. El duplicado arrojó una V_{max} de $10.75 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una V_{max} de 0.452 mM. El promedio de ambos es de: $V_{max}=10.66 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y la $K_m = 0.623$ mM.

Las cinéticas muestran que existe una gran dispersión de datos lo que hace que no sea reproducible. Esta dispersión puede deberse a la inestabilidad de la TPI (ver experimentos de estabilidad a la dilución) y a defectos en la purificación que favorezcan las irregularidades en la medición de la actividad específica de la quimera.

La TPI silvestre de *S cerevisiae* tiene una V_{max} de $11536 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_m (G3P) de 1.27 mM, en cambio la quimera TL, que en su mayor parte está formada por la TPI de levadura, tiene una V_{max} promedio de $10.66 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_m (G3P) de 0.63 mM. Estas diferencias quieren decir que las mutaciones introducidas sobre la enzima silvestre de levadura afectaron sus características cinéticas de modo que la quimera se volvió menos veloz para catalizar la isomerización de las triosas, pero su sitio activo se une con una mayor afinidad al sustrato que el de la proteína silvestre.

Determinación de los parámetros cinéticos de LT.

Concentración de TPI en celda 0.17 μg



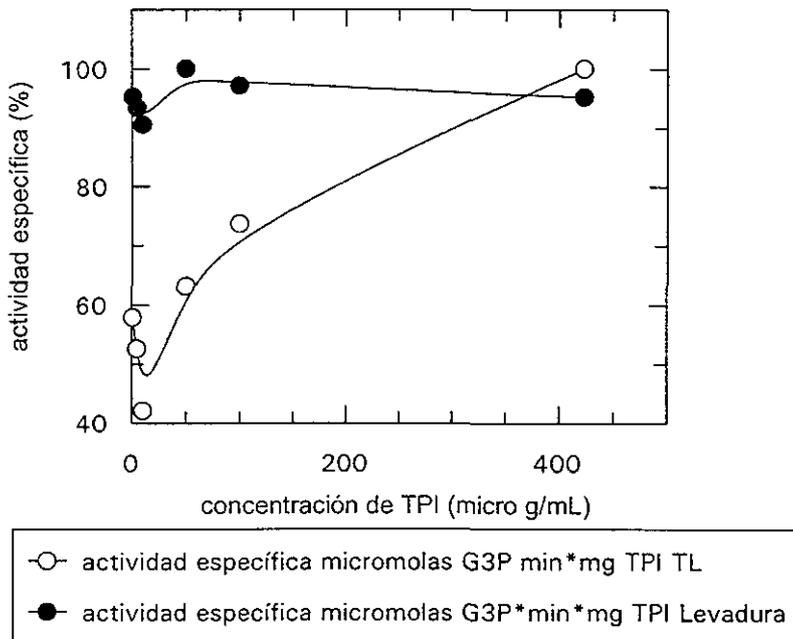
Gráfica 3.12. Curva Michaelis-Menten para los datos de la cinética enzimática de la quimera LT. Se midió la actividad específica de la quimera LT con distintas concentraciones de sustrato (0.07-2.19mM G3P). Se usaron también 0.2mM NADH, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\alpha\text{-GDH}$; 1.7×10^{-4} mg/mL de TPI LT. Amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4 Los datos se ajustaron a una curva Michaelis-Menten en el programa Grafit.

Los datos de la cinética de la quimera LT se ajustaron bien a una curva Michaelis-Menten. No hay demasiada dispersión de datos, quizá porque esta enzima es más estable que la TL (ver datos del experimento de estabilidad a la dilución) y está más pura (ver geles 3.1 y 3.5).

Para esta enzima se obtuvo una V_{max} de $87.86 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_m de 0.96 mM. Al comparar estos datos con los de la TPI silvestre de *T. brucei*, que tiene una V_{max} de $8644.58 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_m de 0.7174 mM, vemos que la V_{max} es unas cien veces menor en la quimera y el sitio activo de la silvestre tiene una mayor afinidad al sustrato. Esto indica que la mutación introducida ha hecho que la enzima sea menos eficiente al isomerizar. Este no es un resultado inesperado ya que los cambios introducidos son bastante fuertes, en el sentido de que son demasiados cambios a la vez, como para que no desequilibren la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima.

Estabilidad a la dilución de la quimera TL mediante actividad enzimática.

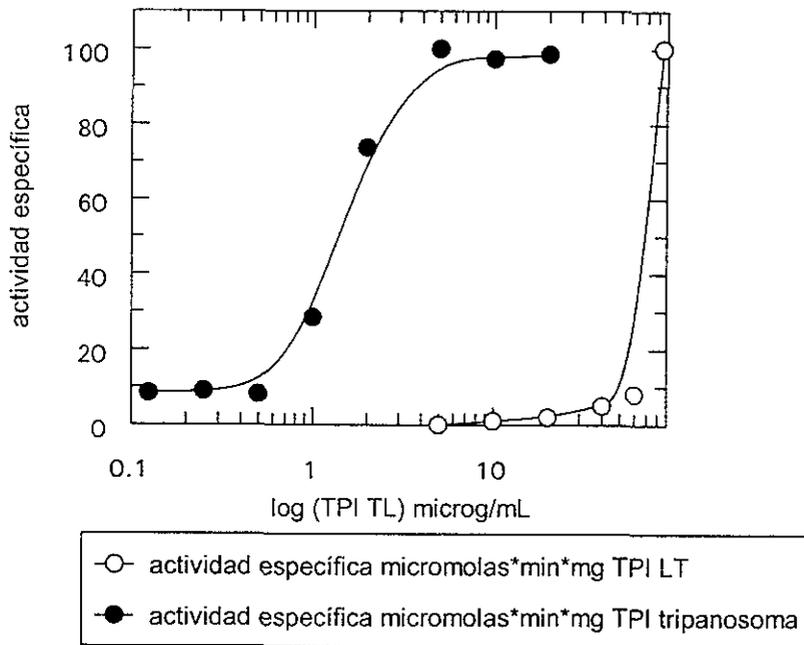
TPI stock 423 $\mu\text{g/mL}$



Gráfica 3.13. Datos del experimento de estabilidad a la dilución de la quimera TL. Se midió la actividad específica de seis muestras de TPI TL diluidas a distintas concentraciones (1,5,10,50,100,423 $\mu\text{g/mL}$ TPI) después de 24 horas de incubación. Se utilizó amortiguador TED 100/10/1, pH7.6; 1 mM G3P; 0.2 mM NADH y 20 $\mu\text{g/mL}$ de α -GDH. El control se hizo con TPI de levadura y el mismo tiempo de incubación.

En la gráfica 3.13 se muestra que a diferencia de los valores de la enzima silvestre de *S cerevisiae* (en negritas), los valores de actividad específica de la quimera caen aun en concentraciones altas de proteína (100 $\mu\text{g/mL}$). La estabilidad de la quimera TL decae considerablemente con la disminución de la concentración de proteína. Esto nos hace pensar que la quimera no es estable porque probablemente no se encuentra presente en forma dimerica. En cambio la TPI silvestre de levadura se mantiene estable a pesar de la dilución.

Estabilidad a la dilución de la TPI LT mediante actividad enzimática.



