



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSTRUCCIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN
DE UNA MUTANTE HIDROFÓBICA EN LA INTERFASE DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

EDUARDO LEYVA HERNÁNDEZ



Tutora: **DRA. MARIANA PEIMBERT TORRES**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO


ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

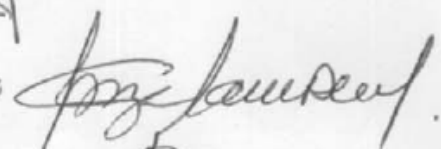
Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:


"Construcción, expresión y purificación de una mutante
hidrofóbica en la interfase de la Triosafosfato Isomerasa"
realizado por Eduardo Leyva Hernández

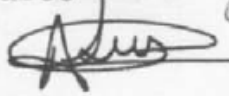
con número de cuenta 097122599, quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

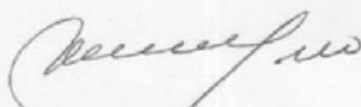
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario Dra. Mariana Peimbert Torres 

Propietario Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez 

Propietario Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco 

Suplente Dr. Alejandro Sosa Peinado 

Suplente Dr. Mario Luis Calcagno Montáns 

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 19 de octubre
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

del 2006 FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. Zenón Cano Santana



El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Mariana Peimbert Torres, en el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización del mismo se recibió una beca de CONACYT 43592.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mariana Peimbert Torres, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutela y por siempre enseñarme a hacerlo de la manera más apropiada. Muchas gracias por tu paciencia y apoyo tanto en la fase experimental como en el trabajo escrito, que sin ellos este trabajo nunca hubiera visto la luz.

Al Dr. Alejandro Fernández, quien me permitió trabajar con la mutante que diseñé durante su estancia en el laboratorio Baker. Por tus valiosas asesorías que permitieron sacar adelante esta tesis, por tus enseñanzas en fisicoquímica y por impimir ánimos en eso que se llama forjar el carácter.

A la Dra. Georgina Garza Ramos, parte de este gran grupo que me abrió las puertas a este campo y que ahora me permite seguir en él. Gracias por apoyarme y confiar en mí.

Al Dr. Alejandro Sosa Peinado por sus valiosos comentarios y correcciones de estilo. Palabras amargas, pero me han ayudado a reflexionar sobre lo que quiero lograr.

Al Dr. Mario L. Calcagno Montáns, por todo el conocimiento que me compartiste durante la revisión. Me dio gusto que te haya gustado la tesis, aunque fuese tan solo la primera parte.

Al Físico Héctor Ceceña cuyo acervo cultural no solo repercutió en mi formación si no también en mi perseverancia.

A los Doctores Edgar Vázquez Contreras y María Elena Chánez Cárdenas por sus enseñanzas al final y al principio de mi carrera, respectivamente.

A todos mis compañeros del laboratorio de fisicoquímica y diseño de proteínas.

A mis amigos de ciencias, en especial a Huilver, Julio César y Daniel.

A Beto, David y Fermín.

A mi madre Ma. Mónica Hernández Medina por todo el cariño que me has dado, gracias. Realmente eres un ejemplo difícil de seguir.

A mi Abuela “Vito” por darme las fuerzas para seguir siempre adelante.

A mi tía abuela Paulina Medina.

A mi padre Emilio Leyva Méndez.

A mi familia, incluyendo a aquellos que ya no están conmigo.

“A wizard is never late, nor is he early. He always arrives when he means to”

Gandalf, the grey.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. LA RELEVANCIA DEL ESTUDIO DEL PLEGAMIENTO E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS	5
1.1.1. <i>Las proteínas en los sistemas biológicos.</i>	5
1.1.2. <i>Las proteínas en la ciencia básica y aplicada.</i>	6
1.2. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS	7
1.2.1. <i>Composición y estructura de las proteínas.</i>	7
1.2.2. <i>Conformaciones estables en las proteínas.</i>	11
1.3. EL PROBLEMA DEL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS.....	12
1.3.1. <i>Descifrando el segundo código genético.</i>	12
1.3.2. <i>El postulado de Anfinsen y la paradoja de Levinthal.</i>	13
1.4. COMO SE DETERMINA LA ESTRUCTURA DE UNA PROTEÍNA	17
1.4.1. <i>De la secuencia a la estructura.</i>	17
1.4.2. <i>Las mutaciones en las proteínas.</i>	17
1.4.3. <i>Las herramientas en la ingeniería de proteínas.</i>	18
1.5. ESTUDIO DEL PLEGAMIENTO Y ASOCIACIÓN DE PROTEÍNAS	19
1.5.1. <i>El plegamiento en el marco fisicoquímico.</i>	20
1.5.2. <i>El plegamiento in vivo e in vitro.</i>	22
1.5.3. <i>Propuestas de mecanismos de plegamiento.</i>	23
1.5.4. <i>La asociación en proteínas oligoméricas.</i>	24
1.6. LA ENZIMA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA	27
1.6.1. <i>Generalidades.</i>	27
1.6.2. <i>Estructura y características del barril α/β8.</i>	30
1.6.3. <i>El barril α/β en monómeros y dímeros de la triosafosfato isomerasa.</i>	31
1.6.4. <i>El mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa.</i>	33
1.6.5. <i>La Triosafosfato isomerasa de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> (ScTPI).</i>	36
1.6.6. <i>Plegamiento y asociación de la ScTPI.</i>	37
1.7. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	39
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	42
2.1. LA INTERFASE DE LA TPI.....	42
2.2. CRITERIOS A TOMAR EN CUENTA PARA LA MODIFICACIÓN DE UNA INTERFASE	44
2.3. JUSTIFICACIÓN	44
2.4. EL DISEÑO DE LA MUTANTE TPI LFFTA.	45
3. OBJETIVO	48
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	48
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	48
4. HIPÓTESIS	49
5. MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1. MATERIALES	50
5.1.1. <i>Medios de cultivo.</i>	51
5.1.2. <i>Plásmidos.</i>	51
5.1.3. <i>Oligonucleótidos.</i>	52
5.2. PURIFICACIÓN DE DNA	53

5.2.1. Purificación de plásmidos de DNA.....	53
5.2.2. Purificación de los fragmentos de PCR.....	55
5.2.3. Extracción de PCR a partir de geles de agarosa.....	55
5.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	56
5.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	57
5.4.1. Construcción por PCR.....	58
5.4.2. PCR diagnóstico.....	61
5.5. CLONACIÓN.....	62
5.5.1. Sistema pGEM-T Easy Vector.....	62
5.5.2. Ligación del inserto con el pGEM-T Easy Vector.....	63
5.5.3. Transformación de XLI-Blue.....	65
5.5.4. Selección de clonas recombinantes.....	65
5.6. SECUENCIACIÓN.....	66
5.7. ENSAYOS DE EXPRESIÓN Y SOLUBILIDAD.....	68
5.7.1. Sistemas de Expresión.....	68
5.7.2. Transformación de las cepas de expresión.....	68
5.7.3. Expresión y solubilidad de TPI LFFTA en BL21 (DE3), BL21 (DE3) Plys y VR101.....	69
5.8. PURIFICACIÓN.....	70
5.8.1. Expresión, lisis y precipitación con sulfato de amonio.....	70
5.8.3. Primera Purificación.....	71
5.8.3. Segunda Purificación.....	72
5.8.4. Tercera Purificación.....	73
5.8.5. Cuarta Purificación.....	74
5.9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	74
5.9.1. SDS-PAGE.....	74
5.9.2. Medición de Actividad.....	75
5.9.3. Radio de Stokes.....	76
5.9.4. Desnaturalización por calor seguida por dicroísmo circular.....	76
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	78
6.1. CONSIDERACIONES DEL DISEÑO.....	78
6.2. CONSTRUCCIÓN DEL GEN TPI LFFTA.....	79
6.3. CLONACIÓN.....	86
6.3.1. Ligación y transformación.....	86
6.3.2. Selección de clonas recombinantes.....	87
6.3.3. Verificación de la construcción.....	88
6.3.4. Confirmación por PCR.....	89
6.3.5. Secuenciación.....	92
6.4. ENSAYOS DE EXPRESIÓN Y SOLUBILIDAD.....	97
6.5. PURIFICACIÓN.....	100
6.5.1. Primera Purificación.....	101
6.5.2. Segunda Purificación.....	107
6.5.3. Tercera Purificación.....	113
6.5.4. Cuarta Purificación.....	119
6.6. CARACTERIZACIÓN DE LFFTA.....	125
6.6.1. Radio hidrodinámico.....	125
6.6.2. Desnaturalización por calor seguida por dicroísmo circular.....	126
6.6.3. Actividad catalítica.....	127
7. CONCLUSIONES.....	129
8. REFERENCIAS.....	131

RESUMEN

La triosafosfato isomerasa es una enzima con un papel central en el metabolismo de la glucosa, catalizando la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P). Aprovechando el conocimiento que se tiene sobre la estructura y el proceso de plegamiento de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI), utilizamos a este homodímero obligado como modelo para entender la contribución de los aminoácidos hidrofóbicos a las fuerzas de asociación entre sus subunidades. El diseño que se obtuvo con el programa ROSSETA junto con el uso de algunas técnicas de biología molecular, sirvió para alterar la arquitectura de la ScTPI y construir una mutante hidrofóbica en su interfase en la que se cambiaron cinco residuos (K17L, Y46F, D48F, Q82T y D85A) para tratar de aumentar la estabilidad del dímero. Después de construir el gen *tpi LFFTA*, se clonó en el vector pGEM, y se expresó utilizando este vector de clonación como sistema de expresión. Se llevaron a cabo cuatro esquemas de purificación para encontrar las condiciones apropiadas para purificar la enzima. La mutante TPI-LFFTA, se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y cromatográficos, junto con ensayos de actividad. Se encontró que solo es parcialmente activa y que tiene un radio hidrodinámico mayor que el de la proteína silvestre en su estado nativo. Probablemente adoptó una estructura de dímero expandido, similar a una estructura nativa pero parcialmente desnaturalizada. Su desnaturalización se ajusta mejor a un modelo de dos estados que a uno de tres estados. La transición estructural fue irreversible al incrementar la temperatura con una tasa de $1.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, probablemente por la agregación de la enzima desnaturalizada. Además, la mutante exhibió una T_m de $75.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, un valor que está por encima de la T_m reportada para la ScTPI silvestre ($59.5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Aunque la TPI-LFFTA no resultó completamente funcional, se generó una enzima más estable.

ABSTRACT

The triosephosphate isomerase is an enzyme with a main role in glucose metabolism, catalyzing the interconversion between dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde 3-phosphate (DGAP). Taking advantage of the knowledge available about the structure and folding process of the TPI from *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI), we used this obligate homodimer as a model to understand the contribution of hydrophobic aminoacids to the association forces between subunits. ROSSETA modelling and molecular biology methods allowed us to create a mutant with an hydrophobic interface, changing five residues (K17L, Y46F, D48F, Q82T and D85A) to enhance the dimer stability. The *tpi LFFTA* gene was constructed, cloned and expressed using a pGEM-easy vector. It was necessary to perform four purification schemes in order to find out the appropriate conditions needed to purify the enzyme. The resultant mutant, TPI-LFFTA, was characterized by spectroscopic and chromatographic methods, along with activity assays. It was found to be just partially active and have a larger hydrodynamic radius compared to the native wild-type protein. This probably means that the mutant adopted an expanded dimeric structure, which remains a native-like structure but is slightly denatured. The unfolding of this enzyme showed a monofasic behavior that fits better to a two state model than to a three state model. The structural transition was irreversible in thermal scannings conducted at a 1.0 °C min⁻¹ rate, irreversibility was likely caused by aggregation of the denaturalized enzyme. Further, the mutant exhibited a T_m of 75.6 °C, a value above the reported T_m for the ScTPI (59.5 °C). Although TPI-LFFTA was not a completely functional enzyme, it was more stable.

ABREVIATURAS

α -GDH	α – Glicerolfosfato Deshidrogenasa
DC	dicroísmo circular
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	cromatografía líquida para separación rápida de proteínas, del inglés “fast protein liquid chromatography”
G3P	D-gliceraldehído 3-fosfato
<i>lacI^d</i>	Marcador genético que indica sobre expresión del represor de <i>lac</i>
λ	longitud de onda
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “polymerase chain reaction”
<i>plac</i>	Promotor de la RNA polimerasa de <i>E. coli</i> que puede ser inducido con lactosa.
pLys ó pLysS	Denominación de las cepas que tienen un plásmido de expresión con el que pueden expresar la lisozima de T7 de forma constitutiva
PMSF	Fluoruro de fenil metano sulfonilo
pT7	Promotor de la RNA polimerasa del bacteriofago T7
ScTPI	triosafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEA	Trietanolamina
TED	TEA, EDTA y DTT
TPI	triosafosfato isomerasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La relevancia del estudio del plegamiento e ingeniería de proteínas

1.1.1. *Las proteínas en los sistemas biológicos.*

Podemos concebir la vida como un comportamiento sinérgico de macromoléculas que surge de una compleja red de reacciones químicas; visto de una forma todavía más sencilla, se puede decir que la vida depende de su capacidad de autocatalizarse, reproducirse y evolucionar. Desde que se originó la vida en la Tierra, algunas macromoléculas como el DNA, el RNA y las proteínas han sido parte primordial de este suceso. Estos elementos son los que mantienen coherencia en esta red y permiten que los agregados que constituyen a los seres vivos permanezcan como agentes autógenos capaces de manifestar una serie de propiedades emergentes, las cuales serían incapaces de conservar cada uno sus elementos por separado (Kauffman, 2000; Holland, 2004).

Las proteínas son polímeros de cadenas lineares con 20 tipos de aminoácidos estándar como sus elementos básicos. Su síntesis ocurre a nivel molecular en todos los seres vivos, desde organismos procariontes extremófilos hasta organismos eucariontes mucho más complejos y organizados. Aunque todas estas macromoléculas están formadas por diferentes combinaciones de los mismos aminoácidos, durante su evolución se han vuelto capaces de desempeñar funciones muy diversas:

- 1) Forman parte estructural de membranas y paredes celulares.
- 2) Sirven de transportadores pasivos y/o activos (canales y bombas) de moléculas como iones, agua, glucosa, entre otras.
- 3) Funcionan como transductores y mediadores de señales intra e intercelulares.
- 4) Son componentes fundamentales de la maquinaria de reconocimiento y funcionamiento del sistema inmune.

5) Catalizan las reacciones metabólicas mediante las cuales los organismos obtienen, a partir de su entorno, el poder reductor y los compuestos esenciales que necesitan para realizar la biosíntesis de sus macromoléculas (Branden y Tooze, 1999; Stryer, 1995).

Inclusive una célula bacteriana relativamente sencilla como *Escherichia coli*, bacteria ampliamente conocida dentro del campo de la biotecnología, tiene la capacidad de llevar a cabo más de un millar de reacciones y puede presentar de 3 a 6 millares de distintos compuestos, la mayoría de los cuales son proteínas exclusivas de este organismo. (Voet, 2004)

1.1.2. *Las proteínas en la ciencia básica y aplicada.*

Mucho tiempo antes de que existieran registros escritos de la historia del hombre, este ya era capaz de manipular su entorno para elaborar alimentos y bebidas como el pan, el queso, el vino y la cerveza. Sin duda alguna, esta inexcusable peculiaridad del hombre de utilizar sus conocimientos sobre el medio ambiente que lo rodea para lograr beneficios en su favor, lo ha caracterizado desde el principio de su existencia (Sloan, 1996).

Hoy en día se han logrado avances vertiginosos en la biología celular, en la bioquímica y en particular en el área que concierne a esta tesis, el campo de estudio del plegamiento e ingeniería de proteínas. Las enzimas constituyen un grupo particularmente importante de proteínas de interés biotecnológico, en especial dentro del área conocida como biocatálisis. Pero ¿por qué empeñarse en trabajar con catalizadores biológicos en lugar de trabajar con aquellos que ha logrado la industria química? Existen varios argumentos que apoyan esta moción. Tal vez el que tenga mayor peso, es el hecho de que la capacidad catalítica de estos sistemas biológicos supera en varios órdenes de magnitud a su contraparte sintética. Aunque también se tiene que tomar en cuenta su alta especificidad y su selectividad. La especificidad se refiere a que actúan sobre un conjunto muy

reducido de sustratos que generalmente son muy parecidos entre sí. La selectividad indica que ejercen su función sobre un grupo químico particular del sustrato, siempre y cuando este presente la configuración espacial correcta. No debemos olvidar que la catálisis dentro de las células se lleva a cabo bajo temperaturas y presiones moderadas, además de realizarse siempre en soluciones acuosas a valores de pH cercanos a la neutralidad. En contraste, la gran mayoría de los productos químicos que se generan actualmente son el resultado de reacciones que utilizan toda clase de condiciones de temperatura, presión y uso de disolventes. Por esta razón, se vuelve increíblemente complicado tratar de implementar el uso de una enzima silvestre (denominación que reciben todas las enzimas cuya composición no ha sido modificada con respecto al estado en el que se les encuentra dentro de la naturaleza) a este tipo de procesos. Aunado a esto, la purificación de enzimas a partir de microorganismos suele ser compleja y en muchas ocasiones las cantidades obtenidas son diminutas. Parte de las investigaciones realizadas en las últimas décadas han servido para superar algunos de estos impedimentos con adelantos en la obtención e ingeniería de biocatalizadores, por lo que las proteínas se han convertido en herramientas trascendentales, en particular por su amplio potencial de aplicaciones en la industria y en áreas como la química y la medicina, entre otras. Es cierto que no todo este conocimiento es aplicable, pero la ciencia básica también tiene la gracia de otorgarnos un mejor entendimiento de la naturaleza, aunque contraproducentemente genere cada vez más interrogantes que respuestas.

1.2. Estructura de proteínas

1.2.1. Composición y estructura de las proteínas.

Como se mencionó, las proteínas son cadenas unidimensionales formadas por n aminoácidos. Precisamente son las características particulares de cada uno de estos aminoácidos lo que

determina la conformación final y la función de las proteínas. Existen 20 tipos distintos de aminoácidos, pero todos tienen una estructura química en común integrada por un átomo de carbono central o $C\alpha$ cuyas cuatro valencias están ligadas a: un grupo amino (NH_2), un grupo carboxilo ($COOH$), un átomo de hidrógeno (H) y un grupo R o cadena lateral. Cada uno de los aminoácidos de una cadena proteica se denomina formalmente como residuos a partir del momento en el que pasan a formar parte de ésta. Los residuos están unidos de forma semejante, a través de enlaces peptídicos; este tipo de enlace es una unión covalente que se da mediante la unión entre el grupo carboxilo del aminoácido n y el amino del aminoácido $n+1$, con la subsiguiente eliminación de una molécula de agua. El enlace peptídico (C – N) tiene un carácter parcial de doble enlace, lo que significa que es ligeramente más corto que un enlace covalente sencillo, además es rígido y plano por lo que no existe rotación a su alrededor. A todos los átomos que forman parte de esta sucesión de enlaces peptídicos se les conoce como “cadena principal” o “esqueleto polipeptídico”. Los átomos que forman parte de este esqueleto por cada residuo son: un $C\alpha$, un grupo amino (NH) unido al $C\alpha$ y un grupo carbonilo ($C=O$), cuyo C también se encuentra unido al $C\alpha$. Es a partir de este esqueleto que se proyectan las numerosas cadenas laterales de los residuos. Sin embargo, las proteínas distan mucho de ser polipéptidos homogéneos, puesto que la cadena lateral o grupo R difiere entre cada aminoácido, confiriéndoles diversas propiedades tanto estructurales como fisicoquímicas. Cabe destacar que la cadena principal es polar independientemente del carácter de las cadenas laterales.

Kendrew descubrió que aquellos residuos cuyas cadenas laterales tienen propiedades hidrofóbicas tienden a ocultarse en el interior o núcleo de la proteína, mientras que los residuos con cadenas laterales hidrofílicas prefieren la periferia de la proteína (Voet, 2004; Stryer, 1995).

Al referirnos a las proteínas utilizamos cuatro niveles de organización: **Estructura primaria**. Este es el nombre que recibe el número de aminoácidos presentes y el orden en el que están

enlazados dentro de una cadena polipeptídica. **Estructura secundaria.** Durante la formación del núcleo hidrofóbico, la cadena principal también tiene que plegarse. Debido a que esta cadena es altamente polar, la única forma de neutralizar sus dipolos es formando un arreglo en el que se presentan interacciones entre sus grupos mediante puentes de hidrógeno. En este arreglo, las distintas regiones de la cadena forman estructuras repetitivas y estables conocidas como estructuras secundarias, las cuales son generalmente de dos tipos: (1) El primero son las hélices α (figura 1), las cuales fueron descritas por primera vez en 1951 por Linus Pauling (Olivares-Quiroz y García-Colín, 2004). Como su nombre lo indica, son hélices formadas por una región que oscila de 6 a 30 residuos de longitud, de 3.6 aminoácidos por vuelta y puentes de hidrógeno entre el amino del residuo n y el carbonilo del residuo $n + 4$. (2) El segundo tipo son las hojas β (figura 1), que en efecto se asemejan a una hoja de papel plegada en zigzag vista desde un costado. A diferencia de las hélices α , las hojas β están formadas por más de una región de la cadena, cada región de la hoja β es de 5 a 10 residuos de largo y recibe el nombre de hebra. Las hebras se alinean adyacentemente una con otra,

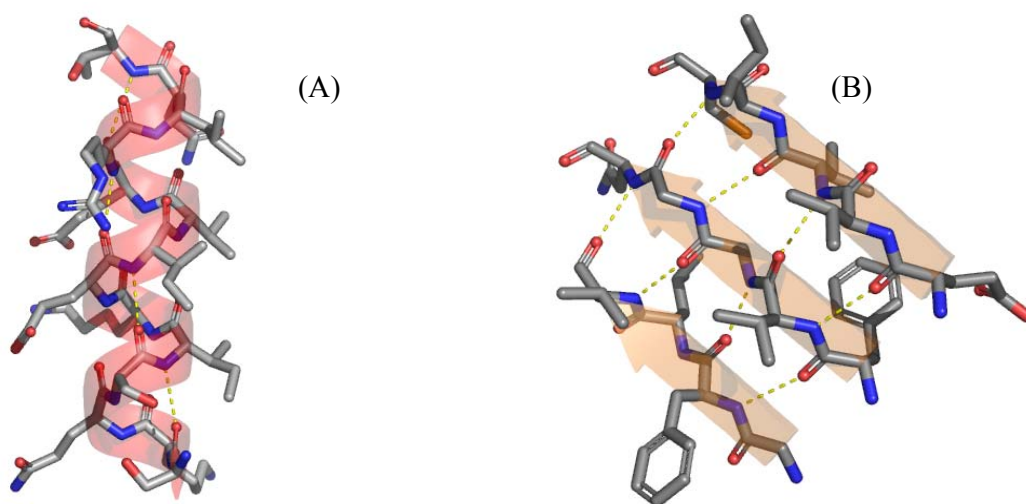


Figura 1. Tipos de estructura secundaria en modelos de caricatura y bastones. (A) Hélice α (B) Hoja β formada por tres hebras.

permitiendo que entre ellas se formen puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y los grupos amino de la cadena principal. Además de estas dos estructuras encontramos algunas regiones de estructura irregular que reciben el nombre de “loops” o asas, debido a su carácter hidrofílico generalmente se encuentran en contacto con el solvente en la periferia de la proteína.

Estructura terciaria. Esta estructura se forma cuando los elementos de estructura secundaria se agrupan y forman unidades globulares compactas conocidas como dominios o subunidades. Cada dominio se caracteriza porque todos sus elementos de estructura secundaria se pliegan de forma simultánea e independiente a otras partes de la proteína, además de desempeñar funciones específicas.

Estructura cuaternaria. Algunas proteínas alcanzan su estado final con sólo una subunidad (monómeros), pero muchas otras están formadas por varias cadenas polipeptídicas o subunidades que tienen que ensamblarse en una sola molécula, la cual recibe el nombre de oligómero o estructura cuaternaria (Branden y Tooze, 1998).

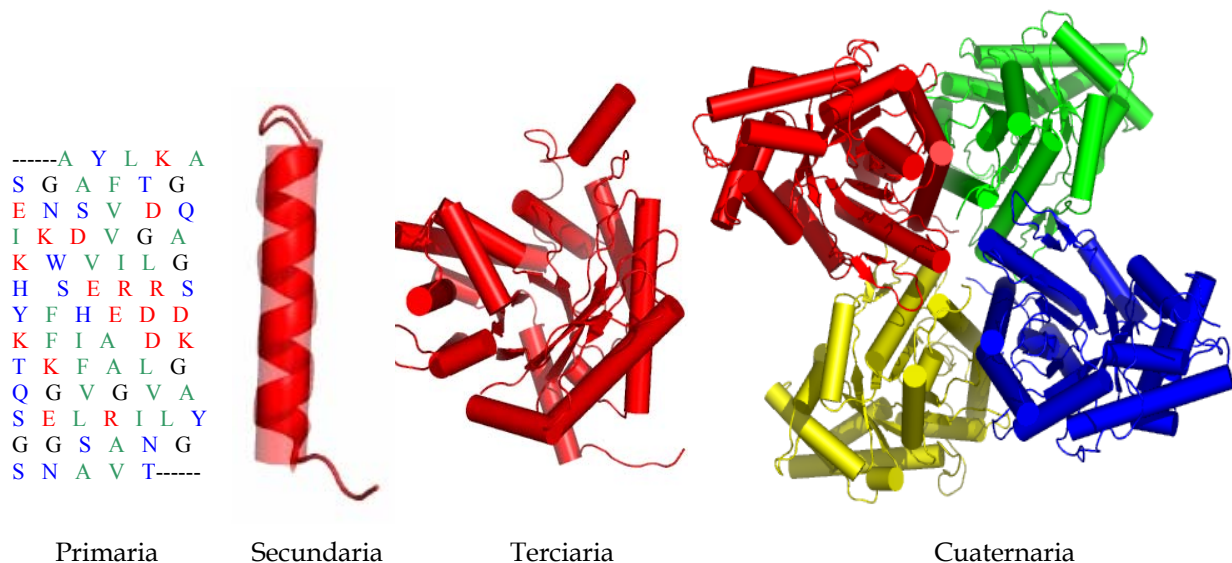


Figura 2. Los cuatro niveles de organización de las proteínas. Representación para la fructosa 1, 6 -bisfosfato aldolasa de músculo de conejo.

1.2.2. Conformaciones estables en las proteínas.

Los puntos de inicio y término para virtualmente todos los estudios de plegamiento de proteínas involucran únicamente a aquellos estados conformacionales que son estables, dado que son las únicas conformaciones que pueden ser caracterizadas a detalle y se mencionan a continuación.

A. El estado nativo o plegado (N). Las conformaciones nativas de las proteínas son aquellas en las que se encuentran totalmente plegadas, presentando actividad bajo condiciones fisiológicas. Se conocen en gran detalle a partir de las estructuras determinadas por cristalografía de rayos X y por Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Aún completamente plegadas, las proteínas demuestran varios grados de flexibilidad. Ésta es mayor en la superficie proteica, donde algunas cadenas laterales y unas cuantas asas tienen cierta libertad de adoptar varias conformaciones similares ya que ninguna de estas conformaciones está energéticamente favorecida por encima de las otras. Aunque la flexibilidad es menor en el interior, aun ahí ocurre rotación de las cadenas laterales. Sin embargo, podemos decir que una proteína tiene la misma arquitectura tridimensional puesto que permanece relativamente similar a la estructura promedio determinada por cristalografía de rayos X o por NMR (Gerstein y Echols, 2004).

B. El estado desplegado (D). La proteína desplegada ideal es una cadena con una conformación al azar (random coil) o elemento no estructurado. Se trata de un estado que no es compacto, en el que la cadena está abierta y expuesta totalmente al solvente. Los ángulos de rotación de cada enlace son independientes de aquellos enlaces distantes en la secuencia y todas las conformaciones tienen energías libres similares. Aunque las repulsiones estéricas son significativas entre átomos cercanos en la estructura covalente, y ponen limitaciones en la flexibilidad local. A pesar de estas restricciones en la flexibilidad conformacional, hay muchas conformaciones posibles aun para el caso de una proteína pequeña (Kohn y col., 2004; Uversky, 2002).

C. Estados intermediarios (I). Se ha observado bajo ciertas condiciones que una variedad de

proteínas exhiben una o varias conformaciones estables que no están completamente plegadas, ni completamente desplegadas. Estas conformaciones tienen suficientes similitudes para sugerir que son diferentes manifestaciones de una tercera conformación estable. Algunos intermediarios tienen las siguientes propiedades: (1) Las dimensiones totales son mucho menores que las de un elemento no estructurado y sólo marginalmente mayores que aquellas del estado completamente plegado. (2) El contenido promedio de estructura secundaria es similar a aquel del estado plegado. (3) Las cadenas aromáticas del interior están en entornos homogéneos, en contraste a los ambientes asimétricos que tienen en el estado completamente plegado. Cuando se observa una estructura estable con estas características, es decir, que presente una estructura secundaria parecida a la nativa y un interior afín a los líquidos, se está observando un intermediario del tipo glóbulo fundido (Uversky, 2002).

1.3. El Problema del Plegamiento de Proteínas

1.3.1. Descifrando el segundo código genético.

Actualmente sabemos que el DNA es la molécula de la herencia y que los genes de la doble hélice especifican los diferentes tipos de proteínas que son producidos por las células. Sin embargo, el DNA no se usa como molde directo para la síntesis de estas macromoléculas. Son las moléculas de RNAm producidas durante la transcripción del DNA, las que realizan esta función en un proceso mejor conocido como traducción. La traducción se lleva a cabo en los ribosomas, donde junto con el RNA de transferencia (RNAt) y el RNA ribosomal (RNAr), el RNAm es leído como una serie de tripletes de bases (código genético) que sirve para determinar cada uno de los aminoácidos que se incorporan en una naciente cadena polipeptídica. (Voet, 2004) Ya se ha dado el primer paso descifrando el código genético, por ello, al determinar el genoma de un organismo podemos saber

la secuencia de las proteínas que le constituyen. Sin embargo, la función de las proteínas requiere de una estructura tridimensional específica que es la única con actividad biológica. Es durante y después de su síntesis que la cadena de aminoácidos sufre una transformación conformacional y finalmente adopta esta estructura particular a través de un proceso conocido como plegamiento. El hecho de que la mayoría de las proteínas purificadas puedan replegarse *in vitro* espontáneamente de una manera tan fidedigna, aún después de ser completamente desplegadas, indica que la estructura tridimensional debe estar implícita en su estructura primaria (secuencia de aminoácidos). Al proceso de como ocurre esto se le conoce como el problema del plegamiento de proteínas (Jaenicke, 1999; Lindorff-Larsen y col., 2005).

Sin duda alguna los avances en el campo de la genómica han permitido que cada vez se conozca mucho mejor el genoma de numerosos organismos, incluido el del hombre, pero sigue siendo esencial conocer la naturaleza de las proteínas codificadas por estos genes. Por ello, entender cómo se pliega una proteína adquiriendo su estructura tridimensional con relevancia para la vida, se ha convertido en uno de los enigmas centrales de la Biología contemporánea (Yon, 2001).

1.3.2. *El postulado de Anfinsen y la paradoja de Levinthal.*

El estudio del Plegamiento de Proteínas es un campo que actualmente se encuentra sometido a una exhaustiva investigación, pero la pregunta de cómo es posible que las proteínas adquieran su estructura tridimensional a partir de tan sólo una secuencia lineal de aminoácidos ha sido perseguida por un tumulto de investigadores desde hace ya varias décadas y muy probablemente nos mantendrá ocupados por muchas más. Un claro ejemplo de esto lo constituyen las investigaciones realizadas por Wu, quien en 1929, tiempo en el que no se sabía nada de la

estructura de las proteínas, se encontraba estudiando el proceso inverso del plegamiento, la desnaturalización (Ghélis y Yon 1982).

No obstante, fue hasta 1960 que resurgió el interés en este campo, gracias al experimento seminal de C. Anfinsen, el cual refutó la creencia de que al igual que en otros sistemas químicos, eran las interacciones covalentes las que determinaban la estructura tridimensional de las proteínas. En este experimento in vitro mostró como la Ribonucleasa A (RNAsa A), una enzima extracelular de 124 residuos con 4 puentes disulfuro, era capaz de retomar su estructura tridimensional después de haber sido desnaturalizada; indicando que efectivamente la secuencia de aminoácidos es la que determina la estructura nativa sin el requerimiento de factores extrínsecos o aporte de energía para alcanzar esta conformación y que por tanto eran las interacciones débiles no covalentes y no las interacciones covalentes las que guiaban el plegamiento.

En la primer fase del experimento, los 4 enlaces disulfuro (S-S) se reducían a 8 grupos sulfidrilo (-SH) usando β -mercaptoetanol y se desnaturalizaba la proteína con urea 8 M; bajo estas condiciones, la enzima era inactiva. En la segunda fase, se removía la urea mediante diálisis; luego los grupos -SH eran oxidados formando nuevamente enlaces S-S. Dado que Anfinsen carecía de métodos que lo ayudaran a visualizar la estructura de la proteína, trabajó bajo la premisa de que si la proteína era capaz de recuperar su estructura nativa espontáneamente después de la remoción de la urea, también recuperaría su actividad. En efecto, la actividad de la enzima tratada fue > 90% de la actividad de la enzima sin tratar (Anfinsen, 1973).

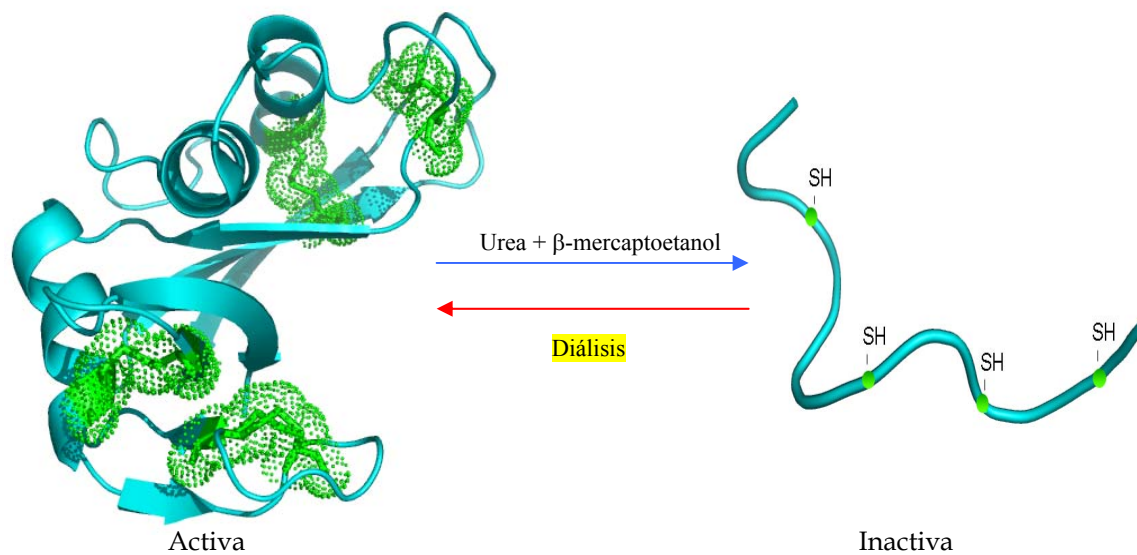


Figura 3. Experimento de renaturalización de la RNasa. Anfinsen mostró que la RNasa A, una enzima de 124 residuos y cuatro puentes disulfuro (marcados en verde) era capaz de renaturalizarse y recuperar su actividad.

