



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**ANÁLISIS DE DOS REGIONES QUE AFECTAN EL  
REPLEGAMIENTO DE LAS TRIOSAFOSFATO  
ISOMERASAS DE *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* POR  
MEDIO DE MUTANTES**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**PRESENTA**

**MÓNICA RODRÍGUEZ BOLAÑOS**

**DR. RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
**DRA. LETÍCIA RAMÍREZ SILVA**  
FACULTAD DE MEDICINA  
**DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**México, D.F.      ENERO 2013**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 201 en el edificio oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo No. 167823, por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del donativo No. IN221812

Agradezco la ayuda técnica de la Bióloga Nallely Cabrera González en la realización del presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular, por la oportunidad para realizar mis estudios profesionales.
- Al Dr. Ruy Pérez Montfort por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo, por su paciencia y confianza.
- A los Doctores Leticia Ramírez Silva y Diego González Halphen por su tiempo y valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo.
- A mi familia por motivarme a seguir adelante, por todo su cariño, esfuerzo.
- A mi hermano L. Óscar por todos los momentos divertidos y el apoyo.
- A Héctor por guiarme y apoyarme en todo lo que me he propuesto... espero seguir mucho tiempo a tu lado y lograr apoyarte de la forma que tu lo haces conmigo. Gracias por la amistad, paciencia y amor.
- A Nitry por estar ahí cada vez que lo necesito y brindarme una visión más objetiva de los hechos jajaja.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio 201-orientado, muchas gracias por hacerme reír tanto, y evitar la pérdida de la cordura, gracias por su amistad y ayuda. En especial quiero agradecerles a Edgar por siempre proveernos con una dotación apreciable de golosinas jajaja y a Jorge por sus momentos de humor ácido. Lucy gracias por escuchar mis numerosas quejas jajaja. Itzhel y Nallely gracias por sus enseñanzas. Selmix por hacer más amena la estancia en el lab y Alex gracias por evitar que la entropía del laboratorio se incremente exponencialmente.

- A mis amigos los laboratorios 324 (Halphens) y 322 Norte (Mases): Héctor, Lili, Ale, Diana, Valentin, Alain, Ara, Alexa, Paco, Paola, Nitry, Harry, Chava, Vic; muchas gracias por sus enseñanzas, consejos, prestamos e invitaciones a los pasteles. Si omiti a alguien mil disculpas, pero saben que los aprecio.
- A todas las personas que de alguna manera han influido en mi formación, en especial, agradezco todos mis profesores, por sus valiosas enseñanzas.
- También agradezco la alegría y el cariño de mis amigos Difo, Deli, Brisa, Pancha, Lalo, Ileana, Ñu, Sr. Panda, Nancy, Aida, Jock, saben que se les aprecia. Nuevamente me disculpo si olvide mencionar a alguien.

## DEDICATORIAS

A mis Padres por ser un ejemplo de lucha y determinación.

A mi hermano L. Óscar por su cariño y a mi sobrina Mafer.

A Héctor Vicente por su amor y comprensión. Gracias por este maravilloso tiempo juntos, gracias por convertir mi mundo en algo mejor, por escucharme, comprenderme y hacerme sonreír. Gracias por permitirme crecer junto contigo.

## INDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Abreviaturas	iii
1.- Introducción:	1
1.1. Características estructurales de la Triosafosfato isomerasa	1
1.2. Sitio activo	2
1.3. Interfase del dímero	5
1.4. Diferencias y similitudes entre TbTIM y TcTIM	6
2. Antecedentes.	7
3. Hipótesis	12
4.- Objetivos	13
5.- Estrategia experimental	14
6. Materiales y Métodos	15
6.1. Construcción y clonación de las mutantes de la triosafosfato isomerasa	15
6.1.1. Subclonación del grupo de mutantes sintetizadas comercialmente en el vector pET-3a	15
6.1.2. Construcción y amplificación del gen de la enzima quimérica TcTIM3-8;TbTIM1,2	16
6.1.3 Mutagénesis dirigida	22
6.2. Ensayos de sobreexpresión	24
6.3. Purificación de las mutantes	25
6.3.1 Purificación de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2	26
6.4. Determinación de la actividad catalítica	27
6.5. Caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM	28

6.6. Ensayos de reactivación	29
6.7. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las mutantes de TcTIM y TbTIM	30
6.8. Modelaje computacional de las mutantes de TcTIM y TbTIM	32
7.0. Resultados	33
7.1 Construcción y clonación de las mutantes de la triosafosfato isomerasa	33
7.1.1. Subclonación del grupo de mutantes sintetizadas comercialmente en el vector pET-3a	33
7.1.2 Construcción y amplificación del gen de la enzima quimérica TcTIM3-8;TbTIM1,2	33
7.1.3 Mutagénesis dirigida	36
7.2. Ensayos de sobreexpresión	36
7.3. Purificación de las mutantes	37
7.3.1 Purificación de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2	37
7.4 Determinación de la actividad catalítica	40
7.5. Caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM	40
7.6. Ensayos de reactivación	42
7.7. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las mutantes de TcTIM y TbTIM	48
7.8 Modelaje computacional de las mutantes de TcTIM y TbTIM	53
8. Discusión	59
9.-Conclusiones	69
10. Perspectivas	69
Referencias	70
Apéndice A. Soluciones.	75



## RESUMEN

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima dimérica de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos por monómero que participa en la vía de la glucólisis y que cataliza la interconversión rápida del gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato. La TIM pertenece a la familia de las proteínas denominada barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, que es la familia con el motivo estructural más frecuente en enzimas cuya estructura se conoce a la fecha. En nuestro grupo de investigación trabajamos con las triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y *T. brucei* (TbTIM), quienes poseen un alto grado de similitud. La comparación de sus secuencias de aminoácidos muestra 73% de identidad global, y 82% de identidad con respecto a los residuos de interfase. Además, sus estructuras cristalográficas se superponen con un RMS de 0.96 Å. Una característica muy particular de ambas TIMs es una diferencia significativa en su comportamiento frente a diversos agentes que afectan sus propiedades fisicoquímicas. Se ha observado que la reactivación a partir de monómeros desplegados con clorhidrato de guanidina es 2 a 3 veces más rápida y 30% más eficiente en TcTIM que en TbTIM.

Con el fin de profundizar en el estudio de estas diferencias de comportamiento en el laboratorio se dividió a la TIM en ocho regiones; cada región se compone por una hoja beta, una alfa hélice y su asa correspondiente. Esta subdivisión permitió diseñar una serie de proteínas quiméricas intercambiando segmentos entre TcTIM y TbTIM. En estudios previos realizados por nuestro grupo obtuvimos datos que sugieren que las diferencias en el comportamiento de reactivación de ambas proteínas recaen en las regiones 1 y 2 (formadas por los 35 amino ácidos del extremo amino terminal y los siguientes 25 aminoácidos de la región contigua, respectivamente) de las enzimas. En el presente estudio empleamos proteínas quiméricas con todas las combinaciones posibles de las regiones 1 y 2 para conocer su importancia en el proceso de reactivación a partir de monómeros desplegados. Nuestros resultados muestran que las regiones 1 y 2 se encuentran fuertemente implicadas en esta diferencia de comportamiento. Aparentemente, la región 2 está relacionada con la velocidad de reactivación, mientras que la combinación de las regiones 1 y 2 es determinante para la eficiencia del proceso.

## ABSTRACT

Triosephosphate isomerase (TIM) is a dimeric enzyme, which has 250 amino acids per monomer and forms part of the glycolytic pathway, catalyzing the interconversion of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. It belongs to the family of proteins called  $(\alpha/\beta)_8$  barrels, which is the most common structural motif found in all enzymes whose structure is currently known. Our research group works with the triosephosphate isomerases from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) and *Trypanosoma brucei* (TbTIM), which have a high degree of similarity. A comparison of both sequences shows 73% of overall identity and 82% identity of the interface residues. Besides, their crystallographic structures superpose with an RMS value of 0.96 Å. One particular characteristic of both TIMs is a significant difference in their behavior when exposed to different agents that affect their physico-chemical properties. It has been observed that reactivation from monomers produced by denaturation with guanidine hydrochloride is 2 to 3 times faster and 30% more efficient in TcTIM than in TbTIM.