TPI stock 85 $\mu\text{g/mL}$

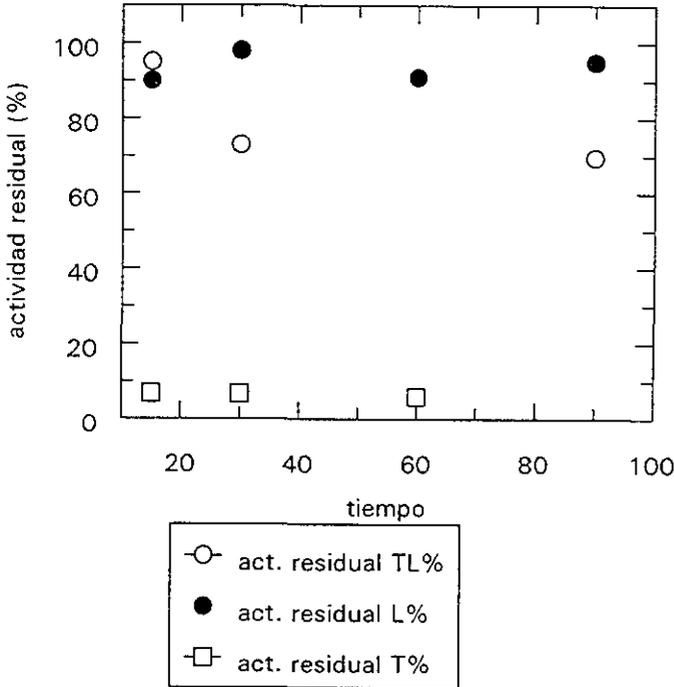
Gráfica 3 14. Datos del experimento de estabilidad a la dilución de la enzima quimérica LT. Se midió la actividad específica de las seis muestras de TPI LT a distintas concentraciones (5,10,20,40,60,85 $\mu\text{g/mL}$ TPI) después de 24 horas de incubación. Las muestras estaban diluidas en amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4 y agua. Los ensayos contenían 1 mM G3P; 0.2 mM NADH y 20 $\mu\text{g/mL}$ de α -GDH. El control se hizo con la TPI de tripanosoma y el mismo tiempo de incubación.

La gráfica 3 14 indica que la enzima LT es inestable a la dilución (aunque lo sea en menor grado que la enzima TL) ya que a bajas concentraciones de enzima casi no hay actividad. La enzima LT es más inestable que la TPI silvestre de tripanosoma. Es probable que esto se deba a que los monómeros de la quimera se disocian fácilmente por causa de las mutaciones introducidas en ella.

La actividad específica de la TPI silvestre de tripanosoma comienza a caer a concentraciones por debajo de los 40 $\mu\text{g/mL}$ de TPI, en cambio, la quimera lo hace desde los 80 $\mu\text{g/L}$, lo que indica que nunca está presente en forma dimerica a esa concentración durante los ensayos de actividad.

Determinación de la reactividad de la quimera TL con MMTS.

El MMTS es un tiosulfonato que reacciona específicamente con la cisteína 14 de la TPI. Dado que los primeros 53 aminoácidos de la quimera TL provienen de la TPI del tripanosoma, sabemos que la quimera tiene una cisteína en la posición 14. Quisimos comparar la inhibición de la actividad de la TPI del tripanosoma con la inhibición de la TPI de la quimera por MMTS. Utilizamos a la TPI de levadura como control.



Gráfica 3.15. Esta gráfica muestra la actividad específica residual en porcentaje para las TPIs de 1) TL; 2) *S cerevisiae* y 3) *T brucei* tras la incubación con 5mM de MMTS a 15, 30, 60 y 90 minutos. Se midió actividad en ensayos que contenían: 1mM G3P; 0.2 mM NADH; 20 µg/mL de α -GDH y 1 µg de TPI de TL; 5 ng de TPI de *T brucei*; 2 ng de TPI de *S cerevisiae*. Se hizo un control de cada muestra con ensayos sin MMTS.

En la gráfica 3.15 se puede ver el efecto que tiene el MMTS en las TPIs de TL, *T brucei* y *S cerevisiae*. Es claro que la TPI del tripanosoma se inactiva desde los primeros 15 minutos de incubación quedando con tan sólo 6.8% de actividad residual que a los 60 minutos llega a ser de sólo 6.0% residual.

En el caso de la TPI de levadura podemos constatar que la actividad residual se mantiene siempre en o por encima del 90% por lo que se puede concluir que el MMTS no afecta significativamente a la TPI de levadura porque no tiene cisteína 14.

Por su parte, la TPI de TL se inhibe parcialmente. Quitando el punto de los 60 minutos que también fue un error de medición, se puede comprobar que conforme pasó el tiempo de incubación, la enzima pierde actividad hasta llegar a los 90 minutos, cuando tiene sólo 69.6% residual. La inhibición de la quimera es mucho menor que para la silvestre de tripanosoma. Esto puede deberse a que la conformación de la quimera impide el efecto inhibitorio del MMTS al hacer a la cisteína 14 menos accesible al tiosulfonato.

Muestra	15 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos
TL	95%	73%	26.6%	69.6%
<i>S. cerevisiae</i>	90%	98%	91%	95%
<i>T. brucei</i>	6.8%	6.8%	6.0%	8.6%

Tabla 3.14. Esta tabla muestra la actividad residual de las enzimas de TPI de 1) TL; 2) *S.cerevisiae*; 3) *T.brucei* a distintos tiempos de incubación con 5mM de MMTS.

Capítulo 4: Discusión y Conclusiones

Construcción de las quimeras.

Las quimeras construidas para el trabajo de esta tesis, se basan en la estructura de la TPI silvestre de *T. brucei* y de *S. cerevisiae*. En buena medida se puede decir que la quimera TL es una mutación sobre la TPI de *S. cerevisiae* y que la LT es una mutación sobre la TPI de *T. brucei*. Por supuesto no se trata de dos mutaciones aisladas, sino de un par recíproco de quimeras complementarias. Esto permitió obtener más información acerca de la estructura de la TPI que si hubiéramos construido una sola quimera. Además, pudimos estudiar algunas diferencias existentes a nivel de estructura y parámetros cinéticos entre las dos especies silvestres utilizadas.

Como ya se mencionó en la introducción, la TPI es una enzima cuyo motivo conformacional es el barril α/β . Esta estructura se presenta en al menos el 10% de todas las proteínas globulares conocidas (Brandén, 1991). A pesar de que es una estructura muy recurrente, la secuencia de aminoácidos que la codifica no está tan conservada como se esperaría. Tan sólo en el caso de la TPI, según datos de Wierenga y colaboradores (1992), de trece secuencias estudiadas, sólo 56 residuos de 250, es decir, el 22%, están conservados. Sin embargo, a nivel tridimensional, los monómeros son casi iguales.

La identidad de residuos de aminoácidos entre la TPI de *S. cerevisiae* y la de *T. brucei* es de aproximadamente 49% (Wierenga, 1992). Se presume que los aminoácidos conservados, no sólo entre éstas especies sino por lo menos en 11 más, sean los responsables de la identidad a nivel tridimensional. Los residuos que conforman el sitio activo están 100% conservados. Entre la TPI de las dos especies silvestres utilizadas en este trabajo, hay un 59% de identidad entre los residuos que conforman la interfase, es decir, aquellos de las unidades α/β 1,2 y 3. A pesar de la variabilidad en la secuencia, la asociación entre los monómeros no cambia significativamente entre las dos especies (Wierenga, 1992). La mayoría de los puentes de hidrógeno directos entre la subunidad 1 y la subunidad 2 están conservados. Hay 24 de estos puentes de hidrógeno en la levadura y 20 en el tripanosoma. La mayoría se establecen con residuos de la unidad α/β 3.

La TPI de levadura tiene tres puentes salinos con el asa 3 y la TPI de *T. brucei* tiene sólo dos. Las interacciones de la unidad α/β 2 de la interfase son diferentes entre las dos TPIs: la interfase es menos hidrofóbica en la levadura que en el tripanosoma. En las trece secuencias que estudió Wierenga en 1992, los residuos conservados están predominantemente en las hebras beta centrales o en las asas que les siguen directamente. Estas estructuras contribuyen en gran medida a la estabilidad del dímero y a la catálisis.

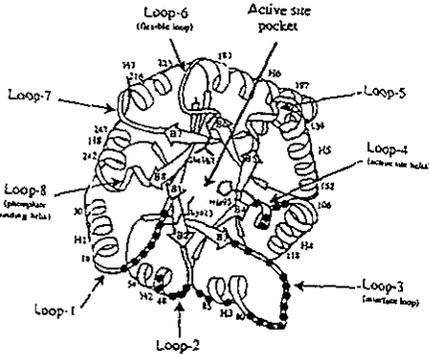


Figura 4.1. monómero de TPI en el que se muestran en gris, las unidades α/β intercambiadas en las quimeras.