A partir de este postulado surgió el corolario del control termodinámico sobre el plegamiento, el cual indica que la estructura tridimensional plegada de una proteína es termodinámicamente estable y representa un mínimo en la escala de energía libre de Gibbs. Por otra parte, al tomar en cuenta el corto tiempo requerido por el proceso de plegamiento tanto *in vivo* como *in vitro*, nació la paradoja de Levinthal, la que podemos ejemplificar para un sistema sencillo como una cadena polipeptídica de sólo 100 aminoácidos. Asumiendo que para cada uno de los residuos de la cadena existen únicamente dos conformaciones, existirían 2^{100} conformaciones posibles para este polipéptido; considerando que se requiere 10^{-11} segundos para que un residuo cambie de una conformación a la otra, la búsqueda al azar de la estructura nativa a través de todas estas conformaciones requeriría 10^{11} años, un tiempo completamente irreal en el contexto biológico donde el tiempo de plegamiento se encuentra en el orden de segundos o minutos. Es entonces claro que la evolución ha encontrado una solución efectiva a este problema de combinatoria. Podemos asumir que esta solución implica que las proteínas se pliegan siguiendo rutas preferenciales de

plegamiento, es decir, la cadena polipeptídica no visita cada una de las conformaciones posibles; en su lugar sólo va tomando la forma de aquellos conforméromos que sirvan de intermediarios en el camino hacia la estructura final. Este camino estaría conducido por un control cinético del plegamiento. La hipótesis termodinámica y la hipótesis cinética se ilustran en la figura 4; no obstante es indiscutible que ambas sirvieron de punto de partida para la realización de numerosos esfuerzos por hallar los caminos de plegamiento, a partir de los cuales han surgido diversos modelos (Creighton, 1993; Honig, 1999).

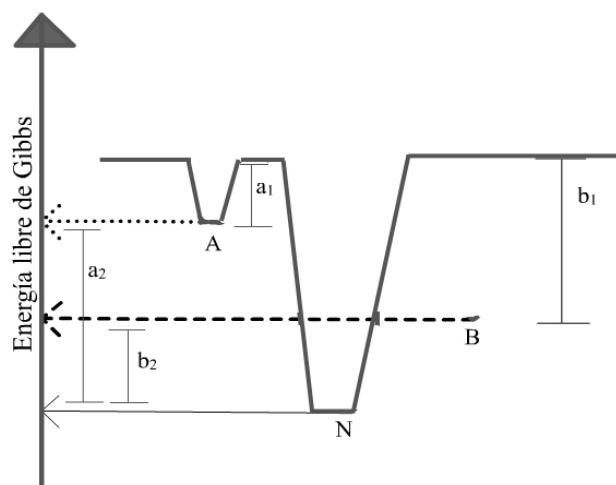


Figura 4. La conjunción de las hipótesis termodinámica y cinética. Se muestran tres estados energéticos, N representa la forma nativa y por tanto el mínimo energético global, mientras que A y B representan cada uno a un mínimo energético local, probablemente intermediarios parcialmente plegados. El estado B se encuentra energéticamente más cercano al estado N ($b_2 < a_2$), mientras que el estado A se halla cinéticamente más cerca al estado N ($a_1 < b_1$) debido a que la barrera energética a superar es menor.

1.4. Como se determina la estructura de una proteína

1.4.1. *De la secuencia a la estructura.*

La evidencia que corroboró la hipótesis de que la estructura primaria determina el camino de plegamiento de las proteínas así como su estructura final surgió del trabajo realizado por Jonathan King (Yu y King, 1984). Su estudio implicó la renaturalización de una proteína del bacteriófago P22. King realizó una variedad de mutantes de esta proteína en las que cambió la secuencia de aminoácidos. Algunas de las mutantes eran incapaces de renaturalizarse a 39 °C, temperatura en la que normalmente inicia la renaturalización de la proteína silvestre, y sólo lograban hacerlo hasta alcanzar los 30 °C. Los cambios de aminoácidos causaron un cambio de sensibilidad con respecto a la temperatura, por lo que aparentemente afectaron tan sólo la estabilidad de los intermediarios durante el proceso de plegamiento. Esta observación sugiere que la secuencia de los aminoácidos de una proteína dicta su estructura nativa especificando como se tiene que plegar a su conformación nativa (Voet, 2004).

1.4.2. *Las mutaciones en las proteínas.*

Las sustituciones son una clase importante de mutaciones en proteínas que implican reemplazar un aminoácido por otro. En la naturaleza, una sustitución puede surgir debido a un error en la replicación, en la transcripción, en la traducción o inclusive durante las reacciones post-traduccionales. Experimentalmente, numerosas técnicas son rutinariamente empleadas para alterar deliberadamente los tipos de aminoácidos en lugares específicos de la secuencia. Una sola sustitución puede originar tanto un cambio imperceptible (mutaciones inocuas) como un cambio radical (mutaciones disruptivas) en las propiedades moleculares: función, estabilidad, o estructura (Voet, 2004).

No se sabe exactamente cuantos cambios en la secuencia de aminoácidos se necesitan para que una proteína deje de plegarse a su conformación nativa, ya sea para que permanezca desplegada o para que adopte una nueva conformación. Pero se ha encontrado que proteínas que comparten tan poco como un 20% de identidad pueden ser funcional y estructuralmente similares. Algunos estudios como el que se realizó con GB1, donde esta proteína adoptó otro plegamiento al cambiar un 50% de sus 56 residuos, demostraron que no todos los aminoácidos tienen papeles de igual importancia en determinar un plegamiento particular (Voet, 2004).

Se ha encontrado que las proteínas son sorprendentemente adaptativas a las mutaciones que se esperaba fueran disruptivas, no obstante, el núcleo hidrofóbico parece ser el aspecto mas crítico para conservar su estructura y estabilidad (Seckler y Jaenicke, 1992).

En cuanto a funcionalidad se refiere, los aminoácidos que se encuentran formando parte del sitio activo suelen ser muy conservados entre proteínas homólogas debido a la gran presión de selección a la que han estado sometidos, por lo que cualquier cambio puede resultar en la disminución o inclusive pérdida de la actividad.

En el caso de la interfase proteína – proteína suele existir un mayor grado de libertad ya que no todos los aminoácidos son tan conservados como en el sitio activo, cabe destacar que aunque en estas posiciones se pueden encontrar aminoácidos distintos, a menudo se trata de aminoácidos con características similares (Gerstein y Echols, 2004).

1.4.3. *Las herramientas en la ingeniería de proteínas.*

El diseño de proteínas solubles y bien estructuradas es difícil debido a la complejidad de las interacciones en juego. En lo que concierne a la forma de realizar este diseño, hay dos corrientes principales. La primera es del diseño racional, e implica realizar un estudio exhaustivo sobre la

enzima y sus características que se desean modificar, para así determinar los sitios sobre los que se aplicará la mutagénesis dirigida. Es cierto que este procedimiento requiere de un gran número de antecedentes, pero al momento de obtener los resultados se tiene una idea más concreta de las razones por las cuales se acepta o se desecha la hipótesis original. La segunda corriente se conoce como evolución dirigida, consiste en experimentos combinatorios que crean muchas secuencias que sirvan para vencer nuestra falta de entendimiento sobre el plegamiento y otras propiedades moleculares mediante la obtención de resultados inesperados. Aunque estos métodos pueden generar un vasto número de secuencias (10^4 - 10^{12}), esta cantidad se torna insignificante al compararla con el número de secuencias posibles para tan sólo una proteína de 100 residuos ($20^{100} \approx 10^{130}$). Por ello, en muchas ocasiones este proceso no se lleva a cabo de forma completamente estocástica, acotándose a la creación de secuencias nuevas dentro de un rango delimitado por parámetros conocidos, como puede ser una base de datos (Peimbert, 2003; Zhao y col., 2002).

La mejora en el desarrollo de herramientas computacionales a la par del aumento de la capacidad de procesamiento de los ordenadores y la posibilidad de compartir datos estructurales a través de las bases de datos que existen en la extensa red del Internet, han sido de gran ayuda en la predicción de estructuras de proteínas modificadas y en aquellas diseñadas *de novo*.

1.5 Estudio del Plegamiento y Asociación de Proteínas

Para facilitar su comprensión, el problema del plegamiento de proteínas puede ser simplificado dividiéndolo en tres preguntas diferentes aunque relacionadas entre sí: (1) ¿Mediante qué camino o proceso cinético, adopta la proteína su conformación nativa y biológicamente activa? (2) ¿Cuál es la base física de la estabilidad de las conformaciones plegadas? (3) ¿Por qué la secuencia de aminoácidos determina un proceso de plegamiento y una estructura tridimensional en particular?

La meta final a la que queremos llegar, es ser capaces de predecir la estructura y la función de una proteína completamente plegada a partir de tan sólo la secuencia lineal de los aminoácidos que la conforman. Este evento debería ser posible dado un entendimiento completo de las preguntas arriba mencionadas. Si bien se han logrado avances considerables en años recientes, como el éxito en el diseño de novo de proteínas sencillas completamente plegadas, el poder alcanzar esta meta no es seguro, o por lo menos no lo es a corto plazo, pues al parecer no existen respuestas sencillas para estas preguntas.

1.5.1. *El plegamiento en el marco fisicoquímico.*

Si bien es cierto que no se sabe si el estado nativo de una proteína corresponde a un mínimo energético global o a un mínimo energético local, está firmemente establecido que en condiciones fisiológicas, durante el plegamiento la variación de energía libre de Gibbs es negativa ($\Delta G_{\text{plegamiento}} < 0$), lo que lo hace un proceso termodinámicamente favorable capaz de ocurrir espontáneamente sin requerir la aplicación de energía externa. Este cambio estructural resulta gracias a la contribución de diferentes tipos de interacciones moleculares, principalmente el aumento de entropía que se da por la liberación de las moléculas de agua que se encuentran ordenadas alrededor de los residuos polares y no polares y también por la disminución de la entalpía. Trabajando bajo esta premisa se han efectuado estudios de renaturalización *in vitro* con el fin de probar que el plegamiento de proteínas sigue caminos específicos con intermediarios estructurales definidos.

El plegamiento de algunas proteínas puede representarse como un modelo sencillo de dos estados; este modelo plantea el mecanismo de plegamiento como una cinética de primer orden y se muestra en la siguiente reacción



donde D representa al estado desnaturalizado y N al estado nativo. De forma análoga a como ocurre en las reacciones químicas, donde la especie A (reactivo) se transforma en una especie B (producto), aquí también es posible aplicar el formalismo termodinámico correspondiente y así plantear el conjunto de relaciones termodinámicas para esta transición. Estas relaciones son:

$$\Delta G_{D \rightleftharpoons N} = -RT \log K \quad (2)$$

$$\Delta H_{D \rightleftharpoons N} = R \frac{\delta \log K}{\delta T^{-1}} \quad (3)$$

En donde K representa la constante de equilibrio de la reacción, que es igual al cociente entre las constantes de velocidad k_1 y k_{-1} . La validez de este planteamiento yace en el hecho de que la proteína sea, efectivamente, un sistema de dos estados, es decir, que no existan intermediarios estables durante el proceso de plegamiento (Olivares-Quiroz y García-Colín, 2004). Sin embargo, encontramos con frecuencia sistemas de tres o más estados, representados por la siguiente reacción



Donde I es un intermediario en el equilibrio. Para determinar las constantes termodinámicas y cinéticas es indispensable saber con qué tipo de sistema se está trabajando, para ello existen varios métodos experimentales que pueden ser usados para seguir una transición de desplegamiento y así poder determinar con certeza el número de estados del sistema. Uno de los más útiles y versátiles es la espectroscopía de fluorescencia (Eftink, 1997).

1.5.2. El plegamiento *in vivo* e *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente, una forma de entender el plegamiento es reproducirlo *in-vitro* con experimentos de desnaturalización y renaturalización. *In vitro* las proteínas se pueden desnaturalizar sometiéndolas a presiones altas, variaciones de temperatura, pH y agentes químicos (caotrópicos). Las proteínas desplegadas en desnaturalizantes fuertes, como cloruro de guanidinio (GuHCl), β -mercaptoetanol y urea, han demostrado tener las propiedades hidrodinámicas promedio esperadas para un polipéptido no estructurado.

En teoría se puede lograr el replegado de las proteínas de forma similar a como ocurre dentro de las células, con tan sólo restaurar las condiciones originales en las que se tenía la proteína plegada. Lamentablemente en algunas ocasiones la renaturalización es incompleta debido a que ocurren apareamientos incorrectos de los dominios, agregación, cambios químicos, etc. Es normal que se presenten este tipo de inconvenientes ya que a diferencia del plegamiento *in vivo*, donde se cuenta con la asistencia de algunas proteínas como chaperonas e.g. Groel y peptidil isomerasas para evitar el plegamiento incorrecto y la agregación de las proteínas, el plegamiento *in vitro* depende únicamente de la interacción de la proteína con el solvente. También se tiene que tener en cuenta que el experimento se realiza con una cadena polipeptídica cuya síntesis ha sido completada, a diferencia del proceso que ocurre dentro de los organismos vivos donde muchas veces el plegamiento sucede al mismo tiempo que se va sintetizando la cadena en los ribosomas. A pesar de esto, eventualmente se puede evadir estos inconvenientes seleccionando cuidadosamente las condiciones apropiadas (temperatura, pH, composición química del solvente, concentración de la muestra, etc.) para que ocurra la renaturalización (Seckler y Jaenicke, 1992).

1.5.3. *Propuestas de mecanismos de plegamiento.*

Existen tres modelos clásicos de plegamiento, el primer mecanismo que se propuso es el de nucleación-propagación, este indica que la estructura terciaria se propaga rápidamente a partir de un núcleo local de estructura secundaria, Cuya formación sería el paso limitante del proceso (Wetlaufer, 1973; Dagget y Ferhst, 2002). Sin embargo, la popularidad de este modelo ha disminuido debido a la falta de evidencia de intermediarios de plegamiento con estas características. El segundo es el mecanismo de armazón (“framework”) similar al modelo de difusión-colisión por lo que comúnmente son catalogados como el mismo modelo; éste plantea que primero se forma la estructura secundaria a lo largo de toda la cadena polipeptídica, a lo que le sigue el ensamblaje de estas unidades preformadas de estructura secundaria dando origen a la estructura terciaria. Este modelo ganó apoyo con la mayoría de los estudios realizados alrededor de 1980 con péptidos helicoidales pequeños y relativamente estables (Kim y Baldwin, 1982,1990; Dagget y Ferhst, 2002). El tercer modelo es el del colapso hidrofóbico, en el que las interacciones hidrofóbicas de largo alcance causan la compactación de la proteína, previo a la formación de una estructura secundaria, por lo que el plegamiento toma lugar en un volumen confinado (Baldwin, 1989).

Recientemente se propuso otro modelo conocido como nucleación-condensación, este una características de los mecanismos de armazón y colapso hidrofóbico. Los autores de este modelo postulan que las proteínas pueden plegarse mediante una simple cinética de dos estados y que la estructura secundaria y terciaria se forma en paralelo al mismo tiempo que ocurre un colapso general (Daggett y Ferhst, 2003).

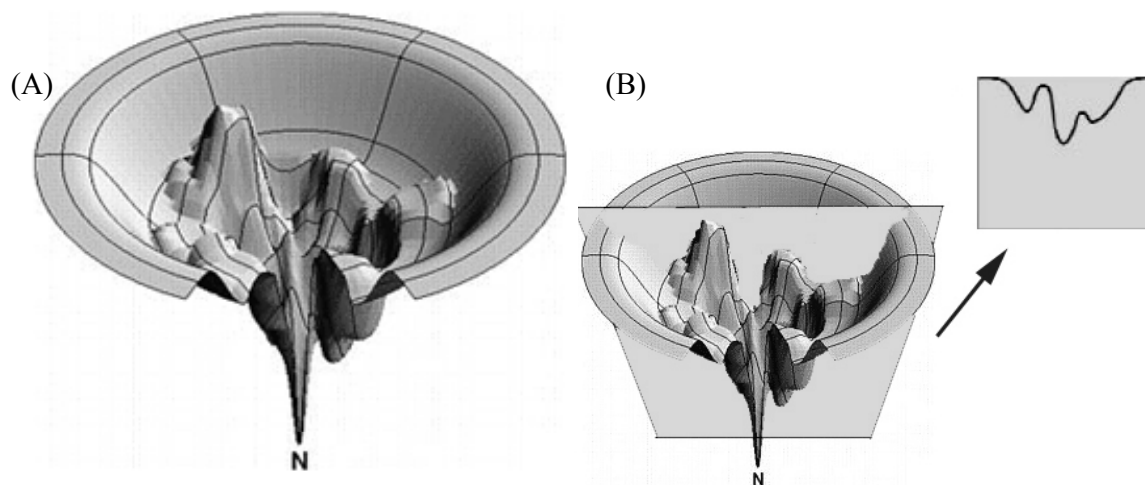


Figura 5. Los paisajes de plegamiento son robustos y con forma de embudo (A) Paisaje energético representado en forma de embudo de plegamiento, donde el eje vertical representa la energía interna. Cada conformación posible está representada por un punto del paisaje, mientras que los dos ejes horizontales muestran los grados de libertad. (B) En un corte transversal del embudo se puede observar una probable vía de plegamiento de una proteína, también se puede apreciar el mínimo energético local y la barrera energética que tiene que superar para alcanzar el mínimo global.

Dejando atrás la controversia que existe con respecto al mecanismo de plegamiento, podemos visualizar este proceso al representarlo tridimensionalmente como un paisaje de energía con topología escabrosa y forma de embudo (figura 5). En general, las múltiples rugosidades de este paisaje energético, representan las barreras de energía entre conformaciones. Estas barreras suelen ser pequeñas; pueden aparecer intermediarios en las partes del embudo donde se presentan valles más pronunciados.

1.5.4. La asociación en proteínas oligoméricas.

Un gran número de proteínas están compuestas por más de una cadena polipeptídica, estas proteínas se denominan multiméricas u oligómeros. Se han hecho varios intentos por cuantificar la

proporción de oligómeros dentro del universo proteico, pero estos estudios difícilmente pueden considerarse concluyentes, ya que están basados en proyecciones y estimados indirectos. Las proteínas oligoméricas además del proceso de plegamiento presentan un segundo evento durante el cual se agrupan todas las subunidades que constituyen su estructura cuaternaria, conocido comúnmente como asociación. Los diferentes tipos de proteínas oligoméricas son muy versátiles y capaces de llevar a cabo funciones para las que los monómeros no están adaptados como en el caso de la ATP sintasa, un complejo oligomérico que sufre una transición continua entre distintas conformaciones para poder desempeñar el ciclo catalítico de la síntesis del ATP en las mitocondrias.

Monod en 1965 enlistó las primeras funciones que se descubrieron para oligómeros, desde ese entonces la lista se ha vuelto mucho más grande e incluye un amplio rango de funciones. Una de las más importantes, es el alosterismo, que se caracteriza por: (1) poseer dentro de una estructura limitada varios sitios capaces de interactuar con substratos y ligandos; (2) responder flexiblemente a diversos ambientes; y (3) tener la aptitud de reaccionar en términos de retroalimentación, a través de la unión cooperativa del ligando a múltiples sitios de la proteína (D'Alessio, 1999).

Las razones subyacentes a esta naturaleza oligomérica no son del todo entendidas. Se ha propuesto que en algunos casos la oligomerización es más bien una cuestión de regulación de la actividad que de estabilidad. De hecho podemos encontrar varios ejemplos de complejos multienzimáticos en los que la asociación se correlaciona con la función. A continuación menciono algunos: Enzimas que pueden presentar un sitio catalítico activo únicamente tras la asociación de sus subunidades, como la glucosamina-6-fosfato desaminasa. En funciones de regulación de la expresión del DNA, o de transducción de señales a través de la membrana celular donde la función depende de una asociación o disociación del complejo en su totalidad, como en el caso de "p53" una proteína supresora de tumores. Cuando ocurren mutaciones en el gen que

codifica esta proteína, se pueden generar proteínas truncadas que no permiten la oligomerización, resultando en una disminución en la tasa de formación de tetrámeros de p53 y en su función preventiva. Sin embargo en otras proteínas, se cree que la formación de oligómeros se da por razones de estabilidad más que catalíticas (Nájera, 2003; D'Alessio, 1999).

Debido a la enorme diversidad de complejos multiméricos se puede observar que el proceso de asociación puede ocurrir a la par del plegamiento, pero también puede suceder poco o mucho tiempo después de que cada una de las subunidades se plieguen por separado. La forma en la que ocurre este evento está determinada hasta cierto punto por las mismas fuerzas que guían el plegamiento, pero también están involucrados procesos que causan cambios o modificaciones en la estructura de las subunidades (D'Alessio, 1999; Mateu, 1999).

Las interacciones oligoméricas también pueden separarse en aquellas que son obligadas y las que no lo son. En los oligómeros obligados o permanentes, no se puede encontrar a los protómeros como estructuras estables e independientes. Estos complejos suelen ser muy estables y generalmente necesitan estar asociados para llevar a cabo su función, por lo que permanecen la mayor parte del tiempo en este estado. En el caso de los oligómeros no obligados o temporales, los protómeros pueden existir de forma independiente y su asociación o disociación puede depender de su concentración y su co-localización. Aunque en algunos casos puede que sea necesario la intervención de algún mecanismo molecular que modifique este equilibrio.

A fin de cuentas, se puede decir que los factores relevantes en la interacción proteína-proteína para la formación de complejos oligoméricos son la concentración de los componentes y la energía libre del complejo con respecto a la de otros estados alternativos. En términos estructurales, las interfaces en oligómeros permanentes como la TPI, suelen ser más grandes e hidrofóbicas que en los oligómeros temporales (Nooren, 2003).

1.6 La Enzima Triosafosfato Isomerasa

1.6.1. Generalidades.

La triosafosfato isomerasa (TPI; EC 5.3.1.1) forma parte de la maquinaria del metabolismo. En eucariontes, bacterias y arqueas mesofílicas la TPI se encuentra como un homodímero soluble donde cada una de las cadenas polipeptídicas que constituyen los monómeros puede pesar 25-27 kDa; mientras que las TPI de arqueas hipertermofílicas e.g. *Thermoproteus tenax*, *Thermotoga marítima* y *Pyrococcus woesei*, existen como homotetrámeros compuestos por monómeros que son más pequeños que los de otras especies en un 10% (Walden y col., 2004). Esta enzima actúa durante la segunda etapa de la glicólisis justo después de que la fructosa-1,6-bisfosfato es partida en dos por escisión aldólica con ayuda de la aldolasa. La triosafosfato isomerasa, como su nombre lo indica, lleva a cabo una reacción de isomerización, catalizando la interconversión entre los compuestos de tres carbonos Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P). Esta reacción se conoce a detalle y se ilustra en la fig. 3 (Stryer, 1995; Knowles, 1991). Solamente el G3P puede continuar de forma directa en la vía glucolítica, pero gracias a que la DHAP puede ser convertida rápidamente a G3P con la asistencia de esta enzima, la célula asegura que por cada molécula de glucosa se obtenga una ganancia neta de 2 moléculas de ATP, 2 moléculas de NADH y 2 moléculas de piruvato que pueden continuar al ciclo de Krebs.

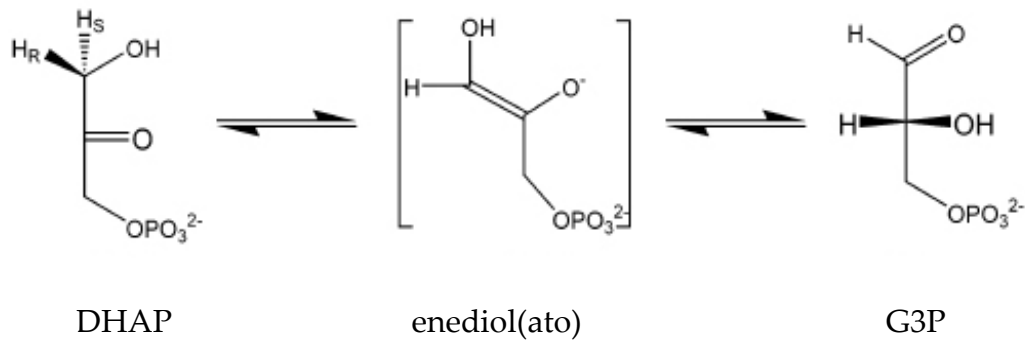


Figura 6. Reacción de isomerización de la TPI. La reacción general de interconversión entre la DHAP y el G3P que cataliza la TPI se muestra en este esquema, donde también se puede observar el intermediario cis-enediol.

Dado que la presencia de esta enzima es un factor que permite obtener el máximo rendimiento del metabolismo de moléculas combustibles, no resulta extraño el hecho de que sea ubicua. La TPI se ha estudiado intensamente durante los últimos años, los reportes indican que hasta el momento se tienen secuenciadas las TPI de más de 100 especies, y se ha determinado la estructura tridimensional por cristalografía de rayos x de las siguientes especies: *Gallus gallus* (Banner y col., 1975), *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis y col., 1990), *Trypanosoma brucei brucei* (Wierenga y col., 1991), *Escherichia coli* (Noble y col., 1993), *Homo sapiens sapiens* (Mande y col., 1994), *Bacillus stearotherophilus* (Delboni y col., 1995), *Plasmodium falciparum* (Velanker y col., 1997), *Vibrio marinus* (Alvarez y col., 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado y col., 1998), *Leishmania mexicana* (Williams y col., 1999), *Thermotoga maritima* (Maes, 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden y col., 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez y col., 2002), *Thermoproteus tenax* (Walden, 2004).

La actividad de la TPI en función de la concentración de sustrato se grafica como una hipérbola, lo que representa una cinética clásica del tipo Michaelis-Menten. La enzima no está regulada alostéricamente, no requiere de la presencia de cofactores y sus subunidades actúan de

forma independiente (Lambeir y col., 1987; Nagano y col., 2002).

La velocidad a la que ocurre la reacción en presencia de la TPI es $\sim 10^9$ veces mayor que la reacción no enzimática (Albery y Knowles, 1976). La relación k_{cat}/K_m para el G3P como sustrato es igual a $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, éste valor es comparable al calculado para reacciones bimoleculares en solución que están limitadas por difusión, el cual es de $10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Debido a esta similaridad se dice que esta enzima ha alcanzado la perfección catalítica, lo que significa que los cambios conformacionales que sufre la proteína desde que se forma el complejo enzima-sustrato ([ES]) hasta que termina la catálisis cuando se libera el producto y la enzima queda libre nuevamente ([E]+[P]), son más rápidos que la velocidad con la que difunde el sustrato al sitio activo, siendo esta última el paso limitante. Este dato se corroboró con el estudio de los parámetros cinéticos a distintas viscosidades del solvente. Se mostró que a mayor viscosidad (únicamente microviscosidad generada por agentes pequeños), más lento se realiza el encuentro entre la enzima libre y el sustrato libre ([E] y [S]), por lo que la catálisis también se vuelve más lenta. De nada serviría modificar cualquiera de los otros pasos de la catálisis, pues su velocidad no está limitada por los cambios conformacionales proteína-solvente o por los rearrreglos químicos sustrato-enzima, sino únicamente por la difusión (Blacklow y col., 1988).

1.6.2. Estructura y características del barril α/β 8.

Existen tres clases principales de patrones de plegamiento con estructura α/β . Los que tienen plegamiento de Rossmann, los que tienen motivos ricos en leucina y los barriles $(\alpha/\beta)_8$ también conocidos como barriles TIM. Este plegamiento tan característico fue descrito por primera vez en una TIM (de ahí su segundo nombre) y se ha encontrado en todas las triosafosfato isomerasas que se han caracterizado hasta el momento (Branden y Tooze, 1999; Nagano y col., 2002; Livesay y La, 2005).

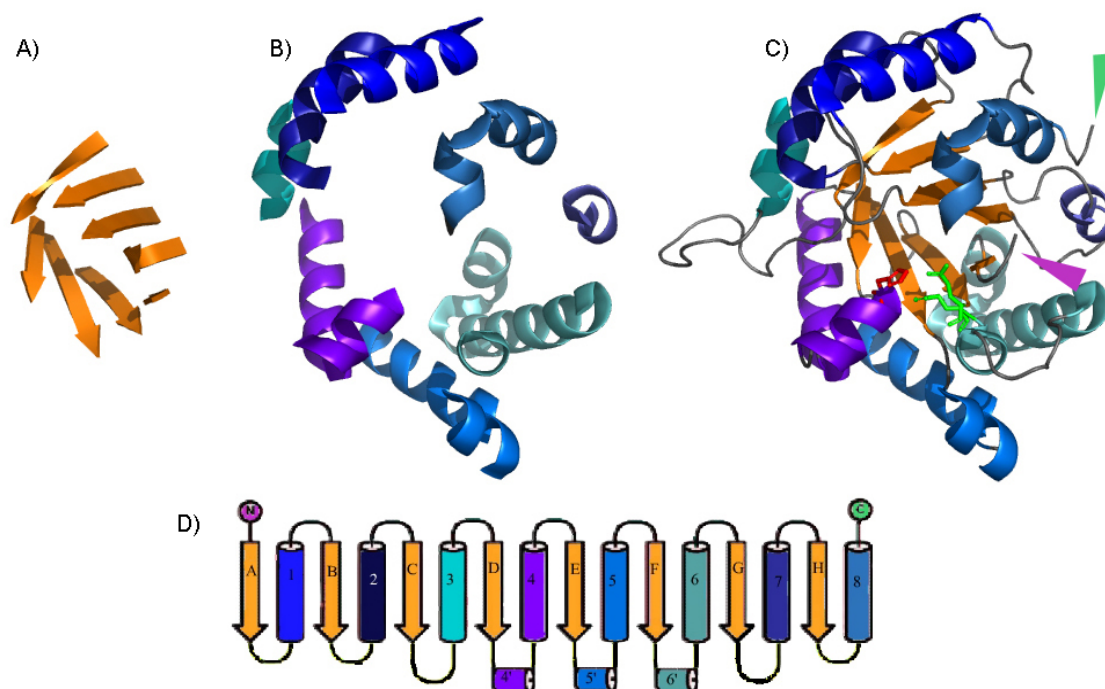


Figura 7. Representación esquemática del barril α/β 8 de ScTPI. (A) Hojas β . (B) Hélices α . (C) Monómero completo. Los triángulos púrpura y verde indican los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. (D) esquema en dos dimensiones de la estructura secundaria del barril α/β , donde se ve con claridad la alternancia entre hélices α y hebras β .

El patrón de plegamiento de barril TIM (Figura 7) consiste en 8 repeticiones de hélices α alternadas por hebras β , de tal forma que en el interior del barril se encuentran las ocho hebras β

paralelas entre sí, mientras que las hélices α están cubriéndolas en la parte externa.

El barril α/β 8 es muy común en la naturaleza, no sólo se ha encontrado en las TPI sino que también esta presente en gran parte de las enzimas registradas en el PDB (protein data bank. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/>). Este esquema de plegamiento se observa en 5 de las 6 clases enzimáticas que existen, mostrando su sorprendente versatilidad al catalizar reacciones completamente diferentes. Algunos ejemplos los constituyen la oritidina 5'-monofosfato descarboxilasa, que cataliza la síntesis de oritidina 5'-monofosfato con un incremento en la tasa de síntesis mayor a cualquier otro reportado y las esfingomielinasas D (SMases D) obtenidas a partir del veneno de arañas del género *Loxosceles*, capaces de catalizar la hidrólisis de esfingomielina, lo que las convierte en la principales toxinas responsables de la manifestación de dermonecrosis por picadura de estos arácnidos (Wierenga, 2001; Swanson y Vetter, 2005; Murakami y col., 2005).

1.6.3. El barril α/β en monómeros y dímeros de la trisafosfato isomerasa.

Dado que el presente trabajo utiliza a la TPI como modelo, se explican algunas de las características particulares de su tipo de plegamiento. En la figura 8 A se muestra un esquema de superficie de un monómero de TPI. Podemos ubicar el sitio activo como una pequeña cavidad en la proteína marcada en rojo. Esta cavidad es tapada durante la catálisis por la protuberancia contigua a este sitio que se encuentra de color verde. En naranja se señala una protuberancia que forma parte de la interfase. En la figura 8 B observamos este mismo panorama en un esquema de caricatura que nos indica la estructura secundaria. Utilizando el mismo código de colores, podemos darnos cuenta de que la protuberancia que acompaña al sitio catalítico (verde) corresponde a una estructura de asa, frecuentemente denominada asa catalítica o asa Ω , mientras que la protuberancia de la interfase también es un asa (naranja) a la que se le llama asa de

interfáse. Ambas asas suelen distinguirse del resto al ser ligeramente más grandes.

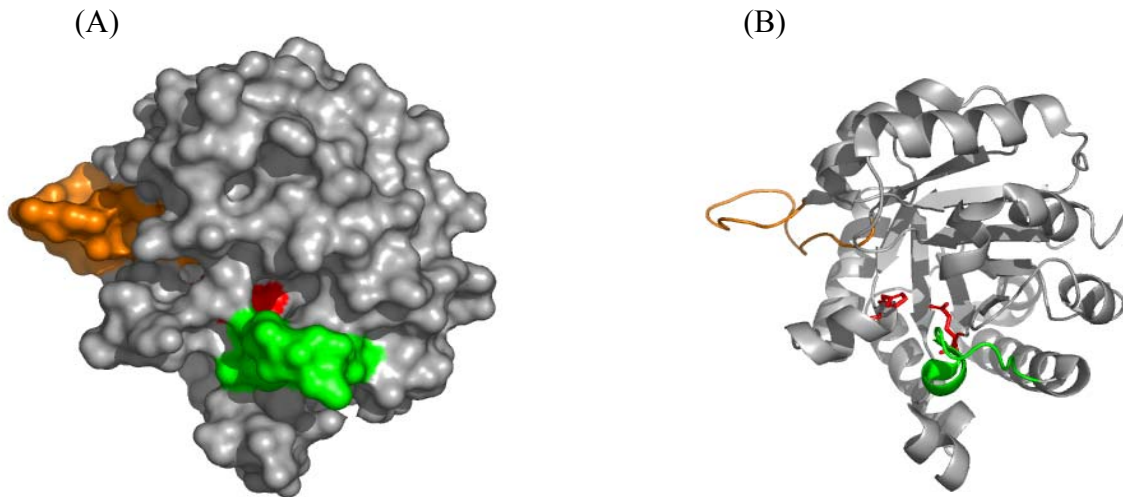


Figura 8. Ubicación del sitio activo y las asas catalítica e interfásica. (A) Representación en superficie. (B) Representación en caricatura. En rojo se señala el sitio activo, en verde el asa catalítica y en naranja el asa interfásica.