To further investigate these differences in behavior, our research group divided the sequence of TIM into eight regions; each region consists of a beta sheet, an alpha helix and the corresponding loop that joins them. This subdivision allowed us to design a series of chimeric proteins, exchanging segments between TcTIM and TbTIM. Previous work by our group suggested that the differences in the reactivation behavior of both enzymes were in regions 1 and 2 (which consist of the 35 amino acids of the amino terminus and the 25 contiguous amino acids, respectively).

In this work we used chimeric proteins with all the possible combinations of regions 1 and 2 to explore their role in the process of reactivation from unfolded monomers. Our results indicate that both, region 1 and 2, are strongly implicated in this difference of behavior. Region 2 seems to be related to the velocity at which reactivation occurs and the combination of regions 1 and 2 determines the efficiency of the process.

## Abreviaturas

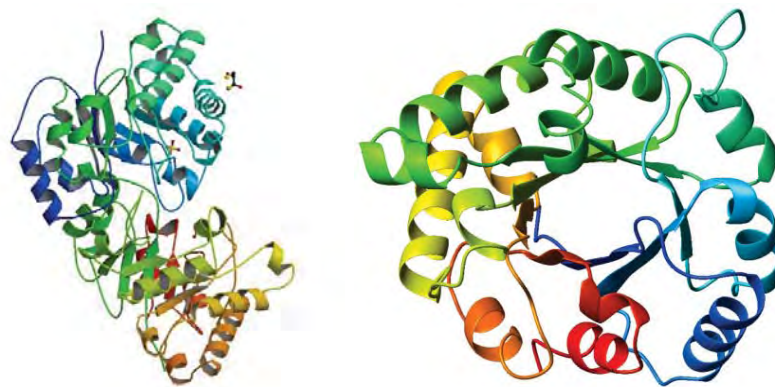
BSA	Albúmina sérica bovina
DHAP	Dihidroxi acetona fosfato
dNTPS	Mezcla de desoxinucleótidos fosfato
DTT	Ditiotreitol
DTNB	Ácido dinitrobenzóico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FPLC	Cromatografía líquida de desarrollo rápido (fast performance liquid chromatography).
GAP	Glicerol fosfato
G3P	D-gliceraldehído 3 fosfato
Gdn HCl	Clorhidrato de guanidina
$\alpha$ -GDH	$\alpha$ -glicerol-3 fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
$k_{cat}$	Constante catalítica
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LC	Lisado celular
MES	Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MMTS	Metil metano tiosulfonato
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fosfato inorgánico
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T.brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
$V_{\max}$	Velocidad máxima
$V_0$	Velocidad inicial

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1. Características estructurales de la triosafosfato isomerasa.

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos por monómero (con una masa molecular de 27000 Da) que cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (Figura 1). Las TIMs, por lo general, están compuestas por dos subunidades idénticas que forman dímeros con excepción de las de organismos termofílicos, las cuales se encuentran formando tetrámeros (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002).



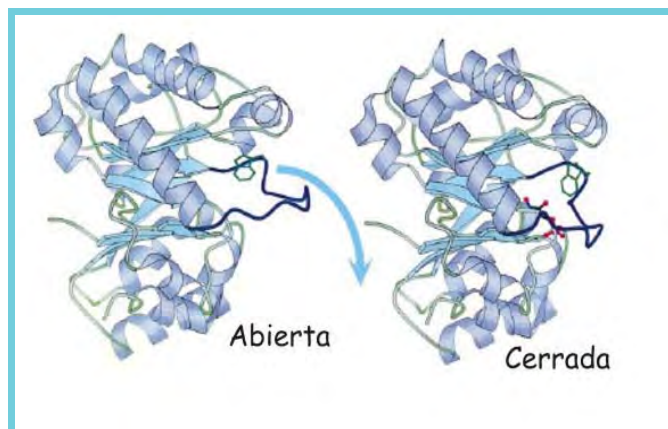
**Figura 1.- Estructura cristalográfica de *Trypanosoma brucei*(TbTIM).** En la primera figura a la izquierda se muestra a la enzima en estado nativo, en la figura a la derecha un monómero rotado de tal modo que puede apreciarse el patrón barril  $\beta/\alpha$  característico en la TIM. Modificado de *pdb5tim* Wierenga R., *et al.* (1991).

La TIM pertenece a la familia de proteínas denominada barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, cada monómero se encuentra compuesto por 8 hojas  $\beta$  (dispuestas en el interior de la proteína) rodeadas por 8  $\alpha$ -hélices unidas entre sí por sus respectivas asas (Figura 1). Cada monómero posee un sitio activo y todos los residuos de aminoácidos relacionados con la catálisis; sin embargo, la proteína solamente es catalíticamente activa cuando esta se encuentra como dímero (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002). Los aminoácidos que componen al barril son predominantemente hidrofóbicos, sólo algunos aminoácidos polares aparecen al final del barril (expuestos al solvente); en este lugar también se localiza el sitio activo de la enzima (Farber G y Petsko G., 1990, Lolis E., *et al.*, 1990, Knowles J., 1991 y Hernández-Alcantara G., *et al.*, 2002). Para realizar la catálisis la TIM no requiere de algún cofactor ni de ningún ion metálico (Albert T., *et al.*, 1981 y Wierenga R., *et al.*

1991.). Tampoco tiene un mecanismo regulador de su actividad a lo largo de la ruta glucolítica (no existe evidencia de algún activador o inhibidor) (Albert T., *et al.*, 1981). Evolutivamente la TIM se considera como el catalizador perfecto, ya que la velocidad con la que opera solamente depende de la difusión del sustrato (Lolis E., *et al.*, 1990). La catálisis enzimática es mucho más eficiente, sobre todo cuando se compara con la isomerización no enzimática.

El paso termodinámicamente desfavorable durante la catálisis en dirección DHAP a GAP es la salida del producto final (GAP), ya que la enzima necesita realizar un cambio conformacional para que el producto sea liberado. Se propone que este cambio conformacional debe ser pequeño para que el medio ambiente del intermediario, ni la unión con el sustrato, se vean afectados por dicho movimiento (Rozovsky S y McDermott A., 2001).

La TIM posee un asa flexible la cual se abre y cierra conforme la catálisis se lleva a cabo (Figura 2). El asa se encuentra compuesta por los aminoácidos 166-176 (asa 6). Cuando la enzima no se encuentra en presencia del sustrato el asa permanece en una posición abierta, a diferencia de cuando el sustrato está presente, en que el asa se mueve alrededor de 7 Å para obtener una conformación cerrada. Particularmente, los residuos 168-173 se encargan de la formación de una porción rígida que parece fungir como tapa, en donde los residuos 170-173 se apoyan para la formación de un enlace tipo puente de hidrógeno con el grupo fosfato del sustrato. Los cambios estéricos realizados por la enzima parecen ser resultado de la estabilización del intermediario enediol. En ausencia de una tapa apropiada, el intermediario enediol-fosfato se despega fácilmente de la enzima y, al entrar en contacto con el medio, este se descompone rápidamente en metilglioxal y fosfato inorgánico. El asa flexible en la TIM parece tener dos funciones: asegurar un buen rendimiento en la reacción y estabilizar el intermediario durante la reacción. En el interior del asa cerrada se forma un ambiente especial de tal modo que muchos residuos ionizables se acomodan alrededor del sustrato para facilitar la reacción de transferencia del protón entre el carbono 1 y 2. La baja constante dieléctrica proporciona un ambiente propicio para que la enzima aumente la estabilidad de los intermediarios. El residuo catalítico clave es el glutamato 167 el cual se mueve en coordinación con el asa. En ausencia de sustrato, el glutamato 167 se une a la serina 96 mediante interacciones tipo puente de hidrógeno; cuando el sustrato entra, esta unión se rompe, y ocurre un cambio en la posición del glutamato 167 (de aproximadamente 2Å) de tal modo que este entra en contacto con el sustrato (Knowles J., *et al.*, 1991, Rozovsky S y McDermott A., 2001).