Entre las TPIs de *S. cerevisiae* y *T. brucei* existen, en las primeras dos unidades α/β codificadas por los primeros 53 y 54 aminoácidos respectivamente, 36 sustituciones. La TPI de *T. brucei* tiene un residuo más (54) que la TPI de *S. cerevisiae* (53) para las primeras dos unidades α/β . De estos 36 cambios, 17 implican cambios en la polaridad del residuo. Muchos de estos cambios son de un aminoácido alifático por uno polar, por ejemplo, alanina 2 en la levadura por lisina 3 en el tripanosoma. Una diferencia así no sólo afecta la polaridad, sino las constricciones estéricas ya que la lisina es bastante más voluminosa que la alanina y la primera puede tener una gran reactividad con otros residuos de la enzima. Otro cambio interesante aunque no muy importante en cuanto a la estabilidad o estructura del dímero, puede ser el introducido en la quimera TL (sobre la TPI de levadura) en el que una arginina (posición 3) se sustituye por una prolina (posición 4). La carga positiva de la arginina es cambiada por la cadena lateral alifática de la prolina, además de las restricciones rotacionales que esta última le impone al enlace N-C alfa de la cadena principal. En el primero de estos ejemplos la lisina permitiría una mayor reactividad que la alanina al posibilitar la generación de puentes salinos. En cambio, en el otro ejemplo, la prolina reduce las interacciones potenciales de esa posición, ya que la cadena lateral de ésta no tiene grupos reactivos, al contrario de la arginina que puede interactuar de muy diversas maneras con otros residuos de la enzima.

En la unidad $\alpha/\beta 1$ los aminoácidos 11, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 son los puntos de enlace en la interfase: todos están conservados (presentes en las dos TPIs silvestres), excepto el residuo 14 (cisteína en el tripanosoma y leucina en la levadura). En la unidad $\alpha/\beta 2$ los residuos que intervienen en la interfase son, para levadura, prolina 44, alanina 45, treonina 46, trosina 47, lisina 48, aspártico 49, y para tripanosoma son glutamina 18, treonina 44, fenilalanina 45, valina 46,

ESTA TESIS NO DEBE
 SER PRESTADA
 SIN LA AUTORIZACION
 DEL AUTOR

histidina 47, lisina 48, alanina 49. Todos estos aminoácidos, a excepción de la lisina 48 son distintos entre ambas TPis.

Residuos de la interfase de la TPI de <i>T. brucei</i>	Elemento de la estructura secundaria	Residuo equivalente en la TPI de <i>S. cerevisiae</i>
Asn 11	Hebra Beta 1	Asn
Lys 13	Asa 1	Lys
Cys 14	Asa1	Leu
Asn 15	Asa1	Asn
Gly 16	Asa1	Gly
Ser 17	Asa 1	Ser
Gln 18	Alfa Hélice 1	Lys
Thr 44	Asa 2	Pro
Phe 45	Asa 2	Ala
Val 46	Asa 2	Thr
His 47	Asa 2	Tyr
Ala 49	Alfa Hélice 2	Asp

Tabla 4 1 Comparación de los aminoácidos que forman las dos primeras unidades α - β en las TPis de *T.brucei* y *S.cerevisiae*.(Wierenga, 1992)

En el asa 1, la cisteína 14 del tripanosoma es sustituido en la levadura por una leucina. Este cambio es muy interesante porque mientras que la cadena lateral de la levadura es alifática, y por lo tanto no tiene grupos reactivos, el grupo tiol de la cisteína es el grupo más reactivo de todas las cadenas laterales (Creighton, 1993). De hecho, es este residuo el que se rastrea con MMTS. Por lo demás, el resto de los residuos de la interfase (Asn 11, Gly 16 y Ser 17) están conservados. Todos estos aminoácidos son capaces de establecer ya sea, puentes de hidrógeno, puentes salinos o, en el caso de la cisteína 14, un enlace disulfuro

En el asa 2, todos los residuos de la interfase son diferentes entre ambas TPis y se sustituyen: glutamina por lisina (18) (poco reactivo por muy reactivo); treonina por prolina (44) (alcohol por pirrolidina), fenilalanina por alanina (45) (aromático por alifático); valina por treonina (46) (no polar por polar; histidina por tirosina (47) (nucleófilo electrófilo por aromático); alanina por asparagina (49) (alifático por amida).

Para ambas asas, en términos de reactividad de los residuos, se podría decir que la TPI de tripanosoma es capaz de generar enlaces polares entre las unidades α/β de la interfase por la presencia de la cisteína 14, treonina 44, fenilalanina 45 e histidina 47. Sin embargo, quizá no sea una diferencia muy significativa porque la TPI de levadura tiene otros residuos que podrían compensarla: lisina 18, treonina 46 y aspártico 49. Además, en el plegamiento de proteínas no sólo la formación de enlaces es determinante, también se deben tomar en cuenta las restricciones estéricas y las interacciones no polares o hidrofóbicas

En términos de hidrofobicidad, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las TPIs silvestres provocan que la interfase en la TPI de levadura sea menos hidrofóbica que la del tripanosoma. En todo caso, en las quimeras, las unidades α/β 1 y 2 se han intercambiado, lo que daría como resultado una inversión en cuanto a las características que les confieren los residuos de dichas unidades. Así, la LT sería más hidrofóbica que la TL en esas unidades. Esto, por supuesto repercute en la interacción con la unidad α/β 3 para conformar la interfase entre los monómeros.

En la siguiente tabla se ve cuáles son las interacciones entre las unidades α/β que hacen la interfase, tanto para las TPIs silvestres, como para las quimeras:

<i>T.brucei</i>	TL	LT	<i>S.cerevisiae</i>
Asa1			
Asn 311-Thr 75	Asn 311-Thr 75	Asn 310- Thr 75	Asn 310-Thr 75
Cys 314(O)-Gly 72 (N)	Cys 314(O)-Gly 72(N)	Leu 313(O)-Gly 72(N)	Leu 313(O)-Gly 72(N)
Cys 314(N)-Gly 72 (O)	Cys 314 (N)- Gly72(O)	Leu 314(N)- Gly72(O)	Leu 314(N)- Gly72(O)
Gln 318 (NEZ)- Asp85(O)	Gln 318(NEZ)-Asp 85(O)	Lys 317(NZ)-Asp 48(OD1) y Asp85(OD2)	Lys 317(NZ)-Asp 48(OD1) y Asp85(OD2)
	Gln 318- Asp 48	Lys 317(N)-Asp 85(OD1) y Asp85 (OD2)	Lys 317(N)-Asp 85(OD1) y Asp85 (OD2)
Gln 318(N)- Asp85(OD2)	Gln 318(N)- Asp 85(OD2)	Lys 317(N)-Asp 85(OD1)	Lys 317(N)-Asp 85(OD1)
Asa2			
		Tyr 346(OH)- Asp85(OD1)	Tyr 346(OH)- Asp85(OD1)

Tabla 4.2. Interacciones entre los aminoácidos que componen las unidades α/β de la interfase en las cuatro TPIs. Entre paréntesis se indica el átomo involucrado en el puente de hidrógeno directo (O por oxígeno; N por nitrógeno OH por hidroxilo; NZ por nitrógeno en la posición Z; NEZ por nitrógeno en posiciones E y Z; OD1 por unidad α/β uno; OD2 por unidad α/β dos). La nomenclatura de los residuos se hizo suponiendo la existencia de dos monómeros unidos por la interfase. Los residuos del primer monómero van del 2 al 250 y del segundo monómero del 302 al 550.

En la tabla 4.2 se puede ver que los puentes de hidrógeno directos entre las subunidades 1 y 2 de la TPI no se establecen entre los mismos residuos de aminoácidos de una especie y de otra, sin embargo, hay que hacer notar de que se trata, en casi todos los casos, de enlaces equivalentes en cuanto a la posición que ocupan dentro de la secuencia de residuos. Esto es, por ejemplo, que mientras que en la TPI de tripanosoma existe un puente de hidrógeno directo entre el aspártico 311 y la treonina 75 del asa 1, en la levadura hay uno equivalente entre el aspártico 310 y la treonina 75 de la misma asa. Se trata, en efecto, del mismo enlace.