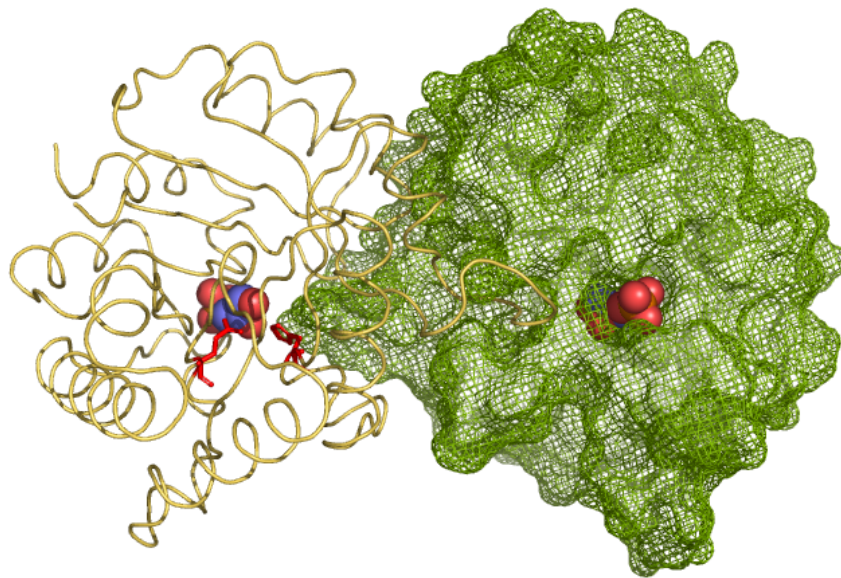


Figura 9. Asociación del homodímero de la ScTPI. El monómero de la izquierda exhibe únicamente el esqueleto polipeptídico, la His95 y el Glu165 de color rojo en una visualización de varas y el sustrato en esferas. El monómero derecho muestra su superficie en una visualización de superficie en malla.

Cuando se forma el dímero (figura 9), los monómeros quedan frente a frente y sus correspondientes superficies de interfase quedan ocultas al solvente. El área que comprende la interfase del dímero constituye una gran parte de la enzima. Esta geometría simétrica de asociación entre monómeros es similar en todas las TPI. Aunado a esto, muchos estudios han establecido que la TPI natural (es decir, no manipulada por ingeniería de proteínas) es activa únicamente como oligómero. Esta es una de las razones por las que se empezó a estudiar a la interfase de la TPI como modelo de diana para desarrollar muchas drogas parásito-específicas (Espinoza y Trujillo, 2004; Tellez y col., 2004; Hernández-Alcántara y col., 2002; Maldonado y col., 1998).

1.6.4. *El mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa.*

Se han llevado a cabo toda una variedad de experimentos para elucidar el proceso de catálisis de la isomerización en la TPI. Esta enzima tiene una maquinaria funcional compleja que ha evolucionado para la catálisis óptima de esta importante reacción. El Glu165 y la His95 son participantes principales de la transferencia de electrones que ocurre durante la catálisis, este mecanismo ácido-base puede ser resumido de la siguiente forma (figura 10): (i) Después de la unión de la DHAP uno de los protones del C-1 es removido por la base catalítica Glu165, produciendo el intermediario enediolato. (ii) Esta especie es posteriormente protonada en el O-2 por el anillo de imidazol neutro de la His95, generando un enediol y un anión imidazolato. (iii) La His95 recupera su protón del O-1 del enediol, formando nuevamente una especie enediolato que ahora carece de un protón en el O-1. (iv) La protonación de este enediolato en el C-2 por el grupo carboxilo del Glu165 restaura de este modo la base general y genera el producto DHAP, que posteriormente es liberado de la enzima (Åqvist y Fothergills, 1996; Kursula y col., 2001).

El principal cambio conformacional de esta enzima implica el cierre y apertura del asa catalítica o asa Ω (asa 6 constituida por 11 aminoácidos), este cierre se produce por un desplazamiento de aproximadamente 7 Å entre sus distintos estados conformacionales. Distintos estudios que implican mutagénesis, cinética y dinámicas moleculares coinciden en que el principal papel del cierre de esta asa es impedir la pérdida del reactivo intermediario enediol(ato). A pesar de esto, el asa Ω de la TPI continúa abriéndose y cerrándose aún en ausencia de ligando (Xiang y col., 2004).

Aunque la His95 y el Glu165 son sin duda parte fundamental del funcionamiento de la enzima, el resto de los residuos del sitio activo también se encuentran implicados en la catálisis, como la Lys12 que provee la carga positiva requerida para la unión del sustrato, la Tyr208 y la Ser211 que forman puentes de hidrógeno con la Ala176 y la Gly173 respectivamente y son esenciales para que el asa del sitio activo se cierre correctamente (Figura 11), por su parte los 11 residuos restantes que forman parte del asa catalítica, ayudan a estabilizar el intermediario cis-enediol en la conformación con el asa cerrada, protegen el sitio activo del contacto de la mayoría de las aguas del entorno y previenen la reacción de eliminación del fosfato. El cambio *in vitro* de cualquiera de estos aminoácidos mediante métodos de DNA recombinante puede producir enzimas deficientes o incluso completamente carentes de actividad, extrapolado a una situación *in vivo*, aún una pequeña mutación en esta zona puede causar severas enfermedades genéticas, que van desde desordenes hemolíticos hasta daños neuromusculares (Derreumax y Schlick, 1998; Kursula y col., 2002).

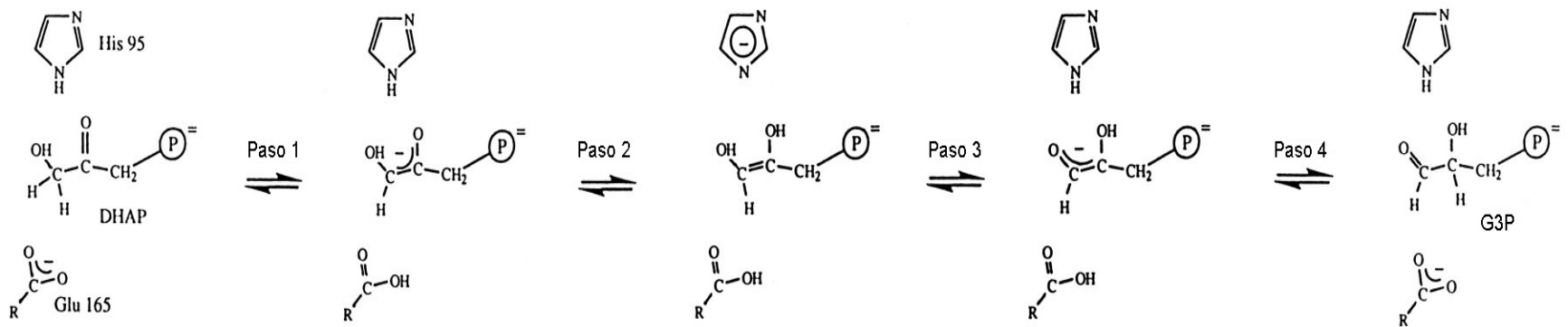


Figura 10. El mecanismo catalítico de la TPI. Se puede mostrar como un proceso de cuatro pasos, excluyendo los pasos de unión y liberación del sustrato (Åqvist y Fothergills, 1996).

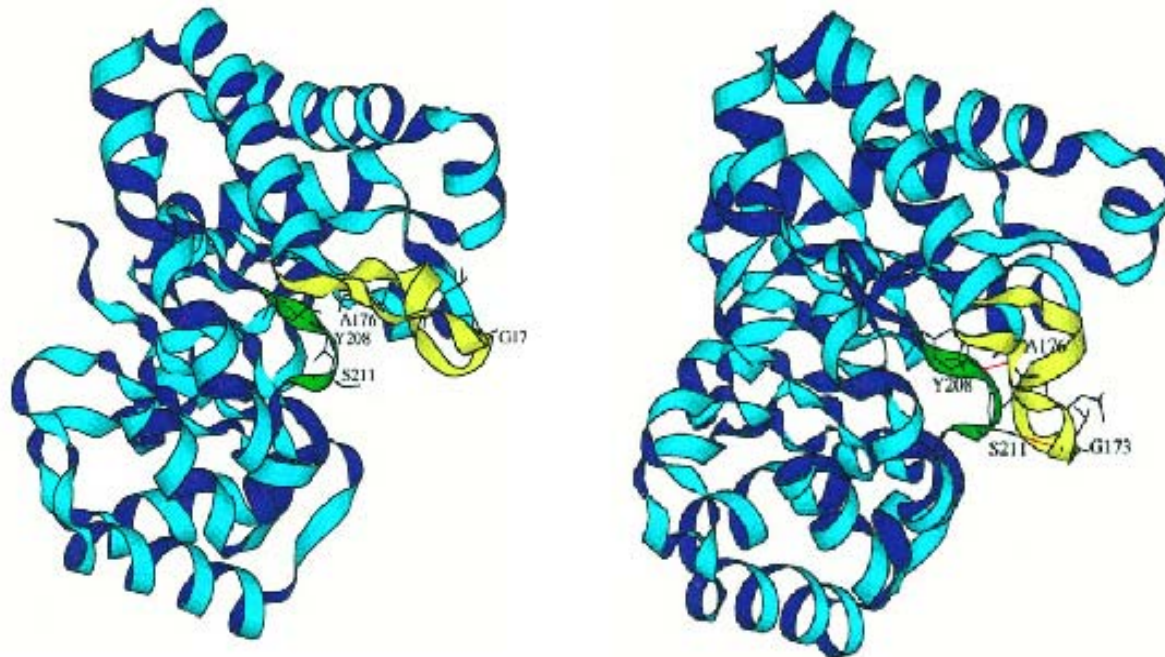


Figura 11. El cierre y apertura del asa Ω . La Tyr208 y la Ser211 que se encuentran en el segmento en verde forman puentes de hidrógeno con la Ala176 y la Gly173 que están en el asa en amarillo (Derreumax y Schlick, 1998).

1.6.5. La Triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI).

La estructura cristalográfica de la triosafosfato isomerasa de levadura (ScTPI) fue resuelta a una resolución de 1.9-Å a un factor R de 21.0%. Esta enzima es un homodímero, cada uno de sus monómeros pesa alrededor de 26 700 Da (Lolis y col., 1990). Presenta tres triptófanos (Trp90, Trp157 y Trp168) y dos cisteínas (Cys41 y Cys126) en su estructura. La estructura del sitio activo claramente indica que los aminoácidos implicados en la catálisis son el Glu165, cuyo grupo carboxilato esta involucrado en la formación de un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Ser 96, así como la His95 y la Lys12. Presenta una k_{cat} de $1.58 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ y una K_m de 1.5 mM (Vázquez, 2005). El área accesible al solvente (ASA) del dímero es de $19\,356 \text{ Å}^2$, mientras que el monómero presenta una ASA de $11\,285.8 \text{ Å}^2$, por lo que el ASA que se oculta al dimerizarse es de aproximadamente $3\,216 \text{ Å}^2$ (Wierenga y col., 1991). Se utilizaron varios experimentos de renaturalización en presencia de glicerol para determinar las constantes de plegamiento de los monómeros ($k_{\text{pleg}} = 1.43 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) y de de asociación de los mismos ($k_{\text{asoc}} = 6.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es de $10^{(14)}\text{-}10^{(16)}$. El cambio en la energía libre de Gibbs estimado para el plegamiento del monómero ($\Delta G^\circ_{\text{pleg}}$) es de $-16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ y de $-70.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para la asociación de los monómeros ($\Delta G^\circ_{\text{asoc}}$) (Nájera, 2003).

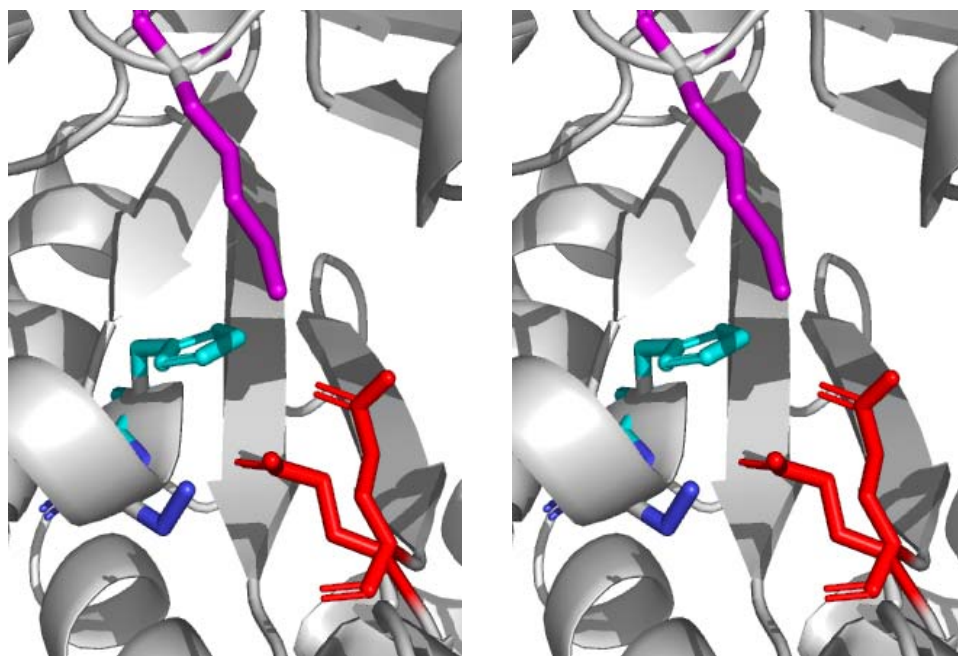


Figura 12. Imagen estereoscópica del sitio activo de ScTPI. Se observan los aminoácidos más importantes para la catálisis, el Glu165 en rojo, la Ser96 en azul, la His95 en cian y la Lys12 en magenta.

1.6.6. Plegamiento y asociación de la ScTPI

La ScTPI es una enzima cuyo plegamiento y asociación ya se han caracterizado. Se obtuvo evidencias cinéticas y termodinámicas que indican que la desnaturalización y la renaturalización de la ScTPI se ajustan a un modelo de tres estados (Nájera y col., 2003).

$2D \rightleftharpoons 2I \rightleftharpoons N$ (ver figura 13). De acuerdo a este modelo, los monómeros sin estructura (desnaturalizados ó D) se pliegan parcialmente como un monómero expandido e inactivo (intermediario o I) para luego ensamblarse en dímeros activos (nativo o N).

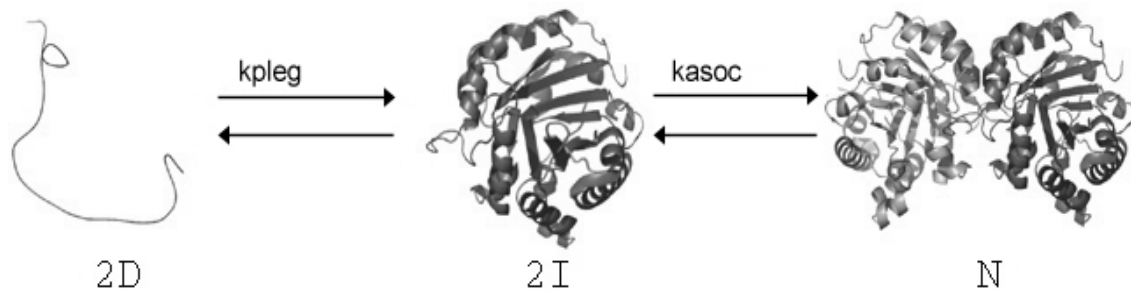


Figura 13. Modelo de tres estados de la desnaturalización y renaturalización de la SctPI. La k_{pleg} es la constante de velocidad asociada al proceso de plegamiento (2D a 2I) y la k_{asoc} es la constante de velocidad asociada al proceso de asociación (2I a N).

El cambio en energía libre para el plegamiento del monómero (ΔG_{pleg}) se define como:

$$\Delta G_{\text{pleg}} = -RT \ln k_{\text{pleg}} \quad (1)$$

donde k_{pleg} es la constante de velocidad de plegamiento que se obtiene de:

$$K_{\text{pleg}} = \frac{[I]}{[D]} \quad (2)$$

Mientras que el cambio en energía libre para la asociación de los monómeros (ΔG_{asoc}) se define como:

$$\Delta G_{\text{asoc}} = -RT \ln k_{\text{asoc}} \quad (3)$$

donde k_{asoc} es la constante de velocidad de asociación que se obtiene de:

$$K_{\text{asoc}} = \frac{[N]}{[I]^2} \quad (4)$$

1. 7. Purificación de proteínas

Las proteínas se purifican en una serie consecutiva e independiente de pasos, durante los cuales las diferentes propiedades fisicoquímicas de la proteína de interés se utilizan para separarla de las otras sustancias. Los métodos modernos de separación se basan en procedimientos cromatográficos. En estos, el extracto celular (fase móvil) se pasa a través de una columna que consiste de una matriz sólida y porosa a la que se le llama fase estacionaria. Las interacciones que tienen las biomoléculas con esta fase estacionaria retardan su paso del soluto a través de la columna y eventualmente causa que las proteínas se separen y eluyan como sustancias puras (Voet, 2004).

En este trabajo se utilizaron dos tipos de procedimientos cromatográficos. El primero se conoce como Cromatografía de exclusión molecular. La columna utilizada para este proceso fue la Sefacryl S-300 (16 mm x 70 cm). Este método sirve para separar moléculas en solución de acuerdo a su tamaño. En el caso de la S-300, las cuentas porosas de sefacryl retienen por más tiempo a moléculas pequeñas capaces de pasar por estos poros, permitiendo que moléculas más grandes atraviesen la columna más rápido.

El segundo es la Cromatografía de intercambio iónico, para el que se usó una columna MonoQ. Consiste en pasar la muestra a través de una matriz con una carga neta positiva. La carga de la proteína es complementaria a la de la matriz en un ambiente con pH por debajo del punto isoeléctrico de la enzima, por lo que esta queda unida a la matriz mientras que otras proteínas y componentes celulares pasan a través de la columna. Al final se eluye la proteína aumentando la carga iónica del solvente.

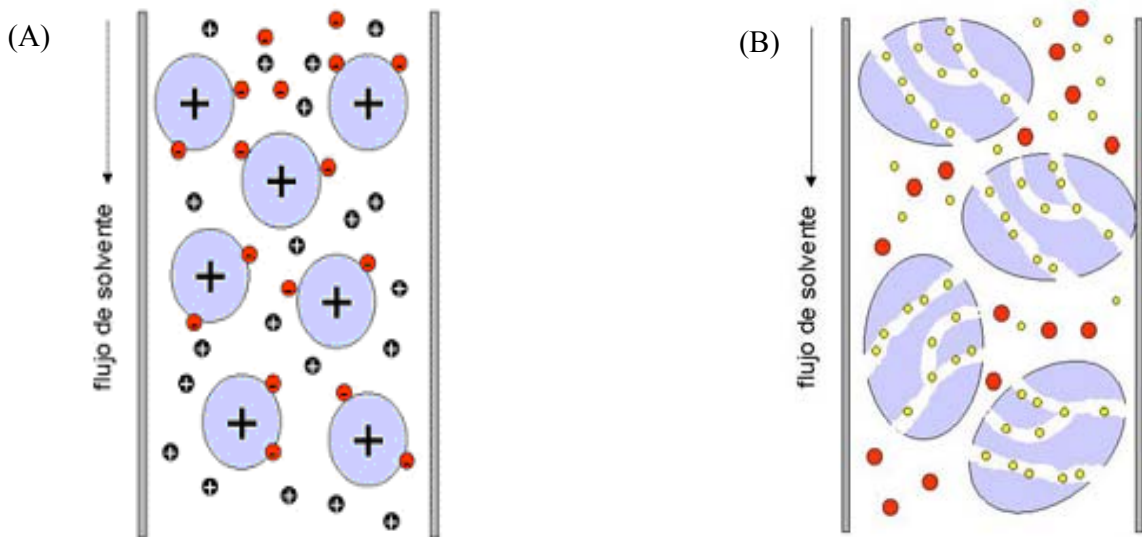


Figura 15. Principio de la cromatografía de proteínas. (A) Intercambio iónico. Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz cargada positivamente y son retenidas. Las partículas cargadas negativamente son rechazadas por la matriz y son eluidas. La elusión de las partículas cargadas negativamente se consigue aumentando la fuerza iónica o cambiando el pH. **(B)** Exclusión molecular. Las moléculas pequeñas entran en los pequeños conductos que presentan las esferas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor. Las moléculas grandes incapaces de pasar por los conductos de las esferas de gel se mueven entre ellas, donde la velocidad de flujo de solvente es mayor. Como consecuencia las moléculas de mayor peso molecular son eluidas primero.

Este método se basa en el principio de que los aminoácidos en solución se protonan cuando se encuentran a un pH más bajo que su punto isoeléctrico. Entre más pequeño es el pH del amortiguador, más grande es la carga positiva de las proteínas, lo que disminuye la fuerza con la que se unen a la matriz aniónica. Cada proteína tiene una composición de aminoácidos distinta, por lo que el número de aminoácidos protonados entre una proteína y otra varía dependiendo de su composición y del pH (Voet, 2004). Esto permite separar a la proteína de interés de acuerdo a su composición y a la afinidad con la que se une a la fase fija de la columna. Usualmente los cambios en el pH y en la pendiente del gradiente salino se llevan a cabo de manera conjunta con el fin de lograr una purificación más eficiente. Un gradiente demasiado abrupto puede eluir a la proteína

en un número pequeño de fracciones, pero puede no ser eficiente para separarla por completo del resto de las proteínas; por el contrario, un gradiente muy prolongado separa mejor a la proteína, pero puede eluirla en un rango de fracciones demasiado grande, dejándola muy diluída. La combinación apropiada de estas condiciones, aunque puede estimarse teóricamente, solo puede encontrarse de forma empírica (Pharmacia Fine Chemicals AB, 1983; Yamamoto y col., 1988).

Durante la purificación se hace uso de tablas de purificación para determinar el rendimiento del proceso. Durante cada paso el tamaño de la muestra se vuelve más pequeño y la cantidad de proteína total también disminuye. Esto es normal, puesto que el objetivo es remover lo más que se pueda de proteína no deseada. Para enzimas como la TPI, se puede seguir su proporción durante cada paso de la purificación, en términos de su actividad. Esto es, el incremento en la tasa de conversión de sustrato a producto. El término actividad total se refiere entonces a la actividad potencial de enzima en una solución. Se espera que este valor también vaya disminuyendo, ya que siempre hay pérdida por inactivación o interacciones inespecíficas con los materiales cromatográficos u otras moléculas en la solución. De la relación entre la actividad total y la cantidad total de proteína se obtiene la actividad específica, que como su nombre lo indica es la actividad que se tiene por cada mg de proteína. En un paso eficiente, la pérdida de proteína es más grande que la pérdida de actividad, por lo tanto, la actividad específica aumenta aun cuando la actividad total decae. Esta información es útil para ubicar los pasos en los que se pierde a la proteína o su actividad, lo que permite mejorar los protocolos en los que no se ha podido establecer las condiciones apropiadas para obtener un buen rendimiento en la purificación (Lehninger, 2000).

2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

2.1. La interfase de la TPI.

La TPI necesita estar en su forma dimérica para lograr la catálisis. Por ello, resulta de gran importancia entender los principios que regulan la asociación de esta enzima. Durante las últimas décadas se han realizado algunos esfuerzos por caracterizar las interacciones que estabilizan las interfaces de las proteínas, revelando unas pocas reglas generales. Este conocimiento ha mostrado tener aplicaciones prácticas en el diseño de drogas especie-específicas capaces de perturbar la asociación en enzimas de agentes patógenos sin afectar las enzimas homólogas del hospedero (Maldonado y col., 1998; Espinoza y Trujillo, 2004; Téllez y col., 2004). Sin embargo, para poder mejorar nuestro entendimiento de estas interacciones es necesario estudiar nuevas mutantes interfásicas. A continuación se mencionan algunos de los trabajos en los que se realizaron modificaciones a la interfase, junto con sus respectivas conclusiones.

Schliebs y col. en 1997 realizaron un experimento en el que los residuos Thr75 y Gly76, que están en la punta del asa 3 (asa interfásica), fueron sustituidos por Arg y Glu, respectivamente. Obteniendo un monómero con actividad residual de TPI, a lo que argumentó que las subunidades monoméricas presentan asas flexibles que se rigidizan cuando ocurre la dimerización.

Gopal y col. publicaron en 1999 un trabajo en el que introdujeron dos puentes disulfuro entre las interfaces de las subunidades de la triosafosfato isomerasa de *Plasmodium falciparum* (PfTPI), con el fin de impedir la disociación de estas durante el proceso de desnaturalización. Para esto se realizó la mutante Y74C, para que cada Cys74 formara un puente disulfuro con la ya existente Cys13 de la otra subunidad. La mutante presentó una actividad catalítica similar a la enzima silvestre. La desnaturalización por calor mostró que la forma oxidada de esta mutante (Y74Cox)

tiene una estabilidad similar a la de la enzima silvestre ($T_m \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$), mientras que la forma reducida (Y74Cred) es bastante lábil ($T_m \sim 38 \text{ }^\circ\text{C}$). Obtuvieron el cristal de una forma parcialmente oxidada de Y74C (solo presenta uno de los dos posibles puentes disulfuro), el cual revela una estructura en la que se forma una cavidad de $\sim 50 \text{ \AA}^3$ en la interfase debido al puente disulfuro.

En el 2002 Hernández-Alcántara y col. cambiaron la cisteína 14 que forma parte de la interfase de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTPI), por cada uno de los otros 19 aminoácidos, con la finalidad de deducir las características que el residuo de esa posición debe tener para dar lugar a enzimas competentes. Las mutantes C14A, C14S, C14P, C14T y C14V presentaron la misma actividad y estabilidad que la enzima silvestre. Las mutantes C14N, C14R y C14G mostraron una actividad y estabilidad bajas, mientras que el resto de las mutantes presentaron menos del 1% de la actividad de la TbTPI. En general el análisis de estos datos indica que se obtuvieron enzimas similares a la enzima silvestre cuando la Cys14 fue cambiada por residuos de baja polaridad y con un volumen de Van der Waals entre 65 y 110 \AA .

Maithal y col. en el 2002 introdujo la mutación Y74G en la interfase de la triosafosfato isomerasa de *Plasmodium falciparum* (PfTPI). De acuerdo a los estudios de fluorescencia y dicroísmo circular la mutante Y74G presentó propiedades espectroscópicas similares a las de la PfTPI, lo que sugiere que tienen una estructura parecida. Pero comparada con la enzima silvestre, la mutante mostró una k_{cat} casi 25 veces menor, sin cambios significativos en el valor de K_m . También se observó una pérdida de actividad enzimática en concentraciones de enzima por debajo de 10 μM y una estabilidad considerablemente menor a agentes desnaturizantes como urea y GuHCl. Esto sugiere que la sustitución de los aminoácidos aromáticos que se encuentran en la interfase de la TPI por residuos pequeños, debilita las interacciones entre subunidades.

2.2. Criterios a tomar en cuenta para la modificación de una interfase

Existen algunos puntos a tomar en cuenta durante el diseño de mutantes interfásicas estables. Un primer criterio indica que, aunque pocos, todos los aminoácidos que sean conservados entre enzimas homólogas no deben cambiarse. Generalmente los aminoácidos conservados están fuertemente ligados a la funcionalidad de la enzima, lo que explica su permanencia a través del proceso evolutivo. La identidad no es la única información que se debe tomar en cuenta del análisis de secuencias homólogas, ya que en muchas ocasiones los aminoácidos que ocupan la misma posición no son exactamente los mismos y puede darse el caso de que sean aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares. Esta similitud puede deberse a que estos aminoácidos desempeñan un papel importante y similar entre proteínas homólogas. A pesar del estado dinámico de la proteína, se debe intentar escoger residuos que formen parte de la interfase pero que se encuentren a una distancia relativamente considerable del sitio activo, con la intención de que las mutaciones no interfieran con la catálisis (Sun y col., 1992; Pérez y col., 1999).

2.3. Justificación

Es importante conocer las distintas fuerzas que toman parte en el proceso de asociación de un complejo oligomérico. Dentro de las fuerzas débiles no covalentes, el efecto hidrofóbico juega un papel crucial en determinar la preferencia conformacional de estas macromoléculas. En la naturaleza se pueden encontrar numerosos ejemplos en los que aminoácidos con cadenas laterales no polares tienden a agruparse entre sí excluyendo al solvente. El caso más común son los núcleos de las proteínas, los cuales suelen contener una mayor proporción de residuos hidrofóbicos con respecto al resto de la proteína. La formación de estos grupos, suele contribuir significativamente a la estabilidad de las conformaciones adoptadas. Esto se atribuye a que se trata de un proceso hidrofóbico que a temperatura ambiente es entrópicamente favorable y entálpicamente neutro

(Espinosa, 2002).

La afinidad por el solvente acuoso de los residuos que forman parte de la interfase de oligómeros, repercute en las fuerzas hidrófobas que favorecen la asociación de sus subunidades. Por lo que se espera que entre más residuos no polares se puedan incluir en la interfase, mayor será la fuerza hidrofóbica que favorezca la asociación.

Tomando en cuenta que el programa ROSETTA ha mostrado ser una herramienta poderosa para el rediseño de estructuras de proteínas (Kuhlman y Baker, 2000) y que la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* es un buen modelo experimental de asociación oligomérica, resulta muy interesante constatar el potencial de este programa para diseñar una interfase de este dímero que sea más hidrofóbica que la de la enzima silvestre.

Una vez que se cumplan los objetivos de construcción, expresión y purificación de la mutante hidrofóbica en su interfase de ScTPI, se piensa comprobar si efectivamente no ocurre una pérdida en la actividad catalítica de la enzima. La funcionalidad de la enzima sirve entonces como método para corroborar la eficiencia del diseño al descartar o aceptar efectos colaterales de las mutaciones.

2.4. El diseño de la mutante TPI LFFTA.

El problema de la predicción de la conformación nativa de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos, generalmente se resuelve encontrando la estructura con menor energía libre correspondiente a una secuencia. Por el contrario, el problema del diseño es completamente inverso a la predicción (Schueler y col., 2005). La mayoría de los esfuerzos para diseñar proteínas utilizan métodos que sirven para empaquetar las cadenas laterales de acuerdo al esqueleto polipeptídico de una proteína que existe en la naturaleza. Recordemos que las secuencias que normalmente encontramos en el mundo biológico han sido determinadas por una compleja

interacción entre diversas presiones de selección. En la que no sólo se trata de mantener una función adecuada para la proteína, si no que también se favorece la estabilidad. A pesar de estas presiones de selección, la deriva al azar dentro de la secuencia sigue ocurriendo debido a la aparición de mutaciones neutras (Kuhlman y Baker, 2000).

En el diseño de esta mutante, se buscó modificar la interfase de la ScTPI cambiando algunos residuos polares por otros de carácter hidrofóbico. Las mutaciones debían situarse en la interfase y no tenían que implicar cambios en residuos conservados. La finalidad de estos cambios era crear un modelo de TPI en el que se cambiaran interacciones polares (puentes de hidrógeno y puentes salinos) de la interfase por interacciones hidrofóbicas, ya que estas últimas son más favorables en ambientes relativamente hidrofóbicos como lo es la interfase. La optimización de las interacciones entre las interfases de los monómeros tenía como fin obtener un modelo de TPI con una mayor interacción entre los monómeros, pero con un plegamiento similar. Como la constante de asociación de los monómeros de esta enzima es muy alta ($3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$), con un valor que es cercano al que presentan las reacciones limitadas por difusión, no se podía lograr un aumento significativo en la velocidad con la que ocurre la asociación. Por lo que el diseño sólo planteaba obtener un modelo que tuviese una interfase termodinámicamente más estable.

Primero se creó un banco de mutantes de ScTPI para las posiciones 17, 46, 48, 82 y 85. Estas mutaciones tenían que ser simétricas, es decir, que estuvieran presentes en ambos monómeros. Para generar el banco y evaluar las mutantes se utilizó el programa ROSETTA. Este presenta una gran versatilidad, al poseer funciones que evalúan la energía de todos los enlaces, la energía de interacción con el solvente y una metodología de optimización que es útil tanto para la predicción como para el diseño. El programa arroja los resultados en formato PDB, para cada uno de los cuales muestra la estabilidad calculada y el número de contactos en la interfase. De todas las mutantes analizadas, la TPI LFFTA (K17L, Y46F, D48F, Q82T y D85A) presentó los valores más

altos de estabilidad calculada y número de contactos en la interfase. Con respecto a la silvestre, TPI LFFTA presenta un menor número de contactos en la interfase, pero presenta un valor de estabilidad calculada mucho mayor.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es construir, expresar y purificar una mutante hidrofóbica en la interfase de la Triosafosfato Isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Objetivos particulares

- 1.- Construir el gen de la triosafosfato isomerasa con modificaciones en los codones para que al expresarlo produzca una enzima con las siguientes mutaciones en la interfase: K17L, Y46F, D48F, Q82T y D85A. El diseño y la síntesis de los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la construcción del gen están considerados dentro de este punto.
- 2.-Introducir este gen en un vector que sirva para su clonación y expresión.
- 3.-Optimizar la expresión de la enzima mutante.
- 4.-Purificar la proteína a partir de las bacterias recombinantes.
- 5.-Caracterizar la actividad catalítica de la enzima mutante.
- 6.-Caracterizar la estabilidad de la mutante.

4. HIPÓTESIS

Se propone que el cambio de ciertos aminoácidos de la interfase por otros de naturaleza más hidrofóbica (de acuerdo al diseño elaborado con ayuda de ROSETTA) puede contribuir a acrecentar las fuerzas que unen a los monómeros de la TPI.

Dentro de los objetivos de esta tesis no se plantea determinar las rutas de plegamiento ni asociación, ni los valores de ΔG o de las constantes de velocidad relacionados a estas transiciones. Esto no implica que en un futuro no se puedan caracterizar las propiedades termodinámicas y funcionales de los procesos de desnaturalización y renaturalización de esta mutante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

El Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco proporcionó el diseño de la mutante de la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* que se obtuvo a partir del programa ROSETTA.

El gen *tpi AFAAS* (gen que codifica para una mutante de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* con las mutaciones K17A, Y46F, D48A, Q82A y D85S, clonado en un vector pBC) y el gen *tpi PLATA* (gen que codifica para una mutante de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* con las mutaciones K17P, Y46L, D48A, Q82T y D85A, clonado en un vector pBC) fueron construidos y clonados por la Dra. Mariana Peimbert Torres.

La α - Glicerolfosfato Deshidrogenasa (α -GDH) se obtuvo de Boheringer Mannheim, el glicerol y el etanol (99.9%) se obtuvieron de Merck, el cloruro de sodio (NaCl) de J. T. Baker. El marcador de DNA fue una escalera de DNA de 1 kb de Invitrogene. El amortiguador de las reacciones de PCR fue el 10x Reaction Buffer de Stratagene. Para subclonar el producto de PCR se utilizó el pGEM[®]-T Easy Vector System de Promega. En la purificación de DNA se utilizó el QIAquick[®] Gel Extraction Kit de QIAGEN y el QIAprep[®] Miniprep Kit también de QIAGEN. La TPI silvestre que se usó como marcador en los geles de proteínas también fue proporcionada por la Dra. Mariana Peimbert Torres. El resto de los reactivos que se utilizaron son de Sigma. Se usó agua desionizada y de grado mili Q.