**Figura 2.-Movimiento del asa 6 durante la catálisis mediada por la TIM.** La posición se encuentra abierta en ausencia de sustrato y se cierra en presencia de sustrato; la estructura se obtuvo en presencia de un análogo de sustrato que se muestra en rojo (fosfoglicohidroxamato). Modificado de Rozovsky S y Mc Dermott A., (2001).

Durante la catálisis no solamente se mueve el asa 6, sino que las asas 5, 7 y 8 también presentan un ligero cambio. El movimiento de las asas 5 y 7 se correlaciona con el movimiento del asa 6 y el movimiento del asa 8 permite una mejor interacción con el fosfato (Wierenga R., *et al.*, 1991).

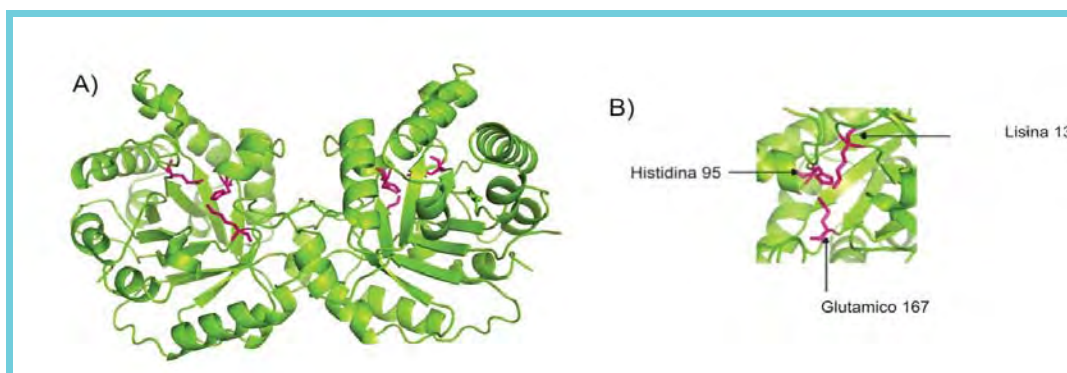
Algunos residuos juegan un papel crítico en el ensamblaje correcto y en el funcionamiento del dímero. La mayoría de estos residuos se encuentran distribuidos en las 8 asas. En el asa 1 (residuos 12-17) se encuentran la lisina 13 (fundamental en el reconocimiento del sustrato) y la cisteína 14 (estabiliza al dímero), en las asas 2 y 3 se encuentran la valina 46 y la treonina 75 (residuos de interfase), el asa 4 posee a la histidina 95 (parte del sitio catalítico) y, en el asa 6, se encuentra el glutamato 167, responsable de la unión del sustrato (Wierenga R., *et al.*, 1991).

Con excepción de los residuos del asa 3 sólo existe una pequeña secuencia muy conservada entre los residuos de la interfase. Un alineamiento de TIMs de diferentes organismos reveló que sólo 30 de los 250 aminoácidos que componen al monómero se encuentran estrictamente conservados, sin embargo, estos cambios evolutivos no parecen afectar sus propiedades catalíticas (Maldonado E., *et al.*, 1998).

## 1.2. Sitio activo

El sitio activo está formado por la lisina 14, histidina 96 y el glutamato 168 en TcTIM y por la lisina 13, la histidina 95 y el glutamato 167 en TbTIM (TcTIM posee una alanina en la posición 2, la cual

se encuentra ausente en TbTIM, por lo que la secuencia de esta última, se encuentra desplazada por un residuo) (Figura 3) (Maldonado E., *et al.*, 1998).

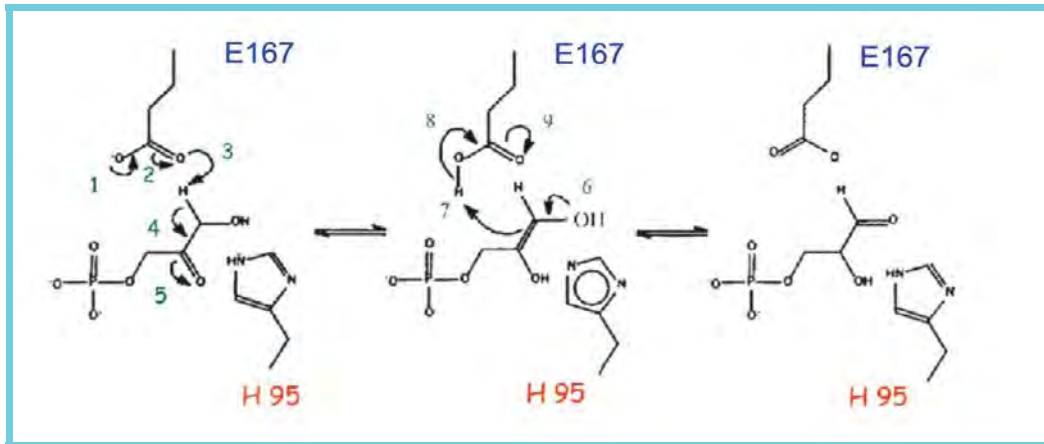


**Figura 3.-Sitio activo de TbTIM.** A) La TIM posee dos sitios catalíticos (resaltados en color rosa) sin embargo, solamente es activa cuando se encuentra como dímero. B) Acercamiento de los tres residuos catalíticos los cuales se encuentran al final de cada barril  $\alpha/\beta$ . Modificado del pdb5tim Wierenga R., *et al.*, (1991).

La reacción catalítica de la TIM comienza con la transferencia de un protón del  $C_1$  de la DHAP al  $C_2$  de la D-GAP. La extracción de este protón conlleva a la formación de un intermediario *cis*-enediol (Albert T., *et al.*, 1981). La extracción del protón del  $C_1$  la lleva a cabo el grupo carboxilo del glutamato 167, el cual se encuentra perfectamente bien posicionado para realizar la escisión del  $H^+$ , pues la distancia entre el  $C_1$  y  $C_2$  es de aproximadamente 3 Å por ser bidentado el grupo carboxilato puede extraer el protón de cualquiera de los carbonos (1 y 2), sin realizar gran movimiento. La extracción del protón es ortogonal con respecto al plano del enolato, lo cual aumenta la rapidez de enolización (Figura 4). Se ha observado que cuando el glutamato 167 es sustituido por alanina o glicina, la actividad catalítica disminuye de hasta 100 veces.

La histidina 95 (asa 4) funge como electrófilo y también se encuentra perfectamente posicionada a 2.9 Å de los carbonos 1 y 2 y el anillo bidentado del imidazol polariza al grupo carbonilo del sustrato, permitiendo su enolización (figura 4) (Knowles J., 1991, Lolis E., *et al.*, 1990). La lisina 13 (asa 1) ayuda a estabilizar la carga negativa del carbonilo en el estado de transición, mejorando la acidez del hidrógeno, y también se encuentra muy relacionada con la especificidad de la enzima por su sustrato (Lolis E., *et al.* 1990; Davenport R., *et al.* 1991)





**Figura 4.- Mecanismo de reacción de los residuos catalíticos E167 y H95.** La reacción sucede en el sentido DHAP a GAP. Un grupo básico (E) extrae el protón del carbono 1 de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) asistido por un grupo ácido (H95) para producir el intermediario enediol. Luego el intermediario colapsa y da lugar al producto gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y se regenera la enzima. El imidazol, funciona como ácido para protonar al carbonilo formando el intermediario enediol. Modificado de Knowles J., 1991 y Ávila- Rios S., 2001.