En el caso de la glutamina 318 de la subunidad 1 de la TPI de tripanosoma, que está enlazada con el aspártico 85 del asa 1, vemos que en la levadura, dicha asa puede establecer dos puentes de hidrógeno directos entre la lisina 317 y el aspártico 48 (con cualquiera de los dos oxígenos de la cadena lateral). En el tripanosoma, la glutamina 318 de la TPI también se puede unir al otro oxígeno del grupo carboxilo de la cadena terminal del aspártico 85. El equivalente de este puente de hidrógeno es el enlace de la lisina 317 con el aspártico 85 en la TPI de levadura. Ahí también, a diferencia de la TPI de levadura, el mismo aspártico 85 puede unirse con la tirosina 346 del asa 2. La TPI de tripanosoma no presenta puentes de hidrógeno directos en el asa 2.

Ahora bien, la quimera LT es capaz de establecer los mismos puentes de hidrógeno que existen en la TPI de levadura. En cambio, la quimera TL, además de poder formar todos los puentes de hidrógeno que forma la TPI de tripanosoma, podría, en principio al menos, establecer un puente de hidrógeno entre el aspártico 48 y la glutamina 318.

Hay que notar que uno esperaría que los enlaces no covalentes fueran iguales entre la quimera LT y la TPI de tripanosoma y entre la quimera TL y la TPI de levadura, ya que cada uno se parece, respectivamente, a esa especie silvestre, pero no sucede así. Esto se debe a que al menos estos puentes de hidrógeno se establecen en su mayoría entre las unidades α/β 1 y 2 con la unidad 3 y ésta está más conservada a nivel de secuencia, por ello, no es de extrañar que el asa 3 de la levadura y el tripanosoma se parezcan entre sí. Por otro lado, cuando los enlaces no ocurren entre las unidades 1 y 2 con la 3, entonces se dan entre las mismas unidades 1 y 2 (que en las quimeras, provienen de una sola especie)

¿Podríamos por ello esperar que sólo con introducir este cambio mutacional, la TPI de levadura se comportara como la de tripanosoma y viceversa? De ser así, eso significaría que parte de lo que hace funcionalmente diferente a la TPI de *T. brucei* de la de *S. cerevisiae*, reside en las diferencias existentes entre los residuos de las primeras unidades α/β . Y sin embargo, estructuralmente, los monómeros son casi idénticos, tal vez porque los enlaces establecidos entre ambas sean equivalentes (la estructura abierta de las dos TPIs de levadura y de tripanosoma es un poco distinta, pero cerradas son casi iguales, Wierenga, 1992). Es posible, entonces, que las quimeras difieran considerablemente en la unión monómero-monómero, no sólo entre ellas sino entre cada quimera y aquella TPI silvestre de la cual se componen en su mayoría. Para saberlo con certeza será necesario realizar experimentos para determinar si las quimeras se presentan como dímeros o no y éstos en qué medida son estables. Se deberá contar con la estructura cristalográfica.

Esperaríamos que con los cambios introducidos en la TPI de tripanosoma, ésta se vuelva menos hidrofóbica y la de levadura más. Pero lo que ocurre es que la quimera LT se vuelve más hidrofóbica que la TPI de tripanosoma y que la otra quimera (TL). Esto se debe a que en las dos primeras unidades α/β del tripanosoma hay 28 residuos polares y en la levadura sólo 25. Al construir las quimeras quedan unidas las ocho unidades alfa con mayor contenido de residuos polares (en TL), al revés que la quimera LT (ver tabla 3.1 y figura 1.2).

Estas diferencias podrían ser importantes a nivel del plegamiento debido al efecto hidrofóbico diferencial.

En la tabla comparativa de las cuatro TPIs (Tabla 3.1) se ve que hay una distribución desigual de los tres residuos aromáticos. Así, mientras los triptofanos en *T. brucei* y en *S. cerevisiae* son cinco y tres respectivamente, en las quimeras ambas tienen cuatro. Es claro que un triptofano de la TPI de tripanosoma se encuentra en las dos primeras unidades α/β y es por eso que aparece después en la quimera TL. De la misma manera, se pueden rastrear los otros residuos para observar, por ejemplo, que una fenilalanina de la levadura pasa a la de *T. brucei* en la quimera LT. La TPI de *T. brucei* cede una tirosina a la TPI de *S. cerevisiae* en la quimera TL.

La quimera LT, en total, tiene dos residuos aromáticos más que TL. Estas diferencias afectan la absorbencia y fluorescencia de las quimeras, sobre todo porque ambas tienen el mismo número de triptofanos, que es el residuo más fluorescente y el que mejor se sigue espectrofotométricamente.

La quimera TL tiene un coeficiente de extinción molar de $1.043 \epsilon (280) (M^{-1} cm^{-1})$, en comparación con la TPI de levadura de $0.95 \epsilon (280) (M^{-1} cm^{-1})$. La quimera LT tiene un coeficiente de extinción molar de $1.21 \epsilon (280) (M^{-1} cm^{-1})$ y el de la TPI de tripanosoma es de $1.302 \epsilon (280) (M^{-1} cm^{-1})$. Los valores de las quimeras son cercanos a los de las TPIs silvestres respectivas. Se tuvieron que variar los protocolos de purificación sobre todo por las diferencias en el punto isoeléctrico de las quimeras. Esto hace que las quimeras reaccionen distinto a las silvestres en las columnas cromatográficas.

Por último, el peso molecular teórico de las quimeras casi no cambia en relación a las TPIs silvestres. Lo cual era de esperarse dado que las dos TPIs silvestres tienen pesos moleculares muy similares entre sí. En este sentido, no se han debido modificar los parámetros de la purificación de las quimeras.

Purificación de las quimeras.

Químera TL

Las quimeras se purificaron con base en los protocolos para la purificación de las TPIs silvestres de *T. brucei* y de *S. cerevisiae*. Como existen importantes diferencias entre las enzimas silvestres y las quimeras, se tuvieron que implementar algunas variaciones pertinentes, sobre todo en lo que concierne a las condiciones de corrida de las columnas cromatográficas y la precipitación por sulfato de amonio.

En el caso de la químera TL, se tomó como base la purificación de la TPI de *S. cerevisiae* (Vázquez et al, 1998, no publicado). En el primer lote de TL, el sobrenadante que salió de la centrifugación a 45000 rpm se llevó a 45% de sulfato de amonio. Pero dados los resultados de la purificación del primer lote, con el segundo decidimos llevar el sobrenadante de 45000 rpm a 50% de sulfato de amonio para lograr que más proteínas contaminantes precipitaran desde el principio. Lo mismo se hizo al incrementar el porcentaje de sulfato de amonio al que se llevó el siguiente sobrenadante: en el lote uno se llevó a 65% y en el dos a 70% de sulfato de amonio.

Una diferencia importante entre las purificaciones de los dos lotes de TL fue que tras la centrifugación del sobrenadante llevado a 65% de sulfato de amonio, se escogió la fracción del precipitado de 65% para pasarla por las columnas cromatográficas. En cambio, del segundo lote, se escogió la fracción del precipitado de 70% de sulfato de amonio. Este último valor de precipitación por sulfato de amonio se eligió porque a ese porcentaje se esperaba una mayor precipitación de la proteína ya que teníamos los antecedentes de la purificación del lote 1 y suponíamos que un valor intermedio daría buen resultado

Es probable que el rendimiento del segundo lote de TL se haya incrementado considerablemente debido a que se modificaron los porcentajes de sulfato de amonio con los que se realizó la purificación por precipitación diferencial. La primera columna por la que se pasaron las muestras fue la de exclusión molecular. Se siguieron las mismas condiciones en ambos casos y como se puede ver en la gráfica 3.1, el rango de las fracciones escogidas es aproximadamente el mismo (42-50 en el lote uno y 43-53 en el lote dos). En el caso del lote uno, 2.2 mL de la mezcla mencionada se pasaron por la siguiente columna, una Monoq pH 7.6. En esa ocasión, la columna se saturó y la mayor parte de la proteína no se pegó a la resina (fracción NP1). Con este antecedente de referencia, en el segundo lote decidimos dividir la mezcla del sobrenadante de 70% en dos partes iguales de 7.5 mL cada una y pasarlas independientemente por dos Monoqs a pH 7.6 que corrieran en las mismas condiciones (figuras 3.2 y 3.3). La mezcla común de ambas Monoqs se pasó por otra Monoq a pH 7.6 y finalmente, ya que la fracción estaba casi pura, se optó por cambiar el pH de la Monoq a 8.0 para propiciar que la proteína se quedara en la resina.

