



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD DE PLEGAMIENTO DE UNA PROTEÍNA  
QUIMÉRICA MUTANTE DE TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Trypanosoma cruzi*  
INTERCAMBIANDO LA REGIÓN DE AMINOÁCIDOS Q82 - R162 POR LA DE SU  
HOMÓLOGA DEL *T. brucei*.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JUAN LÓPEZ GUZMÁN

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2006



Director de tesis  
Dr. Edgar Vázquez Contreras

Asesor de tesis  
Dr. Marco A. Rodríguez Medina



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.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar Vázquez Contreras en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, en colaboración con el laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y la Dra. Maria Elena Chánez Cárdenas. Este trabajo esta financiado por los proyectos de CONACYT No. 40524-M y PAPIIT No. IN217206. Agradezco la beca otorgada por el proyecto de CONACYT.

*“El temor a lo porvenir  
se injerta en el deseo  
de sentir ese temor.”*

*E. M. Cioran*

# DEDICATORIAS

A mis padres Albino López Z. y Alejandra Guzmán G. por ser ejemplos de esfuerzo, lucha y dedicación; sus enseñanzas y consejos me han alentado a seguir adelante.

A mi hermana Claudia y a mis hermanos Francisco, Hugo, y Jesús por su cariño y comprensión y por compartir su vida conmigo.

A todas aquellas personas que me han acompañado incondicionalmente a lo largo de esta etapa de mi vida, la más importante; con quienes he pasado buenos y malos ratos, y que sin ellos, estoy seguro, no habría llegado a la culminación de este sueño: mis amigos.

# AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria Elena Chánez Cárdenas por dirigirme y asesorarme en todo lo relacionado con los experimentos de Biología molecular, durante el largo proceso que fue la construcción de la Quimera y por sus consejos durante la realización de este trabajo. Gracias por su confianza.

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras por aceptarme en su equipo de trabajo e iniciarme y dirigirme en este campo de estudio. Gracias por ser mi asesor.

A la QFB Beatriz Aguirre y al M en IBB Francisco Zarate por su valiosa ayuda en la purificación de la quimera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me dio una segunda oportunidad para continuar mis estudios.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iV
RESUMEN.....	V
<b>CAPITULO I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
A. LAS PROTEÍNAS.....	1
B. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS.....	2
1. EL ENLACE PEPTÍDICO.....	2
2. ESTRUCTURA PRIMARIA.....	3
3. ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	3
4. ESTRUCTURA TERCIARIA.....	3
5. ESTRUCTURA CUATERNARIA.....	4
C. EL PLEGAMIENTO.....	5
1. GENERALIDADES.....	5
2. MODELOS QUE EXPLICAN EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS...	6
3. DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN.....	8
4. TECNICAS QUE AYUDAN A SEGUIR LAS TRANSICIONES DEL PLEGAMIENTO.....	10
5. EL GLOBULO FUNDIDO.....	11
6. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL PLEGAMIENTO ANÓMALO DE LAS PROTEÍNAS (EPAP's).....	12
D. MODELO DE ESTUDIO: LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA (TIM).....	13
1. IMPORTANCIA Y FUNCIÓN EN LA GLUCÓLISIS.....	13
2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.....	14
E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
<b>CAPITULO II. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
A. OBEJTIVO GENERAL.....	17
B. OBJETIVO PARTICULAR.....	17
C. HIPÓTESIS.....	17
<b>CAPITULO III. MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
A. CONSTRUCCION DE LA PROTEINA QUIMERICA MUTANTE Q82-R162.....	18
Q82-R162.....	19
B. LIGACION AL PLÁSMIDO.....	20
C. SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	20
D. SOBREEXPRESIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	20
E. PURIFICACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	21

F. CARACTERIZACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	22
1. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.....	22
2. ESTUDIOS DE REVERSIBILIDAD.....	22
a. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA.....	22
b. ACTIVIDAD CATALITICA.....	23
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
A. CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA MUTANTE Q82-R162.....	25
B. LIGACIÓN AL PLÁSMIDO.....	26
C. SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	26
D. SOBREENPRESIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	29
E. PURIFICACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	31
F. CARACTERIZACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.....	31
1. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.....	31
2. ESTUDIOS DE REVERSIBILIDAD.....	31
a. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA.....	31
b. ACTIVIDAD CATALITICA.....	35
<b>CAPITULO V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
A. CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMERICA MUTANTE Q82-R162.....	36
B. PURIFICACIÓN.....	37
C. ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD DE PLEGAMIENTO.....	37
1. ESTADO NATIVO.....	37
2. ESTADO DESNATURALIZADO.....	37
3. RENATURALIZACIÓN.....	38
<b>CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPITULO VII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>40</b>
APÉNDICE A.....	41
APÉNDICE B.....	44
APÉNDICE C.....	46
REFERENCIAS.....	48



## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Reacción de condensación para la formación de un enlace peptídico.....	2
2. Niveles estructurales de la Triosafofosato Isomerasa.....	4
3. Mecanismo catalítico de la TIM.....	13
4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de Tb TIM VS Tc TIM.....	16
5. Estrategia utilizada para la construcción de la Proteína Quimérica Mutante de Triosafofosato Isomerasa.....	19
6. Reacción general del sistema acoplado para la determinación de la actividad catalítica de la TIM.....	23
7. Monitoreo de la construcción de la TIM Quimérica Q81-R162.....	25
8. Ligación al plásmido del gen mutado.....	26
9. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la TIM Quimérica VS Tb TIM y Tc TIM.....	27
10. Modelo de la estructura secundaria del dímero de la Quimera TIM Q82-R162.....	28
11. Perfil de elusión de la TIM Quimérica en la columna de CM-Sepharose.....	30
12. Gel de poliacrilamida al 12.5 % con muestras de las fracciones que presentan los valores más altos de absorbancia.....	30
13. Espectros de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 en su estado nativo excitando a 280 nm y a 295 nm.....	32
14. Espectros de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 desnaturalizada con 6 M de Gdn-HCl excitando a 280 y 295 nm.....	33
15. Espectros de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 renaturalizada y en estado nativo diluido.....	34
16. Actividad catalítica de la TIM Quimérica Q82-R162.....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Comparación del patrón de plegamiento de la TIM de <i>T. cruzi</i> y de <i>T. brucei</i> ....	15
2. Condiciones de reacción para cada etapa de PCR y Protocolo general de una reacción de PCR.....	19
3. Valores de intensidad de fluorescencia, longitud de onda máxima, y SCM para los estados nativo y desnaturalizado de la TIM Quimérica Q82-R162.....	33
4. Valores de intensidad de fluorescencia, longitud de onda máxima, y SCM para los estados nativo diluida y renaturalizado de la TIM Quimérica Q82-R162.....	34
5. Actividad catalítica de la TIM Quimérica Q82-R162.....	35

## ABREVIATURAS

TIM	Triosafosfato isomerasa
TcTIM	Triosafosfato isomerasa del <i>Trypanosoma cruzi</i>
TbTIM	Triosafosfato isomerasa del <i>Trypanosoma brucei</i>
Gdn- HCl	Clorhidrato de guanidina
AND	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
N	Estado nativo
U	Estado desplegado
SDS	Duodecil sulfato de sodio
DC	Dicroísmo circular
EEB	Encefalopatía epongiforme bovina
EPAP's	Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de las proteínas
GAP	Gliceraldehido -3- fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
ATP	Adenosin de trifosfato
N2	Dímero nativo
N2*	Dímero NO nativo
2M	Monómeros compactos
2U	Monómeros desnaturalizados
A	Agregado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
LB	Luria Bertami
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
DSC	Calorimetría de barrido diferencial
MES	Ácido 2-[N- Morfolino] etansulfónico
EDTA	Ácido etilendiamin tetraacético
DTT	Ditiotreitol
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
TEA	Trietanolamina
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
CM	Carboximetil
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero de bovino
SCM	Centro de masa espectral
AE	Actividad específica
IF	Fluorescencia intrínseca
pI	Punto isoeléctrico
α-GDH	α-glicerol deshidrogenasa
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NAD <sup>+</sup>	Nicotin adenin dinucleótido oxidado
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatados
dNMP's	Desoxinucleotidos monofosfatados

## RESUMEN

En este trabajo se construyó la proteína quimérica mutante de Triosafosfato Isomerasa (TIM) Q82-R162 del *Trypanosoma cruzi*, intercambiando la región que va de la Glutamina 82 a la Arginina 162 de la TIM de *T. cruzi* por la región equivalente de su homóloga la TIM del *T. brucei* para estudiar si la región mutada está involucrada con la reversibilidad de plegamiento. El desplegamiento de la TIM Q82-R162 fue inducido por Gdn-HCl y fue seguido por cambios en la intensidad de Fluorescencia intrínseca y de la actividad catalítica, tanto para el estado nativo como para el renaturalizado. Los resultados de Intensidad de fluorescencia nos indican que la estructura tridimensional de la TIM Q82-R162 en estado nativo no presenta cambios significativos con respecto a la TcTIM silvestre; por otra parte, los resultados de actividad catalítica indican que la mutante presenta una disminución de un 30 % con respecto a la TcTIM silvestre. La actividad específica de la mutante renaturalizada es mucho menor a la del estado nativo (50%), esto quiere decir que: 1) la proteína quimérica mutante TIM Q82-R162 presenta un plegamiento que no es completamente reversible en las condiciones exploradas, y 2) que los residuos de la región mutada (Glutamina 82 – Arginina 162) pueden estar relacionados con el proceso de irreversibilidad de plegamiento en esta enzima.

# CAPITULO I

## ANTECEDENTES

### A. LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son el producto de expresión de la información que está contenida en el genoma de cada especie. Aunque se ha logrado descifrar el genoma de varios cientos de especies no deja de impresionar la cantidad de información que se encuentra almacenada en la simple secuencia de bases púricas y pirimídicas. En el genoma está escrito cual debe ser el primer aminoácido de cada proteína, cuáles son los que lo siguen y cuál es el final. Esto es sorprendente ya que en promedio cada proteína está formada por aproximadamente 200 aminoácidos, y en cada célula existen miles de proteínas diferentes <sup>1</sup>.

El origen de las proteínas únicamente se puede explicar por medio de mecanismos evolutivos en los que, a través de miles de años de ensayo y error, se formaron y persistieron únicamente aquellas biomoléculas que podían efectuar las funciones que se requieren para que un organismo sobreviva. Las proteínas que surgieron hace mucho tiempo son entonces las que, con modificaciones relativamente pequeñas, llegaron hasta nuestros días. A la complejidad del origen de las proteínas se añade el hecho de que en las células hay recambio de estas biomoléculas, y sin embargo existe una cantidad relativamente constante de las mismas en todo momento. Lo anterior implica que en toda la vida de las células la síntesis de las proteínas es un proceso constante <sup>2</sup>.

En términos muy simples las células son esencialmente una máquina programada para resintetizar las moléculas que le constituyen. Por otra parte, se sabe que cada una de esas proteínas tiene la capacidad para llevar a cabo una función específica. Pero ¿qué es una proteína? Una proteína es un tipo de biomolécula, el más abundante en la célula, capaz de realizar un gran número de funciones ya sea formando parte de la estructura básica de los tejidos (músculo, tendones, piel, uñas, etc.) o desempeñando funciones metabólicas y reguladoras tales como las asimilación de nutrientes, el transporte de oxígeno y lípidos en la sangre, la inactivación de materiales tóxicos, entre otras. Estas biomoléculas están formadas principalmente por átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, en algunos casos contienen azufre, fósforo, hierro, magnesio o cobre.

Las proteínas son los elementos que definen la identidad de cada ser vivo (fenotipo) ya que son la expresión del código genético contenido en el ADN (genotipo) y del sistema de reconocimiento de partículas propias y extrañas en el sistema inmunológico <sup>2</sup>.

Una proteína puede formar complejos con otras biomoléculas formando, por ejemplo, glucoproteínas con los carbohidratos, lipoproteínas con los lípidos, ribonucleoproteínas con los ácidos nucleicos y asociaciones de una proteína con otra originado homooligómeros o heterooligómeros formados por cadenas de aminoácidos iguales o diferentes respectivamente <sup>2</sup>. De lo anterior se puede deducir que las posibilidades de generar funciones a través de la conjugación de proteínas con ellas mismas y con otras biomoléculas en la naturaleza son inmensas.

## B. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

### 1. El Enlace Peptídico.

Las proteínas son polímeros cuyas bases monoméricas son  $\alpha$ -aminoácidos los cuales están unidos entre ellos por enlaces peptídicos que son uniones de carácter covalente que se dan entre el grupo carboxilo de un aminoácido (COOH) y el grupo amino (NH<sub>2</sub>) del siguiente, generando así el desprendimiento de una molécula de agua (Figura 1). El enlace peptídico presenta un comportamiento similar al de un enlace C=C ya que presenta cierta rigidez que inmoviliza en un plano los átomos que lo forman <sup>3</sup>. Principalmente se ha encontrado que sólo 20 tipos diferentes de estos  $\alpha$ -aminoácidos son los que forman parte de las proteínas.

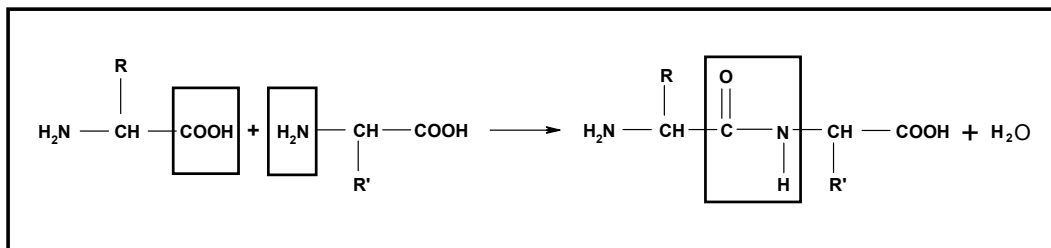


Figura 1. Reacción de condensación para la formación de un enlace peptídico. Se establece entre el grupo carboxilo (COOH) de un aminoácido y el grupo amino (NH<sub>2</sub>) del aminoácido inmediato, con la pérdida de una molécula de agua.

Debido al mecanismo de formación del enlace peptídico una cadena polipeptídica, independientemente de su longitud, siempre tendrá un extremo amino y uno carboxilo. En todas las proteínas los aminoácidos se encuentran unidos por enlaces peptídicos dando lugar a niveles estructurales que describimos a continuación.

**2. Estructura Primaria.** Es la secuencia de residuos de aminoácidos correspondiente a una proteína. Indica qué aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que se encuentran. Si conocemos la secuencia de un gen es posible obtener la secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína utilizando el código genético como tabla de conversión <sup>3</sup>.