### 1.3. Interfase del dímero

Básicamente, la interfase del dímero se encuentra conformada por las asas 1-4. El asa 3 de uno de los monómeros se ancla dentro del espacio formado por las asas 1 y 4 del otro monómero, quedando muy cercano al sitio catalítico. En todas las TIMs el área interfacial entre ambos dímeros es muy grande, existen 32 aminoácidos que forman la interfase (Tabla 1). En el caso de la TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) la interfase tiene un área de aproximadamente 1522 y 1533 Å<sup>2</sup> y para la TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) de 1476 y 1491 Å<sup>2</sup>, para los monómeros A y B, respectivamente. La interfase se encuentra estabilizada por alrededor de 20 enlaces tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de ambos dímeros y moléculas de agua. Hay 18 moléculas de agua que juegan un papel importante en la estabilidad del dímero y la ausencia de éstas explica la inestabilidad térmica de algunas TIMs, como en la mutante D104E (Wierenga R., *et al.*, 1991). En gran medida estas interacciones aumentan la especificidad entre ambos monómeros y controlan el contacto entre los residuos de las asas 1 y 2. Se piensa que estas moléculas de agua son remanentes de algún estado de plegamiento de la enzima en donde ambos monómeros se combinan para formar el dímero activo (Lolis E., *et al.*, 1991). Cuando la enzima no tiene sustrato, existen moléculas de agua que ocupan el sitio activo, las cuales ayudan a estabilizar al sitio activo, ya que permiten la formación de puentes de hidrógeno entre la histidina 95 y la asparagina 10; cuando el sustrato se une al sitio activo estas moléculas son desplazadas (Lolis E., *et al.*, 1990).

Existen 3 residuos completamente expuestos en el monómero y ocultos en la interfase: cisteína 14, valina 46 y treonina 75. La treonina 75 se encuentra al final del asa 3, posicionada cerca del sitio activo; su grupo hidroxilo parece ser importante para lograr un óptimo acercamiento de las cadenas laterales de los residuos catalíticos del sitio activo (Wierenga R., *et al.*, 1991).

**Tabla 1.- Aminoácidos de la interfase del dímero de TbTIM y TcTIM.** Los residuos no conservados entre TcTIM y TbTIM se encuentran resaltados con un asterisco. Tomado de García-Torres I., (2006).

TcTIM			TbTIM		
Asn12	Gly 73	Ile173	Asn11	Gly 72	Ile172
Lys14	Ala 74	Gly174	Lys13	Ala 73	Gly174
Cys15	Phe75		Cys14	Phe74	
Asn16	Thr76		Asn15	Thr75	
Gly17	Gly77		Gly16	Gly76	
Ser18	Glu78		Ser17	Glu77	
Glu19 *	Val79		Gln18*	Val78	
Ser20*	Ser80		Gln19*	Ser79	
Thr45	Ile83		Thr44	Ile82	
Phe46	Leu84		Phe45	Leu83	
Leu47 *	Asp86		Val46 *	Asp85	
His48	Tyr87 *		His47	Phe86*	
Ile49 *	Ile89 *		Leu48 *	Val88 *	
Pro50*	Val93		Ala49 *	Val92	
Met51	His96		Met50	His95	
Gln66	Glu98		Gln65	Glu97	
Asn67	Arg99		Asn66	Arg98	
Ile69	Tyr102		Ile68	Tyr101	
Ser72	Tyr103		Ser71	Tyr102	

#### 1.4. Diferencias y similitudes entre TbTIM y TcTIM.

A pesar de que ambas enzimas provienen de dos parásitos altamente relacionados, cuando se realiza un alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de ambas TIMs éstas tienen un 73% de identidad en su secuencia global, un 82% en su secuencia de interfase y un total de 65 residuos diferentes. Ambas enzimas poseen propiedades catalíticas muy similares y sus estructuras tridimensionales tampoco varían. Si se sobreponen ambas estructuras cristalográficas, la posición en el espacio de los carbonos  $\alpha$  de todos sus residuos varía con un promedio de sus raíces

cuadradas (RMS: root-mean-square por sus siglas en inglés) de 0.96 Å. (Maldonado E., *et al.*, 1998, Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2003, García-Torres I., 2006).

Una característica muy particular de las TIMs es que, a pesar de que todas poseen una estructura básica muy similar, presentan diferencias significativas en su comportamiento frente a agentes que afectan la catálisis enzimática. Por ejemplo, se ha observado que la reactivación de algunas TIMs a partir de monómeros desplegados con agentes caotrópicos como el clorhidrato de guanidina es muy diferente. Cuando se compara el comportamiento de TcTIM con el de TbTIM se sabe que la reactivación de TcTIM es mucho más rápida y eficiente (Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2003). Cuando se examina la susceptibilidad proteolítica de la enzima por subtilisina se observa que TbTIM presenta mayor resistencia que TcTIM. Después de la exposición a subtilisina, TbTIM conserva el 50% de su actividad inicial y cuando TcTIM se expone a la subtilisina, esta se hidroliza en un 100% (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2002).

Cuando se realizan ensayos de termoestabilidad monitoreados por dicroísmo circular a 222 nm TcTIM es más estable a la desnaturalización térmica que TbTIM la temperatura media aparente de desnaturalización de la TcTIM es de 57.6 °C mientras que para TbTIM es de 53.02 °C (García-Torres I., 2006).

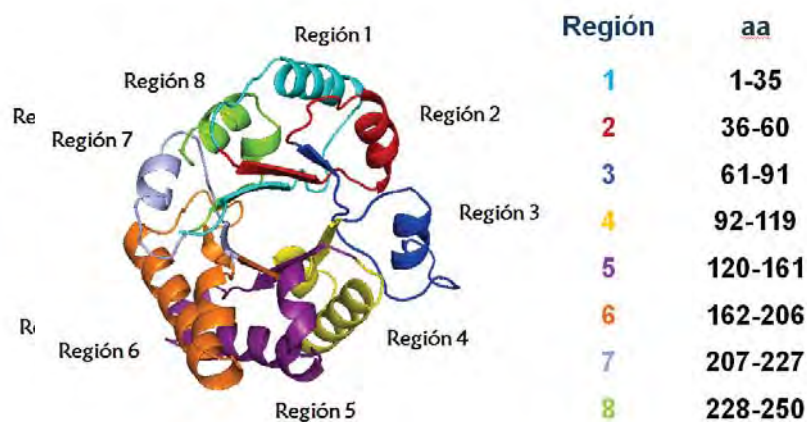
Un comportamiento similar se obtiene cuando ambas enzimas se tratan con compuestos derivatizantes de grupos sulfhidrilo como el metilmetano tiosulfonato (MMTS) o el ácido ditionitrobenzónico (DTNB). Cuando ambas enzimas se tratan con MMTS o DTNB, la susceptibilidad de TcTIM es aproximadamente 100 veces mayor que la TbTIM (García-Torres I., 2006). Se piensa que la diferencia entre la sensibilidad a la inactivación por reactivos de grupo sulfhidrilo podría explicarse por un cambio en la accesibilidad de los reactivos a la cisteína 14 o a la perturbación en la estructura de la enzima después de la derivatización de la cisteína 14 (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998).

## **2.- ANTECEDENTES**

En 2005 Zomosa-Signoret y colaboradores observaron que la TbTIM y la TcTIM presentaban diferentes patrones de desplegamiento-plegamiento, a pesar del alto grado de similitud estructural que poseen ambas proteínas. La reactivación a partir de monómeros desplegados con

clorhidrato de guanidina es mucho más eficiente y rápida en TcTIM que en TbTIM. La TcTIM alcanza un 80% de reactivación durante los primeros 10 minutos (y un 90% a los 45 min), mientras que TbTIM sólo logra un 60% de reactivación a los 45 minutos. El mecanismo descrito para la reactivación de ambas enzimas, involucra una secuencia uni-bi-uni, en donde la primer reacción unimolecular consiste en el plegamiento de monómeros, seguida de una reacción bimolecular en la cual dos monómeros plegados se unen para formar al dímero inactivo. Finalmente, después ocurren otros rearrreglos internos unimoleculares que conllevan a la formación del dímero activo.

Con el fin de explorar y tratar de encontrar aquellos aminoácidos funcionalmente relevantes que puedan proporcionarnos una explicación precisa de las diferencias expuestas anteriormente, y en especial respecto las diferencias en la reactivación de TcTIM y TbTIM se construyeron mutantes quiméricas entre ambas TIMs. Para su estudio en el laboratorio la TIM se dividió en 8 regiones, cada región se encuentra compuesta por una hoja  $\beta$ , una  $\alpha$  hélice y el asa respectiva que las une (Figura 5).