Lo que es claro es que las diferencias en el protocolo de purificación del lote 1 y del lote 2 determinaron que sólo en el segundo caso se tuviera una proteína parcialmente pura. Estas diferencias son, primero el precipitar a la quimera con 70% de sulfato de amonio; dividir la mezcla que se pasaría por la primera columna Monoq en dos partes iguales para que no se saturara, lo que impidió que la proteína se diluyera más como ocurrió en el caso de la fracción NP1 del primer lote.

Los pHs a los que se corrían las columnas no se cambiaron, lo que indica que esos valores son adecuados para obtener proteína pura. Lo que cambió, sin embargo, fueron los gradientes salinos con NaCl para despegar la proteína de la columna.

En el lote 1, la primera Monoq a pH 7.6 tuvo un gradiente de 0-100 mM, esa fue la columna que se saturó. En el lote 2 en cambio, la Monoq que se corrió en dos partes iguales de 7.5 mL a pH 7.6 con un gradiente de 0-100mM. En el lote 1 la segunda Monoq se trató con un gradiente 0-100mM.

En el lote2, después del primer dializado, la columna Monoq a pH 7.6 se trató con un gradiente de NaCl de 0-100mM, lo mismo que la última columna Monoq a pH 8.0

Las diferencias entre los gradientes salinos hizo que la proteína se despegara más de las columnas en el segundo lote.

Quimera LT.

En el caso de la quimera LT, dada su similitud con la TPI de *T. brucei*, se utilizó el protocolo para la purificación de esta última como base (Borchert, T.V et al, 1993) . A diferencia de la purificación de la quimera TL, en este caso sólo se requirió de un lote para obtener proteína pura. Después de la centrifugación de 45000 rpm, al precipitado obtenido se le agregaron 200 mM de NaCl. Esto con el fin de solubilizar a las proteínas que mantienen interacciones electrostáticas con la membrana celular, como es el caso de la TPI de tripanosoma, a diferencia de la TPI de *S. cerevisiae* y de *E.coli* que son solubles en las condiciones en las que se realiza la centrifugación a 45000 rpm. La solubilización de proteínas asociadas a membranas mediante NaCl es ventajosa ya que nos permitió deshacernos de la TPI de *E.coli* que puede ser difícil de eliminar. Este paso se puede realizar sin riesgo de perder TPI de *T. brucei*, por lo que en esta purificación también se precipitó con NaCl

A pesar de que el protocolo para TPI de *T. brucei* sólo toma las fracciones que tienen NaCl, nosotros decidimos rastrear también aquellas otras fracciones provenientes del sobrenadante de 45000 rpm para evitar el riesgo de perder la TPI quimérica, cuyas características podrían diferir lo suficiente de las de la silvestre como para que no se comportaran igual frente a la sal.

Tanto la parte con sal, como la parte sin sal (precipitado de 45000 rpm y sobrenadante de 45000 rpm respectivamente) se trataron con precipitación con sulfato de amonio. Una vez que se llevaron las fracciones parciales hasta 90% de sulfato de amonio, se procedió a medirle actividad enzimática y concentración de proteína a cada una. De ahí se decidió proseguir sólo con la parte de la purificación que tenía los 200mM de NaCl al principio, y de ésta, se escogió la fracción del precipitado de 60% de sulfato de amonio ya que era una fracción con un valor alto de actividad enzimática y de proteína, además de que la presencia de la sal eliminaba prácticamente la contaminación por presencia de TPI de *E.coli*.

Como se ve, los porcentajes de sulfato de amonio difieren de los utilizados para la quimera TL. Esto ya era claro desde los protocolos de purificación para las enzimas silvestres. El hecho de que concuerden hasta cierto punto las condiciones para las silvestres y las quimeras, nos había de que al menos en cuanto a los métodos de purificación se comportan de modo similar.

Después de pasar la quimera por la columna de exclusión molecular a pH 7.6, se obtuvo la mezcla que pasó por la CM-Sepharosa (intercambio catiónico) a pH 7.6. La mezcla de esta CM-Sepharosa se dividió en dos partes. Una de ellas se pasó por una CM-Sepharosa a pH 7.6 y la otra parte por una CM-Sepharosa a pH 7.0. La proteína se pegó mejor a pH 7.6

De la mezcla de la CM-Sepharosa pH 7.0 (no detallada en la tesis) se decidió poner una columna MonoQ, porque fue claro que con las columnas de intercambio catiónico estábamos perdiendo mucha proteína. Esto indicaba que la quimera no estaba reaccionando como se esperaba frente a las cargas negativas de la CM-Sepharosa y si la proteína no se pegaba a los radicales carboxilo de la columna de intercambio catiónico, entonces esperábamos que lo hiciera con los radicales amino de la MonoQ. Por alguna razón (amortiguador, punto isoeléctrico, enlaces no covalentes, etc.) el intercambio de cationes no se estaba dando en la proporción deseada, tal vez se debía a que la proteína no era tan positiva como se esperaba, ya que normalmente la TPI de tripanosoma se purifica con columnas tipo CM-Sepharosa. Además, no sólo se cambió el tipo de columna, sino que regresamos el pH una unidad más que la vez anterior y la corrimos a pH 8. Esta no fue una buena decisión y se terminó por perder lo que quedaba de proteína. Por ello tuvimos que regresar a la mezcla de la CM-sepharosa a pH 7.6 y poner una MonoQ con menor pH 7.4 para que la proteína se pegara más y en efecto así lo hizo aunque en muy bajas cantidades. La MonoQ, pH 7.4 se corrió en dos partes iguales en la misma columna (figuras 3.9 y 3.10). Justamente de la segunda parte de esa MonoQ a pH 7.4 se obtuvo la proteína pura, aunque en muy bajas cantidades.

Al parecer, la quimera LT es menos positiva en cuanto a la carga eléctrica total que la TPI de tripanosoma y esto sin duda se debe a las mutaciones introducidas en esta última

Los protocolos de purificación de las quimeras se pueden perfeccionar ahora que sabemos qué condiciones favorecen la selección de cada una

Los factores que afectan la purificación en columnas cromatográficas son, entre otros, la resina elegida (el adsorbente), la polaridad del solvente (pH del amortiguador), el flujo de elución, la velocidad de la corrida, el gradiente salino, etc.

En el caso de nuestras purificaciones se hicieron variaciones en cuanto al pH del eluyente, el gradiente salino, la velocidad de corrida, el flujo de elución y el tipo de resina. Además del tipo de columna involucrada, ya sea de exclusión molecular (Sephacryl S-300); MonoQ (intercambio aniónico) o CM-Sepharosa (intercambio catiónico); lo que más afectó la purificación por columnas cromatográficas fue el pH del amortiguador eluyente y los gradientes salinos. Esto se debe a que *hay un flujo constante de amortiguador que eluye la columna y separa en fracciones a la muestra corrida, por lo mismo, el equilibrio que se establece a lo largo de la columna es dinámico. Las moléculas que se han de separar están siendo constantemente pegadas y despegadas de la resina hasta que llega a un equilibrio dinámico en el que hay un número promedio de moléculas pegadas a la misma. Este equilibrio dinámico que se establece en la columna y que determina qué moléculas se quedan pegadas y qué otras salen, depende estrechamente del pH del amortiguador de elución, en particular, para las columnas de intercambio iónico.*

El pH del amortiguador se elige según el punto isoeléctrico de la proteína. Por debajo de ese valor, la proteína tiene una carga neta positiva por lo que se pega a resinas con carga negativa como la CM-Sepharosa. En cambio, un valor de pH por encima del punto isoeléctrico hace que la proteína quede con carga neta negativa y por lo mismo se puede pegar a una resina positiva como la MonoQ. Entre más se aleja del valor del punto isoeléctrico, más cargada está la proteína

Como parte del trabajo de afinar el protocolo de purificación de las quimeras, es necesario establecer muy bien los intervalos de pH que son óptimos para obtener la mayor concentración de proteína pura posible.