**3. Estructura Secundaria.** Se refiere al ordenamiento espacial de la estructura primaria a través de diversos tipos de interacciones, generalmente puentes de Hidrógeno, dando lugar a la formación de estructuras repetitivas regulares y estructuras no repetitivas. Las estructuras no repetitivas son conocidas como asas, rizos o bucles y poseen un grado de regularidad menor que las de tipo repetitivo <sup>4</sup>. Las estructuras de tipo repetitivo encontradas comúnmente en las proteínas son las  $\alpha$ -hélice y las hojas  $\beta$ .

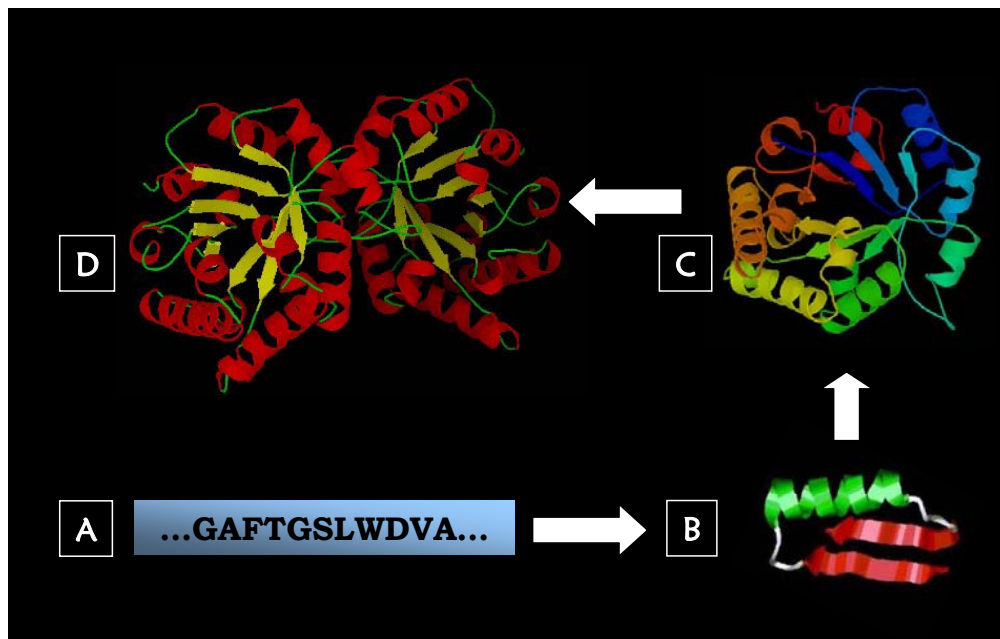
- ◉  **$\alpha$  - hélice.** Es una estructura que se forma cuando la estructura primaria se enrolla helicoidalmente sobre si misma. En esta estructura se forman enlaces o puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de un residuo de aminoácido y el grupo amino del cuarto aminoácido que le sigue en la secuencia.
- ◉ **Hebras- $\beta$ .** En esta conformación los aminoácidos forman una cadena plana conocida comúnmente como conformación  $\beta$ -plegada. En esta conformación, a diferencia de lo que sucede en las  $\alpha$ -hélices, los puentes de hidrógeno se forman entre diferentes sectores del polipéptido.

Existe un tipo especial de modelo molecular para resaltar la estructura secundaria de las proteínas en el cual se representan los segmentos de lámina  $\beta$  como cintas en flecha y las  $\alpha$  hélices como cintas en espiral (ver figura 2).

**4. Estructura Terciaria.** Es la disposición tridimensional de todos los átomos que componen la proteína a través de un empaquetamiento de las estructuras repetitivas e irregulares para formar la conformación nativa (N) y es en muchos casos la responsable directa de las propiedades biológicas de las proteínas. Esta conformación se mantiene estable gracias a la

existencia de enlaces no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos o interacciones de Van der Waals. Para las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica la estructura terciaria es la máxima información estructural que se puede obtener. La estructura terciaria es una disposición precisa y única en el espacio y se forma a medida que la proteína se pliega <sup>5</sup>.

**5. Estructura Cuaternaria.** Únicamente está presente si la proteína en cuestión está formada por más de una cadena polipeptídica. Para muchas proteínas los niveles de estructura que se mencionaron anteriormente son suficientes para adoptar la conformación (N), que es la única biológicamente activa o funcional, en cambio para otras únicamente se logra una estructura con actividad biológica cuando se unen dos o más cadenas polipeptídicas, iguales o diferentes, para dar origen a la estructura cuaternaria de la proteína y que denominamos oligómero, el cual es un complejo proteico formado por la unión de varias cadenas polipeptídicas independientes que poseen una estructura terciaria parcial preformada. Cada una de las cadenas polipeptídicas que forman el oligómero recibe el nombre de monómero <sup>3,4</sup>. La enzima con la que se desarrolló este trabajo, la Triosafosfato Isomerasa (TIM), es un oligómero (ver figura 2).



**Figura 2. Niveles estructurales de la Triosafosfato Isomerasa.** A) Estructura primaria: sólo se muestra un fragmento. B) Estructura secundaria: Las asas representan estructuras de tipo no repetitivo; el espiral representa una  $\alpha$ -hélice, las flechas representan hojas  $\beta$  paralelas y son estructuras de tipo repetitivo. C) Estructura terciaria: se muestra un monómero de la TIM y D) Estructura cuaternaria: Dímero de la Tc TIM, tomada del PDB, 1TCD

## C. EL PLEGAMIENTO

### 1. Generalidades.

La cadena polipeptídica tiene como funciones primarias la adquisición espontánea de la estructura tridimensional y en el caso de proteínas oligoméricas, la asociación de subunidades. Es decir que la función de una proteína está determinada por la disposición espacial definida de su secuencia de aminoácidos de modo que es ahí en donde se encuentra la información necesaria para determinar la estructura tridimensional<sup>6</sup>. A esa conformación capaz de realizar una función biológica se le denomina N y es en la que una proteína permanecerá la mayor parte de su existencia. El plegamiento es un proceso en el cual una proteína adquiere una conformación tridimensional de mínima energía conocida como N. El plegamiento se considera vital pues sólo en N las proteínas pueden llevar a cabo su función biológica. Este es un proceso espontáneo y debido a la constante demanda de proteínas en las células ocurre en el orden de milisegundos a segundos. El principal interés en el estudio del plegamiento radica en poder predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos <sup>4</sup>.

A la fecha el mecanismo de plegamiento es tan complejo que no es entendido a detalle ya que cualquier molécula proteica podría adoptar un número virtualmente astronómico de conformaciones tridimensionales diferentes. Si una proteína hiciera una búsqueda azarosa entre las diferentes conformaciones posibles el tiempo que se requeriría para obtener una proteína nativa sería de millones de años, sin embargo sabemos que plegarse a una proteína le lleva de milisegundos a segundos <sup>6</sup>. Esta observación se conoce como la paradoja de Levinthal y plantea la existencia de rutas preferenciales de plegamiento, pues de todas las conformaciones posibles sólo algunas son relevantes. Cada proteína tiene una estructura N única, o bien, un número limitado de conformaciones preferidas que fluctúan rápidamente entre ellas hasta adquirir la termodinámicamente más estable. Esta información es de gran utilidad ya que ha establecido que las características principales con las que debe cumplir el plegamiento son encontrar la conformación con el mínimo de fluctuaciones (de menor energía libre)<sup>7</sup> y hacerlo en un tiempo biológicamente relevante.

El plegamiento de las proteínas puede compararse con una reacción química en la cual el reactante, la proteína desplegada (U, de “unfolded”) se convierte en el producto, la proteína plegada (N); en el proceso puede o no haber intermediarios y a detección y caracterización de los intermediarios estables que aparecen en las rutas desde el estado N



(desnaturalización) o hacia él (renaturalización), son preguntas centrales en los estudios de plegamiento <sup>7</sup>.

La existencia de estados intermediarios transitorios encargados de dirigir de algún modo la ruta de plegamiento de las proteínas han generado estudios enfocados a identificar y establecer la estructura de estos estados y así poder determinar los factores que guían el plegamiento de las proteínas<sup>8</sup>. Estos estudios han permitido establecer modelos que tratan de explicar las rutas a través de las cuales las proteínas adquieren su estructura nativa y funcional. Se sabe en la actualidad que en el plegamiento *in vivo* existen factores como las chaperonas que facilitan el proceso pero no lo dirigen, sin embargo algunas proteínas pueden plegarse *in vitro* sin necesidad de energía o información adicional. Lo anterior se ha concluido a partir de experimentos de desnaturalización que consisten en ocasionar que la proteína en cuestión pierda su estructura tridimensional.

## 2. Modelos que explican el plegamiento de las proteínas

Entre los modelos propuestos que describen la transición de la proteína de un estado desplegado hacia la formación de su estado Nativo los más importantes son los siguientes:

① **Modelo del colapso hidrofóbico:** Supone que el primer suceso relevante es el colapso al azar del polipéptido para ocultar los residuos hidrófobos. A partir del estado colapsado se va organizando el polipéptido y aparece un re-arreglo de la estructura secundaria hacia la de los intermediarios y finalmente a la del estado nativo <sup>10</sup>.

② **Modelo de nucleación:** Implica la formación de un núcleo de la cadena formado por residuos vecinos hidrofóbicos tanto en la estructura secundaria local como en las interacciones terciarias de largo alcance, seguida de un rápido avance de la cadena polipeptídica hacia el estado plegado. En este modelo la formación del núcleo es la limitante de este paso <sup>11</sup>.

③ **Modelo difusión-colisión:** Sugiere que la nucleación ocurre en pequeñas partes de la molécula formando microdominios lo suficientemente cortos para que todas las posibles conformaciones puedan ser buscadas rápidamente pero no todas son estabilizadas. Varios de estos microdominios tienden a colisionar, siendo el paso final del proceso de plegamiento la formación de la estructura terciaria exacta, incluyendo el empaquetamiento cercano de las cadenas laterales. El plegamiento es realizado por una serie de pasos de difusión-colisión <sup>12</sup>.

① **Modelo de plegamiento en etapas:** Implica varios niveles de estructuración donde los diversos elementos estructurales son formados y ensamblados. Se requiere de una secuencia de eventos bien definidos asignando elementos estructurados con una relativa estabilidad a cada etapa del proceso <sup>13</sup>.

① **Modelo jerárquico:** Propone que el plegamiento comienza con elementos plegados transitoriamente que no son necesariamente estables pero que tienen mayores tiempos de población que las otras conformaciones alternativas. Estas estructuras interactúan, asociándose y estabilizándose mutuamente, para producir intermediarios cada vez más complejos que crecen hasta finalmente formar la estructura nativa. Este modelo plantea que durante los primeros milisegundos del plegamiento la molécula se compacta y aparecen elementos de estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$ ). La siguiente etapa involucra la formación de puentes de Hidrógeno estables y la nucleación de los aminoácidos hidrofóbicos al solvente, en esta etapa inicia la formación de la estructura terciaria y por lo tanto pueden presentarse intermediarios con estructura muy semejante a la nativa la cual es la etapa más lenta del plegamiento <sup>14</sup>.

① **Modelo “*Framework*”:** El plegamiento es secuencial y está dirigido a lo largo de una o unas pocas vías con intermediarios estructurales únicos. Comienza con la formación de elementos con una estructura secundaria estable basada en puentes de hidrógeno, la cual es presumiblemente estabilizada por un pequeño número de interacciones terciarias específicas. El desarrollo subsiguiente de interacciones adicionales lleva a la formación de la estructura terciaria nativa de la proteína <sup>15</sup>.

① **Modelo del Embudo de Plegamiento:** Examina los detalles del mecanismo de plegamiento basado en simulaciones. Reemplaza el concepto de vía de plegamiento de eventos secuenciales por el concepto de embudo de plegamiento de eventos paralelos. Un embudo de plegamiento representa las múltiples vías de plegamiento que puede tomar una proteína determinada bajo una condición en particular. El paisaje de energía corresponde a la energía libre de cada conformación en función de sus grados de libertad y puede tener una amplia cantidad de formas diferentes, con colinas, valles, canales, planos, fosos, etc., que representan barreras de energía, trampas cinéticas o caminos más directos al estado nativo. El eje vertical del embudo representa la suma de las energías libres de los puentes de hidrógeno, pares iónicos, interacciones hidrofóbicas, solvatación, etc., para una cadena en una conformación particular. El área lateral de un

paisaje de energía, a una profundidad dada, representa el número de conformaciones que tiene la cadena polipeptídica con esa energía libre. Cada conformación está representada por un punto en esta superficie de energía multidimensional. La forma del embudo de plegamiento depende tanto de la secuencia de aminoácidos de la proteína, como de las condiciones externas, determinando el mecanismo de plegamiento<sup>16</sup>.

### 3. Desnaturalización y Renaturalización.

Las proteínas son aisladas de la célula que las produce en su estado nativo de modo que el plegamiento de las mismas *in vitro* es un proceso que debe estudiarse por medio de experimentos de desnaturalización y renaturalización.

Se le conoce como **desnaturalización** al cambio en la conformación de una proteína debida a efectos en las interacciones no covalentes pero sin cambio alguno en las interacciones covalentes (en la estructura primaria). Los cambios moderados en las condiciones ambientales (pH, temperatura, presión, etc.) pueden tener o no efecto sobre la estructura nativa de las proteínas, sin embargo, si el cambio de alguna de estas variables excede un valor crítico la proteína se desnaturaliza <sup>17</sup>. Una proteína se desnaturaliza cuando pierde sus diversos niveles de organización estructural.

Generalmente la desnaturalización de una proteína es causada por un colapso en la estructura original, aunado a la ruptura de los enlaces iónicos, las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno, sin cambio en la estructura primaria aunque perdiendo total o parcialmente la estructura nativa. Este efecto va acompañado de la disminución de la solubilidad, cambios en las propiedades espectroscópicas y la pérdida de la función biológica <sup>5</sup>.

La finalidad de estudiar el proceso de desnaturalización de las proteínas se encuentra en determinar: 1) la estabilidad conformacional de éstas bajo diferentes condiciones de desnaturalizante, y 2) seguir la ruta de plegamiento/desplegamiento.

Actualmente se conocen diferentes agentes desnaturalizantes de los cuales a continuación se mencionan los más utilizados en el estudio del plegamiento de las proteínas globulares.

- **Detergentes.** El Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) es un agente que se asocia con los residuos no polares de la proteína e interfiere en las interacciones hidrofóbicas, responsables de la estructura nativa.