**Figura 5.-División esquemática de la Triosafosfato Isomerasa.** Se muestran las regiones en las que la TIM fue dividida para su estudio. Cada color representa una de las regiones y en la tabla anexa se muestran los números en la secuencia de los aminoácidos que componen a cada región.

Como se mencionó anteriormente, existen 65 diferencias en total entre ambas secuencias de aminoácidos. Básicamente el mayor número de diferencias entre ambas secuencias se encuentran

en las regiones 1, 5 y 6 (Tabla 2). La estrategia utilizada para el diseño y construcción de las mutantes fue realizar la conversión gradual de una TcTIM en una TbTIM, aumentando el número de regiones de TbTIM y disminuyendo las de TcTIM. En total se generaron 6 quimeras (Tabla 3).

**Tabla 2.-Diferencias entre las secuencias de las Triosasfosfato isomerasas de *T.brucei* y *T.cruzi***

Región	aa	# de diferencias	Sustituciones conservativas	Sustituciones semiconservativas	Sustituciones sin homología
1	1-35	13	8	1	4
2	36-60	7	4	2	1
3	61-91	8	5	1	2
4	92-119	5	2	-	3
5	120-161	15	8	3	4
6	162-206	10	5	2	3
7	207-227	3	-	2	1
8	228-250	4	4	-	-
Total		65	36	11	18

Todas las mutantes fueron caracterizadas cinéticamente y, en general, no se observó gran variación en su actividad catalítica, sólo la quimera TcTIM1-6;TbTIM 7-8 parece ser un poco menos eficiente (Tabla 4) (García-Torres, I., *et al.*, 2011) . Se han obtenido cristales de algunas de las mutantes y en la resolución de su estructura no se han encontrado diferencias significativas entre estas y las enzimas silvestres (Torres-Larios A., datos no publicados).

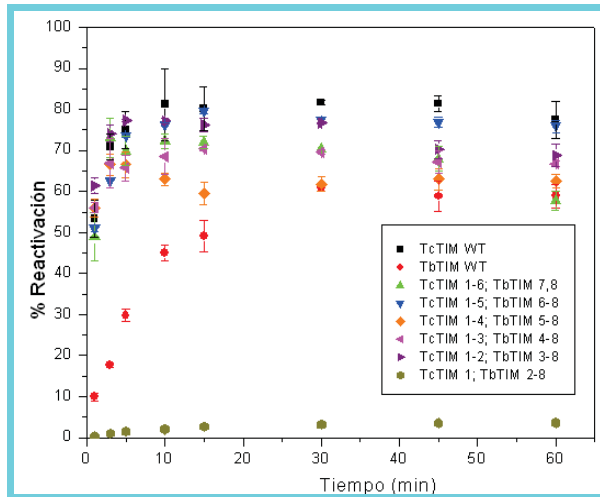
**Tabla 3.-Mutantes construidas de la Triosafosfato isomerasa de TcTIM y TbTIM**

Quimera	Regiones de TcTIM	Regiones de TbTIM
TcTIM1-6;TbTIM7-8	1-6	7-8
TcTIM1-5;TbTIM6-8	1-5	6-8
TcTIM1-4;TbTIM 5-8	1-4	5-8
TcTIM1-3;TbTIM4-8	1-3	4-8
TcTIM1-2;TbTIM3-8	1-2	3-8
TcTIM1;TbTIM2-8	1	2-8

**Tabla 4.- Parámetros cinéticos de las mutantes de la TcTIM y TbTIM**

Enzima	$K_m$ ( G3P mM)	$k_{cat} \times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m \times 10^7$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).
TbTIM	0.45	3.1	1.15
TcTIM	0.43	2.7	1.05
TcTIM1-6;TbTIM7-8	0.13	0.956	1.23
TcTIM1-5;TbTIM6-8	0.38	1.55	0.68
TcTIM1-4;TbTIM 5-8	0.63	3.32	0.87
TcTIM1-3;TbTIM4-8	0.58	3.31	0.95
TcTIM1-2;TbTIM3-8	0.57	3.28	0.92
TcTIM1;TbTIM2-8	0.48	3.17	1.10

Al realizar los estudios de desplegamiento-plegamiento con las seis enzimas quiméricas, Viguera-Meneses G.(2010), observó que la quimera TcTIM1;TbTIM2-8 (regiones 2 a 8 de TbTIM con sólo la región 1 de TcTIM) posee una cinética de reactivación muy lenta y muy poco eficiente (figura 6). En esta quimera la reactivación que alcanzó la enzima fue de menos del 5% a las 24 h. Por otro lado, también observó que la quimera TcTIM1,2;TbTIM3-8 (regiones 3 a 8 de TbTIM y regiones 1 y 2 de TcTIM) mostró una cinética de reactivación muy rápida y eficiente, muy similar a la que presenta TcTIM. Estos resultados indican que las regiones 1 y 2 se encuentran involucradas en la diferencia del comportamiento de replegamiento entre TbTIM y TcTIM. Las otras cuatro quimeras estudiadas (en que se mutaron las regiones 3 a 8, todas muestran un comportamiento similar al observado en TcTIM.



**Figura 6.- Gráfica comparativa de las cinéticas de reactivación entre las enzimas silvestres (TcTIM y TbTIM) y las seis enzimas quiméricas (Viguera-Meneses, 2010).**

Con el fin de continuar con la búsqueda de estas diferencias de comportamiento, en este proyecto se harán nuevas enzimas quiméricas, las cuales nos permitirán elucidar y caracterizar mejor los mecanismos implicados en estas diferencias.

### 3. HIPÓTESIS

Entre las 20 diferencias en las regiones 1 y 2 se encuentran los aminoácidos responsables del distinto comportamiento en la reactivación de los monómeros desplegados por clorhidrato de guanidina entre las triosafosfato isomerasas de *T.cruzi* y *T.brucei*.



## 4.- OBJETIVOS

### Objetivo general

Buscar en las regiones 1 y 2 los aminoácidos responsables de la diferencia de comportamiento en la reactivación de TcTIM y TbTIM después de ser tratadas con clorhidrato de guanidina.

### Objetivos particulares

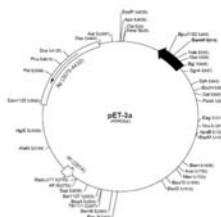
- Obtener 4 nuevas quimeras de las regiones 1 y 2 TcTIM y TbTIM
- Purificar dichas quimeras
- Realizar su caracterización cinética, evaluando sus estabilidades a la dilución, temperatura y su reactivación
- Generar proteínas quiméricas con mutaciones adicionales de aminoácidos en forma individual o múltiple

## 5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Diseñar y hacer quimeras de las regiones 1 y 2 de las triosafosfato isomerazas de *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*



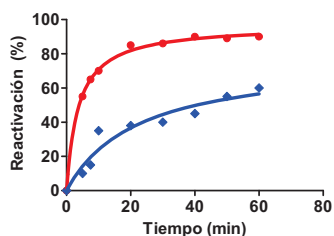
Realizar su clonación, transformación en células de sobreexpresión BI21DE3pLys S



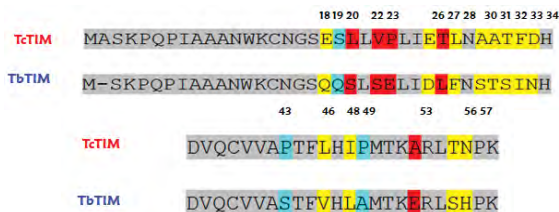
Purificación mediante cromatografía de desarrollo rápido (FPLC)



Realizar su cinética de reactivación



Según resultados obtenidos, producción de quimeras con grupos de aminoácidos mutados



## 6.0. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Construcción y clonación de las mutantes de la triosafosfato isomerasa.