Para purificar a la quimera TL es mejor llevar el sobrenadante de 45000 rpm hasta 70% de sulfato de amonio. Después centrifugar la muestra a 12000 rpm por 15 minutos y utilizar ese sobrenadante para pasarlo por la Sephacryl S-300 a pH 7.6. Las MonoQs sucesivas pueden efectuarse a un pH que oscile entre 7.6 y 8.0

Para la purificación de LT es muy importante agregarle al precipitado de 45000 rpm los 200 mM de NaCl. Quizá sea siempre recomendable medir las fracciones sin sal para descartar la presencia de la TPI quimérica en ellas. En este caso se tendrá que evaluar si las columnas CM-Sepharosa son indispensables o ver si es posible utilizar las MonoQs desde el principio. Al parecer, el pH que estas columnas soportaron mejor fue el de 7.6, porque tanto 7 como 8 resultaron en una pérdida importante de proteína.

Experimentos de Caracterización de las Quimeras.

-Parámetros Cinéticos.

TPI	Vmax $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	G3P Km (mM)	Referencia
<i>T.brucei</i>	8644.58	0.72	Borchert, T.V. et al, 1993
<i>S.cerevisiae</i>	11536	1.27	Krietsch et al, 1970
TL	10.66 (promedio)	0.63 (promedio)	No publicado
LT	87.86	0.96	No publicado

Tabla 4.3. comparación de los parámetros cinéticos (Vmax y Km de las TPIs de *T.brucei*, *S.cerevisiae*, TL y LT.

Esperábamos que si las quimeras se plegaban como las silvestres entonces podíamos encontrar semejanzas en los parámetros cinéticos, sin embargo, la quimera TL no se acerca a los valores de la TPI de levadura. La Vmax es cerca de mil veces menor en la quimera, lo que implicaría que los cambios introducidos en ésta han afectado lo suficiente la conformación para que baje su actividad, pero no demasiado porque como vemos en la figura correspondiente, la enzima puede catalizar la reacción de isomerización

La Vmax de la quimera es menor que la de la TPI silvestre de levadura. Algo semejante ya se había observado con anterioridad en 1994, cuando Kishan y sus colaboradores (Kishan et al, 1994) construyeron una quimera con una TPI de *E.coli* a la cual se le había sustituido una unidad α/β por otra de la TPI de pollo. Esta quimera tenía una Kcat diez veces menor que la de la TPI silvestre de *E.coli*. Sin embargo, a pesar de contar con el cristal de la quimera, Kishan y colaboradores, no observaron un cambio conformacional que justificara esta diferencia, por lo que no explican el descenso en el valor de la Kcat de la quimera.

Nosotros no contamos aún con el cristal de las quimeras TL y LT que tendrán la última palabra en cuanto a la determinación de los cambios estructurales en las quimeras.

Aparentemente la quimera TL une con mayor afinidad al sustrato que la TPI silvestre de levadura, pero tarda más en catalizar la isomerización. Esto confirma que las dos primeras unidades α/β son importantes para el correcto plegamiento del monómero y de la interfase, lo que determina su función catalítica, en particular los parámetros cinéticos.

En el caso de la quimera LT, también se presenta un descenso en la actividad ya que la V_{max} de la quimera es cien veces menor que el de la silvestre. Asimismo, la K_m de la LT es 0.2 unidades mayor que la de *T.brucei*.

Las características cinéticas de las TPIs silvestres utilizadas se han modificado debido a la mutación introducida en las quimeras. La actividad ha disminuido, en estas últimas, pero aún se trata de enzimas capaces de catalizar la reacción de isomerización. Entre ellas, la quimera LT es *más eficiente que la TL, con una velocidad máxima ocho veces mayor y una K_m cercana a la del tripanosoma*. Esto podría ser evidencia de que en la TPI de tripanosoma el sitio activo, y más precisamente, su función, es más independiente de los aminoácidos de las primeras dos unidades α/β , así como de los enlaces que éstos establecen con el resto de la proteína. Dicho de otra manera, la introducción de las dos unidades α/β de la levadura no desestabilizan a la TPI de *T.brucei*. Sin embargo los resultados también se podrían interpretar de otra manera. Es posible que lo que haya sucedido es que, debido a la mutación, LT sea más eficiente que la otra quimera.

Entonces, ¿logramos cambiar las características cinéticas de la TPI de *T.brucei* y de la TPI de *S.cerevisiae*? de ser cierto esto tendríamos que pensar qué parte de la estructura es responsable de la eficiencia en la catálisis. Quizá aunque el sitio activo se codifique por otras dos unidades α/β , sean las dos primeras (tal vez junto con la tercera) las que contribuyan a determinar la V_{max} y la K_m . ¿A pesar de las mutaciones introducidas en las quimeras, se mantienen las características cinéticas de las TPIs silvestres? No, las características cinéticas no se mantienen, entonces las dos unidades intercambiadas contribuyen en el desempeño del sitio activo. Si la dimerización es crucial para la actividad, entonces las mutaciones afectan la actividad al cambiar la interfase de los monómeros

Un cambio en la V_{max} y un aumento en la K_m de una enzima mutante es algo muy común en los experimentos de mutagénesis dirigida (Blacklow et al, 1991; Borchert et al, 1994; Kishan et al, 1994, Schliebs et al, 1997) , por lo que no es raro que en nuestro caso también ocurra así.

-Estabilidad a la Dilución.

Los experimentos de estabilidad a la dilución están más relacionados con la estructura de la enzima que con su actividad catalítica. El estado dimérico de las proteínas es dependiente de la concentración de las proteínas, esto es, que en un experimento de estabilidad a la dilución, se observa claramente cómo al aumentar la dilución, baja estrepitosamente la actividad catalítica. La teoría que explicaría este fenómeno es que los monómeros se unen entre sí, sólo si hay altas

concentraciones de los mismos, lo que aumentaría la probabilidad de que se encontrasen. Los monómeros que no dimerizan bajo estas condiciones, son muy inestables a la dilución. A bajas concentraciones, los monómeros se disocian y pierden actividad.

En cambio otras proteínas diméricas son muy estables a la dilución y aun a bajas concentraciones siguen siendo dímeros y presentan actividad.

La TPI es activa casi únicamente como dímero y la dimerización puede o no estar estrechamente ligada a la concentración de la misma. Hay variantes importantes entre las distintas especies de TPI en cuanto a la estabilidad a la dilución. La TPI de *T. brucei* es inestable a la dilución y la de *S. cerevisiae* es muy estable en las mismas condiciones (ver gráfica 3.13 y 3.14). Una vez más la predicción respecto a la estabilidad de las quimeras, es que la TL sea estable a la dilución y la LT inestable, si esperamos que se comporten como las silvestres. Como se puede ver en las gráficas correspondientes, la curva de la actividad específica de TL desciende rápidamente conforme aumenta la dilución hasta llegar a un valor de dos micromolas de sustrato por minuto por mg de enzima. Es importante ver que en ningún momento, ni siquiera cuando la concentración de enzima era la máxima, tuvo mucha actividad; ésta llegó sólo a un máximo de 3.8 micromolas de sustrato por minuto por mg de enzima. Por esto se podría decir, que esta enzima nunca estuvo presente en forma dimérica. No sabemos hasta qué punto se modificó su estructura original con la dilución. Puede ser que hubiera estado en un principio como monómeros bien formados sin asociar y que tras la dilución perdieran su estructura. O bien que nunca estuvieron bien plegados los monómeros. Esto último es lo más probable.

Por otro lado, la quimera LT, también muestra un descenso en la actividad enzimática conforme aumenta la dilución, pero en este caso, la actividad original, llegó hasta 31.77 micromolas de sustrato por minuto por mg de enzima; lo que en principio nos habla de una posible dimerización inicial. La actividad específica baja paulatinamente hasta llegar a cero después de la dilución. En este caso, la baja en actividad puede deberse a la disociación de los monómeros seguida de la pérdida de estructura de los mismos, o simplemente a la pérdida de estructura secundaria en los dímeros.