- **Agentes químicos.** Son moléculas cargadas iónicas (guanidina) o neutras orgánicas (urea), que incrementan la solubilidad de las sustancias no polares en agua. Son efectivos debido a su capacidad para romper las interacciones hidrofóbicas de la estructura Nativa aunque su mecanismo de acción no se ha descifrado. El clorhidrato de guanidina y la urea son los agentes más usados en la desnaturalización de las proteínas.
- **Variaciones de pH.** Si varía el pH de una solución que contiene proteína se originan cambios en los estados de ionización de las cadenas de los aminoácidos cargados.
- **Temperatura.** Aumentar o disminuir la temperatura del medio en el cual se encuentran las proteínas ocasiona que se hagan sensibles en sus propiedades conformacionales debido al aumento en la energía cinética.

Los experimentos de desnaturalización se basan en que la estructura de la proteína cambia conforme se incrementa la condición desnaturalizante, de manera que se modifica la proporción entre el número de moléculas de proteína en estado nativo y desnaturalizado obteniendo así un perfil de desnaturalización.

Se le conoce como **renaturalización** al fenómeno en el cual la proteína recupera su conformación nativa original al eliminar los agentes que causan la desnaturalización encontrando que las características de la proteína antes y después de la desnaturalización son indistinguibles, siempre y cuando el proceso sea 100 % reversible. Cuando hablamos de un proceso 100 % reversible nos referimos a que en un proceso de plegamiento-desplegamiento las condiciones deben ser tales que la transformación de N a U sea tal que, al regresar a las condiciones que favorecen la presencia de N, la estructura obtenida sea indistinguible de la que se partió originalmente. En general las proteínas pequeñas se desnaturalizan reversiblemente mientras que las proteínas de mayor tamaño lo hacen irreversiblemente o son parcialmente reversibles además de que se agregan o se precipitan antes de que la condición desnaturalizante sea modificada a su estado original <sup>18</sup>.

El objetivo de estudiar una reacción reversible tiene como fin el conocer los cambios energéticos asociados al proceso de plegamiento así como la identificación de los intermediarios involucrados en el mismo, por lo tanto, el primer resultado a presentar en todos los estudios de plegamiento de proteínas es demostrar la completa reversibilidad del proceso.

De manera análoga a la desnaturalización, cuando en la renaturalización se disminuye la condición desnaturalizante, en general, se modifica la proporción entre el número de moléculas que se encuentran en el estado N y U, y se puede obtener así un perfil de desnaturalización o renaturalización según sea el caso.

#### 4. Técnicas que ayudan a seguir las transiciones del plegamiento.

Al desnaturalizar una proteína es necesario seguir una señal que sea sensible a los cambios en la conformación de la proteína nativa. Dentro de los recursos experimentales más importantes se encuentran los siguientes:

① **Actividad Biológica.** Es un método sensible, rápido y específico que ayuda a determinar las transiciones durante el proceso de desnaturalización y replegamiento de proteínas y esta basado en el principio de que la proteína sólo lleva a cabo su función cuando se encuentra en estado nativo.

① **Espectroscopia UV-VIS.** Se utiliza principalmente para el estudio de moléculas con grupos cromóforos donde la sensibilidad del método depende del coeficiente de extinción de cada proteína. Para un coeficiente de extinción de  $10^4$  el límite de detección es de 0.5 nmol utilizado un espectrofotómetro convencional y esperando 0.01 de absorbancia. Las proteínas absorben luz UV-VIS a 280nm.

① **Fluorescencia.** El fenómeno conocido como fluorescencia es aquel en el cual los compuestos que absorben luz la emiten alargando su longitud de onda. En las proteínas los fluoróforos naturales son los residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano). La fluorescencia es cerca de 100 veces más sensible que la espectrofotometría UV-VIS para la detección de bajas concentraciones de proteína. La fluorescencia del triptofano (el residuo al cual se debe la mayor parte de la señal de fluorescencia de las proteínas), se utiliza para seguir la movilidad interna de la proteína y la exposición o exclusión de los residuos aromáticos del solvente.

① **Dicroísmo Circular (DC).** Es una propiedad de la actividad óptica de las moléculas. Es un método ampliamente utilizado para determinar el contenido de estructura secundaria en las proteínas. Esta propiedad se observa en el esqueleto polipeptídico en la región del espectro UV cercano (270-300nm) y UV lejano (170-250nm) en sus diferentes estructuras secundarias. Las  $\alpha$ -hélices se caracterizan por

presentar señal negativa a 222 nm y señales positivas alrededor de 192 nm. Las señales para las hojas  $\beta$  son similares pero menos apreciables.

① **Filtración en Gel.** Esta técnica es ampliamente utilizada para la determinación del tamaño de las moléculas que participan en una reacción de desnaturalización de proteínas. Comúnmente se realiza con geles comerciales como Sephadex, Sephacryl y Biogel. Estos geles tienen un tamaño de poro tal que la proteína puede ser fácilmente separada de las otras moléculas por diferencia de tamaño de manera efectiva.

① **Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).** Esta técnica es utilizada para determinar los datos termodinámicos de la naturaleza del desplegamiento de las proteínas y de las fuerzas involucradas en estabilizar a las proteínas.

## 5. El glóbulo fundido.

Diversos estudios al equilibrio sobre el plegamiento indican que el proceso se logra a partir de la generación local de estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$ ). Este temprano estado del plegamiento de las proteínas, en el que se encuentra mucha estructura secundaria, se dice que es extremadamente rápido (aparece 1 seg. después de iniciado el plegamiento). Al iniciarse dicho proceso se adquiere estructura secundaria y se efectúa una compactación de los aminoácidos hidrofóbicos, lo que hace que el plegamiento se conduzca hasta obtener un colapso hidrofóbico. Este colapso es conocido como glóbulo fundido, estructura intermedia que se presenta en los primeros estadios del plegamiento de muchas proteínas y es considerado como un tercer estado termodinámico en la ruta de plegamiento de las proteínas. Es una molécula muy dinámica y flexible ya que no presenta una conformación única sino un número de conformaciones diferentes que se interconvierten rápidamente. Este estado ha sido observado bajo ciertas condiciones desnaturalizantes y es un conformero con propiedades intermedias entre los estados nativo y desnaturalizado.

En el estudio del plegamiento de proteínas, para entender los factores que dirigen el proceso de plegamiento, es de gran importancia conocer la estructura y los cambios de energía asociados a la formación de estados transitorios que se puedan identificar durante el proceso de plegamiento de proteínas globulares, sin embargo hasta la fecha no ha sido posible cristalizar ningún polipéptido en ese estado <sup>19</sup>.

Para la formación del glóbulo fundido se requiere un tiempo mucho menor al que se necesita para la biosíntesis de una proteína o para adquirir su estado nativo, de modo que en una cadena naciente puede encontrarse la estructura de glóbulo fundido durante e inmediatamente después de su biosíntesis. Los estudios dirigidos a conocer las características de este conformero permitirán determinar el papel de los intermediarios en la vía de plegamiento y la necesidad del glóbulo fundido como intermediario general para el plegamiento de las proteínas *in vivo*. La presencia del glóbulo fundido, como estado intermediario, es común para una gran variedad de proteínas globulares, incluida la TIM <sup>19</sup>.

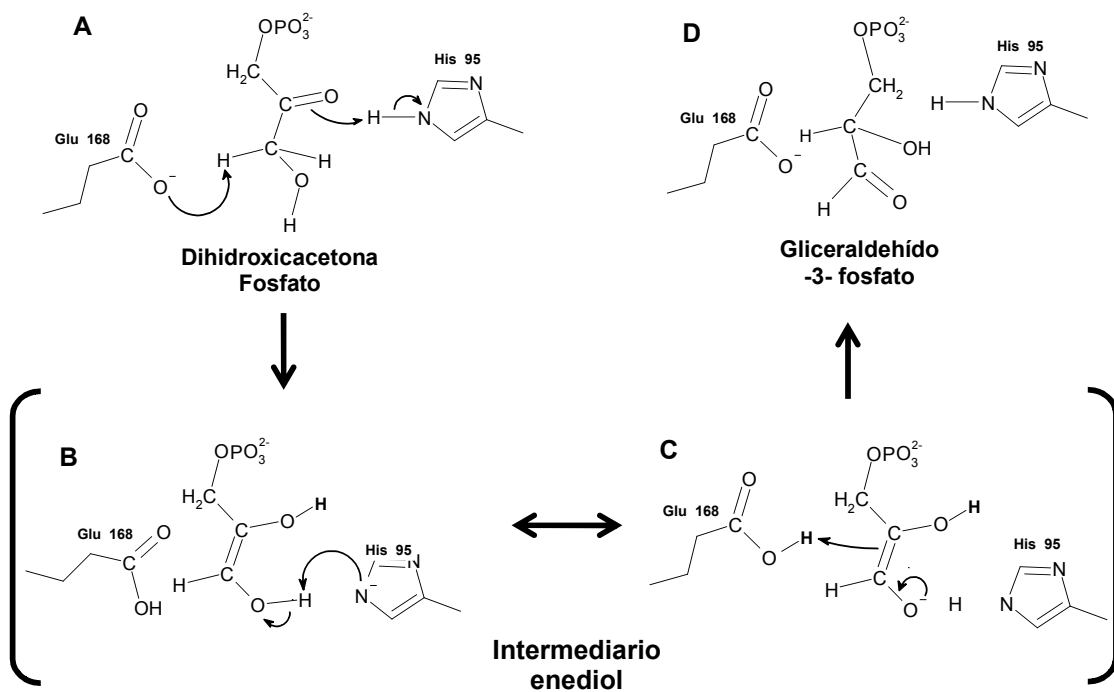
## **6. Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de las proteínas (EPAPs).**

En la actualidad se ha descubierto que existen enfermedades que están relacionadas con conformaciones anómalas o erróneas de algunas proteínas; en estos casos las proteínas, cuya conformación N es globular, adquieren una estructura fibrosa. Estas enfermedades, generalmente neurológicas, se caracterizan por presentar agregados proteicos insolubles llamados depósitos amiloides, en células específicas de tejidos específicos. Estas patologías pueden tener un origen genético esporádico infeccioso, sin embargo se sabe que son el resultado de la precipitación de algunas proteínas y que el plegamiento anormal de las mismas es, al menos, un factor determinante. Dentro del grupo de desordenes infecciosos que presentan estas características encontramos a la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB) o enfermedad de la vacas locas y fatales enfermedades humanas como la enfermedad del Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y la diabetes tipo II. Al conjunto de estas patologías se le conoce como Enfermedades del Plegamiento Anómalo de las Proteínas (EPAPs) <sup>20</sup>.

## D. MODELO DE ESTUDIO. LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA (TIM).

### 1. Importancia y Función en la Glucólisis.

La Triosafosfato Isomerasa (TIM) es una enzima que cataliza la reacción cinco del ciclo glucolítico. Se encarga de la interconversión de las triosas, de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a través de un intermediario *cis*-enediol <sup>21</sup>. La reacción que esta enzima cataliza determina en gran parte la eficiencia de la glucólisis ya que, de las dos triosas, sólo el GAP continua en la ruta glucolítica garantizando la producción neta de dos moléculas de ATP. En la reacción ocurren dos enolizaciones: del DHAP al enediol y del GAP al enediol (Figura 3). Esta enzima lleva a cabo las protonaciones y las desprotonaciones necesarias para que se den las dos enolizaciones antes mencionadas, utilizando una base (histidina) y un ácido (glutámico) catalíticos, así como un asa proteica (el asa 6) que une y estabiliza el intermediario de la reacción.



**Figura 3. Mecanismo catalítico de la TIM.** A) El ácido catalítico (His 95) y la base catalítica (Glu 165) llevan a cabo las primeras protonaciones y desprotonaciones sobre la DHAP. B) y C) Estabilización del *enediol*. D) Isomerización a GAP.



La transformación de DHAP en GAP que realiza la TIM es entre  $10^8$  y  $10^9$  veces más rápida que en ausencia de la enzima. Diversos estudios han confirmado que la unión del GAP a la enzima está limitada por una frecuencia de encuentros entre las dos especies y no se debe a los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el solvente para la catálisis o a los rearrreglos químicos entre el sustrato y la enzima, por ello se le conoce como catalizador perfecto <sup>22</sup>. También se ha establecido que *in vivo* los pasos limitantes de la velocidad de reacción son la unión del sustrato y la liberación de producto <sup>23</sup>.

## 2. Características Estructurales.

La TIM es un homodímero del cual cada subunidad o monómero tiene un peso de aproximadamente 27 kDa con una estructura  $(\alpha/\beta)_8$ . Los monómeros se asocian por medio de interacciones no covalentes y cada uno contiene su sitio activo completo localizado cerca de la interfase que comparten las dos subunidades. Para asegurar al máximo su función la enzima cuenta con un asa móvil que oculta el sustrato del solvente, esta asa se conoce como el asa 6 o asa catalítica y se mueve de una conformación conocida como cerrada a una conformación abierta <sup>24</sup>. El asa 3, también conocida como asa de interfase, encaja en una cavidad que se encuentra cerca del sitio activo de la otra subunidad.

La TIM sólo es activa como dímero y aunque sus monómeros presentan los residuos necesarios para llevar a cabo la catálisis y no presentan cooperatividad entre ellos <sup>25</sup>, pues funcionan independientemente, a la fecha no se han reportado TIM's monoméricas silvestres. Es probable que las interacciones en la interfase sean necesarias para mantener a los aminoácidos catalíticos en una posición adecuada, o para mantener la estabilidad de la estructura de barril, de hecho un determinado número de aminoácidos de la interfase se encuentra conservado. El sitio activo de esta enzima se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad que se forma por las asas contiguas a las hebras. Los aminoácidos que componen el sitio activo (para Tc TIM) son Lisina (K) 12, Histidina (H) 95 y el Glutámico (E) 168, residuos que están conservados en proteínas homólogas, así como las regiones que se encuentran en el sitio activo y los residuos directamente involucrados en la química de la reacción. En el caso de la TIM, los aminoácidos conservados son aquellos que participan directamente en la química de la reacción, o se localizan en la vecindad del sitio activo. A pesar de las diferencias en los aminoácidos de la interfase, la topología del barril y la geometría de la asociación de los monómeros en el dímero, es semejante en diferentes especies <sup>26</sup>.

## E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TIM juega un papel central en el metabolismo anaerobio razón por la cual se ha propuesto como blanco para construir fármacos específicos contra agentes infecciosos, principalmente humanos, que en alguna parte de su ciclo de vida dependan básicamente de la glucólisis como fuente de energía. Este es el caso de los tripanosomátidos como lo es el *Trypanosoma cruzi* y su pariente más cercano, el *Trypanosoma brucei*. Ambos protozoarios son patógenos. El primero es causante de la Tripanosomiasis americana o “Enfermedad de Chagas” y el segundo de la enfermedad del sueño en humanos y el nagana en ganado vacuno en África. Una de las principales preocupaciones científicas en la actualidad es elaborar drogas o medicamentos efectivos contra las enfermedades producidas por estos parásitos, desafortunadamente las drogas actuales contra la tripanosomiasis generan algunos efectos colaterales en los pacientes. El estudio detallado de toda la información estructural proveniente de la TIM de estos parásitos está relacionado además con la generación de información necesaria para tratar de curar las enfermedades que producen y debido a que existen pequeñas diferencias entre la enzima de este parásito y la de los humanos, esta información se puede aprovechar para el diseño racional de nuevos medicamentos.