Las quimeras que se produjeron para este proyecto son:

**Tabla 5.- Mutantes de TcTIM y TbTIM.**

Quimera	Estrategia
TcTIM1;TbTIM2-8	Restricción con <i>Dra III</i>
TcTIM2-8; TbTIM1	Síntesis comercial
TcTIM2;TbTIM1,3-8	Síntesis comercial
TcTIM1,3-8;TbTIM2	Síntesis comercial
TcTIM1,2;TbTIM3-8	Restricción con <i>Sgr AI</i>
TcTIM3-8;TbTIM1,2	PCR
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q)	Mutagénesis dirigida
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q)	Mutagénesis dirigida
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S)	Mutagénesis dirigida
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S)	Mutagénesis dirigida
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S,P23E)	Mutagénesis dirigida

#### 6.1.1. Subclonación del grupo de mutantes sintetizadas comercialmente en el vector pET-3a

La síntesis comercial de las quimeras fue realizada por *Gene Script* (Piscataway, N.J., E.U.A.) (Tabla 5). El gen sintético que codifica para la enzima mutante se encuentra en el vector pUC 57, el cual posee resistencia a ampicilina. Dicho vector fue transformado en células competentes de *E. coli DH5α* para su conservación y propagación. Para lograr lo anterior se tomaron 2  $\mu\text{L}$  (569 ng/ $\mu\text{L}$ ) de plásmido con inserto y se transformaron en 100  $\mu\text{L}$  de células competentes de *E. coli DH5α*; posteriormente el producto se sembró en una caja Petri con medio Luria Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y las cajas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se tomó una de las colonias transformantes y se realizó un subcultivo en 10 mL de medio líquido LB adicionado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) el cual se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8 a 600nm. Una vez alcanzada la densidad óptica se tomó una muestra para su conservación a -70°C y se le adicionó glicerol al 8%. El resto del cultivo se centrifugó a 6000rpm (rotor JA-25.50, Beckman) con el fin de extraer el DNA.

El DNA se extrajo con el sistema QIAprep®Spin Miniprep de Qiagen. Ya purificado el DNA, se efectuó una doble digestión con las enzimas NdeI y BamHI en un horno de microondas (Sharp, Carousel 1100 W) durante tres ciclos de 15 segundos, con intervalos de descanso de 3 minutos. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1%. La banda correspondiente al inserto (peso aproximado de 756pb) se cortó y purificó con el juego de reactivos comerciales QIAquick Gel Extraction de Qiagen. Finalmente se realizaron las reacciones de ligación en el vector pET-3a (previamente digerido con las enzimas de restricción NdeI y BamHI). El producto de la ligación se transformó en células competentes de *E.coli* DH5α, las cuales fueron sembradas en una placa con medio LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina. A partir de esta caja se tomó una colonia y se realizó un subcultivo en 10 mL de medio LB líquido con ampicilina, del cual se extrajo una alícuota para su conservación a -70°C, al resto del cultivo se le extrajo DNA (con ayuda del sistema QIAprep®Spin Miniprep de Qiagen) y se secuenció para verificar la incorporación correcta del inserto al vector.

#### **6.1.2. Construcción y amplificación del gen de la enzima quimérica TcTIM3-8;TbTIM1,2.**

La construcción del gen de la mutante TcTIM3-8;TbTIM1,2 se realizó mediante tres reacciones de PCR. En la primer reacción se amplificaron las regiones 1 y 2 de TbTIM, utilizando al DNA de TbTIM (clonado en el vector pET-3a) como templado y los cebadores T7 promoter (iniciador externo) y el Tc3-8;Tb1,2 Rv (iniciador interno) (figura 7); la mezcla de reacción utilizada se muestra en la tabla 6. La segunda reacción de PCR (PCR2) amplificó el resto de las regiones (3 a la 8 de TcTIM). En esta reacción se usó como templado el DNA de TcTIM (clonado en el vector pET-3a) y los oligonucleótidos T7 terminator y Tc3-8;Tb1,2 Fw, (figura 7). En la tabla 7 se muestra la mezcla de reacción utilizada para dicha reacción. Finalmente, en el tercer PCR se combinan los productos de los PCR 1 y 2, los cuales hibridan en una región complementaria para lograr la amplificación del gen utilizando solamente los oligonucleótidos externos (T7 promoter y T7 terminator) (figura 7). En la tabla 8 se muestra la mezcla de reacción utilizada para la amplificación. Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 8.

Las secuencias de los oligonucleótidos usados fueron:

#### **Tc3-8;Tb1,2 Fw**

5' TCA CAC CCC AAG TTC CAG ATT GCC GCA 3'

**Tc3-8;Tb1,2 Rv**

5' TGC GGC AAT CTG GAA CTT GGG GTG TGA AAG ACG3'

**Tabla 6.- Mezclas de reacción para la reacción de PCR 1**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
DNA de TbTIM (200 ng/mL)	1
Oligo T7 promoter (200 ng/mL)	1
Oligo Tc3-8;Tb1,2 Rv (200 ng/mL)	1
Solución de deoxinucleótidos trifosfatados 10 mM (NEB)	1
Bioline 10X accubuffer	5
Acuzime DNA polimerasa (2.5U/ $\mu$ L)	1.5
Agua	39.5
<b>Volumen total</b>	<b>50</b>

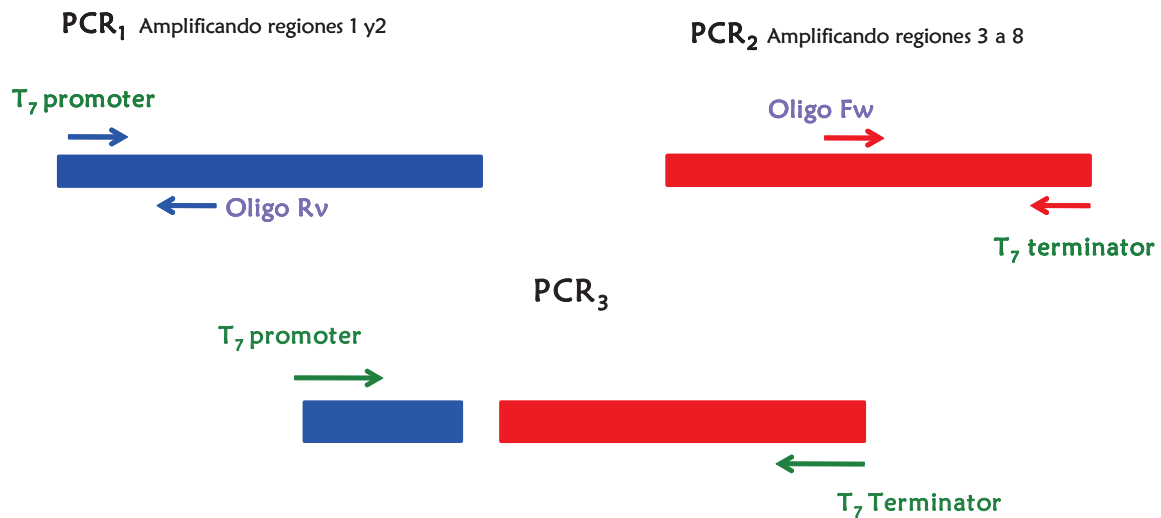


Figura 7.- Esquema de la amplificación de la quimera TcTIM3-8; TbTIM1,2 mediante PCR.