De cualquier forma, es muy interesante que la predicción en cuanto a la estabilidad de las quimeras no se cumpliera. Esto podría querer decir, que la estabilidad o inestabilidad a la dilución en las TPIs de *T. brucei* y *S. cerevisiae*, yace en las unidades α/β que conforman la interfase. Las dos primeras unidades de la levadura serían las responsables de la estabilidad que muestra esta enzima a la dilución; y esto se comprueba porque al reemplazar dichas unidades en la TPI de *T. brucei*, se observa cómo esta quimera (LT) es menos inestable a la dilución. Y viceversa, la TPI de *S. cerevisiae*, con las dos primeras unidades de *T. brucei* (quimera TL), se vuelve inestable a la dilución.

Sabemos que la interfase de la quimera LT es más hidrofóbica que la TL, esto podría acarrear diferencias en el plegamiento del dímero debido al efecto hidrofóbico, que puede influir en la estabilidad de la TPI. Los enlaces establecidos con la unidad 3 no deberían ser la causa principal de esta diferencia en estabilidad, porque como dijimos, dichos enlaces están muy conservados.

-Reactividad con MMTS.

La TPI de *T. brucei* tiene una cisteína en la posición 14, que en presencia de MMTS se une covalentemente y se inhibe la actividad de la enzima. Dada la construcción de las quimeras, esperábamos que la quimera TL se inhiba en presencia del MMTS ya que también cuenta con la cisteína 14 y la cisteína 40, esta última reacciona con el MMTS aunque en menor grado (Garza-Ramos et al, 1996). (Ni la TPI de levadura, ni la quimera LT tienen dichas cisteínas, por lo que ninguna de las dos reacciona inhibiéndose con el MMTS). También se buscó comprobar la efectividad del MMTS para inhibir a la TL. De no inhibirse, eso se debería al componente mayoritariamente proveniente de la levadura.

Los resultados obtenidos concuerdan con las predicciones propuestas en ese sentido, de tal manera que la TPI de *T. brucei* se inhibe hasta presentar sólo el 3.5% de actividad residual. Por su parte, la TPI de *S.cerevisiae* no se inhibe apreciablemente en presencia de MMTS, por lo que su actividad está, hasta los 90 minutos tras la incubación, sobre los 95% de actividad residual.

La quimera TL se inhibe con el MMTS pero en menor proporción que la TPI de *T brucei*. Esto confirma la presencia de la cisteína 14 y de la cisteína 40 pero también es importante decir que la inhibición no es tan grande en la quimera por el efecto amortiguador del resto de la estructura (cuyo origen está en la levadura). Quizá en la quimera, la cisteína 14 esté menos expuesta al ataque del MMTS. Se requiere de la estructura cristalográfica para confirmarlo.

Por otro lado también se buscó descartar una posible contaminación con TPI de *E. coli* . En el caso de la quimera LT, esta contaminación es poco probable dado el tratamiento original con 200 mM de NaCl durante la purificación que solubiliza a las proteínas que tienen interacciones hidrofóbicas con la membrana celular tales como la TPI LT y la de tripanosoma. Como control para este experimento, se incubaron también las TPIs silvestres de *T. brucei* y de *S.cerevisiae*.

-Conclusiones.

En términos de la identidad molecular, y después de haber realizado los experimentos de caracterización de las quimeras, quizá podamos decir que la TPI es una molécula cuya forma tridimensional es el resultado de un largo proceso de evolución molecular que responde a la presión de selección de crear una estructura a la vez flexible y estable. Flexible porque los barriles α/β pueden realizar diversas funciones y estable porque es una conformación robusta, esto es, que los residuos que hacen de ella un barril α/β están repartidos a lo largo de toda la secuencia, por lo que tiene una gran capacidad de amortiguar mutaciones. Esto no es de sorprender si pensamos que puede tratarse de un motivo conformacional que surgió por divergencia evolutiva. Además de que las funciones que todas estas enzimas realizan son básicas e indispensables para el funcionamiento adecuado de la célula.

Existen datos referentes a mutaciones hechas sobre la TPI que no han afectado su estructura tridimensional, lo que también ocurre con las quimeras TL y LT. Presumimos que ambas quimeras, siguen siendo barriles α/β porque presentan actividad. Pero no sólo este motivo conforma la identidad molecular También son importantes la interfase que une a los monómeros y el sitio activo Creemos haber logrado cambiar la interfase de las TPIs silvestres de *T.brucei* y de *S.cerevisiae*, al haber intercambiado sus dos primeras unidades α/β , ya que este cambio no sólo afectó los enlaces comprometidos en la interfase, sino que implicó cambios en la hidrofobicidad que bien pudieron haber contribuido a la pérdida de estabilidad a la dilución de la TPI de *S.cerevisiae* y de *T.brucei*.

Por otra parte, aunque la región del sitio activo no está directamente involucrada en la mutación, es claro que al intercambiar las dos primeras unidades α/β , la actividad catalítica cambió. Vemos que para la quimera TL la V_{max} desciende en relación a la TPI de levadura, pero la K_m también baja. Esto puede estar relacionado con el hecho de que el sitio activo sea más complementario al sustrato y por lo mismo quede más firmemente unido al sitio activo en la quimera. Esto, sin embargo, no se traduce en un mejor desempeño, ya que como vemos la quimera es lenta y tiene poca actividad. TL es inestable a la dilución, lo que querría decir que hay problemas en la dimerización a bajas concentraciones, esto a su vez, repercutiría en la baja actividad catalítica de la quimera.

La quimera LT es cien veces más lenta que la TPI de tripanosoma y tiene una K_m más alta que esta última (ver tabla 4.3). La quimera LT es más veloz que la quimera TL y también es más estable a la dilución que ésta

Es probable que exista un compromiso entre la velocidad de catálisis y la estabilidad del dímero Tal vez no se pueda ser muy veloz en la catálisis ni muy afin al sustrato, sin poner en

entredicho la estabilidad de la estructura terciaria. Las TPIs silvestres son una muestra de la evolución concertada que tiende a favorecer la eficiencia en la catálisis, sin perder la estabilidad estructural. Las quimeras son una muestra de que incluso las mutaciones más fuertes en términos estructurales, como remplazar las dos primeras unidades $\alpha\beta$ a un barril de este tipo, no logran hacer que se pierda la actividad.

Ambas TPIs han existido por varios millones de años y han permitido la supervivencia de los organismos que las poseen. La TPI de *T.brucei* es más antigua que la de *S.cerevisiae*. Un proyecto interesante sería evaluar el desempeño catalítico y la estabilidad de la TPI en varios organismos y ver qué tendencias evolutivas existen en este sentido. Si se favorece más la estabilidad o los parámetros cinéticos.

Al parecer, las unidades $\alpha\beta$ 1 y 2 están muy relacionadas con la estabilidad a la dilución de la TPI, lo que apoyaría la hipótesis de que de existir los módulos de plegamiento, estas dos unidades tenderían a plegarse al mismo tiempo, antes o después del resto del monómero. También parece ser que estas dos unidades afectan los parámetros cinéticos de las enzimas, posiblemente mediante enlaces distantes o indirectamente, al determinar la estabilidad de la interfase. Recordemos que la TPI es activa casi exclusivamente en su forma dimerica.

En cuanto a la identidad molecular de las TPIs silvestres, creemos haber identificado algo acerca de dónde se concentran los residuos importantes para la estabilidad del dímero de la TPI. Aún falta mucho trabajo en cuanto a la determinación de la estructura y del patrón de plegamiento de estas quimeras.

Perspectivas.

- Mejorar los protocolos de purificación para ambas quimeras.
- Determinar si las quimeras son monómeros o dímeros.
- Caracterizar el plegamiento de las quimeras para comprobar la existencia de los módulos de plegamiento y verificar si se dan en arreglo 2+6 ó 6+2.
- Determinar la estructura de ambas quimeras
- Obtener los cristales de TL y LT.

Literatura citada.

Alberts, B., Bragg, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., J. Watson (1994) *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition Garland Press. USA. 1294 p.