Toda la información obtenida hasta la fecha sobre la TIM de *T. cruzi* y de *T. brucei* es de gran utilidad pues revela que entre ambas enzimas no sólo existen características estructurales muy interesantes. Experimentos preeliminares muestran que el patrón de plegamiento de la enzima de *T. cruzi* es reversible pero complejo ya que no es un proceso de dos estados. Esta observación es interesante porque la TIM de *Trypanosoma brucei* posee el mismo patrón de plegamiento pero irreversible y presenta agregados (ver tabla 1).

ESPECIE	MODELO	REVERSIBLE	REFERENCIA
Tc TIM	$N2 \leftrightarrow N2^* \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2U$	SI	27
Tb TIM	$\begin{array}{ccc} A & & A \\ \updownarrow & & \updownarrow \\ N2 \leftrightarrow N2^* \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2U \end{array}$	NO	28

Tabla 1. Comparación del patrón de plegamiento de la TIM de *T. cruzi* y de *T. brucei*. Donde **N2** es el dímero nativo; **N2\*** el dímero NO nativo; **2M** son monómeros compactos; **2U** son monómeros desnaturalizados y **A** son agregados.

Al comparar estructuralmente ambas enzimas se encuentra que son prácticamente idénticas ya que la diferencia en la superposición de sus estructuras tridimensionales es de 0.9 Å. Si se compara la estructura

primaria de las TIM's de ambos parásitos resulta que 185 de los 250 aminoácidos que las componen son idénticos en ambas proteínas; el 26% restante se compone de 31 cambios conservativos y 35 cambios no conservativos, lo que indica que únicamente hay un 14% de cambios drásticos entre ambas proteínas (ver figura 4). A partir de esta información el presente trabajo esta dirigido a tratar de averiguar porque estas enzimas, teniendo características estructurales tan similares, presentan un patrón de plegamiento diferente; sabiendo que de alguna manera los cambios no conservativos entre ambas secuencias son responsables de tan significativa diferencia ¿Cuales pueden ser los residuos de aminoácidos que provocan un cambio tan significativo?

Tb TIM	-MSKPQPIAAANWKCNGSQSLSELIDLFNSTSINHVDVQCVVASTFVHLAMTKERLSHPK	59
Tc TIM	MASKPQPIAAANWKCNGSESLLVPLIETLNAATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK	60
+	/*****-/-*-**/-/*-//*****-*//**-**-**	
Tb TIM	FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGNWIVLGHSEYRAYGETNEIVADKVAASVAVAS	119
Tc TIM	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGHSEYRAYGETNEIVAQVAVAAQACAA	120
	*-*****-/**-*****-**/*/**-*****/**-*****-**-**	
Tb TIM	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTLQIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAIGTGKVVAT	179
Tc TIM	GFHVIVCVGETNEEREAGRTAAVVLTLQIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAIGTGKVVAT	180
	**-**/*/**-**-**-**/**-**/*/**-**-**-**-**-**-**-**-**-**-**-**-**	
Tb TIM	PQQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGGASLK	239
Tc TIM	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK	240
	*****/*-*/*-**-*/*-*/-*****/**-*****-**/**-*****	
Tb TIM	PEFVDIIKATQ	250
Tc TIM	PEFVEIIEATK	251
	****/**-**-**	

Figura 4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de Tb TIM VS Tc TIM. Con la diagonal ( / ) se indican los cambios conservativos entre ambas secuencias; con el guión ( - ) los cambios no conservativos y con asteriscos ( \* ) se indica que aminoácidos son iguales en ambas secuencias.

## CAPITULO II

# OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

- Construir la proteína quimérica mutante TIM Q82-R162 sustituyendo el fragmento que va de la Glutamina 82 a la Arginina 162 de la Triosafofato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi* por la región equivalente de la TIM de *T. brucei* para estudiar la reversibilidad de plegamiento.

### B. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar los oligonucleótidos para la construcción del gen mutante por medio de mutagénesis sitio-dirigida.
- Construir el gen que codifica para la proteína quimérica mutante de TIM de *T. cruzi* por medio de experimentos de biología molecular (PCR), ligación, clonación y sobreexpresión del gen la TIM quimérica mutante.
- Aislamiento y purificación de la proteína quimérica mutante.
- Cuantificación de la actividad catalítica de la proteína quimérica mutante.
- Estudiar la reversibilidad de plegamiento de la proteína quimérica mutante induciendo la desnaturalización con clorhidrato de guanidina.

### C. HIPÓTESIS

- Es posible que al construir una proteína quimérica mutante de Triosafofato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, intercambiando la región que va de la Glutamina 82 a la Arginina 162 por la región equivalente de la Tb TIM, se observen cambios en la reversibilidad del plegamiento.

## CAPITULO III MÉTODOS

### A. CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA MUTANTE Q82-R162.

La construcción inició con el diseño de los oligonucleotidos *Tc reverse 76-2* y *Tb forward 75-3*, complementarios entre sí. Las secuencias de estos oligonucleotidos son las siguientes:

**Tb forward 75-3:** 5' GCT TTC ACG GGG GAA GTC TCC 3'

**Tc reverse 76-2:** 5' CAG AGA GAC TTC CCC CGT GAA AGC 3'

Posteriormente utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se construyó el gen que codifica para la proteína quimérica mutante en tres etapas que se explican a continuación:

- ⊕ **PCR 1.** Sobre el gen de la TIM silvestre de *T. cruzi* se aparean los oligonucleotidos *Tc reverse 76-2* y *T7 promoter*. Se generó un fragmento de 323 pares de bases (pb) que corresponde a la región amino terminal de Tc TIM, que va del aminoácido 1al 81 (figura 5).
- ⊕ **PCR 2.** Sobre el gen de la TIM silvestre de *T. brucei* se aparearon los oligonucleotidos *Tb forward 75-3* y *T7 terminator-2* para generar un fragmento de 639 pb, que corresponde al segmento que va del aminoácido 74 al 250 de la Tb TIM.
- ⊕ **PCR 3.** Con los fragmentos anteriores y los oligonucleotidos flanqueantes *T7 promoter* y *T7 terminator-2*, se amplificó un producto de 938 pb que corresponde al gen completo del Proteína Quimérica Mutante.

Las condiciones utilizadas en cada etapa de PCR se encuentran en la tabla 2A. Los componentes de PCR utilizados en cada reacción se muestran en la tabla 2B.

ETAPA	PCR 1	PCR 2	PCR 3
Desnaturalización	94 °C, 45 seg	94 °C, 45 seg	94 °C, 45 seg
Hibridación	40 °C, 30 seg	45 °C, 30 seg	52 °C, 45 seg
Elongación	72 °C, 90 seg	72 °C, 90 seg	72 °C, 90 seg
Ciclos	30	30	40

REACTIVO	VOLUMEN (μl)	CONCENTRACIÓN FINAL
dNTP 's	0.75	1.5 mM
DNA Templado	1	-
Oligonucleótidos	1	200 ng/μl
Buffer	5	10 x
Mg Cl <sub>2</sub>	3	1.5 mM
Taq Polimerasa	0.2	-
H <sub>2</sub> O c.b.p.	50	-

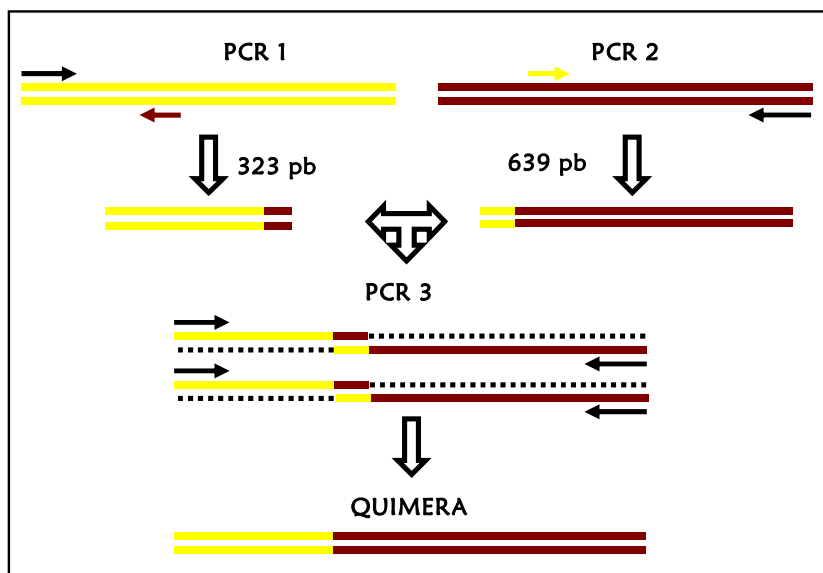
**A**

**B**

**Tabla 2. A)** Condiciones de reacción para cada etapa de PCR. **B)** Protocolo general de una reacción de PCR.

En la Segunda etapa de PCR se utilizaron concentraciones de 2 y 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> para la amplificación óptima del fragmento, mientras que en la tercera etapa se utilizaron concentraciones de 3 y 4 mM.

La estrategia que se siguió para la construcción de la Proteína Quimérica Mutante de TIM se representa en la figura 5.



**Figura 5. Estrategia utilizada para la construcción de la Proteína Quimérica Mutante de Triosafosfato Isomerasa.** PCR1: con el DNA de TcTIM (amarillo) y con los oligonucleótidos *T7 promoter* (flecha negra) y el *Tc reverse 76-2* (flecha roja), se genera el primer fragmento. PCR2: con el DNA de TbTIM (rojo) y con los oligos *Tb forward 75-3* (flecha amarilla) y el *T7 terminator* (flecha negra), se genera el segundo fragmento. Los extremos internos de cada fragmento corresponden a los oligonucleótidos y se marcan de otro color debido a que sus secuencias son complementarias. PCR3: los fragmentos obtenidos de las etapas anteriores y los oligos *T7 promoter* y *T7 terminator* (flechas negras) generan el gen de la TIM Quimérica.

## B. LIGACIÓN AL PLÁSMIDO.

Para la ligación del gen mutante se llevó a cabo previamente una subclonación en el plásmido *pGEM-Easy Vector*® debido a que este plásmido tiene la ventaja de requerir concentraciones muy bajas del producto a ligar. El plásmido ligado fue transformado en células competentes DH5 $\alpha$  de *E. coli* y sembradas en cajas con agar LB suplementadas con 16  $\mu$ l de X-Gal (50 mg/mL) y 34  $\mu$ l de IPTG (100m M). El producto ligado se liberó con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I y fue religado al plásmido de expresión pET3a, transformado a células competentes BL21(DE3)pLysS de *E. coli* y sembradas en cajas con agar LB con ampicilina.

## C. SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.

Una muestra de DNA de la TIM Quimérica Q82-R162 ligada al plásmido pET3a, con una concentración de 300 ng/ $\mu$ l, fue secuenciada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Debido a que el resultado corresponde a la secuencia de bases del gen que codifica para la proteína quimérica mutante se llevó a cabo una comparación entre las secuencias de bases de Tc TIM, Tb TIM y la TIM Quimérica Q82-R162 para verificar los cambios que presenta el gen mutado. Posteriormente, por medio del programa *Translate tool*, se realizó la traducción de la secuencia de bases en aminoácidos y después se compaó una vez más esta secuencia con las correspondientes a Tc TIM y Tb TIM.

## D. SOBREENPRESIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.

En 100 ml de cultivo líquido de agar LB con ampicilina (100 mM) se inoculó una colonia de *E. coli*, BL21(DE3)pLysS, que contiene el plásmido pET3a y el gen que codifica para la Quimera Q82-R162. Se incubó durante una noche a 37 °C con agitación de 2500 RPM. El cultivo anterior se centrifugó 10 min a 5000 RPM y con el botón obtenido se inoculó 1 litro de medio LB conteniendo la misma concentración de ampicilina. El cultivo se incubó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica de A600= 0.8-1.0 para luego agregar el inductor Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 2500 RPM.

## E. PURIFICACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.

- El volumen total de cultivo inducido se centrifugó 12 min a 6000 RPM. Es importante que todo el proceso de purificación se lleve a cabo a 4 °C.
- El paquete celular de *E. coli* se resuspendió en 30 ml de amortiguador de extracción pH 6.5 (MES 25 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PSMF 0.2 mM) y agitación constante.
- Las células se rompieron sometiénolas a ondas de alta frecuencia (sonicar) en 4 tiempos de 1 min y 3 tiempos de 30 segundos.
- La solución anterior se centrifugó 15 min a 15000 RPM.
- El precipitado se resuspende en 30 ml de amortiguador de extracción pH 6.5 (al cual se le añadió previamente NaCl 200 mM) y se agitó en hielo durante 30 min.
- La solución anterior se centrifugó 15 min a 15000 RPM.
- El sobrenadante fue precipitado, con agitación, en sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] al 45 % y se dejó reposar en refrigeración mínimo por 3 horas.
- La solución anterior se centrifugó 15 min a 15000 RPM, se recuperó el sobrenadante que se precipitó, con agitación, en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 65 % y se dejó reposar toda una noche.
- La solución anterior se centrifugó 15 min a 15000 RPM.
- El precipitado se disolvió en 2 ml de amortiguador A, pH 8 (TEA 100 mM, NaCl 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y NaN<sub>3</sub> 1mM).
- La solución anterior se dializó en 500ml de amortiguador A, pH 8, durante 2 horas, transcurrido este tiempo se cambió el amortiguador y se dejó dializando toda una noche.
- La proteína se cargó en una columna de intercambio iónico de Carboximetil Sefarosa (CM-Sepharose), de flujo rápido (previamente lavada con 500 ml de NaCl 0.5 M y equilibrada con 500 ml de amortiguador A, pH 8).
- La proteína se eluyó con 25 a 30 ml de amortiguador A, pH 8.
- El amortiguador A, pH 8 se suplementó con a 200 mM de NaCl y con esta solución se eluyó la proteína resultando en fracciones de 2.5 ml, cuantificando su absorbancia a 280 nm, analizando las fracciones por SDS-PAGE al 12.5 % y tiñendo con azul de Coomassie.
- Las fracciones que presentan la proteína pura se juntaron (pool) y se cuantifica la concentración de la solución resultante.