Tabla 7.-Mezcla de reacción para PCR2

Reactivo	Volumen (μL)
DNA de TcTIM (200 ng/mL)	1
Oligo T7 terminator (200 ng/mL)	1
Oligo Tc3-8;Tb1,2 Fw (200 ng/mL)	1
Solución de deoxinucleótidos trifosfatados 10 mM (NEB)	1
Termobuffer	5
Vent DNA polimerasa (2.5 U/μL)	1.5
Agua	39.5
Volumen total	50

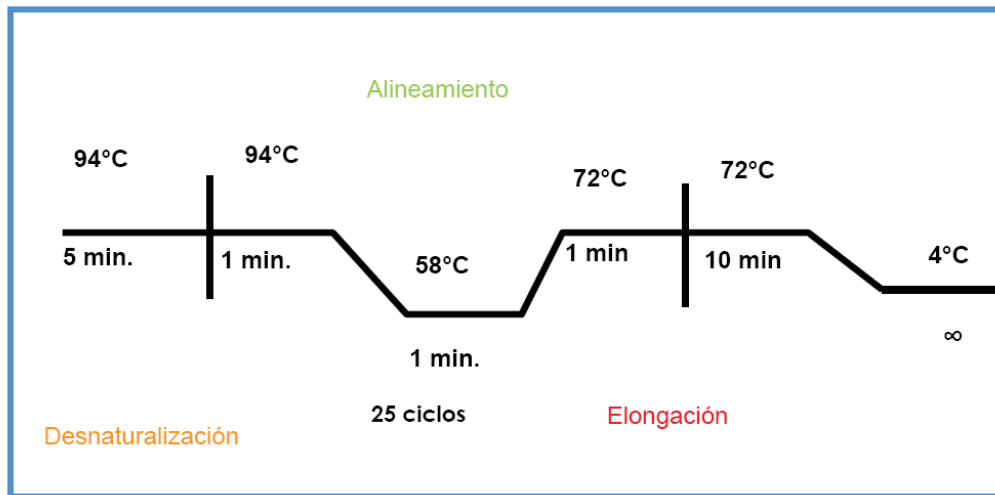


Figura 8.- Condiciones de amplificación utilizadas para los PCR 1, 2 y 3.

Tabla 8.- Mezcla de reacción para el PCR 3

Reactivo	Volumen (μL)
Producto de PCR 1 (8 ng/mL)	10
Producto de PCR 2 (10 ng/mL)	10
T7 promoter (200 ng/mL)	4
T7 terminator (200 ng/mL)	4
Solución de deoxinucleótidos trifosfatados 10 mM (NEB)	4
Termobuffer	10
Vent DNA polimerasa (2.5 U/μL)	2
Agua	6
<b>Volumen total</b>	<b>50</b>

Finalmente el producto de PCR3 se cargó en un gel de agarosa al 1% y se observó la presencia de la banda del peso molecular esperado (de 850 pb). Dicha banda se cortó y se purificó utilizando el juego de reactivos comerciales QIAquick Gel extracción de Qiagen. El vector de clonación utilizado fue el pET-3a (Novagen). Para poder introducir el producto de PCR3 en el vector, éste fue digerido con las endonucleasas NdeI y BamHI al igual que el vector; en la tabla 9 se muestra la mezcla de reacción utilizada.

**Tabla 9.- Mezcla de reacción para la digestión del producto del PCR 3 .**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Buffer 2 10 X de NEB</b>	<b>1</b>
<b>DNA (producto de PCR 3)</b>	<b>4</b>
<b>BSA (NEB)</b>	<b>1</b>
<b>Nde I (20 000 u/mL)</b>	<b>1</b>
<b>BamHI (10 000 u/mL)</b>	<b>0.5</b>
<b>Agua</b>	<b>2.5</b>
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>

La ligación en el pET -3a se realizó usando el inserto y el plásmido digeridos con las endonucleasas antes mencionadas. Las reacciones de ligación se hicieron utilizando diferentes relaciones vector: inserto (Tabla 10).



**Tabla 10.- Condiciones de ligación en el vector pET-3a.**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
<b>Inserto digerido (5 ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>Vector pET-3a (5.3 ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>20</b>	<b>10</b>
<b>Amortiguador de la ligasa (10X)</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>T4 DNA ligasa (400,000 U/mL)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Agua</b>	<b>4</b>	<b>14</b>
<b>Volumen total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

Una vez realizadas las ligaciones se procedió a la transformación en células ultracompetentes de *E.coli* XL-gold las cuales se sembraron en cajas con medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). De las colonias transformantes, se seleccionaron ocho de ellas y se realizaron subcultivos de estas para extraer el DNA. Para asegurar la presencia del inserto en las colonias transformantes se realizó la digestión del plásmido con las enzimas NdeI y Bam HI (en el horno de microondas bajo las mismas condiciones antes mencionadas) y el producto se cargó en un gel de agarosa al 1% para observar la presencia del inserto y verificar su integridad.

Una vez más se realizó un nuevo cultivo en medio LB adicionado con ampicilina de las clonas portadoras del inserto, y de estas se extrajo el DNA y se secuenció para asegurar que el inserto se hubiera introducido de forma correcta.

### **6.1.3 Mutagénesis dirigida**

La mutagénesis dirigida es una técnica utilizada para la introducción de mutaciones puntuales en una cadena de DNA. Para que esta pueda llevarse a cabo se requiere de la síntesis de cebadores que contengan la mutación que se desea introducir, este iniciador, debe hibridar con el DNA que

contiene el gen de interés. Conforme la DNA polimerasa elonga toda la cadena esta incorpora la mutación en las cadenas hijas resultantes. Una vez realizada la elongación se lleva a cabo la digestión de la cadena de DNA parental (la cual no posee la mutación) con la endonucleasa Dpn I, y finalmente el producto de la digestión se transforma en células competentes de *E. coli* XL-gold. Para confirmar la presencia de la mutación, se debe secuenciar el DNA de las colonias transformantes.

Con el fin de generar nuevas mutantes de la región uno y dos de las triosafosfato isomerasas, se diseñaron los oligonucleótidos pertinentes para la introducción de mutaciones puntuales. La estrategia inicial a seguir para generar a estas nuevas mutantes fue primero enfocarse en una de las regiones por separado y ver el impacto que estos cambios generan en el patrón de reactivación. Una vez ubicados los aminoácidos que generen cambios importantes en cada una de las regiones (1 y 2) se realizarán otras mutantes puntuales sencillas o múltiples con estos aminoácidos.

En la región 1, se planteó en un inicio la introducción secuencial de las trece diferencias presentes en esta región. Para evaluar el impacto de estos cambios sobre la reactivación, la mutagénesis se llevó a cabo sobre la mutante TcTIM1;TbTIM2-8 la cual posee un porcentaje muy bajo de reactivación, se espera que al intercambiar los aminoácidos de TcTIM de la región 1 por los de TbTIM, la reacción de reactivación se vea favorecida.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la introducción de las primeras mutaciones de la región 1 se reportan en la tabla 11. La mezcla de reacción para realizar la mutagénesis de sitio dirigido se muestra en la tabla 12 y las condiciones de amplificación utilizadas se muestran en la Figura 9.

**Tabla 11.- Secuencia de cebadores utilizados para realizar la mutagénesis dirigida.**

Oligonucleótido	TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q)	TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S20Q)	TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S20Q,L21S)	TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S20Q,L21S, V23S)	TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S20Q,L21S, V23S)
<b>Fw</b>	5' AAG TGC CAA CGG CTC CCA GAG TT 3'	5' TGG AAG TGC AAC GGC TCC ACC CAG CA 3'	5' GCA AAC CTG GAA GTG CAA CGG CTC 3'	5' AAG TGC AAC GGC TCC AGC AGA G 3'	5' CTG GAA GTG CAA CGG CTC CCA GC 3'
<b>Rv</b>	5' GAG TGG TAC AAG CAA ACT CTG GG 3'	5' GAG TGG TAC AAG CAA CTG CTG GG 3'	5' TGG TAC AAG GCT CTG CTG GAG C3'	5' GAG CGT CTC GAT GAG TGG GCT AA 3'	5'AGC GTC TCG ATG AGT TCG CTA AG 3'

**Tabla 12.- Mezcla de reacción estándar para realizar la mutagénesis de sitio dirigido.**

Reactivo	Volumen (μL)
DNA parental (mutante TcTIM1; TbTIM2-8) (100 ng/μL)	1
Oligonucleótidos Fw y Rv (200 ng/μL)	2 + 2
Deoxinucleótidos trifosfatados (0.2 mM)	1
Amortiguador "termobuffer" 10X	5
DNA polimerasa Vent	1
H <sub>2</sub> O	38

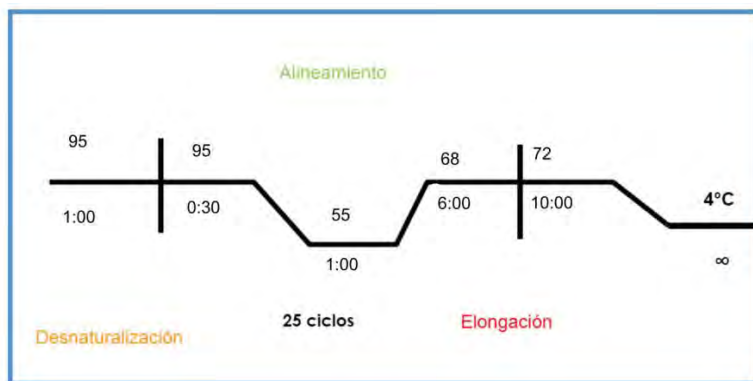


Figura 9.- Condiciones de amplificación para realizar la mutagénesis de sitio dirigido.