5.1.1. Medios de cultivo.

En este trabajo de investigación se utilizó únicamente un tipo de medio de cultivo, cuya composición se menciona a continuación.

Medio Luria – Bertani (LB)

Reactivo	Cantidad (g) requerida para 1 L de medio
Tryptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
Bacto Agar	5

- Se ajusta el pH a 7, en el caso de los medios líquidos no se agrega agar.

5.1.2. Plásmidos.

La tabla 1 contiene y describe en forma breve a todos los plásmidos de los que se hace mención.

Tabla 1. Plásmidos a los que se hace referencia en este trabajo.

Nombre	Descripción	Uso general
pBlueScript	Es un fagémido (plásmido proveniente de un fago) y es un vector de clonación. Contiene al gen <i>lacZ</i> interrumpido por el Sitio de Clonación Múltiple (SCM). Tiene una región que le confiere resistencia a Ampicilina (Am^r).	Clonación
pBC	Plásmido derivado del pBlueScript, también es un vector de clonación con el gen <i>lacZ</i> interrumpido por la secuencia del SCM. La única diferencia con respecto al pBluescript es que la región Am^r fue cambiada por una región de resistencia a Espectinomicina (Sp^r).	Clonación

pGEM-T	Plásmido comercial, también es un vector de clonación con el gen <i>lacZ</i> interrumpido por la secuencia del SCM. Tiene a los promotores T7 y SP6 flanqueando el SCM. Especial para clonar productos de PCR pues tiene extremos 5' T sobresalientes.	Clonación y expresión
pBC-YTIM	Derivado de pBC, con el gen silvestre de la TPI de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Templado de PCR
pBC-AFAAS	Derivado de pBC, con el gen de la mutante TPI AFAAS.	Templado de PCR
pBC-PLATA	Derivado de pBC, con el gen de la mutante TPI PLATA.	Templado de PCR

5.1.3. Oligonucleótidos.

Se usaron los oligonucleótidos comerciales de New England Biolabs M13/pUC Forward Sequencing Primer (FWD-M13), M13/pUC Reverse Sequencing Primer (REV-M13), NdeITim y XhoTim. Además se diseñaron y se mandaron a sintetizar dos oligonucleótidos que pudieran hibridar de manera específica en las partes del gen de la ScTPI donde se encuentran los codones a modificar (L17 y FF48).

Tabla 2. Oligonucleótidos que se usaron durante este proyecto.

Nombre	# de bases	Secuencia
FWD-M13 (M13/pUC Forward Sequencing Primer)	20 b	5' d(GTT TTC CCA GTC ACG AC) 3'
REV-M13 (M13/pUC Reverse Sequencing Primer)	16 b	5' d(AAC AGC TAT GAC CAT G) 3'
NdeITim	24 b	5' d(GAT ATA CAT ATG GCT AGA ACT TTC)3'
XhoTim	23 b	5' d(G CTC GAG TTA GTT TCT AGA GTT G)3'
T7pro	20 b	5' d(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG)3'
L17 (ytim-L17)*	24 b	5' d(CTT AAT GGA TTG <u>CAA</u> GGA ACC GTT) 3'
FF48 (Ytim-FF48)*	25 b	5' d(GA GAC AGA <u>GTA</u> AAA TAA <u>GAA</u> GGT AG) 3'

* Los oligonucleótidos L17 y FF48 tienen subrayado en su secuencia los codones que se van a introducir en la secuencia del gen de TPI de levadura.

5.2. Purificación de DNA

5.2.1. Purificación de plásmidos de DNA.

Para la purificación de los plásmidos de DNA de las clonas recombinantes se utilizó el QIAprep Miniprep kit (QIAGEN). Este método está diseñado específicamente para la obtención de hasta 20 µg de DNA a partir de cultivos de *E. coli* en 1 – 5 mL de medio LB. El procedimiento se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas con un método conocido como Birnboim y Doly. Para cada miniprep se hizo un cultivo de 12 h de 10 mL de LB, el cual se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min. Se resuspendieron las células en 250 µL de amortiguador P1 (el cual contiene RNAsa para

degradar las moléculas de RNA). Se agregó 250 μ L de amortiguador P2, cuyo componente principal es la NaOH y el SDS. El SDS solubiliza los lípidos y los componentes proteicos de la membrana, mientras que la condición alcalina desnatura las proteínas del DNA cromosómico y el resto de las proteínas. En este paso la solución se vuelve viscosa y ligeramente más clara. Es importante que el tiempo que el lisado permanece en esta condición alcalina sea regulado, puesto que una exposición prolongada puede causar que el plásmido sea desnaturado irreversiblemente. Luego el lisado se neutralizó al mismo tiempo que se ajustó a altas concentraciones de sal con la adición de 350 μ L del amortiguador N3. En este momento la solución se vuelve nebulosa y blanca, debido a que las altas concentraciones de sal precipitan el DNA cromosómico, las proteínas desnaturadas y otros restos celulares junto con el SDS. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min y se pasó la fase soluble (en la que se hallan los plásmidos) a través de una columna QIAprep centrifugando a 15 000 rpm por 1 min, esta columna tiene una membrana de gel de silicatos que es selectiva para la absorción de DNA en presencia de altas concentraciones de sal (se forma un puente entre las cargas negativas de la membrana, las cargas positivas de las sales y las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA). Por ello, únicamente los plásmidos son retenidos en la membrana. Antes de eluir se lavó con 0.5 mL del amortiguador PB a 15 000 rpm por 1 min (este amortiguador contiene sales y permite eliminar cualquier rastro de endonucleasas que pudieran degradar el DNA) y con 0.75 mL del amortiguador PE a 15 000 rpm por 1 min (este amortiguador contiene etanol y sirve para eliminar el exceso de sales del amortiguador PB). Finalmente, para eluir el plásmido se colocó la columna en un tubo eppendorf limpio de 1.5 mL, se agregaron 30 μ L de agua estéril al centro de la membrana de la columna y se centrifugó a 15 000 rpm por 1 min.

5.2.2. Purificación de los fragmentos de PCR.

Para purificar los productos de PCR, eliminando los oligonucleótidos utilizados en la reacción previa, se utilizó el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Este protocolo está diseñado para purificar fragmentos de DNA de hebra doble o sencilla con longitudes de 100 pb a 10 kb obtenidas mediante PCR. La purificación elimina nucleótidos, polimerasas y sales, previniendo su interferencia en las siguientes reacciones. El protocolo se basa en la unión del DNA a columnas de sílica de la misma forma que para el miniprep.

Se mezclaron 5 volúmenes del amortiguador PB por 1 volumen de la muestra de PCR. Se aplicó la muestra a una columna QIAquick spin previamente colocada en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Para unir el DNA se centrifugó a 15 000 rpm por 1 min. Se desecha el líquido que atraviesa y se vuelve a centrifugar a la misma velocidad por el mismo tiempo para remover todo el etanol. Se coloca la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio. Para eluir el DNA se agregan 30 µL agua estéril en el centro de la membrana y se centrifuga durante un minuto.

5.2.3. Extracción de PCR a partir de geles de agarosa.

Para extraer y purificar los productos de PCR a partir de geles de agarosa se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit. Este kit está diseñado para extraer DNA de 70 pb a 10 kb de geles de agarosa. Se pueden procesar hasta 400 mg de agarosa por columna. Este protocolo se siguió para todas las reamplificaciones que se hicieron durante la construcción, de la siguiente forma:

Después de desteñir el gel de agarosa y ubicar la zona en la que se encuentra la banda de DNA, se corta este fragmento con una navaja tratando de que el tamaño del pedazo de agarosa sea el mínimo evitando remover agarosa que no tenga DNA. Se pesa el pedazo de agarosa en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agrega 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel

(100mg ~ 100 μ L). El amortiguador QG disuelve la agarosa y es un indicador de pH. La muestra se incuba a 50 °C por 10 min o hasta que el gel se disuelva completamente, vortexeando cada 2 o 3 min para ayudar a disolver el gel. Una vez que el gel se ha disuelto por completo si la solución continua amarilla, similar al QG sin agarosa, su pH es ≤ 7.5 ; si la mezcla se torna naranja o violeta significa que el pH es > 7.5 , en cuyo caso se agregaron 10 μ L de acetato de sodio para ajustar el pH. Se agrega un volumen de isopropanol a la muestra y se mezcla, luego se coloca en una columna QIAquick spin previamente colocada en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Para unir el DNA se centrifuga durante 1 min a 15 000 rpm. Se desecha el líquido que atraviesa la columna, se agregan otros 0.5 mL de amortiguador QG y se centrifuga durante un min a 15 000 rpm para remover los restos de agarosa. Para lavar la columna se agregan 0.75 mL de amortiguador PE a la columna y se centrifuga por 1 min a 15 000 rpm. Se cambia la columna a un tubo eppendorf limpio de 1.5 mL. Para eluir el DNA se agregan 50 μ L de agua y se centrifuga la columna durante 1 min a 15 000 rpm.

5.3. Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis permite separar moléculas de DNA o RNA de acuerdo a su tamaño utilizando geles de agarosa. La agarosa es un polímero aislado de algas que es capaz de formar un gel semisólido constituido por una trama tridimensional de fibras poliméricas. Cada gel de agarosa cuenta con pocillos en la parte superior para cargar las muestras dentro de estos. La movilidad del DNA a través del gel es generada por la presencia de un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos presentan una carga neta negativa por lo que migran desde el ánodo (parte superior del gel) hasta el cátodo (parte inferior del gel). La matriz de acrilamida retarda el paso de los ácidos nucleicos, mientras más grande sea el tamaño de estos lo hará en mayor medida.

Se utilizaron geles al 1% de agarosa en amortiguador TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Todos los geles de agarosa son teñidos con bromuro de etidio ya que este compuesto se intercala entre las bases del DNA y lo hace visible con luz uv. Como estándar de masa molecular se usó el marcador de pesos moleculares de escalera de DNA de 1kb.

Se realizaron dos tipos de geles:

Geles analíticos. Estos geles presentan pocillos pequeños (~ 50 mm), solo se carga una pequeña porción de la muestra ya que es únicamente para identificar la presencia del producto de PCR.

Geles preparativos. Estos geles presentan pocillos mas anchos (~ 1.5 cm) y son ligeramente más gruesos, lo que permite cargar toda la muestra; se usan para aislar todo el producto de PCR.

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa

El PCR (Polymerase Chain Reaction ó Reacción en Cadena de la Polimerasa) consiste primordialmente en varios ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. La desnaturalización normalmente ocurre entre los 90 y 95 °C, es durante el transcurso de ésta que ocurre la separación de las dos hebras de DNA por ruptura de los puentes de hidrógeno que existen entre las bases nitrogenadas. Una vez que quedan completamente separadas, es en la hibridación cuando la temperatura desciende aproximadamente a 40 °C, que algunas de las moléculas de DNA templado se aparean con otras moléculas de DNA templado, pero esto también permite que los oligonucleótidos cebadores presentes en la mezcla puedan hibridar con el DNA templado. La temperatura en la que se realiza mejor este proceso se decide en base a la T_m (Temperatura Media o Melting Point), que es la temperatura en la que la mitad de las moléculas de DNA se encuentran desnaturalizadas. Sin embargo, frecuentemente se afina esta temperatura de forma empírica con el

fin de mejorar la precisión con la que las bases de los oligonucleótidos se alinean con sus correspondientes bases complementarias de las hebras sencillas de DNA templado, lo que resulta en una mejora de la eficiencia de la reacción; el último paso es la elongación; es aquí cuando se sintetizan nuevas hebras de DNA a partir de las hebras molde, esta función la lleva cabo la DNA polimerasa, que para comenzar su acción necesita de la presencia de los oligonucleótidos hibridados al DNA templado para que le sirvan como cebadores; la temperatura de esta parte depende en mayor medida de la enzima DNA polimerasa que se esté utilizando, aunque se utilizan DNA polimerasas termoestables debido a que son las únicas capaces de resistir temperaturas tan altas como la de desnaturalización manteniendo su actividad catalítica, la temperatura de elongación óptima varía de polimerasa a polimerasa; existen también algunas otras características que diferencian a las polimerasas entre sí, como la velocidad a la que incorporan dNTPs a la hebra en crecimiento o si dejan extremos romos o disparejos, muchas de estas características se pueden aprovechar para cambiar el rendimiento o las características del producto de PCR.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler de MJ Research. Dentro de la mezcla de reacción de cada PCR se incluyó el amortiguador 10x Cloned Pfu Reaction Buffer (100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mM Tris-HCl, 20 mM MgSO_4 , 1 % Triton x-100, 1 mg mL^{-1} de BSA, pH 8.8), moléculas DNA templado y dNTPs como sustrato de la reacción; como primers se incluyeron 2 oligonucleótidos ó 1 oligonucleótido junto con 1 producto de PCR como megaprimer (primer de tamaño mayor a 25 nucleótidos), en una cantidad aproximada de 200 ng.

5.4.1. *Construcción por PCR.*

Para cada reacción se especifican las cantidades de reactivos que se utilizaron para preparar la mezcla de reacción y las características de cada uno de los ciclos que se realizaron.

PCR A. En la primera reacción se utilizaron los oligonucleótidos REV-M13 y L17. La molécula templado fue el gen *tpi AFFAS*; se utilizó a la Pfu DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 µL	95 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 µL	50 °C	0' 30"	hibridación
REV-M13	2 µL	68 °C	2' 00"	elongación
L17	5 µL	x 5 veces		
AFFAS	1µL	92 °C	0' 30"	desnaturalización
DNA pol	2 µL	50 °C	0' 30"	hibridación
H ₂ O	30µL	68 °C	2' 00"	elongación
<hr/> Total	50 µL	x25 veces		

PCR B. Esta reacción utilizó *tpi AFAAS* como templado, el oligonucleótido que sirvió de primer fue el FF48 y el producto del PCR A se utilizó como megaprimer (primer o cebador de gran tamaño); se utilizó a la Pfu DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 µL	95 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 µL	50 °C	0' 30"	hibridación
FF48	5 µL	68 °C	2' 00"	elongación
PCR A	10 µL	x 5 veces		
AFFAS	1 µL	92 °C	0' 30"	desnaturalización
DNA pol	2 µL	50 °C	0' 30"	hibridación
H ₂ O	23 µL	68 °C	2' 00"	elongación
<hr/> Total	50 µL	x25 veces		

PCR B2. El templado fue el producto de PCR B, los cebadores fueron el FF48 y el REV-M13; se utilizó a la Pfu DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 μ L	92 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 μ L	55 °C	0' 30"	hibridación
REV-M13	2 μ L	68 °C	2' 00"	elongación
FF48	5 μ L	x 30 veces		
PCR B	31 μ L			
DNA pol	2 μ L			
H ₂ O	0 μ L			
<hr/>				
Total	50 μ L			

PCR C. Esta reacción utilizó como templado a *tpi PLATA*, el pimer que se uso fue el FWD-M13 y el PCR B2 purificado como megaprimer; se utilizó a la Pfu DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 μ L	95 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 μ L	50 °C	0' 30"	hibridación
FWD-M13	5 μ L	68 °C	2' 00"	elongación
PCR B'	10 μ L	x 5 veces		
PLATA	1 μ L	92 °C	0' 30"	desnaturalización
DNA pol	2 μ L	50 °C	0' 30"	hibridación
H ₂ O	21 μ L	68 °C	2' 00"	elongación
<hr/>				
Total	50 μ L	x25 veces		

PCR C2. El templado fue el PCR C, los cebadores fueron el FWD-M13 y el REV-M13; se utilizó a la Taq DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 μ L	92 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 μ L	55 °C	0' 30"	hibridación
FWD-M13	5 μ L	68 °C	2' 00"	elongación
REV-M13	5 μ L	x 30 veces		
PCR C	28 μ L			
DNA pol	2 μ L			
H ₂ O	0 μ L			
Total	50 μL			

5.4.2. PCR diagnóstico.

PCR NdeITim-XhoTim. Esta reacción utilizó como templado a los plásmidos extraídos de colonias transformadas con pGEM-LFFTA. Se usaron al XhoTim y al NdeITim como oligonucleótidos; se utilizó a la Pfu DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 μ L	95 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 μ L	50 °C	0' 30"	hibridación
NdeITim	2 μ L	68 °C	2' 00"	elongación
XhoTim	5 μ L	x 5 veces		
AFFAS	1 μ L	92 °C	0' 30"	desnaturalización
DNA pol	2 μ L	50 °C	0' 30"	hibridación
H ₂ O	30 μ L	68 °C	2' 00"	elongación
Total	50 μL	x25 veces		

PCR FWD-M13 - XhoTim. Esta reacción utilizó como templado a los plásmidos extraídos de colonias transformadas con pGEM-LFFTA. Se usaron al XhoTim y al NdeITim como oligonucleótidos; se utilizó a la Pfu DNA polimerasa.

Contenido de la celda de reacción		Ciclado		
Amortiguador	5 µL	95 °C	0' 30"	desnaturalización
dNTPs	5 µL	50 °C	0' 30"	hibridación
XhoTim	2 µL	68 °C	2' 00"	elongación
FWD-M13	5 µL	x 5 veces		
AFFAS	.1µL	92 °C	0' 30"	desnaturalización
DNA pol	2 µL	50 °C	0' 30"	hibridación
H ₂ O	30µL	68 °C	2' 00"	elongación
<hr/>				
Total	50 µL	x25 veces		

5.5. Clonación.

5.5.1. Sistema pGEM-T Easy Vector.

Para clonar el producto de PCR de la última reacción (PCR C2) se utilizó el pGEM-T Easy Vector System. Los vectores son preparados cortándolos previamente con la enzima *EcoR V* y agregando una timidina 5' terminal a sus dos extremos. Estas timidinas 5' que sobresalen en el sitio de inserción, incrementan la eficiencia de ligación del producto de PCR a los plásmidos previniendo la recircularización del vector y proveyendo a los productos de PCR de extremos compatibles con los suyos.

La región múltiple de clonación se encuentra dentro de la región en la que se encuentra el gen *lacZ* que codifica a la enzima β-Galactosidasa. La inserción del producto de PCR interrumpe la secuencia inactivando su expresión. Esto permite distinguir a las clonas recombinantes por simple

selección de color. Estos vectores contienen los promotores de la RNA polimerasa de T7 y SP6 flanqueando la región múltiple de clonación. El sitio de clonación múltiple permite la liberación del inserto mediante la digestión con distintas enzimas de restricción (Promega, Technical Manual No. 042).

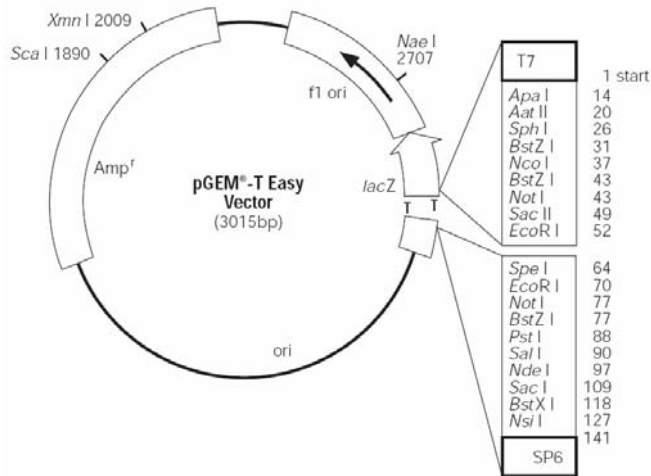


Figura 14. Mapa circular y puntos referencia en la secuencia del pGEM-T Easy Vector. Se puede observar el gen de *lacZ* interrumpido por el sitio de clonación múltiple que va de la base 10 a la 128 en la secuencia. Del lado opuesto al gen *lacZ* se puede observar la región que codifica para la β – lactamasa de la base 1 337 a la 2 197.

5.5.2. Ligación del inserto con el pGEM-T Easy Vector.

Al realizar una reacción de ligación se tienen que determinar las proporciones inserto:vector para optimizar la eficiencia de clonación. Cuando la concentración molar del producto de PCR es alta debido a un tamaño pequeño del fragmento y/o a una buena amplificación, se requieren volúmenes pequeños del fragmento de PCR para la reacción. Cuando la concentración molar es baja debido a un gran tamaño del fragmento y/o a una pobre amplificación, se requieren grandes volúmenes del fragmento de PCR.

En este caso se utilizó una relación molar inserto:vector de 6:1 para evitar resultados subóptimos. La concentración del producto de PCR se estimó en un gel de agarosa al 1.5 % por comparación con el marcador de pesos moleculares DNA ladder de 1 kb como estándar de masa de DNA. Para calcular la cantidad apropiada de producto de PCR en la reacción de ligación se

utilizó la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en kb}}{\text{tamaño del vector en kb}} \times \text{proporción molar inserto:vector} = \text{ng de inserto}$$

Las reacciones de ligación se prepararon en tubos eppendorf de 1.5 ml de acuerdo a la tabla 3. La mezcla se homogenizó con una micropipeta y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

Tabla 3. Contenido de los tubos de la reacción de ligación

	Reacción estándar	Control positivo	Control negativo
Amortiguador de rápida ligación	5 µL	5 µl	5 µl
2X			
pGEM [®] -T Easy Vector (50 ng)	1 µL	1 µl	1 µl
Producto de PCR	2 µL	-	-
Inserto de DNA control	-	2 µl	-
DNA ligasa de T4	1 µL	1 µl	1 µl
H2O	1 µL	1 µl	3 µl
Total	10 µL	10 µl	10 µl

5.5.3. Transformación de XL1-Blue.

La transformación es un método que permite que las células bacterianas capten DNA exógeno con el que adquieren un fenotipo particular. En la electrotransformación o electroporación se somete a un grupo de células preparadas como electrocompetentes a un pulso de corriente eléctrica de alto voltaje, el cual permea la pared y la membrana de las bacterias mediante la formación de poros temporales lo suficientemente grandes como para permitir la introducción del DNA. Las electrocompetentes deben estar en un medio con una concentración muy baja de sales para evitar que ocurra algún corto circuito durante el pulso eléctrico. En la quimiotransformación se utilizan células que han sido sensibilizadas a cambios abruptos de temperatura. Las células se pasan de una temperatura baja a una elevada en un corto tiempo, permitiendo que en la envoltura celular se formen poros de manera similar a la electroporación. El tipo de células que se preparan para este tipo de transformación se denominan quimiocompetentes o calciocompetentes, ya que son sometidas a altas concentraciones de Ca^{+} . En este caso se prepararon células electrocompetentes XL1-Blue para la transformación. Se agregaron 50 μL de células electrocompetentes y 1 μL del producto de la ligación a una celda para electroporar de 0.2 cm, todo a 4 °C. Se homogenizó el contenido de la celda y se aplicó un pulso de 2.5 V en el electroporador. Se recuperó inmediatamente con 1 mL de medio LB y se puso en un tubo de 1.5 mL a 37 °C durante una hora para dejar que las células se recuperaran. Al término de esta hora se agregó 100 μL de las células en placas de 30-35 mL de LB con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, 0.5 mM de IPTG y 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ X-Gal que se prepararon previamente para cada reacción de ligación.

5.5.4. Selección de clones recombinantes.

Las células transformadas se crecieron en placas de LB con ampicilina, IPTG y X-Gal por dos

razones. La primera es evitar que cualquier célula que no contenga el vector crezca en la placa; esto se logra gracias a que el vector posee una región que codifica para la β -lactamasa. Las β -lactamasas son enzimas que confieren resistencia a ampicilina ya que catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo lactámico generando productos inocuos para las células. La segunda es que las clonas recombinantes pueden ser fácilmente identificadas por selección de color en estas placas indicadoras. Las clonas que contienen los productos de PCR producen, en la mayoría de los casos, colonias blancas; mientras que las colonias azules corresponden a aquellas que carecen del inserto pero contienen el vector. Esto se debe a que la clonación exitosa de un inserto en el vector pGEM interrumpe la secuencia del gen *lacZ*, el primer gen del operon *lac*, el cual codifica la β -Galactosidasa. Esta enzima se expresa al ser inducida por el IPTG y es capaz de convertir al substrato (X-Gal) en un pigmento azul insoluble. Gracias a esto se infiere que las células donde permanece la actividad de esta enzima (colonias azules) poseen un vector pero carecen del inserto, mientras que en aquellas células donde no se observa actividad de la β -galactosidasa (colonias blancas) se tiene un vector cuyo gen *lacZ* está interrumpido por la inserción de nuestro fragmento de PCR.

5.6. Secuenciación.

Para obtener la secuencia de bases nitrogenadas de un segmento de DNA por el método automático de secuenciación se necesitan los siguientes compuestos:

El DNA molde o segmento de DNA que se desea secuenciar, una enzima que replique el DNA, un “primer” para que la DNA polimerasa comience a añadir nucleótidos por el extremo 3' OH (suele ser un oligonucleótido corto de alrededor de 20 bases de longitud, con una secuencia complementaria a la del fragmento de DNA que se desea secuenciar), los cuatro nucleótidos

trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y por último, se necesitan didesoxi nucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP). Los didesoxi nucleótidos han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de DNA naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de DNA.

El nucleótido didesoxi utilizado (ddATP por ejemplo) competirá con su homólogo (dATP) por incorporarse a la cadena de DNA que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el momento y lugar donde se incorpora.

Mediante este sistema, se producen una serie de moléculas de DNA recién sintetizados de diferente longitud que terminan todas en el mismo nucleótido. Estos fragmentos se separan por tamaños mediante electroforesis que permiten distinguir fragmentos de DNA que se diferencian en un solo nucleótido. Teniendo en cuenta que el DNA crece en la dirección 5' → 3', si comenzamos a leer el gel por los fragmentos de menor tamaño (extremo 5') y avanzamos aumentando el tamaño de los fragmentos (hacia 3'), obtendremos la secuencia de DNA en la dirección 5' → 3'. Este proceso se realiza de forma automática, utilizando ddNTPs marcados con distintos fluorocromos. La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis. Finalmente se genera un registro informatizado de los cuatro perfiles de color, que combinados se interpretan como una secuencia. Generalmente se usa el rojo para denotar los ddTTP, el verde para los ddATPs, el azul para los ddCTPs y el negro para los ddGTPs.

Se mandaron secuenciar los plásmidos 1B y 2A a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. En total se mandaron a hacer cuatro reacciones de secuenciación. El plásmido 1B con el primer SP6, el plásmido 1B con el primer T7, el plásmido 2A con el primer SP6 y el plásmido 2A con el primer T7.

5.7. Ensayos de expresión y solubilidad

5.7.1. Sistemas de Expresión.

Se transformaron tres cepas distintas de *E. coli*, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLys y VR101. La cepa BL21 (DE3) no tiene resistencia de ningún tipo y tiene clonada la T7pol. La cepa BL21 (DE3) pLys tiene un plásmido que le confiere resistencia a Cm y codifica de forma constitutiva el represor de *lac* (*lacI^q*) y la lisozima. VR101 es una cepa Kanamicina resistente (Km^r), es incapaz de producir la TPI de *E. coli* (Δtpi). Ver tabla 4.

Tabla 4. Diferentes tipos de cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Resistencia a antibióticos	Δtpi	<i>lacI^q</i>	T7pol	Tipo de cepa
BL21 (DE3)	Ninguna	No	No	Sí	expresión
BL21 (DE3) pLys	Cm^r	No	Sí	Sí	expresión
VR101	Km^r	Sí	No	No	expresión
XL1-Blue	Tc^r	No	Sí	No	Clonación

5.7.2. Transformación de las cepas de expresión.

Las cepas BL21 (DE3) y VR101 se prepararon como electrocompetentes y se utilizó la electrotransformación descrita en la sección 6.5.3. Se usaron 50 μ L de células electrocompetentes

y 1 μL del plásmido. Se transformó con un pulso de 2.5 V en una celda de 0.2 cm, a 4 °C. Se recuperó en 1 mL de LB en un tubo de 1.5 mL a 37 °C durante una hora para dejar que las células se recuperaran. Al término de esta hora se agregaron 100 μL de las células en placas de LB con ampicilina.

La cepa BL21 pLys se preparó como calciocompetente y se utilizó la quimiotransformación descrita en la sección 6.5.3. Se incubaron a 4 °C 50 μL de las células más 1 μL de plásmido en un tubo de PCR. Se pasó a 42 °C por 50 s, e inmediatamente después se incubaron nuevamente a 4 °C por 5 min. Luego se incubaron las células en 1 mL de LB a 37 °C durante 1.5 h. Se sembró 100 μL de estas células en una caja de LB con ampicilina.

5.7.3. Expresión y solubilidad de TPI LFFTA en BL21 (DE3), BL21 (DE3) Plys y VR101.

Expresión. Se realizó un cultivo de 12 h de 10 mL de LB complementado con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina para cada una de las cepas BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLys y VR101 que contenían el plásmido pGEM-LFFTA. Con 500 μL de cada uno de los cultivos de 12 h se inocularon matraces con 50 mL de LB y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. Se dejaron crecer los cultivos hasta que alcanzaran una $D.O_{600}$ de 0.5 – 0.6, momento en el que se agregó isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración de 0.2 mM, dejándose por otras 3 h. a 37 °C. Se tomaron 25 mL del cultivo para centrifugar y sonicar, los otros 25 mL se dejaron por otras 2 h a 37 °C dentro del agitador antes de centrifugarlos y sonicarlos. Se tomaron alícuotas de 10 μL de los cultivos antes de inducir, 3 hrs. después de inducir y 5 hrs. después de inducir.

Solubilidad. Los 25 mL de cada cultivo, tomados a las 3 h de inducción, se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 7 mL de *amortiguador de lisis* (Trietanolamina 10 mM (TEA), ácido etilendiaminotetraacético 1.0 mM

(EDTA) y ditioneitol 1.0 mM (DTT), pH 7.6 con NaCl 2 M). Se sonicó a 4 °C con 8 pulsos de 35 de amplitud y 30 s. cada uno con intervalos de 1 min entre pulso y pulso. Después de sonicar se centrifugó el extracto celular a 10 000 rpm por 10 min. Se tomó una alícuota de 10 µL del sobrenadante y otra alícuota de la pastilla.

La otra mitad de los cultivos recibió el mismo tratamiento pero a las 5 h después de haber sido inducidos.

En total se tomaron las siguientes alícuotas para cada uno de los cultivos de las cepas VR01, BL21 DE3 y BL21 Plys: Antes de inducir, 3 h después de inducir, 5 h después de inducir, sobrenadante de 3 h de inducción, sobrenadante de 5 h de inducción, pastilla de 3 h de inducción y pastilla de 5 h de inducción. Todos estas alícuotas se analizaron por SDS-PAGE.

5.8. Purificación

Se realizaron 4 purificaciones de TPI LFFTA. En todas se modificaron algunas condiciones, las cuales se mencionan más adelante de forma específica. Se usaron variantes del amortiguador TED con distintas molaridades y pH. Este amortiguador recibe su nombre de las iniciales de sus componentes, que son: Trietanolamina (TEA), Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) y Ditioneitol (DTT).

5.8.1. Expresión, lisis y precipitación con sulfato de amonio.

En todas las purificaciones se realizó un cultivo de 10 mL y 12 h en LB complementado con 100 µg mL⁻¹ de ampicilina de *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformada con el plásmido 1B. Con este cultivo se inoculó un cultivo más grande de LB con 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Se indujo con 0.2 mM de IPTG, y se mantuvo a 37 °C dentro de un agitador orbital a 200 rpm por otras 4 h. Se concentraron las células centrifugando a 10 000 rpm. Se resuspendió la pastilla en *amortiguador*

de lisis (TED 10/1/1, con 2 M NaCl y 20 mM de PMSF previamente disuelto en DMSO, pH 7.6) y la ruptura de las células se llevó a cabo con un sonicador a una temperatura de 4°C, utilizando varios pulsos hasta que la solución cambiara de turbia a ligeramente translúcida.

Se centrifugó el extracto celular a 10 000 rpm, el sobrenadante de esta centrifugación se centrifugó a 45 000 rpm. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio, agregando éste poco a poco durante 1 h en constante agitación.

5.8.3. Primera Purificación.

Esta purificación se realizó en el lapso de una semana. Se hizo un cultivo de 3 L. El sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio dentro del rango de 20 – 90 % en 15 mL y se dializó toda la noche contra 1 L de amortiguador pH 7.6 (TED 10/1/1).

Cromatografía. En el siguiente paso de purificación se utilizó la columna de exclusión molecular Sefacryl S-300 (16 mm x 70 cm). La columna fue preequilibrada con el mismo amortiguador pH 7.6 (TED 10/1/1). Se programó una corrida de un total de 220 mL a un flujo constante de 0.2 mL min⁻¹ del amortiguador; el colector se programó para recolectar fracciones de 1.5 mL cada una. Las fracciones correspondientes a los picos en el cromatograma se analizaron utilizando SDS-PAGE.

La segunda columna que se utilizó en esta purificación fue la de intercambio iónico MonoQ, la cual se equilibró con amortiguador pH 7.6 (TED 10/1/1). Se aplicó la muestra (conjunto de fracciones con proteína obtenidas de la columna Sefacryl S-300) a la columna. La corrida se llevó a cabo con el mismo amortiguador y se eluyó con un gradiente lineal de sal de 0–100 mM desde los 10 mL hasta los 120 mL y de 100 mM–1 M desde los 120 mL hasta los 140 mL. Este gradiente se creó utilizando un amortiguador *con sal* pH 7.6 (TED 10/1/1, con 1 M NaCl). El flujo de la

corrida fue constante a 2 mL min^{-1} y las fracciones recolectadas de un volumen de 2 mL por fracción; se corrieron un total de 220 mL. La corrida se monitoreó con el detector de uv a 280 nm. Las fracciones correspondientes a los picos en el cromatograma se analizaron por SDS-PAGE.

Las fracciones con proteína resultantes de la primera columna MonoQ se juntaron y dializaron en amortiguador pH 7.2 (TED 10/1/1). Esta muestra se inyectó nuevamente a una columna MonoQ preequilibrada con el mismo amortiguador en el que se dializó, el amortiguador pH 7.2 (TED 10/1/1). Se utilizó amortiguador *con sal* pH 7.2 (TED 10/1/1, con 1 M NaCl) para introducir el gradiente lineal de elución con NaCl de 0 mM – 100 mM desde los 10 mL hasta los 50 mL, y de 100 mM – 1 M desde los 50 mL hasta los 160 mL. En total, la corrida constó de 220 mL a un flujo constante de 2 mL min^{-1} ; se monitoreó con el detector de uv a 280 nm y se recolectaron fracciones de 2 mL cada una. Se realizó un SDS-PAGE y un ensayo de actividad para cada una de las fracciones que mostrara tener la proteína en el gel.