## F. CARACTERIZACIÓN

### 1. Cuantificación de la concentración de proteína de la TIM Quimérica Q82-R162.

La cuantificación de la proteína se determinó por el método del Ácido Bicinconínico (BCA) por medio de una curva estándar de BSA con el kit *BCA Protein Assay (Pierce)*®.

### 2. Estudios de Reversibilidad

#### a. Intensidad de Fluorescencia.

Los cambios por intensidad de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro *Olis DM 4*, con temperatura controlada a 25 °C. Con los datos de longitud de onda máxima y la intensidad de fluorescencia de los espectros obtenidos se determinó el centro de masa espectral utilizando la siguiente ecuación:

$$CMS = \sum \lambda I(\lambda) / \sum I(\lambda)$$

donde,

$\lambda$  = longitud de onda

$I(\lambda)$  = Intensidad de Fluorescencia a la longitud de onda

**Intensidad de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 en su estado Nativo.** Para evaluar el estado nativo de la TIM quimérica Q82-R162 (150  $\mu\text{g/ml}$ ), se incubó a 25 °C durante una hora en amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4 (TEA 100 mM, EDTA 10 mM, y DTT 1mM). En una primera etapa se excitaron todos los residuos aromáticos Fenilalanina (F), Tirosina (Y) y Triptofano (W), a 280 nm con barridos de 300 a 400 nm. En una segunda etapa, en la misma muestra, se excitaron solo los Triptofanos (W) a 295 nm con barridos de 310 a 410 nm. Lo anterior tiene la finalidad de obtener el máximo de información estructural de la proteína en su estado nativo.

**Desnaturalización de la TIM Quimérica Q82-R162 con Clorhidrato de Guanidina.** Para la desnaturalización se utilizó una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$  de la TIM Quimérica y 6 M de Clorhidrato de Guanidina (Gdn-HCl), como desnaturalizante, en amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4, incubando a 25 °C durante 24 horas. El cambio en la estructura terciaria fue seguido a 280 y 295 nm verificando el cambio en el máximo de longitud de onda y en la intensidad de fluorescencia.

**Renaturalización de la TIM Quimérica Q82-R162.** La renaturalización de la TIM Quimérica se llevó a cabo diluyendo el ensayo de desnaturalización a 2.5  $\mu\text{g/ml}$  y 0.1 M de proteína y Gdn-HCl respectivamente, en amortiguador TED 100/10/1 pH 7.4, incubando a 25 °C durante 24 horas. El cambio en la estructura terciaria fue seguido por intensidad de fluorescencia a 280 y 295 nm.

#### b. Actividad catalítica de la TIM Quimérica Q82-R162.

La actividad catalítica de la TIM, en el sentido de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), se evaluó de forma indirecta por medio de un sistema acoplado con la enzima  $\alpha$ -glicerol-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH). En este sistema la oxidación del Nicotin Adenin Dinucleótido (NADH) va acompañada de un cambio del color amarillo a incoloro que se detecta a 340 nm (ver Figura 6).



**Figura 6. Reacción general del sistema acoplado para la determinación de la actividad catalítica de la TIM.** GAP: Gliceraldehído-3-fosfato; DHAP: Dihidroxiacetona Fosfato; NADH: Nicotin Adenin Dinucleótido reducido; NAD<sup>+</sup>: Nicotin Adenin Dinucleótido oxidado; G3P: Glicerol-3-fosfato y  $\alpha$ -GDH:  $\alpha$ -glicerol-fosfato deshidrogenasa.

Debido a que las muestras que se utilizan para la prueba de fluorescencia son las mismas que se utilizan para cuantificar la actividad catalítica fue necesario evitar el efecto del desnaturalizante sobre la  $\alpha$ -GDH diluyendo las muestras de TIM Quimérica nativa y renaturalizada a concentraciones finales de 5 ng/ml. La dilución es necesaria ya que se requiere de esa concentración para calcular la actividad específica de la TIM Quimérica y además garantiza que la concentración de guanidina sea lo suficientemente baja para que se pueda evitar el efecto sobre la  $\alpha$ -GDH.

De la lectura obtenida para cada muestra se analizan los resultados obteniendo una curva de actividad de la cual se calcula el valor de la pendiente en unidades de absorbancia (ua), se sustituyen en la siguiente formula y se cuantifica la actividad específica (AE) para cada muestra:

$$AE (\mu mol / min \cdot mg) = \frac{\frac{\Delta u.a.}{min}}{\left( \frac{6.22 u.a.}{\frac{\mu mol}{mL}} \right) * \{ Prot (mg / mL) \}}$$

donde 6.22 u. a. es el coeficiente de extinción del NADH y la concentración de proteína es un valor constante de 5 ng/ml que debe transformarse a las unidades que la formula requiere(mg/mL).

La determinación de la actividad se realizó en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU 7500 en el programa de Cinética Multiceldas, a una longitud de onda de 340 nm, con tabulaciones de 1.0, tiempo de 30 segundos entre cada lectura y con un total de tiempo de 420 segundos.

El protocolo utilizado para preparar la mezcla de reacción en la cual se cuantificó la actividad catalítica de las muestras es el siguiente:

Gliceraldehido - 3 - fosfato	1.5 - 3 mM
$\alpha$ - glicerol - fosfato deshidrogenasa	5 - 10 $\mu$ g/ml
NADH	0.2 mM
TIM Quimérica	5 ng/mL
Amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4	c.b.p. 1 mL

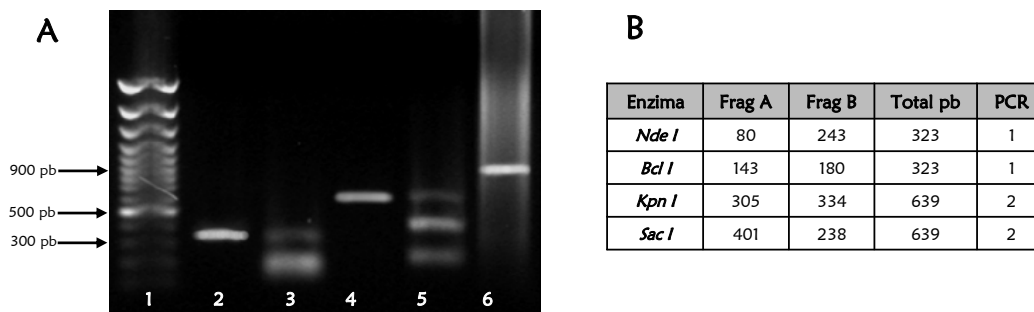
## CAPITULO IV RESULTADOS

### A. CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMERICA MUTANTE Q82-R162.

Los fragmentos obtenidos en las etapas de PCR fueron digeridos con las siguientes enzimas de restricción, específicas para cada fragmento, que cortan sólo una vez (ver figura 7B):

- **PCR 1:** El fragmento 1 de 323 pb (carril 2, figura 7A) corresponde a la región amino-terminal, del aminoácido 1 al 81 de la TcTIM. Fue digerido con las enzimas *NdeI* (carril 3, figura 7A) y *BclI* que tienen sitios específicos de corte en las bases 80 y 143, respectivamente.
- **PCR 2:** El fragmento 2 de 639 pb (carril 4, figura 7A) corresponde al segmento de aminoácidos 74 al 250 de la TbTIM. Fue digerido con las enzimas *SacI* (carril 5, figura 7A) y *KpnI* que tienen sus sitios específicos de corte en las bases 401 y 305, respectivamente.
- **PCR 3:** El fragmento de 938 pb (carril 6, figura 7A) no fue digerido con ninguna enzima hasta que fue clonado.

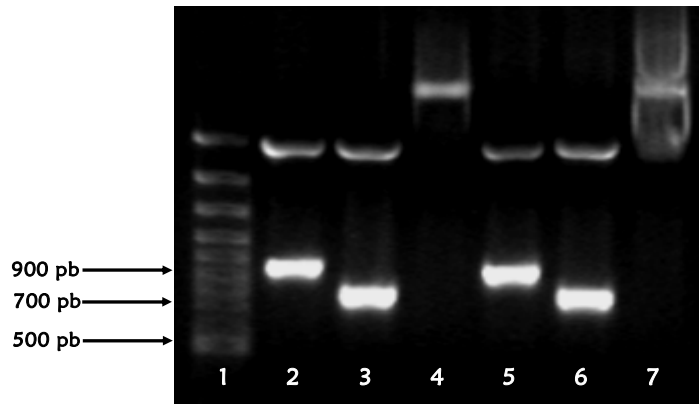
Las etapas de PCR y las digestiones con enzimas de restricción fueron monitoreadas por medio de geles de agarosa al 0.1 %. El tamaño de los fragmentos (en pares de bases) generados por el corte de cada enzima se puede revisar en la figura 7B.



**Figura 7. Monitoreo de la construcción de la TIM Quimérica Q81-R162. A)** Gel de agarosa al 1% con la digestión de los fragmentos utilizados en la construcción de la TIM Quimérica Q82-R162. 1. Marcador de 100 pb; 2. Fragmento 1 de 323 pb; 3. Digestión del fragmento 1 con *BclI*; 4. Fragmento 2 de 639 pb; 5. Digestión del fragmento 2 con *SacI*; 6. Quimera de 938 pb, etapa 3 de PCR. **B)** Tabla comparativa del tamaño de los fragmentos (en pares de bases) generados por el corte de cada enzima en las dos primeras etapas de PCR.

## B. LIGACIÓN AL PLÁSMIDO.

La ligación al plásmido *pGEM Easy Vector®* se comprobó digiriendo el gen mutado con la enzima **EcoRI** que corta en los extremos del inserto generando un producto de aproximadamente 938 pb (carriles 2 y 5 figura 8). El inserto fue ligado al plásmido de expresión *pET3a* y clonado en células BL21(DE3)pLysS. Lo anterior fue monitoreado digiriendo el plásmido con las enzimas de clonación **NdeI** y **BamHI** lo que ocasiona la liberación del inserto de aproximadamente 753 pb. (carriles 3 y 6, Figura 8).



**Figura 8. Ligación al plásmido del gen mutado.** Gel de agarosa al 1% que presenta el inserto liberado del plásmido con la digestión de enzimas de restricción específicas. 1 Marcador de 100 pb; 2 y 5 Fragmento de 938 pb digerido con **EcoRI**; 3 y 6 Fragmento de 756 pb digerido con **Nde I** y **Bam HI**; 4 y 7 Plásmido sin digerir.

## C. SECUENCIACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA MUTANTE Q82-R162.

El gen clonado fue reamplificado y posteriormente secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. El producto que se amplificó es un gen que tiene una longitud de 756 pb que codifican para una proteína de 251 aminoácidos.

Posteriormente se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos de la TIM Quimérica Q82-R162 vs Tb TIM y Tc TIM para verificar los cambios que se habían generado. Encontramos que la Quimera presentaba cambios en su secuencia que no se habían diseñado pues inicialmente se planteo construir

una TIM Quimérica en la cual la región amino-terminal (del aminoácido 1 al 81) correspondiera a la secuencia de la Tc TIM y el resto de la Tb TIM (del aminoácido 82 al 250), sin embargo se encontró que la TIM Quimérica Q82-R162 tiene un 82.8 % de similitud con Tb TIM y un 90 % con respecto a Tc TIM. Después de este análisis se encontró que la secuencia de aminoácidos corresponde a una TIM Quimérica con los extremos amino y carboxilo terminal iguales a Tc TIM y la región central, de Glutamina 82 a la Arginina 162, igual a la Tb TIM (Figura 9).

## A

Quim	MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLNAATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK	60
TcTIM	MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLNAATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK	60
	*****	
Quim	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLSLKDFGVNWIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA AAVAS	120
TcTIM	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGHSERRLYYGETNEIVAEKVAQACAA	120
	*****/**/*	
Quim	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLQIAAIAKCLKKADWAKVVIAYEPVWAI GTGKVAT	180
TcTIM	GFHVIVCVGETNEEREAGRTAAVVLQLAAVAQKLSKEAWSRVVIAYEPVWAI GTGKVAT	180
	**/*	
Quim	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK	240
TcTIM	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK	240
	*****	
Quim	PEFVEIIEATK	251
TcTIM	PEFVEIIEATK	251
	*****	

## B

Quim	MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLNAATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK	60
TbTIM	MSKPQPIAAANWKCNGSQQLSELIDLFNST'SINHDVQCVVASTFVHLAMTKERLSHPK	59
	//*****//**/*	
Quim	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLSLKDFGVNWIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA AAVAS	120
TbTIM	FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVNWIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA AAVAS	119
	*/*****//*****//*****//*****//*****//*****//*****//*****	
Quim	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLQIAAIAKCLKKADWAKVVIAYEPVWAI GTGKVAT	180
TbTIM	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLQIAAIAKCLKKADWAKVVIAYEPVWAI GTGKVAT	179
	*****	
Quim	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK	240
TbTIM	PQQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGGASLK	239
	*****/*	
Quim	PEFVEIIEATK	251
TbTIM	PEFVDIIKATC	250
	***/*/*/*/*	

Figura 9. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la TIM Quimérica VS Tb TIM y Tc TIM. Con la diagonal (/) se indican los cambios entre ambas secuencias; con asteriscos (\*) se indica que aminoácidos son iguales en ambas secuencias. A) En amarillo se muestra la secuencia de la Tc TIM y los extremos amino y carboxilo terminal de la Quimera. B) En rojo se muestra la secuencia de la Tb TIM y la región central de la Quimera.

Se realizaron las pruebas necesarias para encontrar la razón por la cual se tiene este resultado, desde la generación de nuevos fragmentos y el análisis de los mismos con sus respectivas enzimas de restricción, hasta tratar de construir la Quimera propuesta originalmente obteniendo productos inespecíficos y con rendimientos tan bajos que no permitían una correcta reamplificación o una ligación al plásmido *pGEM Easy Vector®*. Se realizó además otra prueba digiriendo la Quimera con las mismas enzimas con que se evaluaron los fragmentos encontrando que, las enzimas que cortan el primer fragmento, *NdeI* y *BclI*, si generaron los fragmentos correctos en la Quimera, mientras que las enzimas que cortan el segundo fragmento, *kpnI* y *SacI*, no cortaron en ningún sitio de la secuencia de la Quimera. Esto es muy interesante, ya que, cuando se digirieron los fragmentos con los que se construyó la Quimera, las enzimas cortan correctamente (ver figura 2). Sin embargo, después de la clonación, cuando se digiere la Quimera, los sitios en los que deberían cortar las enzimas correspondientes al segundo fragmento, se pierden.

Basado en lo anterior se señala que la quimera con la cual se realizó este trabajo no es con la que inicialmente se quería trabajar, sin embargo en nuestro objetivo general se plantea construir una proteína quimérica mutante de TIM y eso fue lo que se obtuvo.