An-Qiang Sun, K. Umit Yuksel and Robert W. Gracey (1993) Limited proteolysis of Triosephosphate Isomerase and Characterization of Catalytically Active Peptide Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, No 36. 26872-26878

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., John, A. Smith, Kain Struhl (eds.) (1997) *Short protocols in Molecular Biology*. 3rd. ed Wiley

Baldwin, R. L. (1995) The nature of Protein Folding Pathways. The classical versus the new view. *J. of Biomolecular NMR*, 5: 103-109

Banner, D. W., Bloomer, A., Petsko, G., Phillips, D., Pogson, C., Wilson, I., Conan, P., Furth, A., Milmar, J., Offord, R., Priddle, J y S Waley (1975) Structure of chicken muscle Triosephosphate Isomerase determined crystallographically at 2.5 Angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 225: 609-614

Blacklow, S.C., R.T. Raines, W.A. Lim., P D. Zamore y J.R. Knowles (1991) Stepwise improvements in catalytic effectiveness: independence and interdependence in combinations of point mutations of a sluggish TPI. *Biochemistry*, 30: 8470-8476

Borchert, T., Abagyan, R., Jaenicke, R., R. Wierenga (1994) Design, Creation and Characterization of a stable monomeric Triosephosphate Isomerase. *Proc Natl. Acad.Sci.USA*. 91 1515-1518

Borchert, T. Kishan, K., Zeelen, J., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R. R. Wierenga (1995) Three new crystal Structures of point mutation variants of Momo TIM: conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8. *Structure*, 3: 669-679

Branden, C I (1991) The TIM barrel- the most frequently occurring folding motif in proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 1: 978-983

Creighton, T E (1993) *Proteins: Structure and Molecular Properties*. 2nd. edition. Freeman.NY.

Delboni, L.F., S C.Mande, F. Renter-Delrue, V. Mainfroid, S. Turley, F.M.D. Villieux, J A Martial y V G J Hol (1995) Crystal Structure of recombinant Triosephosphate Isomerase from *B. stearmophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structure points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science*, 4: 2594-2604

Dill, K A y Hue Sun Chan (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*, 4: 10-18

Eder, J, K Karschne(1992) Stable Substructures of Eightfold beta-alfa barrel proteins: Fragment Complementation of Phosphoribosyl anthranilate Isomerase. *Biochemistry*, 31: 3617-3625

- Garza-Ramos G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., Tuena, M., A. Gómez puyou (1996) Species specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved aminoacid residues. The cysteines of Triosephosphate Isomerase. *Eur.J.Biochem.* 241: 114-120
- Godzick, A., J Skolnick, A Kolmski (1992) Simulations of the folding pathway of Triosephosphate Isomerase-type alfa-beta barrel proteins. *Proc Natl. Acad.Sci.* 89: 2629-2633
- Houbrechts, A., Moreau, B., Abagyan, R., Mainfroid, V., Préaux, G., Lamproye, A., Poncin, A., Goormtgh, E., Ruyschaert, J., Martial, J., K Goraj (1995) Second generation octarellins: two de novo (alfa beta)₈ polypeptides designed for investigating the influence of beta residue packing on the alfa-beta barrel structure stability. *Protein Engineering.* Vol 8, No3: 249-259
- Innis, M A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., y White T J (eds.) (1990) PCR Protocols a guide to methods and applications. Academic, San Diego. CA
- Kishan, R., Zeelen, J., Noble, M., Borchert, T., Mainfroid, V., Goraj, K., Martial, J., R.Wierenga (1994) Modular mutagenesis of a TIM-barrel enzyme: the crystal structure of a chimeric *E coli* TIM having the eight beta-alfa unit replaced by the equivalent unit of chicken TIM. *Protein Engineering.* Vol7, No.8: 945-951
- Kolhoff, M., A.Dhm y R. Hensel (1996) Tetrameric Triosephosphate Isomerase from Hypertermophilic Archaea. *FEBS Letters*, 383: 245-250
- Krietsch, W.K.G. et al (1970) The isolation and crystalization of a Yeast and Rabbit Liver Triosephosphate Isomerase and a cooperative characterization with the rabbit muscle enzyme. *Eur.J. Biochem* 168: 69-74
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227: 680-685
- Lambeir, A.M., Opperdoes, F.R. y R. Wierenga (1987) Kinetic properties of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. A comparison with Rabbit muscle and Yeast enzymes. *Eur J. Biochem* 168: 69-74
- Lattman, E.E. y George D Rose (1993) Protein Folding- what's the question? *Proc.Natl. Acad.Sci.*, 90:439-441
- Lolis, E. Alber, T. Davenport, R., Rose, D Hartmann, F. y G. Petsko (1990) Structure of Yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9 Angstrom resolution. *Biochemistry*, 29.6609-6618
- Mainfroid, V., Mande, S., Hol, W., Martial, J., K.Goraj (1996) Stabilization of Human Triosephosphate Isomerase by improvement of the stability of individual alfa helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein *Biochemistry*, 35. 4110-4117
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Fiere, J., Mande, S., Hol, W., Martial, J., K.Goraj (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol.Biol.*, 257: 441-456
- Maldonado, F. et al (1997) Crystallization and preliminary X ray analysis of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein Pept Letters*, 4: 139-144

- Mande,S.C. et al. (1994) Crystal Structure of recombinant human Triosephosphate Isomerase at 2.8 Angstrom resolution. *Protein Science*, 3: 810-821
- Nickbarg,E.B. y J.R. Knowles (1988) Triosephosphate Isomerase: Energetics of the reaction catalized by the Yeast Enzyme Exposed in *E.coli*. *Biochemistry*, 27: 5939-5947
- Noble,M E., Wierenga, R., Lambeir,A., Opperdoes,F., Thonissen,A., Kalak,K., Groendijk,H., y W. Hol (1993a) Structure of a Triosephosphate Isomerase from *E.coli* determined at 2.6 Angstrom resolution. *Acta Crystallog. Sect.D.*, 49: 403-417
- Pace,N,Vajdos,F., Grimsby,G., Gray P.T. (1995) How to measure and predict molar absorption. *Protein Science*, Vol 268,No.2: 345-347
- Rierveld,A. y S.Ferreira (1996) Deterministic Pressure Dissociation and Unfolding of Triosephosphate Isomerase: Persistent Heterogeneity of a Protein Dimer. *Biochemistry*,35: 7743-7751
- Richards,F.M. (1992) *Folded and Unfolded Proteins: an introduction in Protein Folding*. Creighton editor.Freeman.NY, 1-57
- Rose,G.G. y T. Creamer (1994) *Protein Folding: Predicting predicting*. Proteins: Structure Function and Genetics, 19: 1-3
- Saito,S.M Sasai, T Yomo (1997) Evolution of the folding ability of proteins through functional selection. *Proc.Natl Acad Sci.*, 21: 11324-11328
- Sanger,F, Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl,Acad.Sci.* 74: 5463-5467
- Schliebs,W., Abagyan,R, Jaenicke,R, R. Wierenga (1997) A double mutation at the tip of a dimeric interface loop of Triosephosphate Isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*, 36: 9655-9662
- Stryer,L. (1988) *Biochemistry*. 3rd ed. USA. 1089 p.
- Tabor,S., and Richardson,C.C (1989) Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7DNA polymerase by in vitro mutagenesis. *J.Biol.Chem.* 264: 6447-6458
- Tanaka,T., Kuroda,Y., Kimura,H., Kidokoro,S, H Nakamura (1994) Cooperative deformation of a de novo designed protein. *Protein Engineering*, Vol 7, No.8 969-979
- Velanker,S, Soumya,R, Rajesh,S., Suma,S, Hemalatha,B., Balaram,P., M. Murthy (1997) Triosephosphate Isomerase from *Plasmodium falciparum* The crystal structure provides insight antimalarian drug design. *Structure*,5: 751-761

Wilson Miles,E., Yutani,K., K. Ogasahara (1982) Guanidine Hydrochloride Induced Unfolding of the alfa subunit of Tryptophan Synthase an of the two proteolytic frgments: Evidence for Stepwise Unfolding of the two alfa domains. *Biochemistry*,21: 2586-2592^a.

Wierenga,R. K., M. Noble (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal Trisephosphate Isomerase. *J.Mol.Biol.*, 224: 1115-1126