5.8.3. Segunda Purificación.

Esta purificación se realizó en el lapso de tres días. Se hizo un cultivo de 3 L. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 70% en 6 mL y se dejó dializando contra 1 L del amortiguador pH 7.6 (TED 10/1/1) por 8 h.

Cromatografía. Se usó la columna Sefacryl S-300 (16 mm x 70 cm) preequilibrada con la solución de amortiguador pH 7.6 (TED 10/1/1). Se ocupó la columna MonoQ como segunda columna del proceso de purificación, se uso amortiguador pH 7.2 (TED 10/1/1) para equilibrar y desempeñar el resto de la corrida. Se juntaron y aplicaron a la columna las fracciones que resultaron de la primera cromatografía y que mostraron mayor actividad específica. Se eluyó con un gradiente lineal de sal de 0 mM–100 mM desde los 10 mL hasta los 50 mL, y de 100 mM–1 M

desde los 50 mL hasta los 160 mL, utilizando el amortiguador *con sal* pH 7.2 (TED 10/1/1 con 1 M NaCl). Las fracciones con absorbancia se analizaron por SDS-PAGE. Se midió la concentración, y la actividad catalítica de las fracciones con proteína de cada una de las columnas.

5.8.4. Tercera Purificación.

Esta purificación se llevó a cabo en 24 h. El cultivo fue de 1 L. Se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación, en 2 mL de amortiguador pH 7.6 (TED 100/10/1). Se dializó durante 1 h en 1 L del amortiguador pH 7.6 (TED 100/10/1), con un recambio del amortiguador a los 30 min.

Cromatografía. Se usó la columna MonoQ previamente equilibrada con amortiguador pH 7.6 (TED 100/10/1). La corrida fue de 220 mL totales a un flujo de 2 mL min⁻¹, recolectando fracciones de 2 mL. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de sal que se introdujo con el amortiguador *con sal* pH 7.6 (TED 100/10/1, con 1 M NaCl). El gradiente fue de 0 mM–100 mM a partir de los 30 mL hasta los 60 mL y de 100 mM–1 M desde los 60 mL hasta los 100 mL.

Las fracciones con mayor actividad específica se juntaron y dializaron en amortiguador pH 7.2 (TED 100/10/1) durante una hora, bajo agitación y a 4 °C; se realizó un recambio de amortiguador a los 30 min. Una vez dializada la muestra se inyectó nuevamente a la columna MonoQ, preequilibrada con amortiguador pH 7.2 (TED 100/10/1); el mismo amortiguador se utilizó para llevar a cabo la corrida. El amortiguador *con sal* pH 7.2 (TED 100/10/1 con 1 M NaCl) se utilizó para crear un gradiente lineal de sal que se utilizó para eluir la proteína. El gradiente fue de 0 mM–300 mM desde los 30 mL hasta los 60 mL y cambió a un gradiente de 300 mM–1 M desde los 60 mL hasta los 90 mL.

5.8.5. Cuarta Purificación.

Esta purificación se realizó en el lapso de una semana. Se utilizó un cultivo de 1 L. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 70 % en 15 mL. El tiempo de diálisis fue de 12 h en 1 L de amortiguador pH 7.4 (TED 10/1/1).

Cromatografía. Se utilizó la columna Sefacryl S-300 (16 mm x 70 cm) con amortiguador pH 7.4 (TED 10/1/1). Como no se pudo hacer uso del detector de UV, se analizó con SDS-PAGE aquellas fracciones en las que se había estado obteniendo la TPI en las ocasiones anteriores, además se determinó su concentración de proteínas y se les midió actividad.

La segunda columna fue la MonoQ con amortiguador pH 7.4 (TED 10/1/1). Se eluyó con un gradiente lineal de sal de 0 M–1 M de los 20 mL hasta los 100 mL, utilizando el amortiguador *con sal* pH 7.4 (TED 10/1/1 con 1 M NaCl).

Las fracciones con mayor actividad específica se juntaron e introdujeron nuevamente a la columna MonoQ. En esta ocasión se utilizó amortiguador pH 7.7 (TED 10/1/1) y se utilizó amortiguador *con sal* pH 7.7 (TED 10/1/1, con 1 M NaCl) para introducir el gradiente lineal de elución, el cual fue de 0 M – 1 M desde los 20 mL hasta los 100 mL. Se realizó un SDS-PAGE y un ensayo de actividad para cada una de las fracciones que mostrara tener la proteína en el gel.

5.9. Análisis de Proteínas

5.9.1. SDS-PAGE.

Es un método común para separar proteínas por electroforesis que utiliza un gel discontinuo de poliacrilamida como medio de soporte y dodecil sulfato de sodio (SDS) para desnaturalizar las proteínas. Después de que una proteína es desnaturalizada por calor, el SDS se une a la cadena polipeptídica. Las cargas negativas del detergente mantienen a las proteínas desnaturalizadas, y

hacen que sean atraídas hacia el ánodo en un campo eléctrico. El gel de poliacrilamida retiene a las moléculas más grandes permitiendo que moléculas pequeñas migren más rápido. Por lo general el gel consta de dos fases. La primera se conoce como gel concentrador, tiene una concentración menor de acrilamida para permitir que las muestras se emparejen y empiecen la corrida al mismo tiempo. La segunda fase se conoce como gel separador, que al ser más compacta separa a las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Se utilizó el método de Laemli, con geles al 12% de acrilamida. Se usó una TPI silvestre como estándar de peso molecular y para la tinción de los geles se aplicó azul de Coomassie.

5.9.2. Medición de Actividad.

Con el fin de detectar la actividad de TPI, se siguió el protocolo descrito por Plaut y Knowles (Maihál y col., 2002). Se trata de un ensayo acoplado a la α -GDH, en el que se mide la actividad de la TPI mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm (debido a la oxidación del NADH) como función del tiempo. La actividad se determinó con la reacción en el sentido de G3P a DHAP.

La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Beckman DU 7500 con temperatura controlada a 25°C. Se usaron las siguientes condiciones: TED 100/10/1, pH 7.4, G3P 0.025-2.5 mM, α -GDH 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y NADH 0.2 mM.

En todos los casos se trató de medir la actividad con una cantidad de enzima de aproximadamente 10 ng mL^{-1} . En caso de no presentar actividad, la medición se realizó con cantidades 10 ó incluso 100 veces más grandes. En las mediciones de cinética se utilizaron distintas concentraciones de G3P dentro de un rango de 20 a 1000 mM. }

5.9.3. *Radio de Stokes.*

La cromatografía de exclusión por tamaño es una técnica mediante la cual se puede calcular el radio de Stokes (R_s) de una proteína a partir de conocer el volumen en el que eluye de una columna. El volumen de elución (V_e) es un sinónimo del tiempo de retención dentro de la columna, por lo que moléculas con un radio hidrodinámico grande tendrán un V_e menor que aquellas que tengan un radio hidrodinámico pequeño. Esto se debe a que las moléculas pequeñas tardan más tiempo en atravesar la columna. El cálculo del radio de Stokes de la proteína problema se hizo en base a una curva de calibración, la cual se elaboró pasando por la columna una serie de proteínas con radios de Stokes conocidos.

Para este experimento se utilizó una columna Superdex 75 HR 10/30 de filtración en gel acoplada a un sistema FPLC. Se utilizó amortiguador pH 7.7 (TED 10/1/1) con un flujo de elución de 0.4 mL min^{-1} . La corrida se siguió con ayuda de un detector de fluorescencia Waters 474, usando una longitud de onda de 280 nm en la excitación y 320 nm en la emisión.

5.9.4. *Desnaturalización por calor seguida por dicroísmo circular.*

Una molécula presenta señal en el espectro de dicroísmo circular (DC) si puede interactuar en distinta medida con los dos tipos de luz polarizada circularmente (L y R). Esta interacción puede detectarse como la diferencial de la absorción de cada rayo (θ). El DC puede producir un rayo que cambia constantemente entre L y R. El rayo pasa a través de la muestra y llega a un fotomultiplicador, la señal detectada puede ser procesada para dar una gráfica de θ contra λ . Desde hace más de cuarenta años, se ha utilizado el espectro del DC para determinar la estructura secundaria de las proteínas.

En este caso se utilizó el DC para seguir la desnaturalización de la mutante causada por un

incremento en la temperatura. Para hacerlo, se registró de forma continua el cambio en la elipticidad a 220 nm, conforme se aumentó la temperatura de 20 °C a 95 °C con un incremento constante de 1 °C min⁻¹. Se utilizó el espectropolarímetro JASCO J-715 con celdas de 0.1 cm. Se empleó una solución de amortiguador de pH 8 (TRIS 20 mM) con una concentración de TPI LFFTA de 0.44 mg mL⁻¹. También se obtuvieron los espectros en el UV-lejano (200-250 nm) y a 20 °C para la TPI LFFTA nativa y después de ser desnaturalizada, con el fin de calcular el porcentaje de proteína capaz de renaturalizarse al regresar a la temperatura inicial.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Consideraciones del Diseño

Para evaluar objetivamente la aportación del cambio de algunos residuos de aminoácido de la interfase por otros de naturaleza hidrofóbica, se utilizó el rediseño de una mutante hidrofóbica en su interfase de TPI de *Saccharomyces cerevisiae* elaborado con ayuda del programa ROSETTA. En la figura 16 se presenta con imágenes generadas con el programa PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>), el conjunto de mutaciones que se incluyeron en el modelo de la mutante TPI-LFFTA. A continuación se describen de forma breve, las características fisicoquímicas de los residuos que se cambiaron en cada una de estas mutaciones (Voet, 2004):

En la posición 17 lisina (K) por leucina (L). Ver figura 16a. Lisina tiene una cadena lateral cargada positivamente, en cambio la Leucina tiene una cadena lateral no polar.

En la posición 46 tirosina (Y) por fenilalanina (F). Ver figura 16b. Tirosina tiene un grupo aromático en su cadena lateral con un grupo hidroxilo que puede formar puentes de hidrógeno, por lo que es relativamente más polar que la fenilalanina que también tiene una cadena lateral aromática.

En la posición 48 ácido aspártico (D) por fenilalanina (F). Ver figura 16c. El ácido aspártico tiene una cadena lateral cargada negativamente, en cambio la fenilalanina tiene un grupo aromático como cadena lateral.

En la posición 82 glutamina (Q) por treonina (T). Ver figura 16d. La glutamina tiene una cadena lateral con carga negativa y la treonina tiene una cadena lateral polar gracias a su grupo hidroxilo, pero no presenta carga.

En la posición 85 ácido aspártico (D) por alanina (A). Ver figura 16e. El ácido aspártico tiene

una cadena lateral cargada negativamente, mientras que la alanina tiene una cadena lateral alifática.

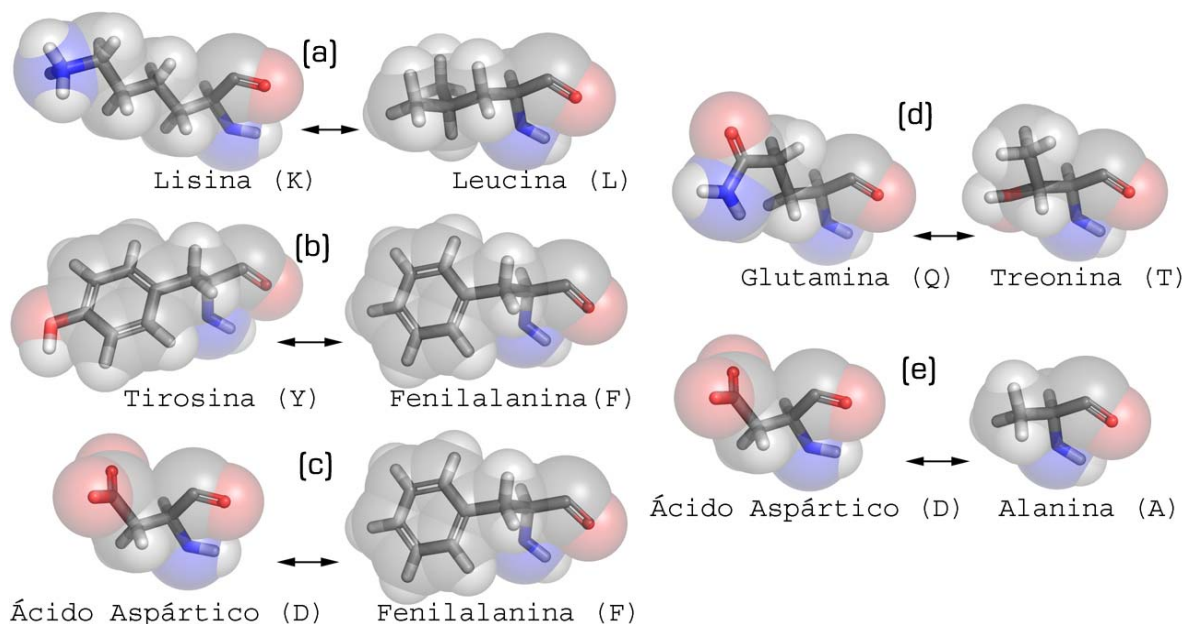


Figura 16. Representación de bastones y CPK de cada uno de los cambios en los residuos de la mutante LFFTA.

6.2. Construcción del gen *tpi* LFFTA

Para la construcción del gen *tpi* LFFTA se utilizó un protocolo que incluyó múltiples reacciones de PCR. Los PCR se realizaron de forma consecutiva hasta completar la secuencia completa del gen.

El esquema general de la construcción se puede ver en la figura 17. La estrategia consistió en utilizar el producto del primer PCR como megaprimer para el segundo PCR. Reamplificar el producto del segundo PCR para usarlo como megaprimer del tercer PCR. Y finalmente reamplificar el producto del tercer PCR para tener este fragmento de DNA en una cantidad lo suficientemente grande para poder clonarlo eficientemente.

En las primeras dos reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos L17 y FF48 para introducir mutaciones en los codones 17, 46 y 48 respectivamente. Durante el penúltimo PCR se

utilizó el templado *tpi PLATA* para copiar las mutaciones a los codones 82 y 85. De esta forma, el producto final consistió en un fragmento de DNA ligeramente más grande que el gen (puesto que contenía también la secuencia promotora), con mutaciones en los codones 17, 46, 48, 82 y 85. A continuación se mencionan las reacciones de manera más específica.

PCR A. En la primera reacción se obtuvo un producto de PCR al que se le denominó PCR A. Los primers utilizados en su elaboración fueron los oligonucleótidos L17 y REV-M13; el templado fue *tpi AFAAS* (figura 17a y b). Se puede usar como templado el gen *tpi* o cualquier versión mutante de este, siempre y cuando no incorpore mutaciones que no hayan sido contempladas en el diseño. El oligonucleótido L17 presenta una secuencia de nucleótidos que es complementaria al gen, excepto por el triplete de nucleótidos CAA que tiene al centro de su secuencia. Esto significa que hibrida perfectamente con el gen *tpi* por sus dos extremos, pero no puede hacerlo en ese pequeño segmento de tres bases. Aun así, L17 funciona bien como primer al hibridar aproximadamente 60 bases corriente arriba del sitio de inicio de transcripción del gen *tpi*. Así la polimerasa puede copiar el triplete de nucleótidos CAA en la hebra en síntesis. El oligonucleótido REV-M13 no es mutagénico, pero hibrida corriente abajo del sitio de inicio de transcripción del gen de *tpi*.

El PCR A abarca desde la región en la que hibrida el oligonucleótido REV-M13 (incluye parte del vector pBlueScript), hasta la región en la que hibrida el oligonucleótido L17 (dentro del gen). Estos fragmentos de DNA tienen mutados el codón 17, presentan TTG que codifica para Leucina en lugar de AAA que codifica para Lisina. La electroforesis en gel de agarosa mostró, de acuerdo al marcador de pesos moleculares, que el PCR A tuvo una longitud aproximada de 200 pb (figura 18). Este es un número de bases similar al esperado para esta reacción.

PCR B. El producto de PCR de la segunda reacción se llamó PCR B. Se utilizó al oligonucleótido FF48 como primer y al PCR A como megaprimer (primer de mayor tamaño que el

habitual); el templado fue *tpi AFAAS*, aunque se pudo utilizar cualquier otro gen de *tpi* (figura 17c y d). El oligonucleótido FF48 tiene una secuencia complementaria al gen, excepto por los tripletes GTA y GAA (tabla 2). Estos nucleótidos se encuentran aproximadamente a la mitad del oligonucleótido y son las únicas partes donde este no hibrida por completo con el gen. Aunque en este caso son dos tripletes los que no hibridan, el resto de la secuencia del FF48 es lo suficientemente grande para permitir que se asocie con el templado. Cuando la polimerasa lo usa como primer, copia su secuencia de bases e incorpora las mutaciones de los codones 46 y 48 a la hebra en síntesis. El megaprimer PCR A, tiene la mutación del codón 17. Al igual que como ocurre para un primer normal, la DNA polimerasa copia la secuencia del megaprimer e incorpora todos los cambios que este trae consigo.

El PCR B abarca desde lo que consiste el PCR A hasta donde hibrida el oligonucleótido FF48. Estos fragmentos de DNA tienen mutados el codón 17, el codón 46 y el codón 48. En el codón 17 tienen la misma mutación que el PCR A, la cual codifica para leucina en lugar de lisina. En el codón 46 tienen TTC que codifica para fenilalanina en lugar de TAC que codifica para tirosina. En el codón 48 tienen TTT que codifica para fenilalanina en lugar de GAC que codifica para ácido aspártico. El peso del PCR B de acuerdo a la electroforesis corresponde a un tamaño de 300 pb, lo que es aproximado al tamaño estimado para el producto de esta reacción. A pesar de esto, mostró una baja intensidad en el gel, lo que significa que estaba presente en una baja concentración.

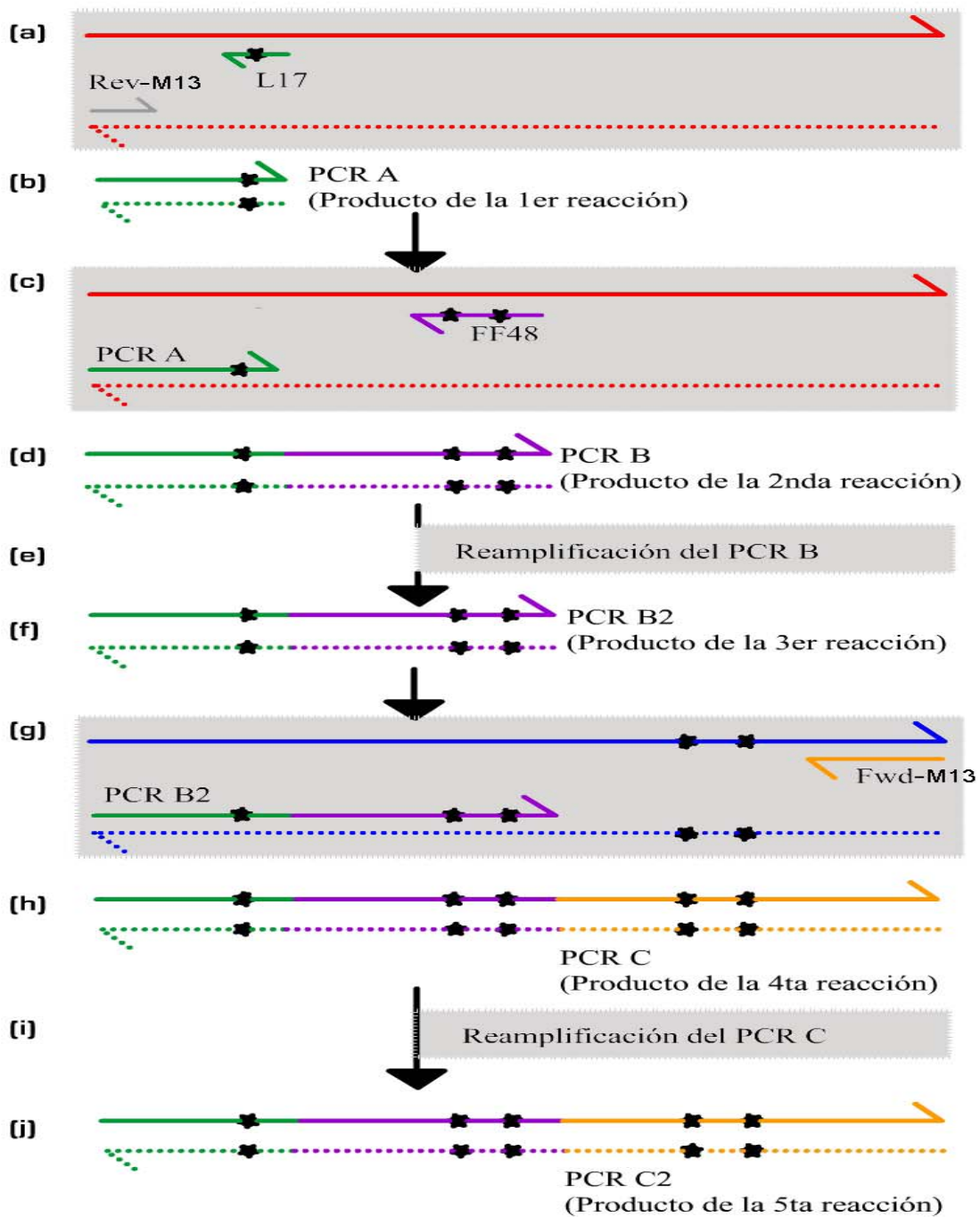


Figura 17. Esquema general de la construcción del gen *tpi* LFFTA. Las cadenas de DNA que va de 5' a 3' están representadas por líneas continuas; las cadenas complementarias son líneas punteadas. Las mutaciones están marcadas con estrellas color negro. Todos los pasos que representan reacciones están dentro de cajas color gris. (a) Primer PCR (b) Producto del primer PCR (c) Segundo PCR (d) Producto del segundo PCR (e) Tercer PCR (f) Producto del tercer PCR (g) Cuarto PCR (h) Producto del cuarto PCR (i) Quinto PCR (j) Producto del quinto PCR.

PCR B2. El producto de la tercera reacción de PCR se llamó PCR B2. Los primers utilizados fueron los mismos que se usaron en el segundo PCR (PCR A y FF48); el templado fue el PCR B purificado del gel de agarosa para evitar contaminación con el gen original (figura 17e y f).

La finalidad de esta reacción fue aumentar la cantidad de producto del PCR B. En el gel de agarosa mostró tener el mismo peso de 300 pb pero una mayor concentración (figura 18). Esto coincide con la suposición de que el PCR B2 es una reamplificación del PCR B, ya que en principio su longitud y composición deberían ser las mismas.

PCR C. En la cuarta reacción se obtuvo un producto de PCR al que se le llamó PCR C. Los primers utilizados fueron el PCR B2 y el oligonucleótido XhoTim. El templado fue *tpi PLATA* (figura 17g y h). La DNA polimerasa siempre sintetiza una hebra complementaria a la hebra molde (Lewin, 2000), por eso se usó a *tpi PLATA* como templado para que se copiaran las mutaciones de los codones 85 y 87. De esta manera no se necesitaron de más oligonucleótidos mutagénicos para modificar esos dos codones y bastó con utilizar el oligonucleótido comercial XhoTim que hibrida corriente arriba del gen con una serie de nucleótidos que proviene originalmente del plásmido pBlueScript. Esto permite que la polimerasa copie el templado *tpi PLATA* desde ese extremo, lo que incluye a los codones 85 y 87. El PCR B2 se usó como megaprimer para copiar las mutaciones de los codones 17, 46 y 48 al producto final de la reacción.

El PCR C abarca desde el comienzo del PCR B (corriente arriba del gen del lado de su sitio de inicio de transcripción) hasta donde hibrida el oligonucleótido XhoTim (corriente abajo del sitio de término de transcripción del gen). Estos fragmentos de DNA tienen mutados los codones 17, 46, 48, 82 y 87. En el codón 17 tienen TTG que codifica para leucina en lugar de AAA para lisina, en el codon 46 tienen TTC fenilalanina en lugar de TAC para tirosina, en el codón 48 tienen TTT para fenilalanina en lugar de GAC para ácido aspártico, en el codón 82 tienen ACC para treonina en lugar de CAA para glutamina y en el codón 87 tienen GCC para alanina en lugar de GAT para

ácido aspártico. Midió unos 900 pb en el gel de agarosa, lo que correspondió al peso estimado, pero mostró una baja concentración.

PCR C2. Por último se obtuvo un producto de PCR al que se le llamó PCR C2. Los primers utilizados fueron los oligonucleótidos REV-M13 y XhoTim, ya que son los únicos que flanquean el gen por el extremo izquierdo y por el extremo derecho respectivamente; el templado fue el PCR C (17i y j). El PCR C2 es la reamplificación del PCR C y por tanto tiene la misma longitud y composición. En el gel de agarosa mostró un peso de 900 pb al igual que el PCR C pero mayor concentración (figura 18). En esta ocasión la reamplificación del PCR C tuvo más importancia. Esto se debe a que el PCR que precede a la clonación debe presentar altas concentraciones para evitar problemas durante la clonación. Un número reducido de productos de PCR se ve reflejado en una baja eficiencia de ligación.

La electroforesis en gel de agarosa de todas las reacciones mostró solo una banda predominante por producto de PCR (figura 18). La aparición de otras bandas se debe a la producción de algunos subproductos generados por la hibridación inespecífica de los oligonucleótidos. A pesar de no ser visibles, para evitar la interferencia de estos subproductos, durante las reacciones de reamplificación se purificaron sólo los fragmentos que correspondían al producto de interés. También se purificaron los productos de PCR entre cada reacción para eliminar a los oligonucleótidos empleados, evitando su interferencia en las reacciones posteriores (QIAGEN, 2002).

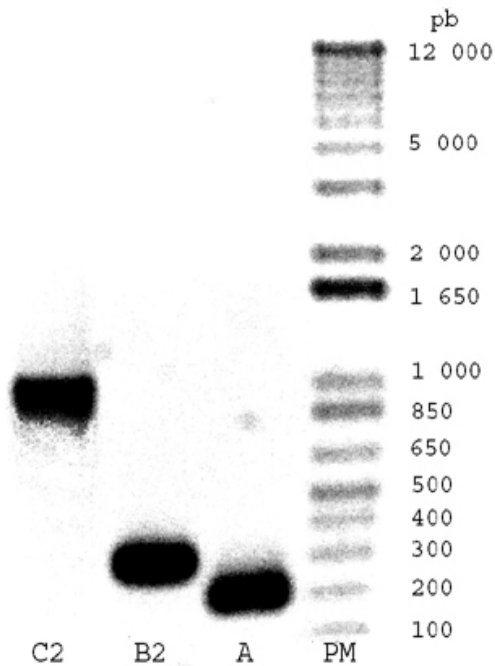


Figura 18. Fragmentos amplificados en la construcción. Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. De derecha a izquierda se observa el marcador de pesos moleculares, el PCR A con un peso de 200 pb, el B2 con un peso de 300 pb y el C2 con un peso de 900 pb, este último es el producto final de los PCR.

Las primeras 4 reacciones se realizaron utilizando a la Pfu polimerasa, procedente del organismo *Pyrococcus furiosus* (Brock y col., 1994; Rodríguez y Barrera, 2004). Si bien esta DNA polimerasa tiene una velocidad de polimerización de oligonucleótidos baja (1 kb por cada 2 min), en comparación con la velocidad de otras polimerasas, esta aparente desventaja se compensa con la gran fidelidad con la que se copia la hebra molde (con una tasa de error de 1×10^{-6}). La fidelidad con la que se copió el DNA fue sin duda un requisito indispensable para estas primeras reacciones en las que no se quería obtener mutaciones adicionales a las que se introdujeron por mutagénesis dirigida (Cline y col., 1996).

La Pfu deja extremos romos, esta es la razón por la que se utiliza la Taq polimerasa en la última reacción. La Taq polimerasa fue extraída a partir de *Thermus Aquaticus* (Brock y col., 1994; Rodríguez y Barrera, 2004). La Taq polimerasa presenta una velocidad de polimerización mayor (1 kb por min), pero a diferencia de la Pfu esta DNA polimerasa deja extremos dispares y agrega una adenina extra al extremo 3' de las hebras que sintetiza; esta propiedad se aprovecha para introducir al gen dentro del vector de clonación (Promega, Technical Manual No. 042; Cline y

col., 1996), tal y como se describirá en el apartado de clonación.

6.3. Clonación

6.3.1. Ligación y transformación.

La clonación de *tpi LFFTA* implicó ligar el PCR C2 (inserto) al vector pGEM-T. Es importante recordar que solamente aquellos productos de PCR con extremos disperejos (adeninas 3' en ambos extremos) pueden hibridizar y ligarse exitosamente al vector y que solo ciertas polimerasas poseen esta característica de agregar una deoxiadenosina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados de una forma independiente al templado (Promega, Technical Manual No. 042). Aunque en este paso no existe forma de cuantificar la eficiencia de la reacción, se pensaba que no habría problemas dado que se usó a la Taq polimerasa (DNA polimerasa que deja adeninas 3' en los extremos) para llevar a cabo el último PCR. Se puede inferir que las adeninas 3' del inserto ayudaron a que este se uniera a las timidinas 3' del vector pGEM-T y que posteriormente la DNA ligasa selló los huecos entre el inserto y el vector. Aun así, existe la posibilidad de que parte de los insertos se hayan ligado a un solo extremo del vector y de que algunos vectores se hayan recircularizado ente sí. Estos fenómenos suelen ocurrir con frecuencia aún en un sistema controlado como el del pGEM-T, pero esta ineficiencia puede tolerarse siempre que durante la transformación se usen células competentes altamente eficientes (Promega, Technical Manual No. 042).

En nuestro caso, el producto de la reacción de ligación entre el PCR C2 y el vector pGEM-T se transformó en células de *E. coli* de la cepa XL1-Blue. También se transformaron células de XL1-Blue con el producto de la reacción de ligación entre el vector pGEM y el inserto control (incluido en el kit de pGEM-T) para que funcionara como control positivo y con el producto de la reacción

de ligación que incluyó únicamente al vector como control negativo.

6.3.2. Selección de clonas recombinantes.

Las células de *E. coli* de la cepa XL1–Blue que fueron transformadas se sembraron en placas de LB con ampicilina, IPTG y X-Gal.

En el control negativo se obtuvieron únicamente colonias azules, es decir, con actividad de β -Galactosidasa; lo que indica que el gen *lacZ* no fue interrumpido por el inserto. Mientras que en el control positivo y en el proceso estándar (ligación y transformación con el producto de PCR) se obtuvo aproximadamente un 30 % de colonias blancas y un 70% restante de colonias azules. Estos resultados concuerdan con lo que se esperaba para un control negativo, ya que este permite determinar el número colonias azules que resultan de vectores no digeridos o carentes de timidina terminal. En algunas ocasiones se obtienen colonias azules aun cuando el fragmento de PCR se encuentra inserto pero este no logra interrumpir al gen *lacZ* (Promega, Technical Manual No. 042). Como el número de colonias azules obtenidas en el control negativo y en el proceso estándar fueron similares, se descartó la posibilidad de que hubiese PCR ligados a vectores que no interrumpieran eficazmente a *lacZ*. Esto significaba que las colonias recombinantes no se encontraban dentro de las colonias azules.

Otra evidencia que apoya esta conclusión, es el hecho de que se encontrara una proporción similar de colonias blancas en el control positivo y en el proceso estándar. El inserto de DNA control está específicamente diseñado para interrumpir al gen *lacZ* y producir colonias blancas (Promega, Technical Manual No. 042), lo que prueba que el fragmento de PCR interrumpió el gen *lacZ* con la misma eficiencia que el inserto control.

Generalmente el control positivo se usa para determinar cuando la ligación y la transformación

proceden eficientemente. Cuando la transformación es óptima solo de un 10 a un 40% de estas células es azul. En el caso de que no se obtengan colonias se deduce que hubo un fallo en la transformación. Si solo se obtienen colonias azules, el resultado sugiere que la reacción de ligación falló. En el caso de que se observen menos de un 50% de colonias blancas se puede decir que las condiciones de ligación fueron subóptimas (Promega, Technical Manual No. 042). Como se obtuvieron un poco más de 100 células pero el número de colonias recombinantes no rebasó el 30% se propone que hubo una baja eficiencia de la ligación. Esta falla pudo deberse a que el tiempo de incubación de la reacción no haya sido suficiente, a que la proporción vector:inserto no fuera óptima, a que el pGEM-T estuviera un poco degradado de tal suerte que algunas moléculas de vector no tuvieran T sobresalientes promoviendo la autoligación del vector, o a que el producto de PCR no haya podido ligarse debido a la formación de dímeros de pirimidina por sobre exposición a UV.

Aunque no se supo con certeza cual fue la causa, se obtuvieron cepas con plásmido e inserto en cantidades suficientes como para continuar con los siguientes experimentos. Se puede decir que esta cepa fue un buen sistema para detectar por simple distinción de color a las colonias que contenían el vector ligado al inserto de las que no. Esta ventaja se atribuye a que la cepa es $\Delta lacZ$, es decir, no tiene β -Galactosidasa en su cromosoma y a que presenta $lacI^q$, lo que significa que sobre produce el represor de *lac* (Promega, Technical Manual No. 042).

6.3.3. Verificación de la construcción.

Se aislaron los plásmidos de 10 colonias mediante miniprep y se verificó la presencia del *gen tpi* *LFFTA* primero por PCR y luego por secuenciación.

6.3.4. *Confirmación por PCR.*

Antes de mandar a secuenciar alguno de los plásmidos, se hicieron dos pruebas de PCR con las que se intentó corroborar no solo la presencia del gen dentro del plásmido sino que también la dirección en la que este estaba inserto.

El primer PCR diagnóstico se realizó con los oligonucleótidos NdeI y XhoTim. El oligonucleótido XhoTim hibrida en el codón de término del gen, pero en la cadena complementaria. NdeITim también hibrida dentro del inserto, en este caso en el codón de inicio. Se puede observar sus posiciones en la figura 19. La distancia que hay entre las regiones en las que hibridan ambos oligonucleótidos es de aproximadamente 800 pb y como ambos hibridan en cadenas complementarias se esperaba que se generara un producto de PCR de esta longitud. El análisis que se hizo utilizando estos oligonucleótidos fue positivo para todos los plásmidos exceptuando para el plásmido que se obtuvo de la colonia 3. Todas las reacciones produjeron fragmentos de 800 pb visibles en el gel de agarosa. Lo que demostró que todos los plásmidos que se extrajeron, exceptuando el pGEM-LFFTA 3, contenían el inserto.

El segundo PCR utilizó a los oligonucleótidos XhoTim y T7pro. Como se mencionó el oligonucleótido XhoTim hibrida con el extremo 3' de la cadena que va de 5' – 3'. T7pro no hibrida dentro del inserto, más bien lo hace con la cadena complementaria del vector pGEM-LFFTA en la región que se encuentra entre las bases 2 900 y 3 000 de acuerdo al mapa de secuencia de este. Esta región se encuentra por debajo del promotor de T7. Al contrario de la primer reacción (NdeITim – XhoTim) que únicamente sirvió para determinar presencia o ausencia del inserto, esta reacción arrojó información concerniente a la dirección en la que estaba insertada el fragmento de PCR dentro del vector. Como el inserto puede estar en dos diferentes direcciones con respecto al vector, el oligonucleótido XhoTim puede ubicarse en distintas posiciones al comenzar la reacción. Solo se puede generar un producto de PCR cuando XhoTim hibride con la

cadena complementaria, como se ve en el caso a en la figura 19a. Esto permite que se generen fragmentos de aproximadamente 900 pb.