Con este análisis secuencial se encontró que los 5 triptofanos y los aminoácidos catalíticos están conservados (figura 10).



**Figura 10. Modelo de la estructura secundaria del dímero de la Quimera TIM Q82-R162.** Se resaltan los residuos catalíticos Lisina (K) 14 en verde, Histidina (H) 96 en blanco y Ác. Glutámico (E) 168 en morado. En amarillo tenemos las regiones amino y carboxilo terminal que son idénticas a la Tc TIM y en rojo la región central que es idéntica a Tb TIM.

## **D. SOBREEXPRESIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA MUTANTE Q82-R162.**

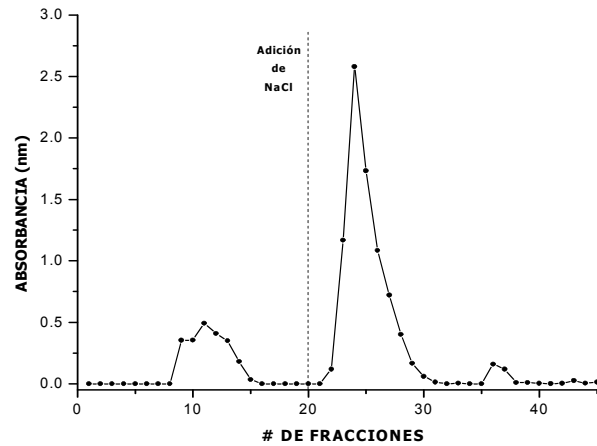
Debido a que la TIM Quimérica se encuentra clonada en el plásmido pET3a y en la cepa BL21(DE3)pLysS se utilizó IPTG como inductor de la transcripción de la T7 RNA polimerasa que a su vez se une al T7 promotor del plásmido, permitiendo entonces el inicio de la transcripción de la secuencia genética clonada. Las condiciones mencionadas en la sección de métodos son las utilizadas en la sobreexpresión de las enzimas Tc TIM y Tb TIM silvestres. Para verificar si esas condiciones podían ser las adecuadas para inducir la sobreexpresión de la TIM Quimérica se realizó un ensayo en 100 ml de medio LB con 100 µg/ml de Ampicilina y 0.4 mM de IPTG. Debido al éxito del ensayo posteriormente se realizó una sobreexpresión en volumen total de un litro.

## **E. PURIFICACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA MUTANTE Q82-R162.**

El método utilizado es el reportado por Borchert <sup>29</sup> para la purificación de la Tb TIM silvestre. Cabe mencionar que para elegir este método fue necesario iniciar el proceso de purificación siguiendo simultáneamente los métodos que se utilizan para purificar las enzimas silvestres de Tc TIM y Tb TIM y se utilizó el método mencionado debido al mayor rendimiento obtenido. Esto quiere decir que, con las modificaciones necesarias, el método de purificación de la Tc TIM silvestre también puede ser eficiente para la purificación de la TIM Quimérica Q82-R162.

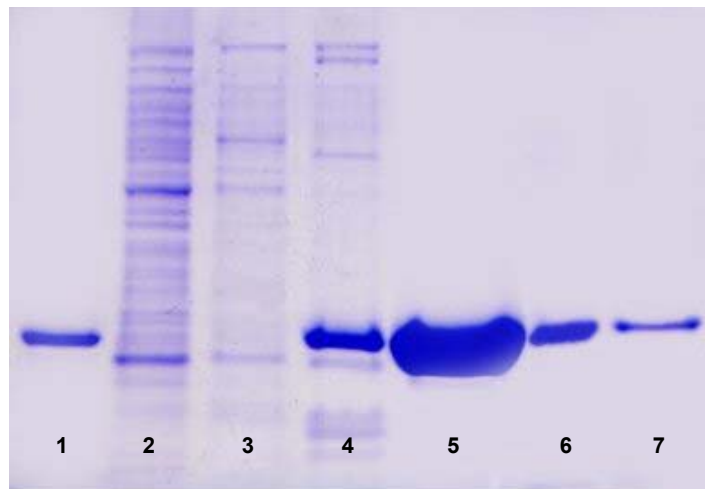
El resultado del proceso se analiza en las fracciones recuperadas de la elusión de la columna de CM-Sefarosa. A cada una de las fracciones se mide su absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la cual absorbe el enlace peptídico en las proteínas, y graficando cada uno de esos valores obteniendo se el siguiente perfil.





**Figura 11. Perfil de elución de la TIM Quimérica en la columna de CM-Sepharose.** El primer pico corresponde a todas aquellas proteínas que no son afines a la columna y eluyen inmediatamente, el segundo pico corresponde a las fracciones que presentan la mayor cantidad de proteína pura y el tercer pico es el remanente de proteína que eluye al aumentar la concentración de NaCl.

Posteriormente se seleccionaron las fracciones que presentaron los valores altos de absorbancia y que puedan presentar la proteína pura (12, 15, 22, 24, 29, 36 y 37) para ser analizados en un gel SDS-PAGE al 12.5 % obteniendo el siguiente resultado (figura 12).



**Figura 12. Gel de poliacrilamida al 12.5 % con muestras de las fracciones que presentan los valores más altos de absorbancia.** 1) Tc TIM silvestre. 2) Fracción 12, proteínas no afines a la columna. 3) Fracción 15, proteínas no afines a la columna. 4) Fracción 22, inicio del pico correspondiente a la proteína pura, 5) Fracción 24, valor máximo del segundo pico con la mayor cantidad de proteína pura, 6) Fracción 29, final del segundo pico con más proteína pura y 7) Fracción 36, tercer pico con una cantidad menor de proteína pura eluida al aumentar la concentración de NaCl.

## F. CARACTERIZACIÓN DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162

### 1. Cuantificación de la concentración de la TIM Quimérica Q82-R162.

Para cuantificar la concentración de la TIM Quimérica se juntaron las fracciones que corresponden al segundo y tercer pico (23-29 y 36-37, respectivamente) formando una sola muestra. El método que se utilizó para calcular la concentración de proteína TIM Quimérica fue el de curva estándar de ácido bicinonínico (BCA) en la cual se interpolaron los valores de absorbancia de la muestra a 562 nm, cuantificado por duplicado, y finalmente por regresión obtener 0.667 mg/ml para la fracción mayoritaria de TIM Quimérica.

### 2. Estudios de Reversibilidad

#### a. Intensidad de Fluorescencia.

**Intensidad de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 en su estado Nativo.** Después de una hora de incubación a 25 °C, de una muestra de TIM Quimérica Q82-R162, a una concentración de 150 µg/ml en amortiguador TED 100/10/1 pH 7.4, los espectros de intensidad de fluorescencia obtenidos, excitando todos los fluoróforos (Y, F y W), y excitando únicamente a los triptofanos (W), presentan un máximo de longitud de onda a 325 nm (figura 13 A), en los cuales claramente se observa que los 5 triptofanos presentes en la secuencia contribuyen con aproximadamente 60% de la fluorescencia total (ver tabla 3 A), debido a la estructura tridimensional de la TIM Quimérica Q82-R162. Simultáneamente se obtuvieron los espectros de intensidad de fluorescencia de la Tc TIM silvestre a la misma concentración de proteína y sometiendo las muestras a las condiciones de incubación mencionadas anteriormente. Los datos obtenidos para cada espectro fueron normalizados observado que los espectros correspondientes a la TIM Quimérica Q82-R162 presentan un patrón prácticamente idéntico al de la Tc TIM (figura 13 B), donde se puede apreciar que la longitud de onda de máxima emisión es de 325 nm para ambas enzimas, cuando se excitan todos los fluoróforos y cuando se excitan sólo los triptofanos. Este resultado es atípico pues ya se han reportado para Tc TIM valores máximos de longitud de onda que difieren

ligeramente entre sí cuando se excitan los todos los fluoróforos de cuando sólo se excitan los triptofanos. Estos datos fueron comparados con los valores calculados del SCM (con la formula mostrada en la sección de métodos) donde se puede apreciar que el valor de SCM del espectro de los fluoróforos es ligeramente menor al SCM del espectro de los triptofanos (ver tabla 3 B).

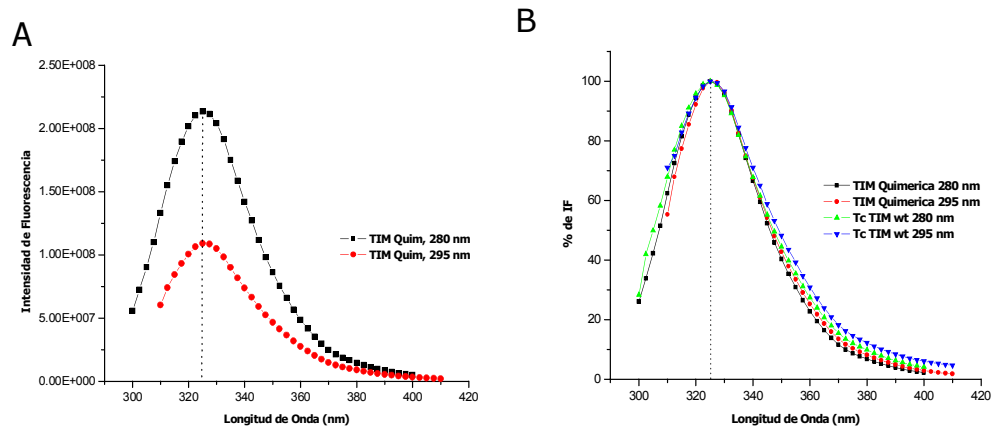


Figura 13. Espectros de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 en su estado nativo excitando a 280 nm y a 295 nm. A) Quimera Q82-R162 a 280 y 295 nm; B) Espectros de fluorescencia normalizados de la TIM Quimérica Q82-R162 y la TcTIM silvestre en estado nativo.

**Desnaturalización de la TIM Quimérica Q82-R162 con Clorhidrato de Guanidina.** La desnaturalización se llevó a cabo como se menciona en la sección de métodos. Se observa un aumento en el máximo de longitud de onda de 325 nm en estado nativo a 345 nm en estado desnaturalizado (comportamiento que se conserva al cuantificar el SCM para cada muestra), además de una disminución de aproximadamente un 60% en la intensidad de fluorescencia (ver tabla 3B). Se observa además que los triptofanos, al igual que en el estado nativo, contribuyen con casi el 50% de la fluorescencia (figura 14A y tabla 3A) al igual que en el estado nativo. Los datos normalizados de la TIM Quimérica Q82-R162 comparados con los de la Tc TIM silvestre se muestran en la figura 14 B.

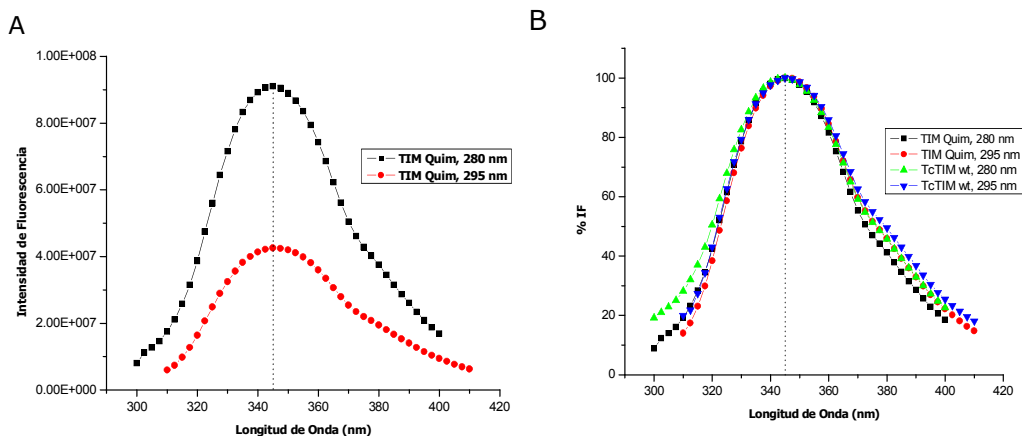


Figura 14. Espectros de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 desnaturalizada con 6 M de Gdn-HCl excitando a 280 y 295 nm. A) Quimera Q82-R162 a 280 y 295 nm. B) Espectros de fluorescencia normalizados de la desnaturalización de la TIM Quimérica y la TcTIM silvestre.

**A**

$\lambda$ (nm)	NATIVA		DES NATURALIZADA	
	IF MAX	% IF	IF MAX	% IF
280 nm	213510722	100	91073023	100
295 nm	108948439	51.02	42532030	46.70
$\Delta$ 's	104562283	48.98	48540993	53.30

**B**

QUIMERA	IF MAX		%IF		$\lambda$ MAX		SCM	
	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm
NATIVA	213510722	108948439	100	100	325	325	331.38	335.58
DES NAT.	91073023	42532030	42.65	39.03	345	345	349.92	354.11
$\Delta$ 's	122437699	66416409	57.35	60.97	20	20	18.54	18.53

Tabla 3. Valores de intensidad de fluorescencia, longitud de onda máxima, y SCM para los estados nativo y desnaturalizado de la TIM Quimérica Q82-R162. A) Comparación de la intensidad de fluorescencia de máxima emisión de todos los fluoróforos y de los triptofanos. B) Comparación de los valores de % de IF, longitud de onda máxima y del SCM.

**Renaturalización de la TIM Quimérica Q82-R162.** En el proceso de renaturalización se encontró que la intensidad de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 excitada a 280 nm presenta un máximo de longitud de onda de 325 nm mientras que al excitar sólo los W a 295 nm el máximo de longitud de onda es aproximadamente de 329 nm (ver tabla 4 A y B).

Para efectos de comparación en este experimento se prepararon muestras de TIM Quimérica Q82-R162 en estado nativo a la misma concentración de proteína que presentan las muestras que fueron diluidas ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) y fue cuantificada su fluorescencia, longitud de onda máxima y SCM, del mismo modo que a las muestras desnaturalizadas y renaturalizadas. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 15 A y B y en la tabla 4 B.

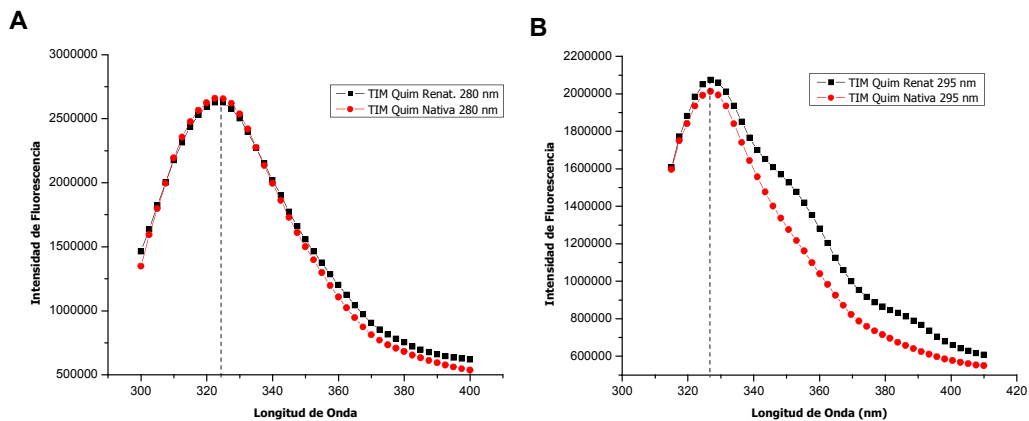


Figura 15. Espectros de fluorescencia de la TIM Quimérica Q82-R162 renaturalizada y en estado nativo diluido. A) TIM Quimérica Q82-R162 renaturalizada y nativa a 280 nm de excitación. B) TIM Quimérica Q82-R162 renaturalizada y nativa a 295 nm de excitación.

**A**

$\lambda$ (nm)	NATIVA DILUIDA		RENATURALIZADA	
	IF	% IF	$\lambda$ (nm)	IF
280 nm	2658645	100	280 nm	2658645
295 nm	2011664	75.66	295 nm	2011664
$\Delta \lambda$	646981	24.33	$\Delta \lambda$	646981

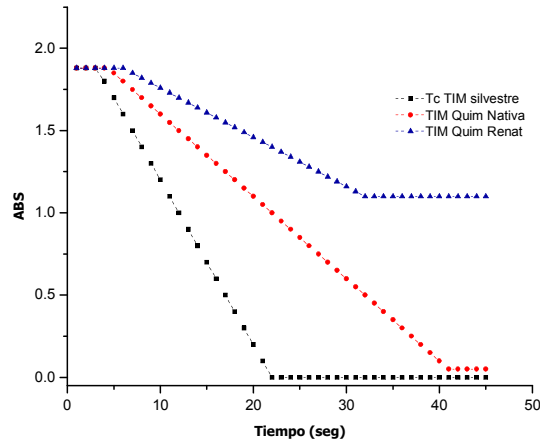
**B**

QUIMERA	IF		%IF		$\lambda$ MAX		SCM	
	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm
NATIVA DIL.	2658645	2011664	100	100	322.5	326.875	337.33	350.40
RENAT.	2627275	1628748	98.8	81	325	329.75	338.29	355.68
$\Delta \lambda$	31370	382916	0.2	19	2.5	2.875	0.96	5.28

Tabla 4. . Valores de intensidad de fluorescencia, longitud de onda máxima, y SCM para los estados nativo diluido y renaturalizado de la TIM Quimérica Q82-R162. A) Comparación de la intensidad de fluorescencia de máxima emisión de todos los fluoróforos y de los triptofanos. B) Comparación de los valores de % de IF, longitud de onda máxima y del SCM.

## b. Actividad catalítica de la TIM Quimérica Q82-R162.

La actividad catalítica se cuantificó como se menciona en la sección de métodos. Se observa un cambio mayor para la TIM Quimérica Q82-R162 en estado nativo en comparación al estado renaturalizado que requiere más tiempo para llevar a cabo su actividad. Para la Tc TIM en estado Nativo la velocidad de cambio es claramente mayor a la Quimera (ver figura 16).



**Figura 16. Actividad catalítica de la TIM Quimérica Q82-R162.** En el sistema acoplado utilizado, la oxidación del NADH va acompañada de un cambio del color amarillo a incoloro que se detecta a 340 nm.

Posteriormente se realizó la cuantificación de la actividad específica como se menciona en la sección de métodos. El resultado indica que:

- 1) La TIM Quimérica Q82-R162 presenta una diferencia del 30% con respecto al modelo reversible de Tc TIM.
- 2) En la renaturalización la TIM Quimérica Q82-R162 pierde aproximadamente un 50% de actividad catalítica con respecto a su estado nativo (ver tabla 6).

Enzima	Actividad Especifica ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ )	%
Tc TIM silvestre	3627	100
Quimera Nativa	2546.62	70
Quimera Renaturalizada	1202.57	33

**Tabla 5. Actividad específica de la TIM Quimérica Q82-R162.** Comparación de los resultados calculados con la fórmula mostrada en la sección de métodos.

## CAPITULO V DISCUSIÓN

### A. CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA MUTANTE TIM Q82-R162.

En este trabajo se construyó la proteína quimérica mutante de TIM Q82-R162 a partir de los genes de Tc TIM y Tb TIM por medio de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

Las razones por la cuales no fue exitosa la construcción de la quimera inicialmente planteada nos se pudieron establecer claramente ya que el análisis de restricción nos indica que los fragmentos, antes de unirse y formar a la quimera, tienen el tamaño correcto así como los sitios de corte correspondientes.

Cabe hacer mención que en la serie de reacciones que presentaron el fragmento de 938 pb, correspondiente a la Quimera, en una de ellas el fragmento fue digerido con las enzimas de la región carboxilo-terminal (*SacI* y *KpnI*), es decir que tentativamente se tenía un producto de PCR que contenía el gen de la Quimera para la cual se diseñó la estrategia presentada. A partir de esta información se tomó esta reacción, se limpió el gen y se ligó al plásmido pGEM-Easy Vector® para su posterior clonación en células DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Ya clonada, se extrajo DNA para liberar el fragmento con las enzimas de clonación *NdeI* y *BamHI* sin lograrlo, de modo que antes de continuar fue necesario reamplificar el fragmento y secuenciar. En la secuencia encontramos un producto repetitivo de 938 pb que incluía los sitios de las enzimas de la región carboxilo-terminal. Sabiendo que en un PCR se tienen productos secundarios inespecíficos, y que este era uno de ellos, decidimos continuar con los estudios de reversibilidad utilizando la Quimera construida.

El gen de la mutante fue ligado al plásmido pET3a con el que se transformó la cepa de expresión BL21(DE3)pLysS de *E. coli* la cual nos permitió secuenciarla, sobreexpresarla y purificarla como se menciona en la sección de Métodos.

## B. PURIFICACIÓN.

Para decidir el método de purificación óptimo a utilizar se tomó en cuenta la siguiente información. A partir del análisis de la secuencia sabemos que la quimera tiene un 90% de identidad con la Tc TIM y el 10% restante sólo presenta 12 cambios no conservativos (ver figura 9).

Esto podría sugerir que la Quimera tendría un comportamiento en su proceso de purificación similar al de la Tc TIM. Adicionalmente se calculó el punto isoeléctrico (pI) de la Quimera obteniendo un valor de 9.52 el cual se considera más cercano al valor de la Tb TIM (9.85) que al de Tc TIM (8.19) Debido a esto, al inicio del proceso de purificación y dado que ambos protocolos son muy parecidos <sup>29, 30</sup>, se siguieron simultáneamente hasta la etapa de precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 65% en la cual se analizaron muestras de ambos precipitados por SDS-PAGE al 12.5% y donde se pudo apreciar que siguiendo ambos protocolos podemos purificar la TIM Quimérica pero se decidió utilizar el reportado para Tb TIM debido a que en el gel se observó una cantidad mayoritaria de quimera al seguir dicho método.

## C. ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD DE PLEGAMIENTO DE LA TIM QUIMÉRICA Q82-R162.

Los resultados de intensidad de fluorescencia indican lo siguiente:

**1. Estado Nativo.** A partir de los espectros de fluorescencia sabemos que la TIM Quimérica presenta características fluorescentes prácticamente iguales a las de Tc TIM (ver figura 9) así como un máximo de longitud de onda de 325 nm, esto nos indica además que la posición de los fluoróforos, y particularmente los triptófanos, se encuentran conservados tanto a nivel de estructura primaria como de terciaria.

**2. Estado desnaturalizado.** Los valores máximos de longitud de onda de 345 nm, tanto para la TIM Quimérica como para Tc TIM, nos indican que los residuos fluorescentes se encuentran totalmente expuestos al solvente por efecto de la concentración 6 M de Gdn-HCl y que la Quimera se encuentra en estado desplegado (U).



**3. Renaturalización.** Después de diluir el desnaturalizante e inducir la reactivación de la TIM Quimérica incubando a 25 °C durante 24 hrs. tenemos un espectro de fluorescencia casi idéntico al de la enzima nativa, con un máximo de longitud de onda de 325 nm (igual al de el estado nativo), pero cuando se excita sólo a los W's a 295 nm la TIM Quimérica presenta diferencias considerables ya que su espectro no es igual al de al enzima nativa y su valor máximo se desplaza a 329 nm, este comportamiento se confirma con el valor de SCM ya que presenta un valor casi igual a del estado desnaturalizado. Esto indica que en el proceso de renaturalización la TIM Quimérica adquiere una estructura tridimensional diferente, donde los triptófanos, y probablemente algunos residuos más, no están adquiriendo la posición en la cual se encuentran el estado nativo y que probablemente no se están llevando a cabo las interacciones intramoleculares o intermoleculares necesarias para que la enzima adquiriera la estructura tridimensional que presenta en su estado nativo.

Lo anterior sugiere que la TIM Quimérica no tiene una reversibilidad de plegamiento del 100 %. Este dato se confirma al evaluar la actividad catalítica. Los resultados obtenidos para la actividad específica del estado nativo y renaturalizado indican que la TIM Quimérica tiene sólo un 50 % de reversibilidad con respecto a su estado nativo. Esto se puede apreciar en la gráfica de actividad (figura 16) donde se tiene que la TIM Quimérica en estado renaturalizado presenta una pendiente menor al valor del estado nativo lo cual está directamente relacionado con la velocidad con la que la TIM lleva a cabo su función metabólica. También se sabe que la TIM Quimérica tiene un 70 % de actividad con respecto a la Tc TIM, esto es muy interesante pues a partir del análisis de las secuencia se conoce que los residuos catalíticos se encuentran conservados.

## CAPITULO VI

# CONCLUSIONES

- En este trabajo se construyó la TIM Quimérica mutante Q82-R162 que pudo ser clonada, sobreexpresada y purificada.
- A nivel de estructura primaria se confirma que los aminoácidos catalíticos se encuentran conservados en los sitios equivalentes de las enzimas silvestres Tc TIM y Tb TIM, así como los residuos de Triptofano (W).
- A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos se obtiene un 90% de identidad con respecto a Tc TIM y un 83% con respecto a Tb TIM.
- En el proceso de purificación la TIM Quimérica mutante Q82-R162 presenta un comportamiento similar al de Tc TIM y Tb TIM.
- Los espectros de fluorescencia intrínseca del estado nativo y desnaturalizado de la TIM Quimérica mutante Q82-R162 indican que a nivel de estructura terciaria presenta una estructura tridimensional con un comportamiento casi idéntico al de la Tc TIM.
- Aunque aun no se caracteriza por completo el patrón de plegamiento, la primera aproximación revela que la reversibilidad de plegamiento que presenta es diferente del modelo reversible que presenta Tc TIM.
- Entre las secuencias de aminoácidos de las enzimas silvestres de Tc TIM y Tb TIM existe aproximadamente un 74 % de identidad y sólo un 14% corresponde a cambios no conservativos ente ambas enzimas. Al construir la TIM quimérica mutante Q82-R162 y estudiar su reversibilidad de plegamiento es posible elucubrar que en la región mutada se encuentran residuos de aminoácidos que podrían estar directamente relacionados con la reversibilidad de plegamiento que presenta TC TIM o bien con la irreversibilidad observada en Tb TIM.

## CAPITULO VII

# PERSPECTIVAS

- Establecer un método de purificación idóneo para la TIM Quimérica Q82-R162.
- Caracterizar la TIM Quimérica Q82- R162 en términos de estabilidad a la dilución y grado de reversibilidad del proceso de plegamiento inducido por Clorhidrato de Guanidina.
- Obtener el patrón de plegamiento/desplegamiento por fluorescencia, actividad catalítica y dicroísmo circular.
- Identificar si presenta intermediarios en el proceso y determinar su estado de asociación.
- Determinación de peso molecular de la TIM Quimérica Q82- R162.
- Cristalización y difracción de rayos X de la TIM Quimérica Q82-R162.
- Realizar mutaciones puntuales sobre la región intercambiada.
- Construir la Quimera diseñada inicialmente.

# APÉNDICE A

## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Considera hoy en día como una herramienta imprescindible en el laboratorio de Biología Molecular e Ingeniería Genética, el objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen, un fragmento de ADN o indirecta de ARN (a través de su ADN complementario) presentes en mezclas de muy diversas fuentes sin necesidad de una purificación previa de la muestra integra original. Se puede partir de homogenados, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmento de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras resultantes de extracción y aislamiento de ADN. Sin embargo es un requisito imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de ADN o ARN que se quiere amplificar.

Debido a su especial capacidad de amplificación la PCR es un método muy adecuado para preparar ácidos nucleicos en una cantidad muy superior a la de la muestra original, tanto como método de clonación acelular como para la detección. El objetivo básico de la PCR es entonces el de amplificar ADN, donde la amplificación propiamente dicha nos permite disponer de una cantidad suficiente para utilizarlo con diversos fines, y la detección de ADN en muestras con pequeñas cantidades de ADN.

## PRINCIPIO

La PCR es una metodología resultante de la aplicación práctica de tres conceptos: **desnaturalización** de ADN para generar hebras sencillas, **hibridación** específica de la hebra sencilla con un oligonucleotido y **replicación** de la hebra sencilla por una DNA polimerasa a partir de oligonucleotido anterior como cebador. Mediante la aplicación en forma cíclica de estos tres procesos se consiguen múltiples copias del fragmento de ácido nucleico en un corto espacio de tiempo. A pesar de la aparente complejidad, en teoría es un método sencillo, sensible y relativamente rápido para amplificar secuencias. En la práctica se requiere un control preciso de los valores que condicionan este triple proceso además de instrumentos adecuados para establecer condiciones de tiempo y temperatura y repetirlos cíclicamente (en este trabajo se utilizó el termociclador *Gena Applied Biosystem 9700*). Estableciendo lo anterior se pueden amplificar secuencias de tamaños diverso comprendidos entre 50 pares de bases (pb) y 2.5 Kb.