Los plásmidos pGEM-LFFTA 2, 4, 5 y 6 mostraron un resultado positivo. Este fue confirmado por la presencia en gel de agarosa de un producto de aproximadamente 900 pb, el cual indicaba que el oligonucleótido XhoTim había hibridado con la cadena complementaria a la cadena con la que híbrido el oligonucleótido FWD-M13. La dirección opuesta de estos dos oligonucleótidos permitió que se diera la amplificación del fragmento proporcional a la distancia entre estos dos. Como el oligonucleótido XhoTim hibrida del lado del inserto en el que se encuentra el sitio de termino de la transcripción y en oligonucleótido T7pro hibrida del lado del vector en el que se encuentra el promotor de T7, se puede deducir que el inserto se encuentra en la misma dirección en la que corre la numeración de la secuencia del vector y el sitio de inicio de la transcripción del gen *tpi* LFFTA está corriente abajo del promotor de T7 como en el caso A (ver figura 19B).

Los plásmidos pGEM-LFFTA 1 y 3 dieron un resultado negativo, al no observarse ningún producto de PCR en el gel de agarosa. Este resultado se debió, al menos en el plásmido 1 a que a pesar de que ambos oligonucleótidos hibridaron cerca el uno del otro, lo hicieron con la misma cadena impidiendo que la reacción se volviera exponencial. Se puede inferir que el inserto se encuentra unido en dirección contraria a la del vector y que se encuentra corriente abajo del promotor *lac* como en el caso B (ver figura 19C).

Dado el resultado del primer PCR diagnóstico, se descartó al plásmido pGEM-LFFTA 3 por carecer de inserto. Mientras que el resultado del segundo PCR indicó que el único plásmido que presentaba las características del caso B era el plásmido pGEM-LFFTA 1. Por esta razón se seleccionaron a los plásmidos pGEM-LFFTA 1 y 2 para secuenciar y de esta manera cubrir las dos posibles situaciones.

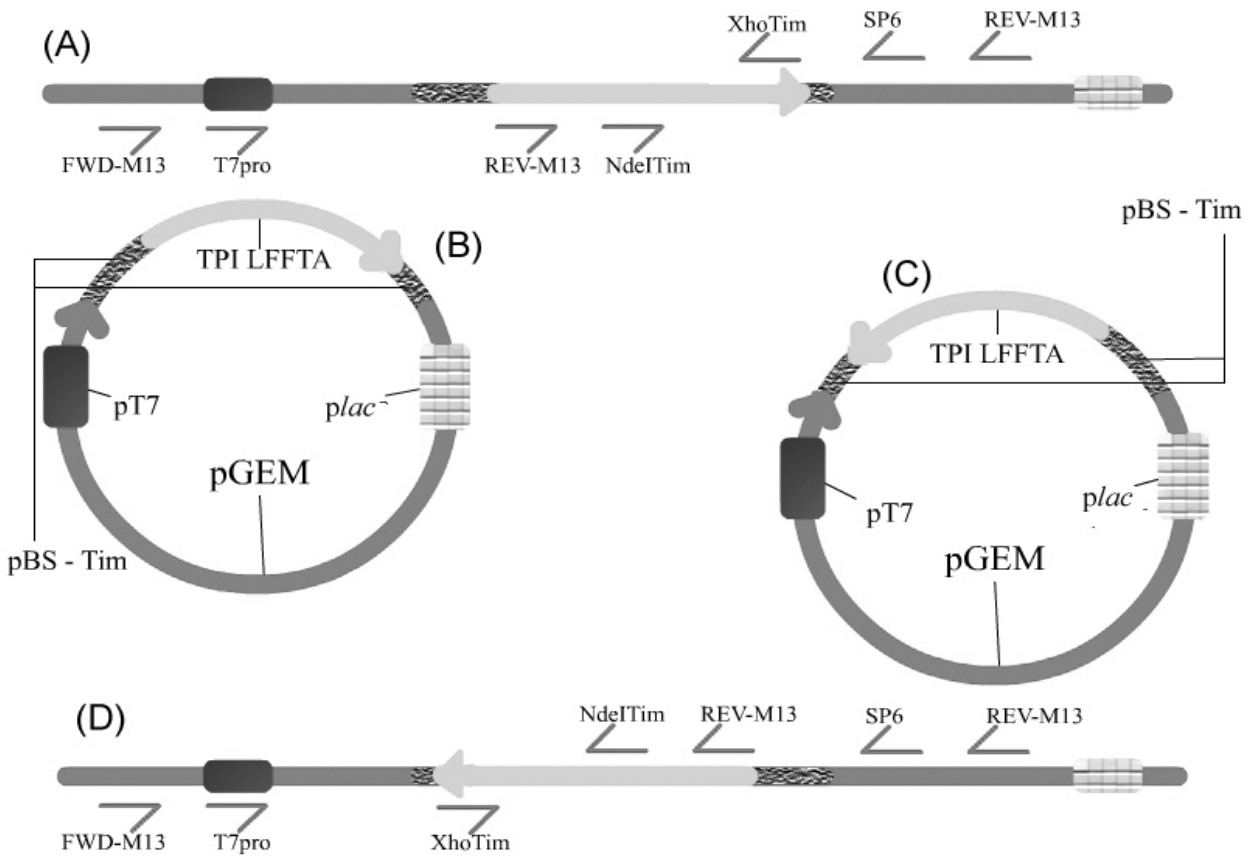


Figura 19. Las diferentes direcciones del inserto dentro del vector. El gen *tpi LFFTA* tenía la posibilidad de quedar ligado al vector en dos direcciones. (B) muestra el caso en el que sitio de inicio de transcripción queda corriente abajo del promotor T7. (C) muestra el caso en el que sitio de inicio de transcripción queda corriente abajo del promotor *lac*. (A) y (D) muestran los sitios en los que hibridan cada uno de los oligonucleótidos dependiendo de cada caso.

Tabla 5. Resultados de las pruebas de PCR para la confirmación de la presencia y orientación del inserto.

No. de plásmido	Resultado de la reacción (NdeI/XhoTim)	Resultado de la reacción (FWD-M13/XhoTim)	Tipo de caso
1	Positivo Producto de PCR de 800 pb	Negativo Sin producto de PCR	B
2	Positivo Producto de PCR de 800 pb	Positivo Producto de PCR de 900 pb	A
3	Negativo Sin producto de PCR	Negativo Sin producto de PCR	Ninguno
4	Positivo Producto de PCR de 800 pb	Positivo Producto de PCR de 900 pb	A
5	Positivo Producto de PCR de 800 pb	Positivo Producto de PCR de 900 pb	A
6	Positivo Producto de PCR de 800 pb	Positivo Producto de PCR de 900 pb	A

6.3.5. Secuenciación.

Se mandaron a secuenciar los plásmidos pGEM-LFFTA 1 y pGEM-LFFTA 2 con el fin de confirmar que ambos tuviesen el gen de la mutante de TPI y que su secuencia careciera de mutaciones ajenas a las que se introdujeron durante la construcción u otras modificaciones como inserciones o deleciones que modificaran el marco de lectura (Lewin, 2000).

Se escogieron los oligonucleótidos SP6 y T7 pro (figura 20) ya que hibridizan en regiones flanqueantes al gen. Sus características se resumen en la tabla 2.

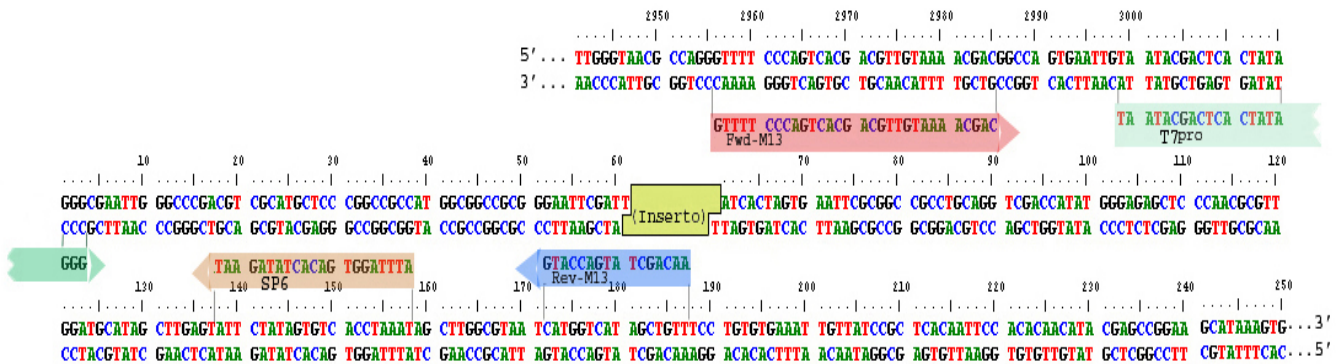


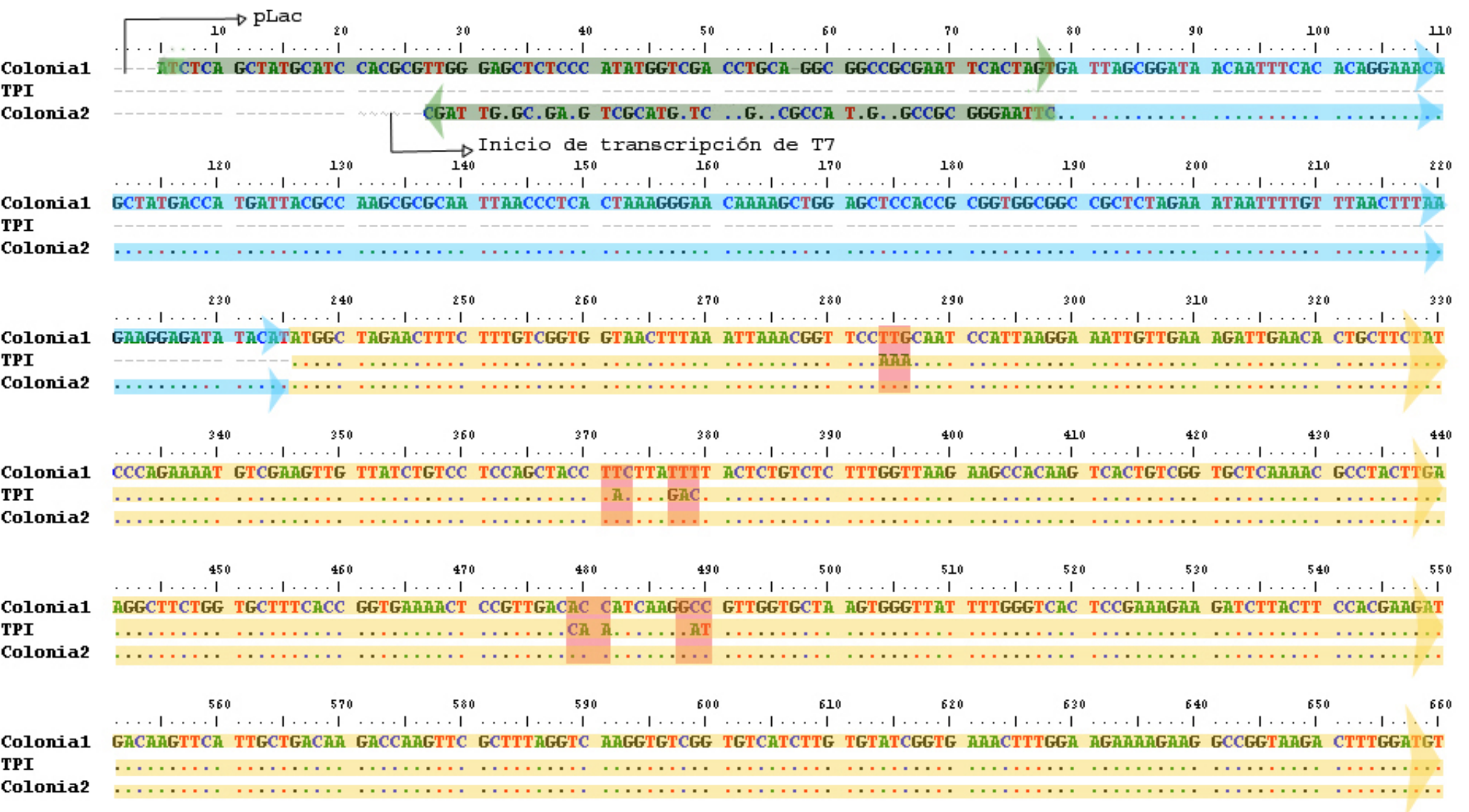
Figura 20. Esquema en el que se muestran las regiones del vector donde hibridan los oligonucleótidos contemplados para la secuenciación. Se puede observar que los oligonucleótidos SP6 y T7 hibridan más cerca del inserto que los oligonucleótidos FWD-M13 y REV-M13.

El oligonucleótido T7 hibrida con la cadena complementaria corriente arriba del sitio de clonación, mientras que el oligonucleótido SP6 hibrida corriente abajo del mismo (figura 20). De esta manera se logró secuenciar la cadena 5' – 3' con el oligonucleótido T7 y su reversa complementaria con el oligonucleótido SP6. Una vez teniendo las secuencias, se hizo un alineamiento (figura 21) con el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/boedit.html>) que incluyó la reversa complementaria de la secuencia que se obtuvo con SP6, la secuencia obtenida con T7 y la secuencia del gen silvestre.

Se confirmó que ambos plásmidos contenían el gen *tpi* *LFFTA*. Además se vio que en ambos casos el gen se encontraba sin mutaciones ajenas a las que se contemplaban en el diseño. En total las mutaciones que se introdujeron en el gen *tpi* de acuerdo a este análisis son: en el codón 17, se cambió el triplete AAA que codifica para lisina por UUG que codifica leucina. En el codón 46 se cambió el triplete UAC que codifica para tirosina por el triplete UUC que codifica fenilalanina. En el codón 48 se cambió el triplete GAC que codifica ácido aspártico por el triplete UUU que

codifica fenilalanina. En el codón 85 se cambió el triplete CAA que codifica glutamina por el triplete ACC que codifica treonina. En el último codón que se modificó, se cambió el triplete GAU que codifica para ácido aspártico por GCC que codifica para alanina.

Se confirmó la presencia de algunas partes del vector pBC flanqueando el gen, las cuales fueron copiadas a partir de los vectores que sirvieron de templado durante las reacciones de PCR de la construcción. A los extremos de la secuencia del inserto se encuentra el vector pGEM.



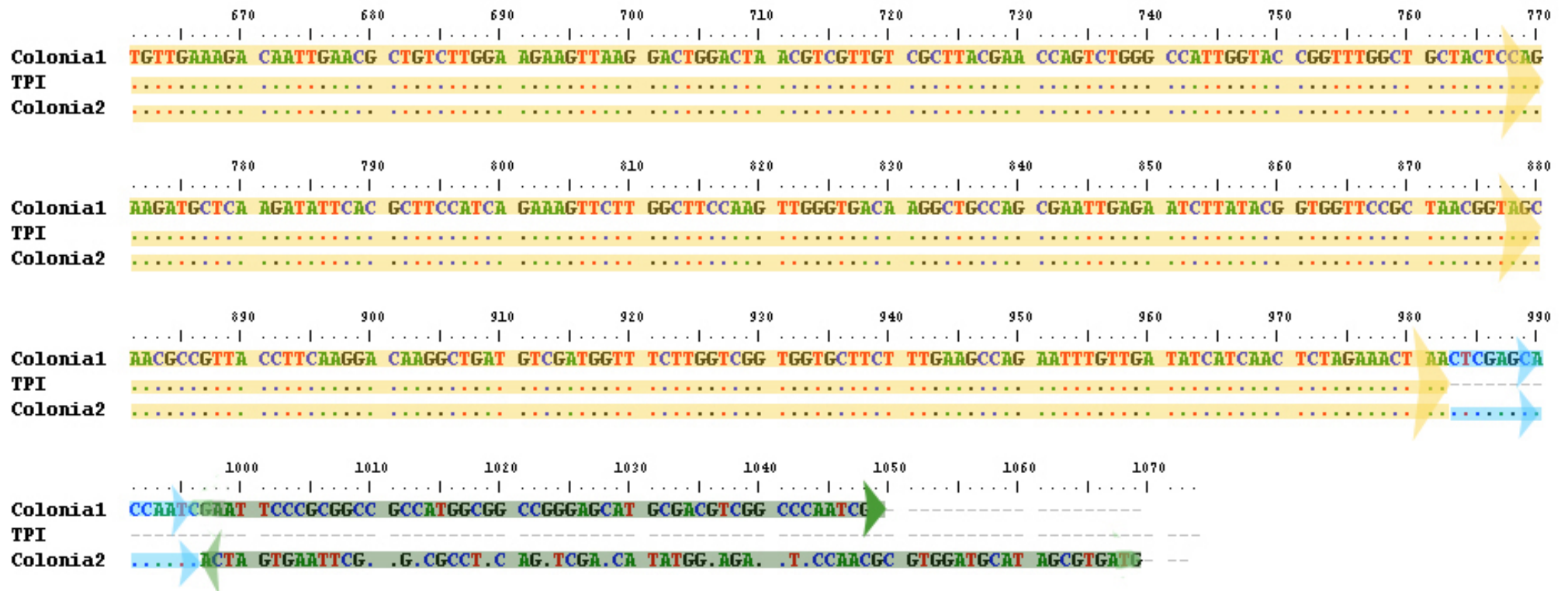


Figura 21. Alineamiento entre las secuencias de los genes *tpi LFFTA* y el gen *tpi* silvestre. Esta figura muestra como los vectores pGEM (verde) de los plásmidos 1B y 2A poseen un inserto orientado en direcciones distintas, pero que en ambos casos interrumpe el gen *lacZ*. El gen *tpi LFFTA* se encuentra bajo el control de *plac* en el plásmido 1 y bajo pT7 en el plásmido 2. Se puede observar que el inserto está formado por dos partes, el gen *tpi LFFTA* (amarillo) y las partes que lo rodean que corresponden al vector pBC (azul) donde estaba clonado el gen *tpi* silvestre. El gen *tpi LFFTA* sólo presenta las mutaciones contempladas en su diseño (codones marcados en cuadros rojos).

6.4. Ensayos de expresión y solubilidad

Se decidió conservar y expresar el gen *tpi* *LFFTA* en el vector pGEM-T. Formalmente el pGEM es un vector de clonación, pero aun cuando tal vez no sea el mejor vector de expresión, puede ser utilizado como tal. El pGEM presenta dos promotores, el *plac* y el pT7 (Promega, Technical Manual No. 042). En el plásmido 1B el gen *tpi* *LFFTA* se encuentra bajo el control de *plac*. Esto significa que el gen puede ser inducido de la misma forma en la que normalmente se induce *lacZ*; esto es, agregando IPTG (Lewin, 2000). En el plásmido 2a, el gen se encuentra bajo el control de pT7, este es un promotor específico para la RNA polimerasa de T7 por lo que no puede unir a la RNA polimerasa de *E. coli* (Ikeda y Richardson, 1986).

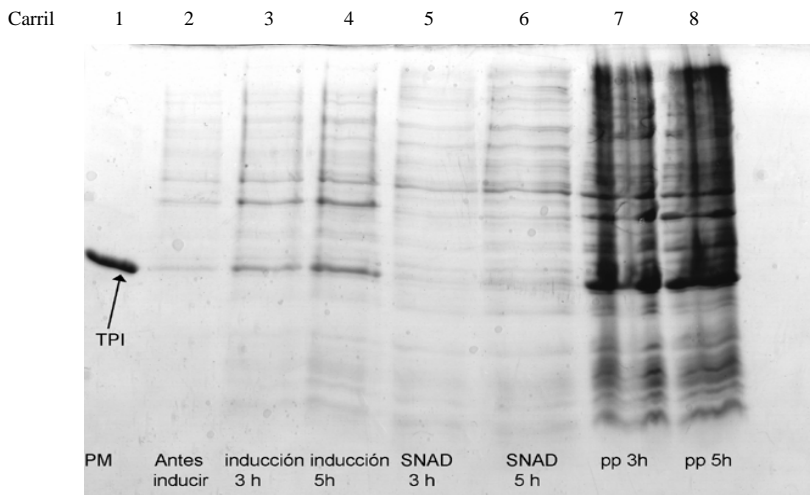
Se probaron distintos sistemas bacterianos para determinar cual lograba expresar mejor la proteína. Tomando ventaja de la característica de las cepas BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pLys de tener en su genoma un gen que transcribe la RNA polimerasa de T7, se decidió utilizar estas cepas en combinación con el plásmido 2A. En estas cepas, el gen de la RNA polimerasa de T7 se encuentra bajo el control del *plac*, por lo que solo se necesita IPTG para inducirla (Stratagene, 2006). Una vez expresada, la RNA polimerasa se une al pT7 y empieza a transcribir el gen *tpi*. Mientras que el plásmido 1B se decidió probar en la cepa, la VR101. En este caso el gen *tpi* se encuentra bajo el control de *plac*, por lo que al inducir con IPTG este promotor se libera del represor, permitiendo que se una la RNA polimerasa de *E. coli* y empiece a transcribir el gen (Peimbert, com. pers.). Las tres cepas de *E. coli*, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLys y VR101 fueron transformadas con éxito y crecieron favorablemente en las cajas de LB con ampicilina.

En los ensayos VR101 mostró altos niveles de expresión de TPI tanto a las 3 h como a las 5 h. BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pLys también presentaron buenos niveles de expresión a las 3 h y 5 h, por lo que se concluyó que todas las cepas eran inducidas con éxito utilizando IPTG a una

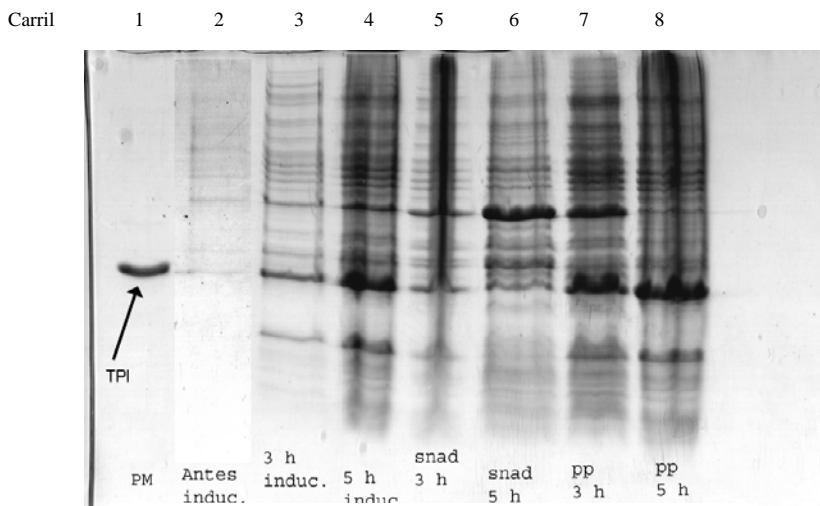
concentración de 0.2 mM.

A pesar de esto, los ensayos de solubilidad demostraron que durante la primera centrifugación después de romper las células con el sonicador gran parte de la población de enzima expresada quedó atrapada en la parte insoluble en las cepas VR101 y BL21 (DE3). En el centrifugado de la cepa BL21 (DE3) pLys también pasó algo similar, ya que una gran parte de la población de enzima producida por la expresión quedó atrapada en la parte insoluble. Sin embargo, una parte de enzima permaneció en la fracción soluble. Ver figura 23.

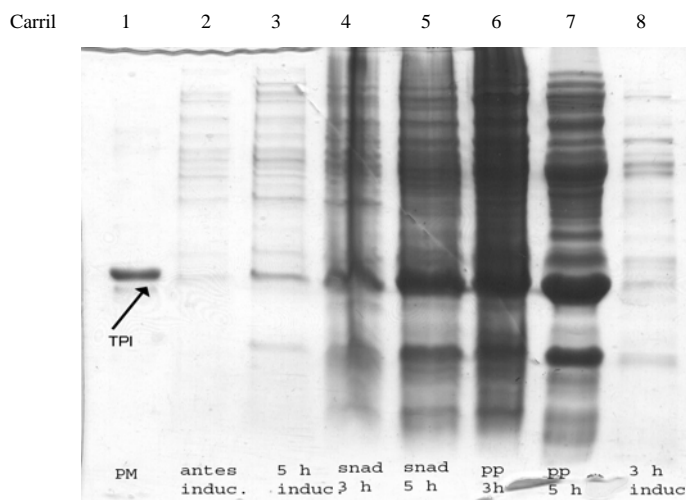
Se llegó a la conclusión de que las células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) pLys transformadas con el plásmido 1B eran el sistema más adecuado para expresar la mutante TPI LFFTA. A pesar de que BL21 (DE3) pLys no es la cepa que presenta los mejores niveles de expresión de esta proteína, es la única en la que una parte significativa de la población de proteína permanece en la fracción soluble después de sonicar y centrifugar.



(a) Expresión y solubilidad en VR101



(b) Expresión y solubilidad en BL21(DE3)



(c) Expresión y solubilidad en BL21 (DE3) pLys

Figura 23. Niveles de expresión y solubilidad de la TPI LFFTA. Se pueden observar los niveles de expresión de la enzima antes de inducir, 3 h después de la inducción y 5 h después de la inducción. También se muestran las fracciones solubles e insolubles de la centrifugación del extracto celular. (a) Cepa VR101. La enzima queda en la fracción insoluble. (b) Cepa BL21 (DE3). La enzima queda en la fracción insoluble. (c) Cepa BL21 (DE3) pLys. Parte de la enzima queda en la fracción soluble.

6.5. Purificación

Se realizaron varias purificaciones para obtener a la mutante TPI LFFTA. En todas se utilizaron variaciones del protocolo que se utiliza para purificar la enzima silvestre (Vázquez, 2000). A continuación se menciona de forma general el procedimiento que se siguió en la purificación de la TPI LFFTA.

La mutante se expresó a partir de cultivos de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) pLys transformadas con el plásmido 1B. Se usó medio LB con ampicilina para que este antibiótico funcionara como una presión de selección a la que sólo pudieran dividirse las células que contuvieran el plásmido. En este plásmido el gen a expresar se encuentra bajo el control del promotor *plac*; así que para inducir la expresión del gen se agregó una concentración final de 0.2 mM de IPTG, manteniendo una temperatura constante de 37 °C dentro de un agitador orbital a 200 rpm. El IPTG al ser un análogo de la lactosa, liberó al *plac* del represor, permitiendo que la RNA polimerasa de *E. coli* se le uniera e iniciara la transcripción del gen.

Después de inducir la expresión de la proteína en los cultivos, se procedió a concentrar las células por centrifugación. Se resuspendieron las células en *amortiguador de lisis* y se usó un sonicador para romper su membrana. Durante la lisis de las células se mantuvo la temperatura a 4°C. El *amortiguador de lisis* contenía Fluoruro de fenil metano sulfonilo (PMSF) previamente disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). El PMSF es un potente inhibidor de proteasas que se agregó para evitar la degradación de TPI LFFTA. El extracto celular se centrifugó para precipitar principalmente membranas celulares y las proteínas integrales de membrana. El sobrenadante se centrifugó a 45 000 rpm, con el fin de desechar cualquier remanente de las moléculas ya mencionadas.

El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 70 %, este compuesto es una sal que sirve para fraccionar el extracto celular. En este proceso se concentró la muestra y se separó la mutante

de algunas proteínas con diferente solubilidad; lo que ayuda en parte a la purificación.

Se dializaron las muestras para eliminar el sulfato de amonio y se sometieron a cromatografía de exclusión molecular y de intercambio aniónico. Conforme los diferentes componentes de la muestra fueron saliendo de la columna, se registraron con ayuda de un detector de uv a 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas) para trazar un cromatograma en 2D con los niveles de absorbancia en cada fracción.

Las fracciones también se analizaron mediante SDS-PAGE, ya que un criterio que sirve para determinar el grado de pureza de las proteínas, es el número de bandas que se observan en el gel de poliacrilamida. Si en este sólo se presenta una banda y ésta corresponde a la proteína de interés, se puede decir que esa proteína se ha purificado exitosamente. También se realizaron ensayos de actividad para ubicar las fracciones con proteína que presentaran mayor actividad catalítica (Lehninger, 2000; Voet, 2004). Es importante mencionar que en la primera purificación, el ensayo de actividad se realizó únicamente en las fracciones que se obtuvieron de la segunda columna cromatográfica, mientras que en las siguientes purificaciones se llevó a cabo en cada uno de los pasos de la purificación.

A continuación se mencionan las características y los resultados obtenidos para cada una de las purificaciones de manera más específica.

6.5.1. *Primera Purificación.*

Esta purificación se realizó en el lapso de una semana. Se expresó favorablemente la proteína TPI LFFTA en cultivos de 3 L de *E. Coli* BL21 (DE3) pLys con una inducción de 4 h con 0.2 mM de IPTG. Durante la lisis y la centrifugación gran parte de la proteína permaneció en la fase soluble, por lo que se procedió a precipitar la muestra en un rango de 20-90 % de saturación con sulfato de

amonio. Una vez precipitada la muestra se dializó en *amortiguador* pH 7.6 (TED 10/1/1) y se pasó por la Sefacryl S-300 utilizando el mismo amortiguador.

El cromatograma presentó dos grandes picos de absorción en U.V., el primero de los 29 a los 74 mL y el segundo de los 85 a los 110 mL (figura 24). El gel de poliacrilamida reveló que la proteína se hallaba en las fracciones 40, 41, 42, 43, y 44, al final del primer pico en el volumen de los 60 a los 67.5 mL. La proteína quedó distribuida en un volumen de 7 mL.

El gel de acrilamida de las fracciones que se obtuvieron de la columna Sefacryl, mostró otras bandas además de la de TPI (Vázquez, 2000).

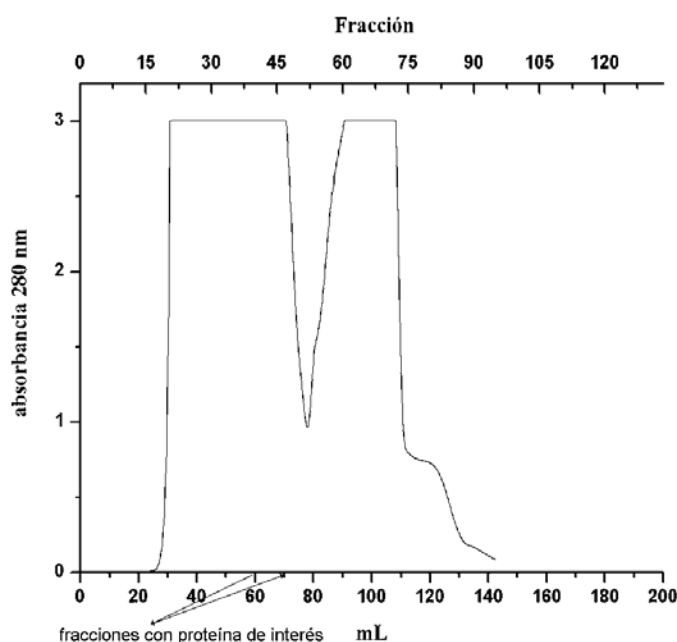


Figura 24. Cromatograma de la primera columna (Sefacryl) de la primera purificación. La corrida fue de 200 mL a un flujo de 0.2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 1.5 mL.

La segunda columna que se utilizó en esta purificación fue una columna MonoQ. Esta columna es de intercambio aniónico. El gradiente lineal de NaCl fue de 0–100 mM desde los 10 mL hasta los 120 mL y de 100 mM–1 M desde los 120 mL hasta los 140 mL.

El cromatograma mostró un gran pico entre los 130 y los 140 mL y otros dos picos de menor tamaño, uno entre los 70 y los 80 mL y el otro entre los 100 y los 105 mL (figura 25). Se colectaron 2 mL por tubo, por lo que las fracciones analizadas por SDS-PAGE fueron 36, 37, 51, 61, 63, 65, 67, 69 y 71, dejando al marcador de peso molecular en el último carril. La proteína apareció principalmente en el séptimo carril correspondiente a la fracción 67, aunque el octavo carril también presentó algo de proteína (figura 26). La concentración salina aproximada a la que eluyó la proteína fue de 730 a 910 mM de NaCl.

El cromatograma indica que la proteína se unió eficientemente a la columna y que posteriormente pudo eluirse con el gradiente de sal. El gel de acrilamida muestra una proteína que no está completamente pura.

No es factible estudiar muestras de proteínas con este grado de impureza, por lo que se decidió hacer un tercer paso de purificación utilizando nuevamente una columna de intercambio iónico MonoQ a un pH diferente.

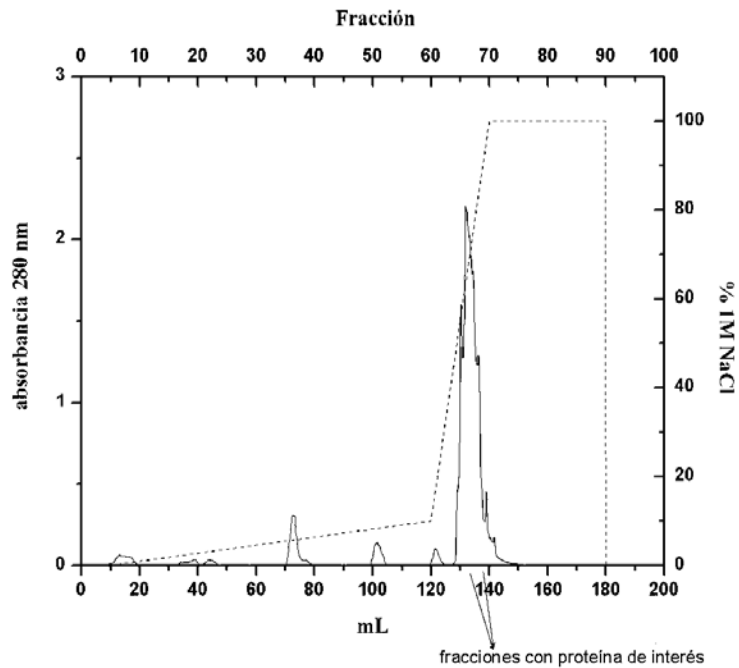


Figura 25. Cromatograma de la segunda columna (MonoQ 7.6) de la primera purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 220 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 2 mL.

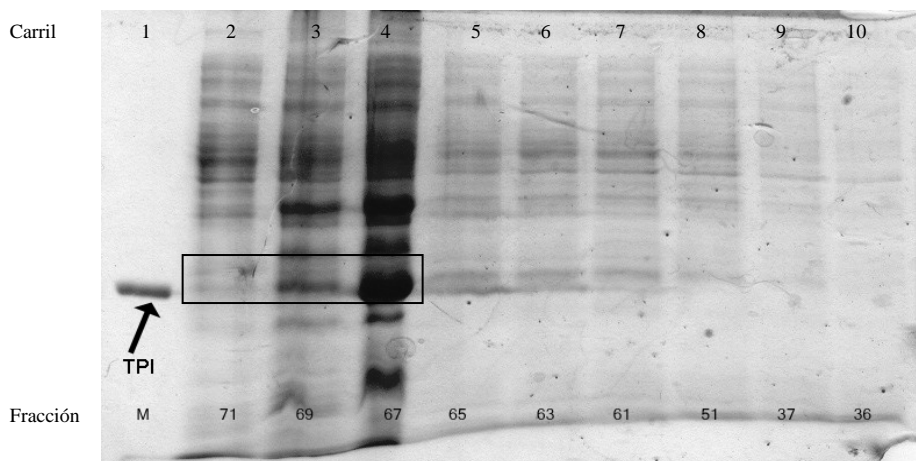


Figura 26. Fracciones con proteína de la segunda columna (MonoQ 7.6) de la primera purificación. Se corrieron las fracciones que mostraron mayor absorbancia. La proteína se observa principalmente en los carriles 2, 3 y 4.

Por las razones que se mencionaron, se corrió la columna MonoQ con un amortiguador pH 7.2 (TED 10/1/1). El gradiente lineal de elución con NaCl fue de 0 mM – 100 mM desde los 10 mL hasta los 50 mL, y de 100 mM – 1 M desde los 50 mL hasta los 160 mL. La pendiente de este gradiente fue menos pronunciada comparada con la pendiente de la primera MonoQ.

El cromatograma de la segunda columna MonoQ mostró la mayor absorbancia de los 60 mL a los 110 mL (figura 27). En el gel de poliacrilamida se analizaron las muestras 50 y 33 en los primeros dos carriles, en el tercer carril se puso el marcador y en el los siguientes, las fracciones 40, 41, 42, 43, 45, 46 y 48 en ese orden. La enzima se encontró en las fracciones comprendidas dentro del rango 39 – 51 que corresponden de los 78 hasta los 102 mL (figura 28). La concentración de sal a la que eluyó la proteína fue de 330 – 520 mM de NaCl.

La purificación se planeó pensando en que la disminución del pH del amortiguador causaría que la enzima se uniera con menos fuerza a la columna. Así durante el incremento del gradiente salino, la TPI eluiría al principio, separándola de aquellas proteínas que se unieran con mayor afinidad y que se despegarían de la columna hasta que se alcanzara una concentración elevada de sal. También se usó un gradiente menos pronunciado que el del paso anterior (Pharmacia Fine Chemicals AB, 1983; Yamamoto y col., 1988). La proteína que salió de esta columna no presentó actividad catalítica. En ninguna de las fracciones que se analizaron apareció la enzima completamente pura, puesto que aparecieron muchas otras bandas de proteínas, pero presentó un mayor grado de pureza que las muestras de la primera MonoQ. La enzima se encontró dispersa en varias fracciones. Mientras que en la columna anterior teníamos toda nuestra proteína en un volumen total de 4 mL, en esta columna la proteína quedó mucho más diluida en un volumen total de 24 mL.

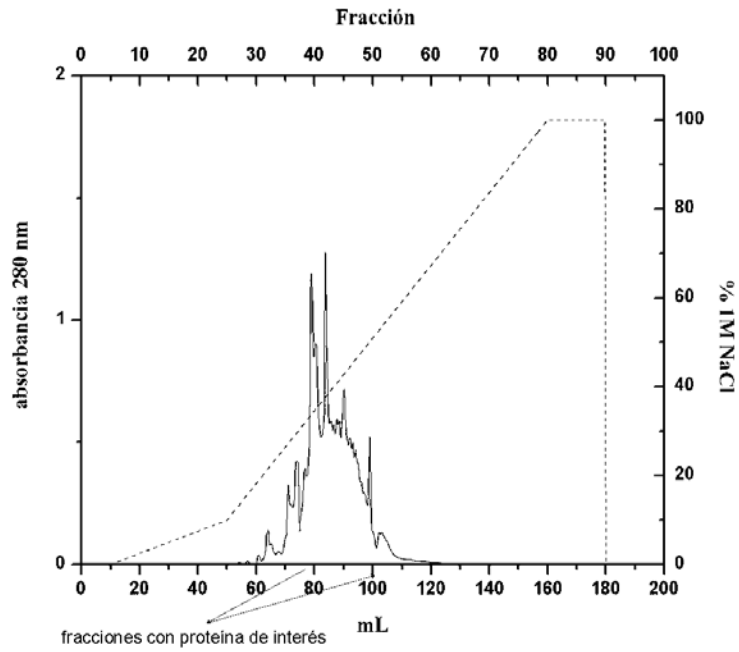


Figura 27. Cromatograma de la tercera columna (MonoQ 7.2) de la primera purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 220 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 2 mL.

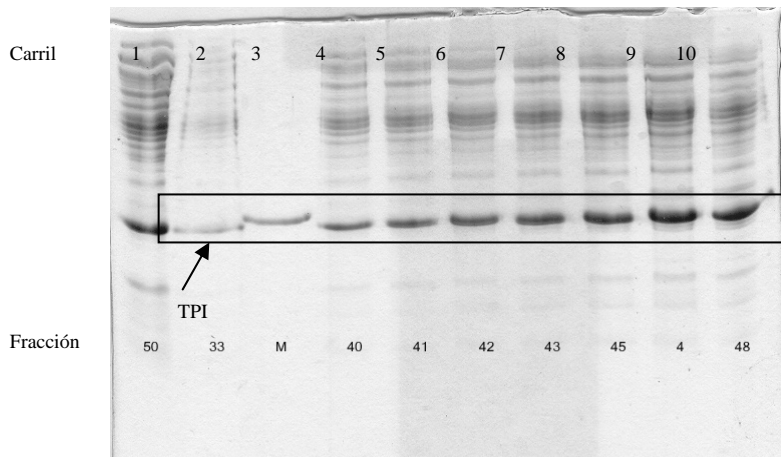


Figura 28. Fracciones con proteína de la tercera columna (MonoQ 7.2) de la primera purificación. Se corrieron las fracciones que mostraron mayor absorbancia. La proteína está distribuida entre todos los pozos del gel.

Las fracciones que presentaron más proteína (45, 46, 47 y 48), fueron analizadas y presentaron una cantidad de proteína total de 11.2 mg, una actividad total de $2.7 \times 10^3 \mu\text{mol min}^{-1}$ y una actividad específica de $2.4 \times 10^2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Lo que significa que la enzima se inactivó en algún momento durante la purificación.

6.5.2. Segunda Purificación.

Los resultados de la primera purificación indicaron que la enzima era inactiva. Probablemente la enzima se inactivo durante la purificación debido a que era inestable. Para caracterizar la actividad de le enzima, se decidió cambiar un poco la estrategia de purificación.

La purificación se llevo a cabo en tres días. La TPI LFFTA se expresó favorablemente en cultivos de 3 L de *E. Coli* BL21 (DE3) pLys con una inducción de 4 h con 0.2 mM de IPTG. Durante la lisis y la centrifugación gran parte de la proteína permaneció en la fase soluble. Se precipitó la muestra al 70 % de saturación con sulfato de amonio. Una vez precipitada la muestra se dializó en *amortiguador* pH 7.6 (TED 10/1/1) y se pasó por la Sefacryl 300 utilizando el mismo amortiguador.

El cromatograma de la columna Sefacryl 300 presentó absorbancia desde los 138 mL hasta los 145 mL. Esta región se estaba dividida en tres picos, el primero abarcó de los 38 mL a los 48 mL, el segundo de los 58 mL a los 77 mL y el tercero de los 96 a los 135 mL (figura 29). Las fracciones que se corrieron en electroforesis fueron las 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 y 51. En el primer carril se colocó el marcador y en el último una mezcla de todas estas fracciones. La proteína se ubicó dentro del rango de fracciones 44 – 50 que corresponden de los 66 mL a los 75 mL. La proteína apareció con otras bandas (figura 30), sólo se esperaba una purificación parcial al tratarse de la primera columna.

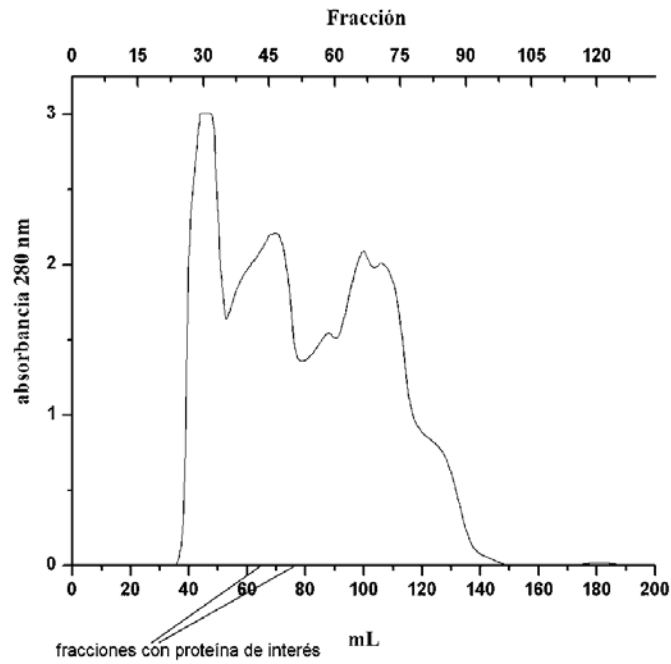


Figura 29. Cromatograma de la primera columna (Sefacryl) de la segunda purificación. La corrida fue de 200 mL a un flujo de 0.2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 1.5 mL.

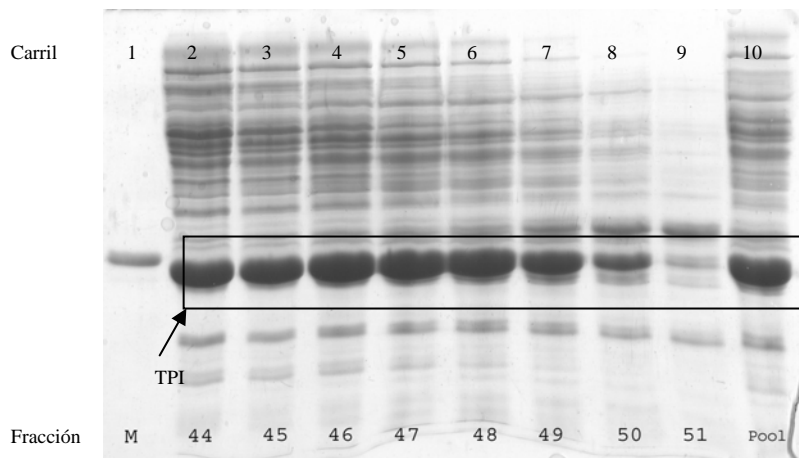


Figura 30. Fracciones con proteína de la primera columna (Sefacryl) de la segunda purificación. Se corrieron las fracciones que mostraron mayor absorbancia. La proteína se encuentra del carril 2 al 8. El último carril es un pool o mezcla de estas 7 fracciones.

La segunda columna en esta purificación fue la MonoQ. Se utilizó un *amortiguador* pH 7.2 (TED 10/1/1) para pasar la muestra por la columna. El gradiente lineal de sal fue de 0 mM–100 mM desde los 10 mL hasta los 50 mL, y de 100 mM–1 M desde los 50 mL hasta lo 160 mL.

El cromatograma de la primera MonoQ de esta segunda purificación mostró absorción a los 280 nm desde los 45 mL hasta los 95 mL, con tres picos principales en 45 mL – 50 mL, 55 mL – 60 mL y 70 mL – 90 mL respectivamente (figura 31). En la electroforesis se encontró que las fracciones 37 – 42 que abarcan de los 74 mL a los 84 mL presentaron la proteína (figura 32). Aunque aparecen las bandas de otras proteínas, la enzima de interés quedó parcialmente purificada. La concentración a la cual eluyó la proteína fue de 300 – 380 mM de NaCl.

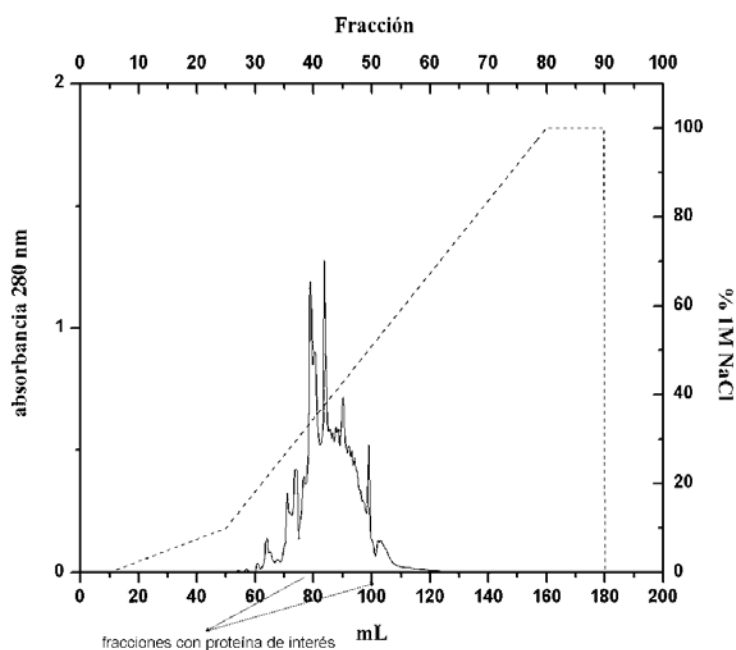


Figura 31. Cromatograma de la segunda columna (MonoQ 7.2) de la segunda purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 220 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 2 mL.

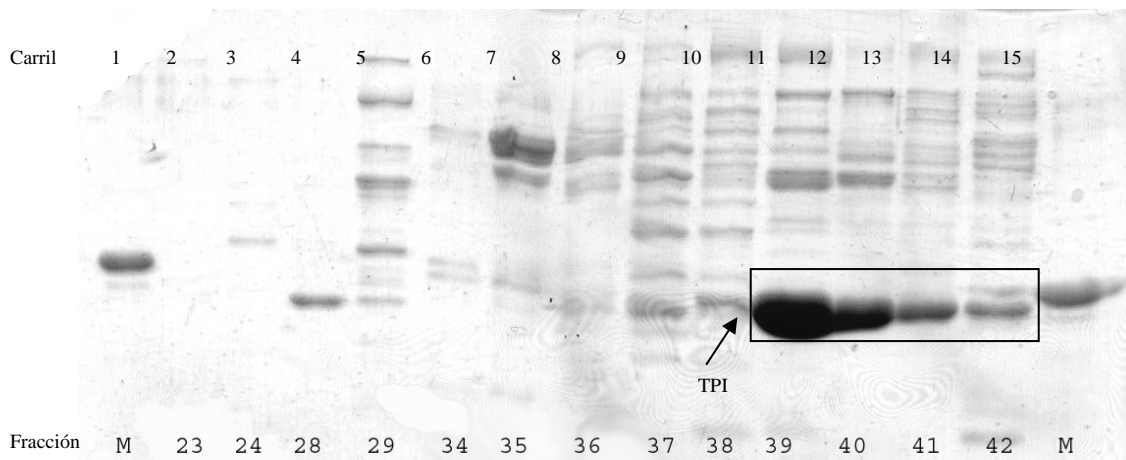


Figura 32. Fracciones con proteína de la segunda columna (MonoQ 7.2) de la segunda purificación. Se corrieron las fracciones que mostraron mayor absorbancia. La proteína se encuentra entre las fracciones 39 y 42. En los extremos, los carriles 1 y 15 muestran marcador de pesos moleculares.

En esta ocasión se construyó una tabla de purificación (tabla 6). Se analizaron los pasos de la purificación en los que se tenía la fracción soluble, las fracciones con proteína que se obtuvieron de la primera columna (Salida Sefacryl) y de la segunda columna (Salida MQ 7.2). Para cada uno de estos pasos se midió y calculó el volumen (mL), la concentración (mg mL^{-1}), la actividad ($\mu\text{mol min}^{-1}$) y la actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

Se puede ver que se partió de un volumen de 45 mL y al final se obtuvieron 12 mL. Esto es normal tomando en cuenta que se parte de una gran cantidad de biomasa, que incluye membranas y muchas otras proteínas y al final solo se quiere obtener una proteína libre de estos elementos. La cantidad de proteína total también disminuye de 319.5 mg a 37 mg. Esto también es característico de una purificación, ya que en un principio se tiene una mezcla que no solo incluye a la proteína de interés sino también a muchas otras. Al contrario del volumen y la cantidad de proteína, se espera que la actividad vaya en aumento, ya que cada vez se concentra más a la TPI, además de que entre cada proceso de purificación se eliminan proteínas que no tienen esta actividad catalítica. Al final se espera que toda la actividad presente corresponda exclusivamente a la TPI. Los valores de

actividad específica representan de cierta forma esta relación, indicando cuanta actividad hay por cada mg de proteína (Lehninger, 2000). Se puede observar en la tabla 6 que los valores de actividad y actividad específica decaen significativamente para las fracciones que salieron de la segunda columna (MonoQ).

Los datos de la Tabla 6 indican que gran parte de la actividad catalítica de la TPI LFFTA se perdió después de pasar a través de la segunda columna. El gradiente y el pH que se utilizaron solo sirvieron para purificarla en aproximadamente un 70%. El tiempo en el que se llevó a cabo la purificación es muy corto, se plantearon dos posibles explicaciones. La primera implica que la enzima es muy inestable y pierde su actividad rápidamente y la segunda implica que aunque la enzima es inestable, alguna de las condiciones de purificación exagera la pérdida de su estabilidad y de su función.

Tabla 6. Tabla de Purificación de la mutante de la Triosafosfato Isomerasa LFFTA 2nda Purificación

Paso	Concentración mg mL ⁻¹	Volumen mL	Proteína total mg	Actividad total μmol min ⁻¹	Actividad específica μmol min ⁻¹ mg ⁻¹
Soluble	7.1	45	319	1.3 x 10 ⁶	4.0 x 10 ³
Salida Sefacryl	15.3	9	137	5.5 x 10 ⁶	4.0 x 10 ⁴
Salida MQ 7.2	3.1	12	37	6.3 x 10 ⁴	1.7 x 10 ³

6.5.3. Tercera Purificación.

La tercera purificación se llevó a cabo durante 24 horas ininterrumpidas para minimizar la pérdida de actividad de la enzima. Se trabajó con un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLys de 1 L; se indujo 4 h con 0.2 mM de IPTG.

Durante la lisis y la centrifugación gran parte de la proteína permaneció en la fase soluble. Se precipitó la muestra al 70 % de saturación con sulfato de amonio. La muestra se dializó contra un *amortiguador* con mayor fuerza iónica y a pH 7.6 (TED 100/10/1).

Se decidió utilizar directamente a la MonoQ. Esta decisión se tomó con la intención de agilizar el proceso de purificación, al saltarnos el paso de la enzima por la columna de exclusión molecular. Para evitar saturar la columna se tuvo que manejar un volumen menor. Se utilizó un *amortiguador* pH 7.6 (TED 100/10/1) para pasar la muestra por la columna y un *amortiguador* con sal pH 7.6 (TED 100/10/1, con 1 M NaCl) para crear el gradiente de elución. El gradiente fue de 0 mM–100 mM a partir de los 30 mL hasta los 60 mL y de 100 mM–1 M desde los 60 mL hasta los 100 mL.

Se obtuvieron tres picos de absorción en el cromatograma, el primero de los 5 a los 10 mL, el segundo de los 70 a los 80 mL y el tercero de los 85 a los 100 mL (figura 33). El análisis en gel de poliacrilamida mostró que únicamente las fracciones 4-5 que corresponden al primer pico de los 8 mL a los 10 mL tenían la proteína (figura 34). La proteína salió mucho antes de que empezara el gradiente de elución, a pesar de ello se purificó considerablemente.

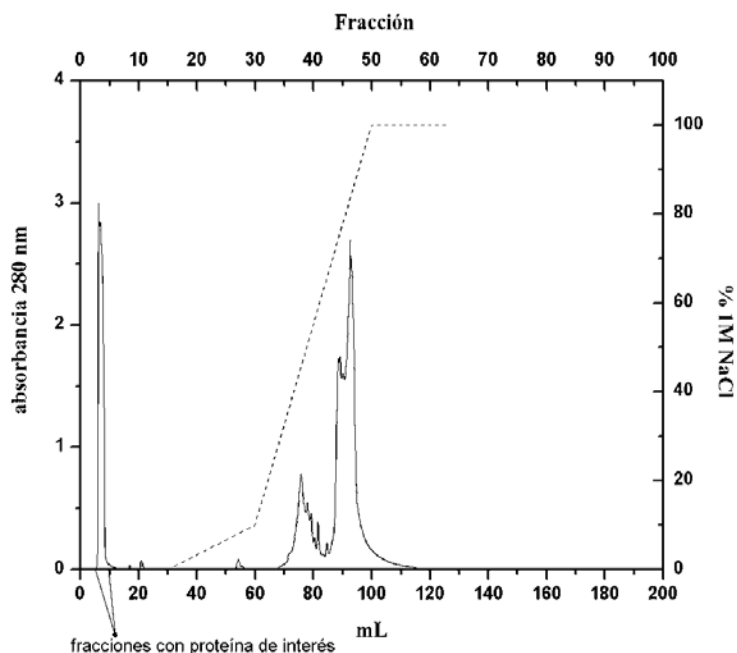


Figura 33. Cromatograma de la primera columna (MonoQ 7.6) de la tercera purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 220 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 2 mL.

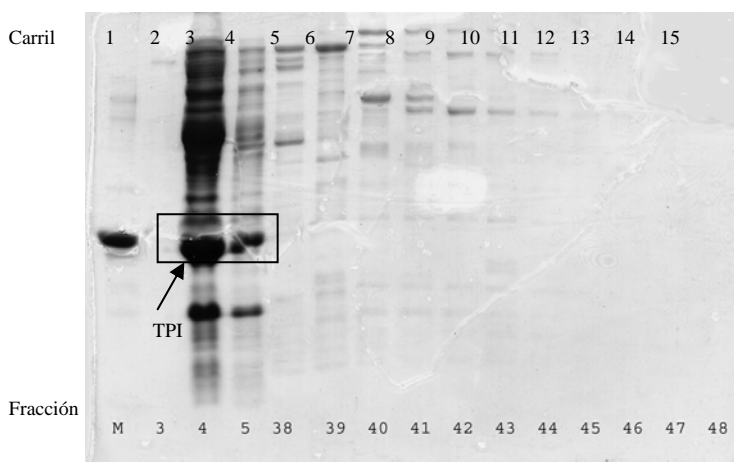


Figura 34. Fracciones con proteína de la primera columna (MonoQ 7.6) de la tercera purificación. Se corrieron las fracciones que mostraron mayor absorbancia. La proteína se encuentra principalmente en las fracciones 4 y 5.

Las fracciones que se obtuvieron en la primera columna se juntaron y se dializaron en el *amortiguador* a pH 7.2 (TED 100/10/1) y luego se volvieron a inyectar a la columna MonoQ. Esta vez la corrida se llevo a cabo con *amortiguador* pH 7.2 (TED 100/10/1). Se usó el amortiguador con sal pH 7.2 (TED 100/10/1 con 1 M NaCl) para crear el gradiente de elución. El gradiente fue de 0 mM–300 mM desde los 30 mL hasta los 60 mL y se cambió a un gradiente de 300 mM–1 M desde los 60 mL hasta los 90 mL.

Esta segunda MonoQ mostró un cromatograma de absorción en uv a 280 nm con tres picos delgados. El primer pico de los 5 a los 10 mL, el segundo de los 15 a los 16 mL y el tercer pico de los 29 a los 30 mL. La proteína apareció en las fracciones 15 y 16; que corresponden a los 15 y 16 mL. La proteína se eluyó con 30 – 40 mM de NaCl.

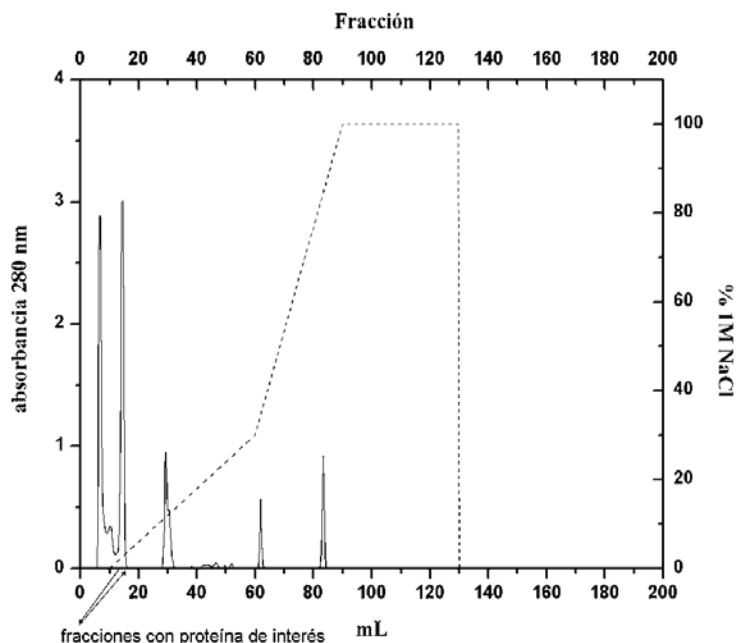


Figura 35. Cromatograma de la segunda columna (MonoQ 7.2) de la tercera purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 170 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , el tamaño de las fracciones fue de 1 mL.

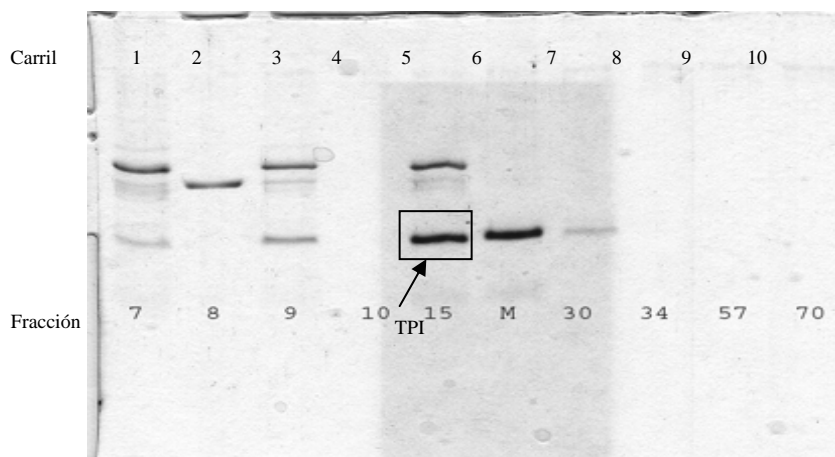


Figura 36. Fracciones con proteína de la segunda columna (MonoQ 7.2) de la tercera purificación. La proteína se encuentra en el quinto carril.

También se realizó una tabla de purificación (tabla 7). Se analizaron los pasos de la purificación en los que se tenía la fracción soluble (soluble), la muestra precipitada con sulfato de amonio y dializada (pp/diálisis), la muestra que se inyectó a la primera MonoQ (Entrada MQ1 7.6), las fracciones que salieron de la primera MonoQ (Salida MQ1 7.6), las fracciones que se inyectaron a la segunda MonoQ (Entrada MQ2 7.2) y las fracciones que salieron de la segunda MonoQ (Salida MQ2 7.2). Para cada uno de estos pasos se midió y calculó el volumen (mL), la concentración (mg mL^{-1}), la actividad ($\mu\text{mol min}^{-1}$) y la actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

Los datos se muestran en la Tabla 7. Se puede ver que se partió de un volumen inicial de 12 mL y se terminó con uno de 1 mL. La cantidad de proteína total fue de 1344 mg mL^{-1} al inicio y de 3.8 mg mL^{-1} al final. De nueva cuenta se observa como el volumen y la cantidad de proteína total tiende a disminuir como en el caso anterior.

En el caso de la actividad específica vemos que esta va en aumento, desde la fracción soluble ($4.9 \times 10^3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) hasta las fracciones que salieron después de la primera MonoQ.

Después de dializar y filtrar estas fracciones vemos una pequeña disminución en su actividad específica ($3.7 \times 10^4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Esto indica que la muestra que se metió a la segunda columna ya había perdido algo de actividad, causada probablemente por la dilución de la enzima durante el proceso de diálisis. Posteriormente se observó que la actividad disminuyó abruptamente para las fracciones que salieron de la segunda columna, perdiendo como el 90 % de su actividad específica ($2.3 \times 10^3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

La realización de esta purificación fue mucho más rápida que la de la purificación anterior. El uso de gradientes de elución con pendientes ligeramente pronunciadas también puede contribuir a la dilución de la proteína y por lo tanto a la pérdida de su actividad. Resulta interesante notar que la enzima queda casi por completo inactiva durante su paso por la segunda columna. Este fenómeno coincide con las purificaciones anteriores en los pasos en los que se utilizó algún amortiguador a pH 7.2. Por lo que existe la posibilidad de que la enzima se vuelva todavía más inestable a este pH.

Tabla 7. Tabla de Purificación de la mutante de la Triosafosfato Isomerasa LFFTA 3era Purificación

Paso	Concentración mg mL ⁻¹	Volumen mL	Proteína total mg	Actividad total μmol min ⁻¹	Actividad específica μmol min ⁻¹ mg ⁻¹
Soluble	112	12	1344	6.6 x 10 ⁶	4.8 x 10 ³
pp/diálisis	127	4.5	571.5	7.0 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁴
Entrada MQ1 7.6	127	2	254	3.1 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁴
Salida MQ1 7.6	14.2	4	56.9	3.2 x 10 ⁶	5.5 x 10 ⁴
Entrada MQ1 7.2	18.4	1.3	23.9	8.8 x 10 ⁵	3.7 x 10 ⁴
Salida MQ2 7.2	3.8	1	3.8	8.7 x 10 ³	2.3 x 10 ³

6.5.4. Cuarta Purificación.

Durante la lisis y la centrifugación gran parte de la proteína permaneció en la fase soluble. Se precipitó la muestra al 70 % de saturación con sulfato de amonio. La muestra se dializó en *amortiguador* pH 7.6 (TED 100/10/1).

Como ayuda para el diseño de este protocolo, se implementaron algunas pruebas de estabilidad a distintos pH para ver si efectivamente la enzima tenía alguna predisposición a perder actividad cuando se mantiene a ciertos valores de pH. Después de resuspender la pastilla del precipitado de sulfato de amonio al 70%, se incubó la muestra en *amortiguador* TED 100/10/1 a distintos pH (7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 8.0 y 8.5) a 25°C y una concentración de 6.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada una de las alícuotas se realizaron ensayos de actividad a las 4 y a las 8 h con 130 ng de proteína.

En ambas mediciones, se obtuvieron lecturas similares para todos los pH, lo que indica que a esta concentración, la enzima permanece estable y el pH no afecta su comportamiento. No se descarta, sin embargo, la posibilidad de que a concentraciones más elevadas de proteína pueda ocurrir la agregación de la enzima por los cambios de pH. Por esta razón, durante el uso de las columnas de cromatografía se evitaron cambios bruscos en el pH. El gradiente de elución se determinó en base a los resultados obtenidos anteriormente.

En la cromatografía de exclusión molecular la proteína salió en las mismas fracciones que en las ocasiones anteriores. En el gel se observa la TPI presente de la fracción 42 a la 47 (figura 37). Se seleccionaron a las fracciones 43, 44, 45 y 46 por presentar los valores más altos de concentración de proteína y de actividad específica.

La primera columna MonoQ se utilizó con un *amortiguador* pH 7.4 (TED 100/10/1) y un *amortiguador* con sal pH 7.4 (TED 100/10/1, con 1 M NaCl) para crear el gradiente de elución. El gradiente fue de 0 M–1 M a partir de los 20 mL hasta los 100 mL.

El cromatograma mostró la mayor absorción de los 40 a los 60 mL, correspondientes a las fracciones 40-50 (figura 38). En el gel de poliacrilamida se analizó de la fracción 42 a la 50. Las fracciones 42, 43, 44, 45 y 46 presentaron la TPI (figura 39). La proteína eluyó cuando la concentración de sal era de aproximadamente 700 mM.

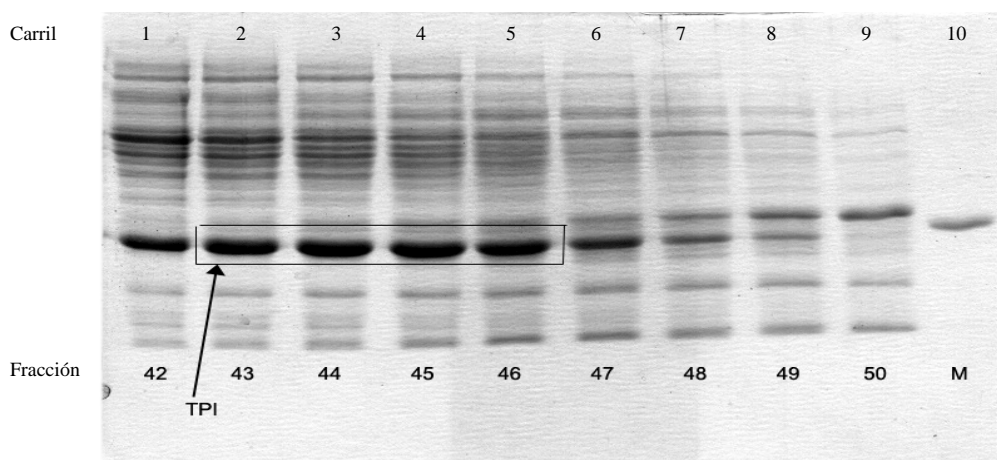


Figura 37. Fracciones con proteína de la primera columna (Sefacryl) de la cuarta purificación. El gel se observan las muestras que

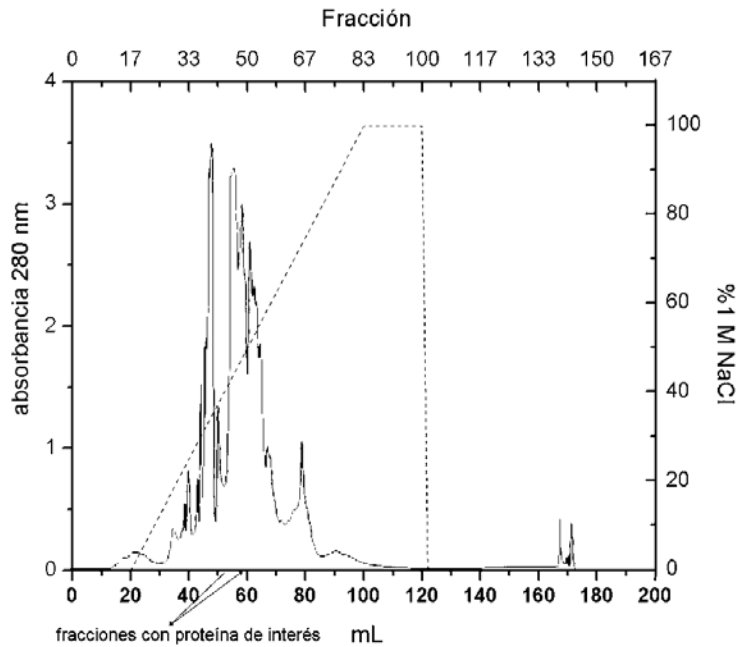


Figura 38. Cromatograma de la segunda columna (MonoQ 7.4) de la cuarta purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 220 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , las fracciones fueron de 1 mL cada una.