Para la realización práctica en la mezcla de reacción se necesitan de los siguientes componentes:

- ◉ **dNTP's.** Son los cuatro Desoxinucleotidos Trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) que se agregan en exceso como sustratos para la síntesis de innumerables copias de ADN, de cada uno de ellos queda incorporado a la nueva hebra de ADN la parte dNMP de la molécula.
- ◉ **MgCl.** Para una actividad óptima se requiere un ion metálico divalente como cofactor asociado a los dNTP's.
- ◉ **Oligonucleotidos.** Comúnmente conocidos como "Oligos", son fragmentos de ADN cuya secuencia es complementaria a los extremos 3' del ADN molde, uno para cada hebra, de modo que los oligos puedan fungir como cebadores para la replicación de las dos hebras. Por esta razón no se puede amplificar una región de ADN si no se conoce la secuencia de sus dos extremos. Lo que define la longitud del fragmento que se amplifica es la posición donde hibridan los cebadores.
- ◉ **DNA molde o templado.** El orden correcto de la incorporación de los dNTP's viene determinado con su complementariedad de bases con la secuencia de cada hebra de ADN que actúa así como molde o plantilla.
- ◉ **DNA polimerasa termoestable.** Esta enzima debe ser enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (75-95 °C), esta característica permite su actuación en sucesivos ciclos sin inactivarse; además la replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente desapareados y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso. La enzima más empleada es la *Taq polimerasa* que procede la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en manantiales de agua caliente.

## ETAPAS DEL PROCESO

Cuando se lleva a cabo un proceso de PCR se requiere de una sucesión de ciclos de entre 20 y 40 con una duración aproximada de entre 1.5 a 5 minutos por ciclo. Cada ciclo incluye un proceso de desnaturalización, hibridación y replicación para conseguir una enorme amplificación del número de moléculas que contiene la secuencia de interés. La duración total del proceso es de alrededor de 2 horas, dependiendo de las condiciones experimentales concretas. Cada ciclo de PCR consta de tres etapas:

**Desnaturalización.** Calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN mediante un calentamiento breve (de 30 a 120 seg) a una temperatura de entre 68 y 97 °C, que debe ser superior a la temperatura de fusión de la región de ADN que se quiere amplificar.

**Hibridación.** Es una etapa de enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión de forma que se permita la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los oligos o cebadores. Generalmente se usan temperaturas de 37 a 65 °C que se mantienen entre 10 y 120 seg.

**Elongación.** También conocida como etapa de replicación, es la etapa de amplificación propiamente dicha (a una temperatura de entre 72 a 75 °C con una duración de 1 a 3 min) en la que la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5' a 3' a partir del extremo 3' OH de cada cebador empleando como sustrato los cuatro dNTP's hasta terminar la lectura del molde o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización, un nuevo ciclo. Generalmente se lleva a cabo a una temperatura de entre 72 a 75 °C con una duración de 1 a 3 min dependiendo del tamaño del fragmento de ADN a amplificar.

## APÉNDICE B

### Fluorescencia.

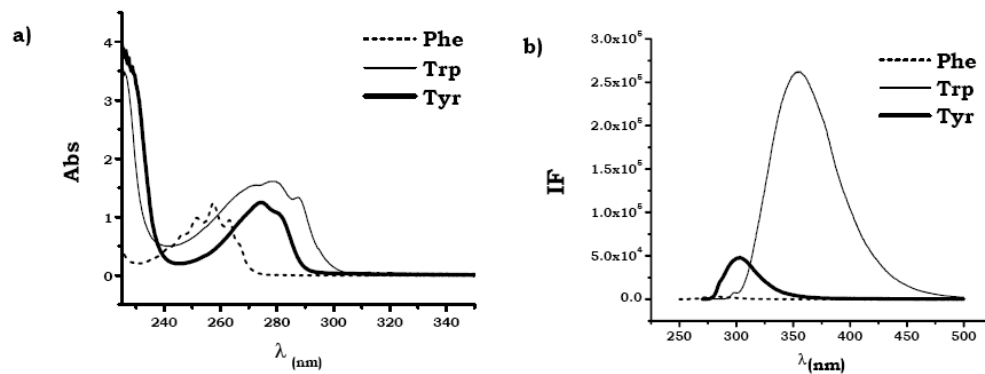
La fluorescencia es un proceso en el que ocurre una emisión de radiación cuando una molécula, en un estado electrónico excitado, regresa a su estado basal. En el fenómeno de fluorescencia, la luz emitida es de una frecuencia menor que la luz incidente, pues los procesos no radiativos que compiten con la fluorescencia para despoblar el estado excitado ocasionan una disminución en la energía de éste.

Los grupos moleculares que le dan origen se denominan fluoróforos. Existen fluoróforos naturales o intrínsecos como el NADH, las flavinas y la clorofila; las proteínas, por su parte, deben su fluorescencia intrínseca a la presencia de tres aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina y fenilalanina. En bioquímica se usan además fluoróforos extrínsecos como la pireína o el 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS).

La fluorescencia refleja las interacciones del fluoróforo con las moléculas circundantes, especialmente durante el tiempo de vida del estado excitado. La fluorescencia es muy sensible al ambiente del fluoróforo y, por tanto, los varios parámetros cuantificables (espectros de emisión y excitación, la intensidad y el tiempo de vida) pueden ser afectados de diferentes formas. Por ello, dentro del estudio de las proteínas, la fluorescencia ha sido empleada ampliamente para medir la unión de ligandos y los cambios conformacionales de las proteínas.

La mayor parte de la señal de fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe a la presencia de residuos de triptofano (W) ya que su absorción y la eficiencia cuántica de la emisión son considerablemente mayores que los de F y Y (ver figura A I). Generalmente todos los residuos fluorescentes pueden ser excitados a 280 nm, mientras que los W pueden ser selectivamente excitados a 295 nm. Las proteínas por lo general tienen pocos residuos de W. Estos residuos tienen un grupo indol que es muy sensible al ambiente. La emisión de estos residuos, en un medio hidrofóbico como el interior de una proteína,

se lleva a cabo a longitudes de onda menores (de entre 320 nm), a diferencia de la que se observa en un medio en el que se encuentran completamente expuestos al solvente (350 nm aprox.), de tal manera que es posible seguir los cambios en la intensidad de fluorescencia y el cambio en la longitud de onda de máxima emisión al aumentar una condición desnaturante en la que se exponen los residuos de W.



**Figura A I. a)** Espectros de absorción y **b)** Espectros de fluorescencia de los aminoácidos fenilalanina, triptofano y tirosina. En b) fenilalanina fue excitado a 240 nm, triptofano a 270 nm y tirosina a 260 nm.



## APÉNDICE C

### Preparación de reactivos.

#### Medios de cultivo LB (Luria Bertami)

- Bacto tristoná 10 g
- Extracto de Levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Agua c.b.p. 1 Lts

#### Amortiguador de Lisis, pH 6.5

- MES 25 mM
- EDTA 1 mM
- DTT 1 mM
- PMSF (en 200 $\mu$ L de DMSO) 0.2 mM

#### Amortiguador A, pH 8

- TEA 100 mM
- NaN<sub>3</sub> 1 mM
- DTT 1 mM
- EDTA 1 mM
- NaCl 25 mM

#### Gel de Azarosa al 1 %

- Agarosa 0.25 gms
- Bromuro de etidio 2  $\mu$ L
- Amortiguador TAE \* 25 mL

\* El Amortiguador TAE contiene: TRIS 50x, Ácido acético y EDTA.

## Geles de poliacrilamida al 12.5 %

### Amortiguador gel separador

- Tris base 1.5 M
  - SDS 14 mM
- \* Se ajusto a pH 8 con HCl

### Amortiguador gel concentrador

- Tris base 0.5 M
  - SDS 14 mM
- \* Se ajusto a pH 6.8 con HCl

### Gel Separador 12 %

- Agua 2.5 mL
- Archilamida/Bis 3.0 mL
- Amortiguador del gel separador 1.9 mL
- Persulfato de amonio 10 % 112  $\mu$ L
- TEMED 5.0  $\mu$ L

### Gel Concentrador 5 %

- Agua 1.0 mL
- Archilamida 30 % 444  $\mu$ L
- Amortiguadore del gel concentrador 300  $\mu$ L
- Persulfato de amonio 10 % 28  $\mu$ L
- TEMED 5.0  $\mu$ L

\* El gel concentrador se corrió a 80 V y 50 mA por 20 minutos. El gel separador se corrió entre 100-120 V y 50 mA.

## REFERENCIAS

1. Nelson D. L. y M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 3ra edición. New York, EUA, 2000, 1152 pp.
2. Gómez Puyuo, A., La complejidad de las proteínas: relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. Mensaje Bioquímico (2003). Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A., Vázquez Contreras E., (eds). Departamento de bioquímica Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria. México DF. pp 85-95.
3. Voet, Donald. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. 1999, pp 94-192.
4. Branden C., Tooze J., Introduction To Protein Structure. Garland Publishing, Inc. New York 1991, pp. 33-75.
5. Creighton Thomas E. 1994. Proteins Structures and Molecular Properties, W. H. Freeman and Company, New York. 547 pp.
6. C. Levinthal. Are There Pathways for protein folding. Journal of Chemical Physics, 65(1) 1968 44,45.
7. Anfinsen C. B., Principles that Govern the Folding of Proteins Chains, Science, 181, 1973, 223-230.
8. Matthews, C. R., The Mechanism of protein folding. (1991), Curr. Op. Struc. Biol. 1, 28-35.
9. Gómez Puyou, A. y col., Using Evolutionary Changes to Achieve Species-specific Inhibition of Enzyme Action, studies with triosephosphate isomerase; Chem. & Biol., vol. 2 No. 12, 1995, pags. 847-849.
10. Dill K. A. 1985. Theory for the Folding and Stability of Globular Proteins. Biochemistry. 24, 1501-1509.
11. Fersht A. R. 1997. Nucleation Mechanisms in protein Folding. Current Opinion in Structural Biology. 7, 3-9.
12. Karplus M. y D. L. Weaver. 1994. Protein Folding Dynamics: The Diffusion-Collision Model and Experimental Data. Protein Science. 3, 650-668.
13. Nolting B. y K. Andert. 2000. Mechanism of Protein Folding. Proteins: Structure, Function and genetics. 41. 288 – 298.

14. Baldwin R. L. y G. D. Rose. 1999. Is Protein folding Hierarchical. Local Structure and Peptide Folding. *Trends in Biological Science*. 24, 26 – 33.
15. Kim P. S. y R. L. Baldwin. 1982. Specific Intermediates in the Folding Reaction of Small Proteins and the Mechanism of protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 631- 660.
16. Dill K. A. y H. S. Chan. 1997. From Levinthal to Pathways to Funnels. *Nature Structural Biology*. 4, 10-19.
17. Fernández Velazco, D. A. 1995. Plegamiento de proteínas. *Boletín de Educación Bioquímica*. 14 (2). 5 – 10.
18. Garel J. R. 1992. Folding the large proteins: multidomain and multisubunit proteins. En: *Protein folding*. T. E. Creighton. 405 - 454.
19. María Elena Cháñez-Cárdenas y Edgar Vázquez-Contreras. 2003. “¿Es el glóbulo fundido un intermediario general en la vía de plegamiento de las proteínas globulares?”, *Revista de la Sociedad Química de México*. 47, Núm. 4, 320-327.
20. María Elena Cháñez-Cárdenas, David Alejandro Cisneros Armas, Luis del Pozo Yauner, Baltazar Becerril y D. Alejandro Fernández-Velasco. 2002. Enfermedades relacionadas al Plegamiento anómalo de las proteínas. *Mensaje Bioquímico*. Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E. (eds). Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, México DF, pp 73-98.
21. Knowels J. R., 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350, 121- 124.
22. Knowels J. R. y Alberly W. J., 1997. Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Act. Chem. Res.* 10, 105 - 111.
23. Blacklow S. C., Raines R. T., Lim W. A., Zamore P. D., y Knowels J. R., 1988. Triosephosphate isomerase catalysis y diffusion controlled. *Biochemistry* 27 (4), 1158 – 1167.
24. Wierenga R. K. y Noble M. E. M. 1992. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Bio.* 224. 1115 – 1126.

25. Schnackerz K. D. y Gracy R. W. 1991. Probing the catalytic site of triosephosphate isomerase by P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *Eur. J. Biochem.* 199. 231 – 238.
26. Wierenga R. K., Noble M. E. M., Postma J. P. M., Groendijk H., Kalk K. H., Hol W. G. J. y Opperdoes. 1991. The crystal structure of the “open” and the “closed” conformation and the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins* 10. 33 – 49.
27. Cháñez-Cardenas, M. E.; Pérez-Hernández, G.; Sánchez-Rebollar, B.; Costas, M.; Vázquez-Contreras, E. **2005**. The reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*, 44, 10883-10892.
28. María Elena Cháñez-Cárdenas, D. Alejandro Fernández-Velasco, Edgar Vázquez-Contreras, Roberto Coria, Gloria Saab-Rincón, and Ruy Pérez Montfort. 2002. Unfolding of triosephosphate isomerase (TIM) from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 399, No. 2, March 15, pp. 117–129.
29. Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M. E. M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M. y Wierenga, R. K., Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* 211, 703-710
30. Pedro Ostoa-Saloma, Georgina Garza-Ramos, Jorga Ramírez, Armando Gomez-Puyuo and Ruy Pérez Montfort. 1997. “Cloning, expresión, purificación and caracterización of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* “ *European Journal Biochemistry*. Vol 244, January 15, pp. 700-705.
31. Hernandez J. L. A., 2001. Texto ilustrado de ingeniería genética y biología molecular. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Editorial Harcourt. Madrid, España. 893 pp.
32. Lambeir AM., Backmann J., Ruiz-Sanz J., Filimonov V., Nielsen JE., Kursula I., Norledge BV. and Wierenga RK., (2000). The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase *Eur. J. Biochem.* 267:2516-2524

33. María Elena Cháñez-Cárdenas and Edgar Vázquez-Contreras. (2002) "Two notably similar proteins follow different unfolding pathways" *Revista de la Sociedad Química de México*. 46, Núm. 3 219-222.
34. María Elena Cháñez-Cárdenas, Miguel Costas and Edgar Vázquez-Contreras (2002). "The equilibrium unfolding of homologous triosephosphate isomerase induced by guanidinium hydrochloride is heterogeneous. The case of Trypanosoma cruzi." *Protein Science* 11, Suppl. 1, August 2002, pag. 205-206.
35. Bart W. Swinkels, Wendy C. Gibson, KlaasA. Osinga, Roel Kramer and Piet Borst. "Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) Triosephosphate isomerase of Trypanosoma brucei". *The EMBO Journal*. Vol. 5, No 6, Jun. 6, pp. 1291-1298.
36. Cháñez-Cardenas, M. E.; Fernández-Velasco, D. A.; Vázquez-Contreras, E.; Coria, R.; Saab-Rincón, G.; Pérez-Montfort, R. **2002**. Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arc. Biochem. Biophys.* 15, 399, 117-129.
37. <http://www.rcsb.org/pdb/>.
38. <http://www.arrakis.es/~lluengo/enlace.html>