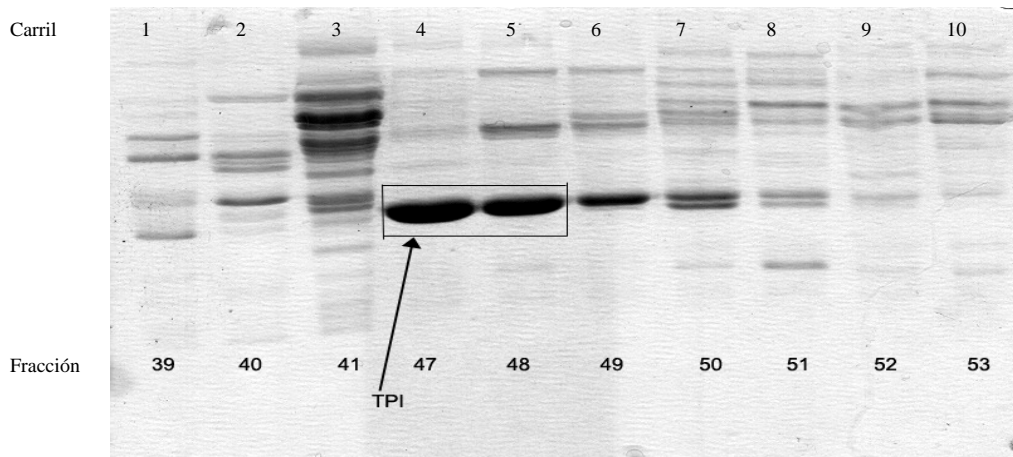


Figura 39. Fracciones con proteína de la segunda columna (MonoQ 7.4) de la cuarta purificación. Las bandas correspondientes a la TPI aparecen de la fracción 47 a la 50, si embargo solo las fracciones 47 y 48 se inyectaron a la siguiente MonoQ.

La segunda columna MonoQ se utilizó con un *amortiguador* pH 7.7 (TED 100/10/1) y un amortiguador con sal pH 7.7 (TED 100/10/1, con 1 M NaCl) para crear el gradiente de elución. El gradiente fue de 0 M–1 M a partir de los 20 mL hasta los 100 mL.

La mayor absorción se presentó de los 55 a los 60 mL, correspondientes a las fracciones 48 y 49 (figura 40). Se analizaron las fracciones 46, 47, 48, 49, 50 y 51. La TPI apareció principalmente en las fracciones 48 y 49 (figura 41). Por lo que eluyó a una concentración de sal de aproximadamente 720 mM. Sólo la fracción 48 presentó la proteína pura. Se dializó una vez más en amortiguador pH 7.7 (TED 100/10/1) para eliminar la sal de la corrida. Finalmente, la enzima pura quedó a una concentración de 2 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

De acuerdo a los datos que se recolectaron (Tabla 4), se empezó con un volumen de 42 mL y se terminó trabajando con 1 mL. La cantidad de proteína total disminuyó de 10 920 mg a 2.2 mg. La actividad específica iba en aumento hasta el momento en el que la muestra salió de la columna de Sefacryl, ya que justo antes de que se metiera la muestra a la primera MonoQ, se registró una disminución en este valor. Pasando de $2.7 \times 10^4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ a $8.2 \times 10^3 \mu\text{mol min}^{-1}$. Aparentemente, desde que la muestra salió de la Sefacryl y durante su paso a través de la MonoQ 7.4, la actividad de la enzima disminuyó por razones inespecíficas. Cualesquiera que hayan sido las causas, se descartaron un vez que la enzima salió de la MonoQ 7.4 ya que se volvió a registrar un incremento de la actividad específica cuando se inyectó la muestra a la MonoQ 7.7. Pasando de $2.6 \times 10^3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ a $5.5 \times 10^3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Este valor se mantuvo constante durante el paso a través de esta última columna. No se pudo identificar con certeza a los factores responsables de la inactivación de la enzima, de cualquier manera, se puede sospechar de condiciones como la concentración o la temperatura, pero sería necesario llevar a cabo más experimentos para ratificarlo.

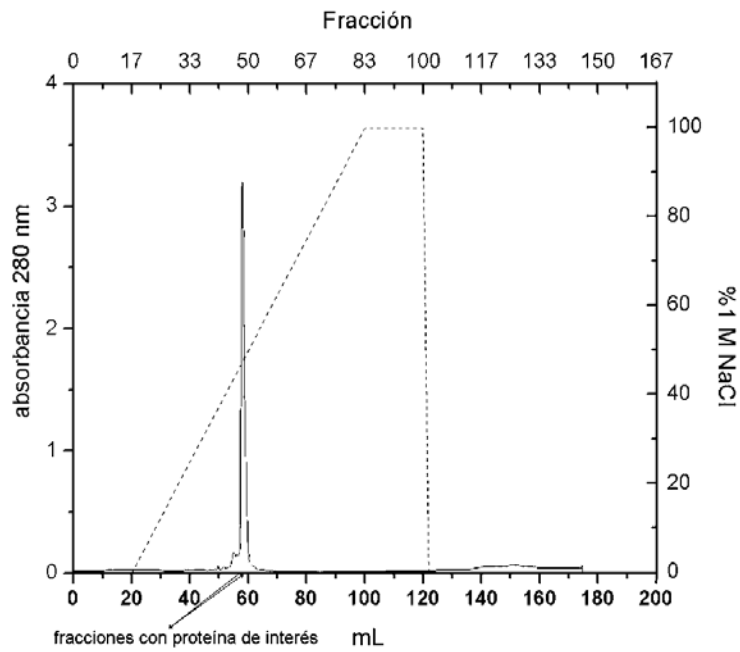


Figura 40. Cromatograma de la tercera columna (MonoQ 7.7) de la cuarta purificación. La línea continua representa la absorbancia y la línea punteada es el gradiente salino. La corrida fue de 220 mL a un flujo de 2 mL min^{-1} , las fracciones fueron de 1 mL cada una.

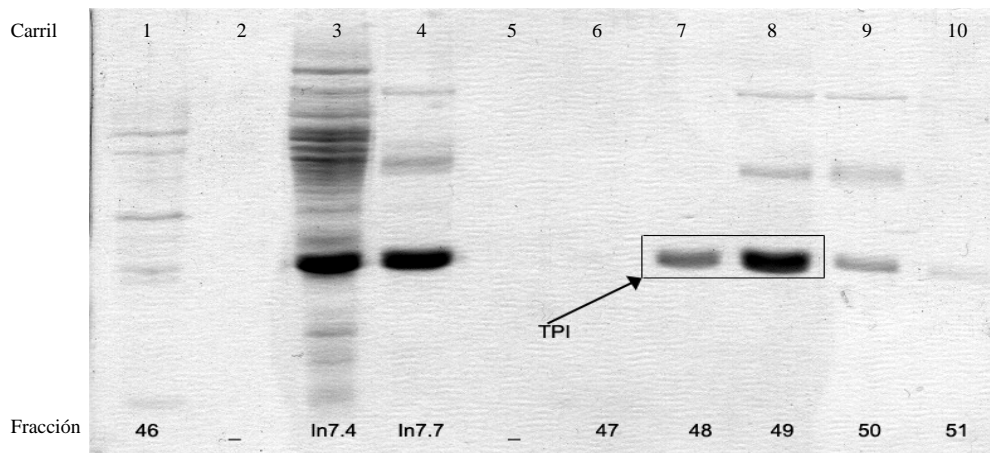


Figura 41. Fracciones con proteína de la tercera columna (MonoQ 7.7) de la cuarta purificación. La TPI está presente en las fracciones 48 y 49 principalmente, pero solo la fracción 48 presenta la TPI a homogeneidad.

Tabla 8. Tabla de Purificación de la mutante de la Triosafosfato Isomerasa LFFTA 4ta Purificación

Paso	Concentración mg mL ⁻¹	Volumen mL	Proteína total mg	Actividad total μmol min ⁻¹	Actividad específica μmol min ⁻¹ mg ⁻¹
Soluble	260	42	10920	1.3 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁴
Entrada Sefacryl	240	4	1040	2.2 x 10 ⁷	2.1 x 10 ⁴
Salida Sefacryl	8.6	6	51.6	1.4 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁴
Entrada mQ 7.4	10.3	5	41.2	3.4 x 10 ⁵	8.3 x 10 ³
Salida mQ 7.4	5.7	4	23	6.0 x 10 ⁴	2.6 x 10 ³
Entrada mQ 7.7	3	1	3	1.6 x 10 ⁴	5.5 x 10 ³
Salida mQ 7.7	2.2	1	2.2	1.2 x 10 ⁴	5.4 x 10 ³

6.6. Caracterización de LFFTA

6.6.1. Radio hidrodinámico.

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular analítica para calcular el radio hidrodinámico o radio de Stokes (R_s) de la mutante TPI LFFTA. Se obtuvo un volumen de elución de 10.393 mL, con lo que se calculó un R_s de 36.5 Å (figura 42). Este valor es ligeramente mayor que los radios hidrodinámicos de la ScTPI en estado nativo y de su intermediario monomérico, ambos de aproximadamente 30 Å, pero menor que el R_s de la ScTPI en estado desplegado que es de 45 Å (Nájera, 2003). Podemos inferir que la mutante tiene un radio mayor que la TPI silvestre y que probablemente presenta una estructura terciaria similar pero parcialmente desnaturalizada.

Existe la posibilidad de que el empacamiento interno de los residuos que se introdujeron en la interfase de la mutante haya causado un reacomodo en el resto de los aminoácidos. De tal forma que el reacomodo de los residuos vecinos a los residuos mutados tuviera un impacto en aquellos que se encuentran en las lejanías de la interfase. Esto pudo exponer al solvente a algunos de los residuos que se encontraban ocultos en la estructura de la enzima silvestre.

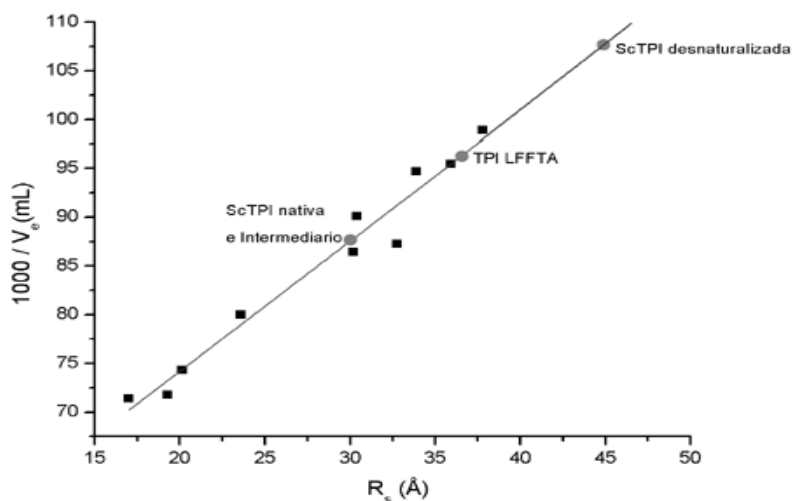


Figura 42. Radio de Stokes que muestran la TPI silvestre y la mutante LFFTA de acuerdo a la curva de calibración para cromatografía de exclusión por tamaño.

6.6.2. *Desnaturalización por calor seguida por dicroísmo circular.*

Se obtuvo un espectro de dicroísmo circular en el que se siguió la desnaturalización por calor de la TPI LFFTA, en el que se registró el cambio en la elipticidad a 220 nm con respecto al aumento en la temperatura. Bajo estas condiciones, se observa una transición (figura 43 A) en la la señal. Este cambio se debe a la desnaturalización de la proteína, ya que la proteína desplegada es un monómero que carece de la mayoría de las interacciones secundarias presentes en la estructura nativa, por lo que la proteína desplegada presenta características espectroscópicas diferentes y presenta una señal distinta a la nativa (Fasman, 1996). Se observó una T_m (la temperatura a la que el 50% de la población de enzima se encuentra desnaturalizada) de 75.6 °C, un valor más grande que el de la proteína silvestre que es de 59.5 °C (Benítez y col., 2001), por lo que la mutante mostró ser más estable. Al igual que para muchas otras TPIs, se encontró que el proceso de desnaturalización iba acompañado de la agregación de la proteína desnaturalizada (Álvarez y col., 1998; Chánez-Cárdenas y col., 2002). Se obtuvo un espectro de DC en el UV-lejano para la TPI LFFTA a 20 °C después de su desnaturalización por calor. Este espectro se comparó con el obtenido para la TPI LFFTA nativa (figura 43 B), encontrándose muchas diferencias espectroscópicas que claramente reflejan cambios irreversibles importantes en la estructura secundaria de la proteína.

Se estima que sólo un 4.57 % de la proteína desnaturalizada fue capaz de renaturalizarse una vez que se regresó a la temperatura inicial. Por lo que la desnaturalización no es reversible y no se puede definir un ciclo termodinámico para obtener parámetros como el ΔG_{pleg} y el ΔG_{asoc} .

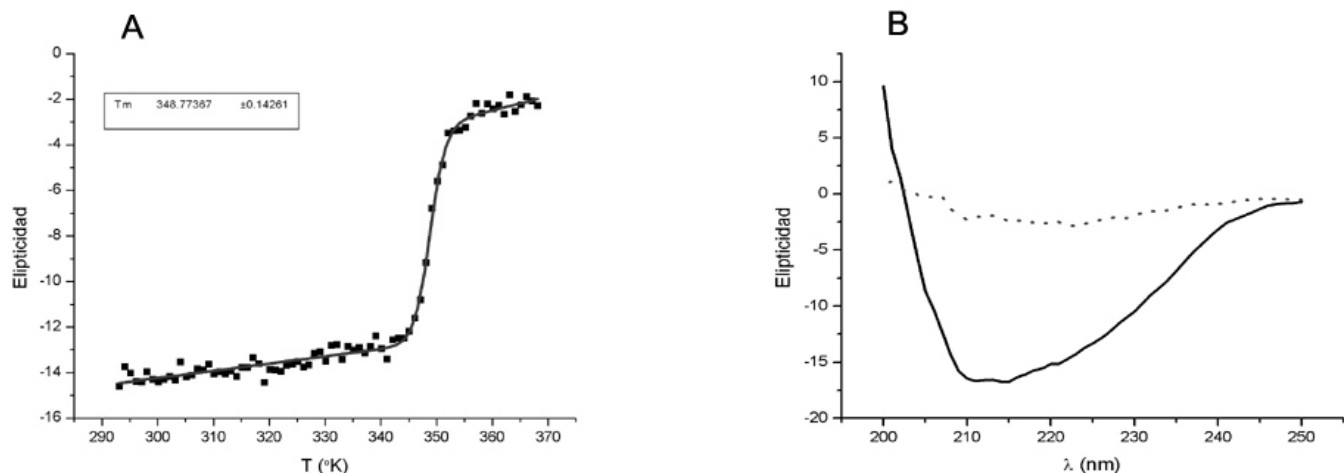


Figura 43. Espectros de dicroísmo circular. A) Desnaturalización por calor seguida a 220 nm. B) Espectros en el UV-lejano de la TPI LFFTA nativa (línea continua) y después de ser desnaturalizada (línea punteada).

6.6.3. Actividad catalítica.

La TPI LFFTA, al igual que la ScTPI, presenta una cinética de tipo Michaelis – Menten, ya que cuando se grafica la velocidad contra la concentración de sustrato, se observa una hipérbola (figura 44). Esto indica que la enzima alcanza su V_{max} conforme aumenta la concentración de sustrato (Voet, 2004).

La K_m de la TPI LFFTA para el G3P es de 3.7×10^{-4} M, mientras que la K_m correspondiente de la ScTPI es de 1.5×10^{-3} M (Vázquez, 2005). Como la K_m es una medida inversa de la afinidad de la enzima por el sustrato, al aumentar la K_m la afinidad disminuye (Stryer, 1995), este resultado indica que la TPI LFFTA presenta una afinidad mayor por el G3P. En cuanto a la k_{cat} o constante catalítica, descrita como la capacidad de la enzima para llevar a cabo la transformación del sustrato en producto (Stryer, 1995), la TPI LFFTA presenta una k_{cat} aparente de 3.87×10^2 s⁻¹, un valor que es tres órdenes de magnitud más pequeño que el de la ScTPI de 2.63×10^5 s⁻¹ (Vázquez, 2005). La V_{max} que presenta esta mutante es de 14.5 mmol de sustrato seg⁻¹ mg de proteína⁻¹. El cociente

$k_{\text{cat}} K_m^{-1}$ indica que la TPI LFFTA presenta una eficiencia catalítica de $1.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, un valor bajo en comparación con el de la ScTPI que es de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Nájera, 2003). Esto significa que la difusión del sustrato al sitio activo de la TPI LFFTA no es el paso limitante de su catálisis. Todos estos parámetros coinciden en que esta mutante es solo parcialmente activa.

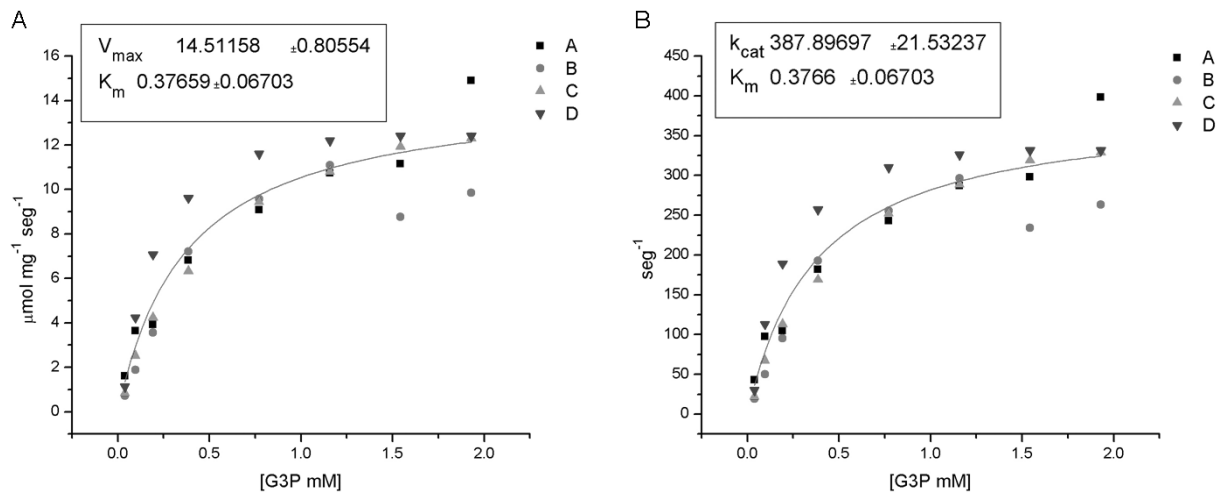


Figura 44. Cinética de TPI LFFTA. Las cuatro repeticiones que se utilizaron para obtener la cinética están representadas cada una por un número y su correspondiente figura geométrica. A) Concentración mM de G3P contra μmol de sustrato $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína $^{-1}$. B) Concentración mM de G3P contra min^{-1} .

7. CONCLUSIONES

Se logró construir con éxito el gen de la mutante TPI LFFTA, que de acuerdo a la secuencia obtenida, presenta únicamente las mutaciones consideradas dentro del diseño. Este gen se clonó en el vector de clonación PGEM easy-vector, se obtuvieron las condiciones para expresarlo dentro de este vector en las cepas de *E. coli*, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLys y VR101. La purificación se llevo a cabo utilizando la cepa BL21 pLys, debido a que sólo en estas condiciones la proteína estaba en la fracción soluble. Se obtuvo un protocolo de purificación, que consiste en utilizar una columna de exclusión molecular seguida por dos columnas de intercambio iónico MonoQ, una a pH 7.4 y otra a pH 7.7 respectivamente. Los gradientes de elución se pueden observar en las figuras 38 y 40.

La enzima tuvo una baja actividad con una K_m de 3.7×10^{-4} M y una k_{cat} de 3.87×10^2 s⁻¹. Presentó un radio hidrodinámico más grande que su contraparte silvestre, por lo que probablemente adoptó una estructura de dímero expandido. La desnaturalización por temperatura de esta mutante mostró ser irreversible y exhibió una transición monofásica que se ajusta a un modelo de dos estados. En contraste, este modelo carece de un intermediario monomérico estable, característico de modelos de tres estados como el reportado para la ScTPI silvestre. Con una concentración de 0.44 mg mL^{-1} , la TPI LFFTA exhibió una T_m mayor que la de la enzima silvestre ($75.6 \text{ °C} > 59.5 \text{ °C}$).

El diseño permitió obtener una mutante de TPI con una interfase hidrofóbica, una actividad baja y una T_m elevada. En esta mutante se nota claramente la importancia que tiene la interfase sobre la estructura, estabilidad y función de la TPI. Se puede ver que el empacamiento de la interfase puede impactar la geometría del sitio activo, pero aun más importante, el alto valor de su T_m prueba que existen varias regiones de la interfase en las que es posible optimizar el

empacamiento de esta y con ello aumentar la estabilidad del dímero.

La identificación de aquellos cambios en los que prevalezcan las interacciones favorables entre interfaces por encima de las desfavorables y el uso de programas computacionales como apoyo en la búsqueda eficiente de variantes apropiadas dentro del espacio de la secuencia, permitirán obtener mutantes que presenten T_m y actividades elevadas. Estos avances concederán muchas mejoras al conocimiento que se tiene de los principios evolutivos, estructurales y funcionales que rigen el plegamiento y la asociación de las proteínas oligoméricas.

8. REFERENCIAS

1. Albery, W. J. y Knowles, J. R. (1976). Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry*. **15**: 5631-41.
2. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Reintier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. y Maes, D. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem*, **273**: 2199-206.
3. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. **181**: 223-30
4. Åqvist, J. y Fothergills, M. (1996). Computer simulation of the triosephosphate isomerase catalyzed reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**: 10010-6.
5. Baldwin, R. L. (1989). How does protein folding get started?. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 291-4.
6. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. y Waley, S. G. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*. **255**: 609-14.
7. Benítez, C. G., Rojo, A. y Hernández, A. (2001). Temperature-induced denaturation of Triosephosphate Isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry*. **40**: 9049-58.
8. Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. y Knowles, J. R. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry*. **27**: 1158-67.
9. Bonneau, R., Strauss, C., Rohl, C., Chivian, D., Bradley, P., Malmström, L., Robertson, T. y Baker, D. (2002). De novo prediction of three – dimensional structures for major protein

families. *J. Mol. Biol.* **322**: 65 – 78.

10. Bonneau, R., Ruczinski, I., Tsai, J. y Baker, D. (2002). Contact order and ab initio structure prediction. *Protein Science.* **11**: 1937 –44.

11. Bonneau, R. y Baker, D. (2001). Ab initio protein structure prediction: progress and prospects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**: 173 – 89.

12. Bonneau, R., Tsai, J., Ruczinski, I., Chivian, D., Rohl, C., Strauss, C. E. y Baker, D. (2001). Rosetta in CASP4: progress in ab initio protein structure prediction. *Proteins.* **5**: 119-26.

13. Branden, C., y Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure.* Garland Publishing, Nueva York. 410 pp.

14. Cháñez-Cárdenas, M.E., Fernández-Velasco, D. A, Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G. y Pérez-Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**: 117-129.

15. Chivian, D., Kim, D. E., Malmström, L., Bradley, P., Robertson, T., Murphy, P., Strauss, C. E. M., Bonneau, R., Rohl, C. A. y Baker, D. (2003). Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server. *PROTEINS:Structure, Function and Genetics.* **53**: 524-33.

16. Cline, J., Braman, J. C. Y Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research.* **24**: 3546-51.

17. Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and molecular proteins.* 2a ed. W. H. Freeman and Co. Nueva York.. p 455-539.

18. Dagget, V., y Ferhst, R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding?. *TRENDS in Biochemical Sciences.* **28**: 18-25.

19. D'Alessio, G. (1999). The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins: tools, the enviroment, the hypotheses. *Progress in biophysics & molecular biology.* **72**: 271-98.

20. Davison, T. S., Yin, P., Nie, E., Kay, C., Arrowsmith, C. H. (1998). Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene*. **17**: 651-6.
21. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A. y Hol, W. G. J. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**: 2594-604.
22. Derreumax, P. y Schlick, T. (1998). The loop opening/closing motion of the enzyme Triosephosphate Isomerase. *Biophysical Journal*. **74**: 72-81.
23. Eftink, M. R. (1997). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biochemistry (Moscow) On-Line*.
24. Espinosa, J. F. (2002). Analysis of the factors that stabilize a designed two-stranded antiparallel β -sheet. *Protein Science*. **11**: 1492-505.
25. Espinoza-Fonseca, L. M. y Trujillo-Ferrara, J. G. Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-tripanosomal drug design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **14**: 3151-4.
26. Fasman, G. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press. Nueva York y Londres.
27. Ferhst, A.R. y Dagget, V. (2002). Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell*. **108**: 573-82.
28. Gerstein, M. y Echols, N. (2004). Exploring the range of protein flexibility, from a structural proteomics perspective. *Current Opinion in Chemical Biology*. **8**: 14-9.
29. Ghélis, C y Yon, J. (1982). Protein folding. Academic Press, New York..

30. Gopal, B., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Balaram, H., Murthy, M. R. N. y Balaram, P. (1999). Cavity-creating mutation at the dimer interface of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: Restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry*. **38**: 478-86.
31. Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Mendoza, G., Gómez-Puyou, A. y Pérez-Montfort, R. (2002). Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent nonomeric enzyme. *Biochemistry*. **41**: 4230-8.
32. Holland, J. H. (2004). El orden oculto-de cómo la adaptación crea la complejidad. FCE, México, D.F. p 183.
33. Honig, B. 1999. Protein Folding: From the Levinthal Paradox to structure prediction. *JMB*. **293**: 283-93
34. Ikeda, R. A. Y Richardson, C. C. (1986). Interactions of the RNA polymerase of bacteriophage T7 with its promoter during binding and initiation of transcription. *PNAS*. **83**: 3614-8.
35. Jaenicke, R. (1999). Stability and folding in the cell. En: Protein folding. (Creighton, T. E. ed.) W. H. Freeman and Co. Nueva York. p 445-539.
36. Kauffman, S. A. (2000). Investigations. OxfordUniversity Press, Nueva York. Pag. 1-48.
37. Kim, D. E., Chivian, D. y Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using Robetta server. *Nucleic Acids Research*. **32**: 526-31.
38. Kim, P. S. y Baldwin, R. L. (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 459-89.
39. Kim, P. S. y Baldwin, R. L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 631-60.

40. Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*. **350**: 121-4.
41. Kohn, J. E., Millett, I. S., Jacob, J., Zagrovic, B., Dillon, T. M., Cingel, N., Dothager, R. S., Seifert, S., Thiagarajan, P., Sosnick, T. R., Hasan, M. Z., Pande, V. S., Ruczinski, I., Doniach, S. y Plaxco, K. W. (2004). Random-coil behavior and the dimensions of chemically unfolded proteins. *PNAS*. **101**: 12491-6.
42. Kuhlman, B. y Baker, D. (2000). Native protein sequences are close to optimal for their structures. *PNAS*. **19**: 10383-8.
43. Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A., Wierenga, R. K. (2002). The importance of the conserved Arg191-Asp227 salt bridge of triosephosphate isomerase for folding, stability, and catalysis. *FEBS Letters*. **518**: 39-42.
44. Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A., Antonov, D. M., Augustyns, K. y Wierenga, R. K. (2001). Structural determinants for ligand binding and catalysis of triosephosphate isomerasa. *Eur. J. Biochem*. **268**: 5189-96.
45. Lambeir, A., Opperdoes, F. R. y Wierenga, R. K. (1987). Kinetic properties of triosephosphate isomerasa from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem*. **168**: 69-74.
46. Lehninger, Nelson, D. y Cox, M. (2000). *Principles of Biochemistry*. Third edition. Worth Publishers. Nueva York. p 115-153.
47. Lewin, B. (2000). *Genes VII*. Oxford University Press. Nueva York. p 347-408.
48. Lindorff-Larsen, K., Rogen, P., Paci, E., Vendruscolo, M. y Dobson, C. M. (2005). Protein folding and the organization of the protein topology universe. *TRENDS in Biochemical Sciences*. **30**: 13-8.
49. Livesay, D. R. y La, D. (2005). The evolutionary origins and catalytic importance of conserved electrostatic networks within TIM-barrel proteins. *Protein Science*. **14**: 1158-70.
50. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. y Petsko, G. A. (1990).

Structure of yeast triosephosphate isomerasa at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*. **29**: 6609-18.

51. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H. D., Backmann, J., Martial, J., Wyns, J. A., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerasa (TIM) from *Thermotoga maritime*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Struct. Func. Gen.* **37**: 441-53.

52. Maithal, K., Ravindra, G., Nagaraj, G., Singh, S. K., Balaram, H. y Balaram, P. (2002). Subunit interface mutation disrupting an aromatic cluster in *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerasa: effect on dimer stability. *Protein Engineering*. **15**: 575-84.

53. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. y Pérez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **283**: 193-203.

54. Mande, S. C., Mainfroid, V. P., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A. y Hol, W. G. J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerasa at 2.8 Å resolution. *Protein Sci.* **3**: 810-21.

55. Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., Tambourgi, D. V., Arni, R. K. (2005). Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of Sphingomyelinases D. *The journal of biological chemistry*. **280**: 13658-64.

56. Nagano, N., Orengo, C. A. y Thornton, J. M. (2002). One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on their Sequences, Structures and Functions. *JMB*. **321**: 741-65.

57. Nájera, H. (2003). Caracterización cinética y termodinámica del plegamiento y la asociación de la Triosafosfato Isomerasa. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

58. Nájera, H., Costas, M. y Fernández-Velasco, A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as rehasnos for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**: 785-92.
59. Noble, M. E. M., Zeellen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., goraj, K., Gohimont, A. C. y Martial, J. A. (1993). Structure of triosephosphate isomerasa from *E. Coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog. sect. D.* **49**: 403-17.
60. Nooren, I. M. A y Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein – protein interactions. *The EMBO Journal.* **22**: 3486-92.
61. Olivares-Quiroz, L. y García-Colín, L. (2004). Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **48**: 95-105
62. Peimbert, M. (2003). Migración catalítica en la superfamilia de las β -lactamasas: Obtención de la actividad β -lactamasa en una DD-peptidasa. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Bioquímicas. UNAM. Cuernavaca, Mor.
63. Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández, G., Reyes-Vivas, H., Gao, X., Maldonado, E., de Gómez-Puyou, M. T. y Gómez-Puyou, A. (1999). Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry.* **38**: 4114-20.
64. Peruski, L. F. Jr. y Peruski, A. H. (1997). *The Internet and The new biology. Tools for genomic and molecular approach.* American Society for Microbiology, Washington D. C.
65. Pharmacia Fine Chemicals AB. (1983). *Affinity Chromatography. Principles & methods.*
66. Promega. Technical Manual No. 042. pGEM[®]-T y pGEM[®]-T easy vector systems.
67. QIAGEN. (2002). *QIAquick[®] Spin Handbook.*
68. Reyes-Vivas, H., Hernández-Alcantara, G., López-Velázquez, G., Cabrera, N., Pérez-

Montfort, R., de Gómez-Puyou, M. T. y Gómez-Puyou, A. (2001). Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosome brucei* and *Trypanosome cruzi*. *Biochemistry*. **40**: 3134-40.

69. Rodríguez, I., P. y Barrera, H., S. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. Vol. VII. No.3.

70. Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. y Fernández-Velasco, D. A. (2002). Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**: 669-75.

71. Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M. y Baker, D. (2004). Protein structure prediction using Rosetta Methods. *Enzymol.* **383**: 66-93.

72. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*. **36**: 9655-62.

73. Schueler-Furman, O., Wang, C., Bradley, P., Misura, K. y Baker, D. (2005). Progress in modeling of protein structures and interactions. *Science*. **310**: 638-642.

74. Seckler, R. y Jaenicke, R. (1992). Protein folding and protein refolding. *FASEB J.* **6**: 2545-52.

75. Sloan, P. R. 1996. *Natural History*. En: *Companion to the history of modern science*. p 295-313.

76. Stratagene. (2006). BL21 (DE3) competent cells, BL21 (DE3) pLysS competent cells and BL21 competent cells. *Instruction Manual*.

77. Stryer, L. 1995. *Bioquímica*. 4ta ed. Reverté, Barcelona. Pag. 147-417.

78. Sun, A., Yüksel, K. Ü. y Gracy, R. W. (1992). Interactions between the Catalytic Centers and Subunit Interface of Triosephosphate Isomerase Probed by Refolding, Active Site

Modification, and Subunit Exchange. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**: 20168-74.

79. Swanson, D. L. y Vetter, R. S. (2005). Bites of brown recluse spiders and suspected Necrotic arachnidism. *The New England Journal of Medicine*. **352**: 700-7.

80. Téllez-Valencia, A., Olivares-Iliana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, L., de Gómez-Puyou, M. T. y Gómez-Puyou, A. J. *Mol. Biol.* **341**: 1355-65.

81. Uversky, V. N. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science*. **11**: 739-56.

82. Vázquez, A. (2005). La Triosafosfato Isomerasa bajo presión hidrostática: estudio comparativo de dos especies. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

83. Vázquez, E. (2000). Caracterización del patrón de plegamiento y asociación de la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

84. Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy, M. R. (1997). Triosephosphate Isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure*. **5**: 751-61.

85. Voet, R., y Voet, J. (2004). *Biochemistry*. Wiley, New York. p 10-180.

86. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. y Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerasa. *J. Mol. Biol.* **306**: 745-57.

87. Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjaden, B., Hensel, R. (2004). Structure and function of a regulated archeal Triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* **342**: 861-75-

88. Wetlaufer, D. B. (1973). Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in

proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**: 697-701.

89. Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*. **492**: 193-8.

90. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Nauche, S. y Hol, W. G. J. (1991). Refined 1.83 Å structures of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerasa-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* **220**: 995-1015.

91. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. y Wierenga, R. K. (1999). Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerasa: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**: 243-50.

92. Xiang, J., Jung, J. y Sampson, N. S. (2004). Entropy effects on protein hinges: The reaction catalyzed by triosephosphate isomerasa. *Biochemistry*. **43**: 11436-45.

93. Yamamoto, S., Nakanishi, K. Y Matsuno, R. (1988). Ion exchange chromatography of proteins. *Science*. pp. 25-35.

94. Yon, J. M. (2001). Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **34**: 419-435.

95. Yu, M y King, J. (1984). Single amino acid substitutions influencing the folding pathway of the phage P22 tail spike endorhamnosidase. *PNAS*. **81**: 6584-8.

96. Zhao, H., Chockalingam, K. y Chen, Z. (2002). Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. **13**: 104-10.