### Transformación en células de expresión

Se verificó que las secuencias de las construcciones fueran las correctas, y éstas se transformaron en células de sobreexpresión ultracompetentes de *E. coli* BL21DE3pLysS compatibles con el sistema de expresión pET-3a (Novagen).

### 6.2. Ensayos de sobreexpresión

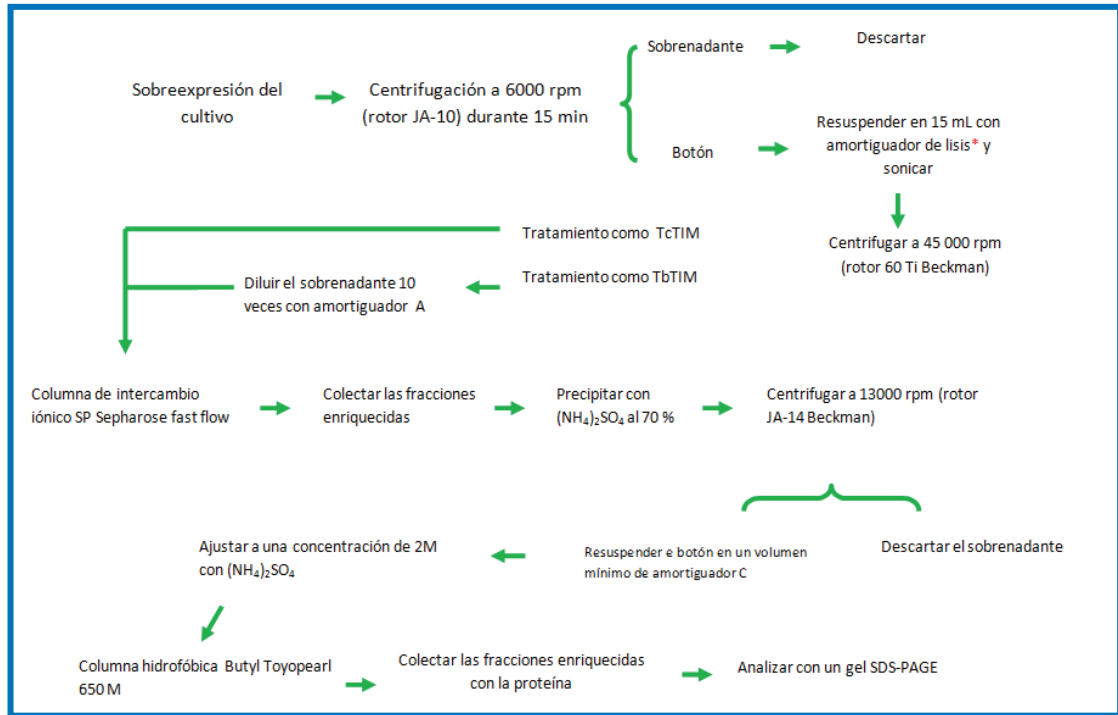
Una vez verificada la presencia de la construcción en las células BL21DE3pLysS, se realizaron ensayos de sobreexpresión para establecer las condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante. Para ello se realizó un precultivo, en medio LB líquido (10 mL) con ampicilina (100 µg/mL), el cual se incubó durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, con estas células se inició otro cultivo de 100 mL en medio LB líquido con ampicilina [100 µg/mL], al cual se le agregó la cantidad de inóculo suficiente, para que tuviera una densidad óptica de  $A_{600nm} = 0.1$  y se incubó a 37° C, hasta obtener una  $A_{600nm} = 0.8$ . Una vez alcanzada esta densidad óptica, se tomó una muestra de aproximadamente 100 µL y se guardó a 4° C. Enseguida el cultivo se indujo con IPTG 0.4 mM y se dividió en tres partes, cada parte se incubó a una temperatura distinta: 21, 30 y 37 °C. Se monitoreó la producción de la proteína tomando muestras a las 3 y 16 horas de incubación. Las muestras se etiquetaron y conservaron a 4° C. La producción de la proteína se analizó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes siguiendo la metodología descrita previamente por Schägger y Von Jagow., 1987.

### 6.3. Purificación de las mutantes

Antes de llevar a cabo la purificación de la enzima, se efectuó un ensayo para encontrar las condiciones más apropiadas para llevar a cabo la ruptura celular. Se probaron dos condiciones distintas como se describe a continuación:

A partir de los cultivos inducidos a diferentes temperaturas, las células se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos utilizando el rotor JA-10 de Beckman Coulter. Posteriormente, cada uno de los botones se dividió en dos partes, una parte se resuspendió en el amortiguador de lisis adicionado con NaCl (300 mM) y la otra parte se resuspendió en el amortiguador de lisis sin NaCl. Entonces se procedió a realizar la ruptura celular por sonicación (sonicador Sonifier 450 Branson) en 5 ciclos de 1 minuto, con intervalos de descanso de un minuto, a una potencia de 5 W. Se tomaron muestras de los lisados celulares, sobrenadantes, pastillas y se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Al conocer las condiciones óptimas para la obtención de cada enzima, se realizó la purificación correspondiente usando cromatografía líquida de desarrollo rápido. El protocolo utilizado se describe en la figura 10. La composición de los amortiguadores utilizados se reportan en el apéndice A.



**Figura 10.- Esquema de purificación de las mutantes de TcTIM y TbTIM.**

\* En el caso de TbTIM el amortiguador de lisis contiene NaCl 300 mM mientras que el amortiguador de lisis para TcTIM no contiene NaCl.

### 6.3.1 Purificación de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2

En un principio todas las mutantes recibieron un tratamiento con NaCl 300 mM al momento de llevarse a cabo la ruptura celular y se siguió el protocolo descrito en la figura 10. Sin embargo, en el caso de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2 se observó un comportamiento muy diferente con respecto al observado para el resto de las enzimas quiméricas previamente caracterizadas. Esta enzima quimérica siempre se encontró formando cuerpos de inclusión. Dicho comportamiento puede deberse a que la proteína no se está plegando de manera adecuada en la célula. Con el fin de incrementar la solubilidad de la proteína se decidió realizar la inducción de esta a una temperatura más baja, escalar el cultivo a volúmenes mayores y reducir la cantidad de inductor (Tabla 14, sección de resultados). También la purificación de esta mutante varió con respecto al protocolo reportado, ya que, tras la ruptura celular (en donde aumentaron los ciclos de 5 a 11 con descansos de 2 minutos entre cada ciclo) y la centrifugación a 45000 rpm, se hizo una precipitación con sulfato amonio al 40%, luego se resuspendió en 200 mL de amortiguador A (pH 6.3) (Apéndice A) y se dializó contra el mismo amortiguador. Tras realizar la diálisis, la parte

soluble se cargó en la columna de intercambio catiónico Source 15 S 5/50, y se separó con un gradiente de NaCl 0 a 500 mM en MES 100 mM pH 6.3 y las fracciones enriquecidas con la proteína se colectaron y se concentraron para separarse posteriormente en una columna de exclusión molecular Superose 12 10/300.

Con el objeto de facilitar la purificación de esta proteína se le añadió una etiqueta de hexahistidinas a la construcción original. Al realizar los ensayos de inducción, se observó que en todas las condiciones la proteína formó cuerpos de inclusión. La purificación de esta enzima etiquetada con histidinas se describe en la figura 11.

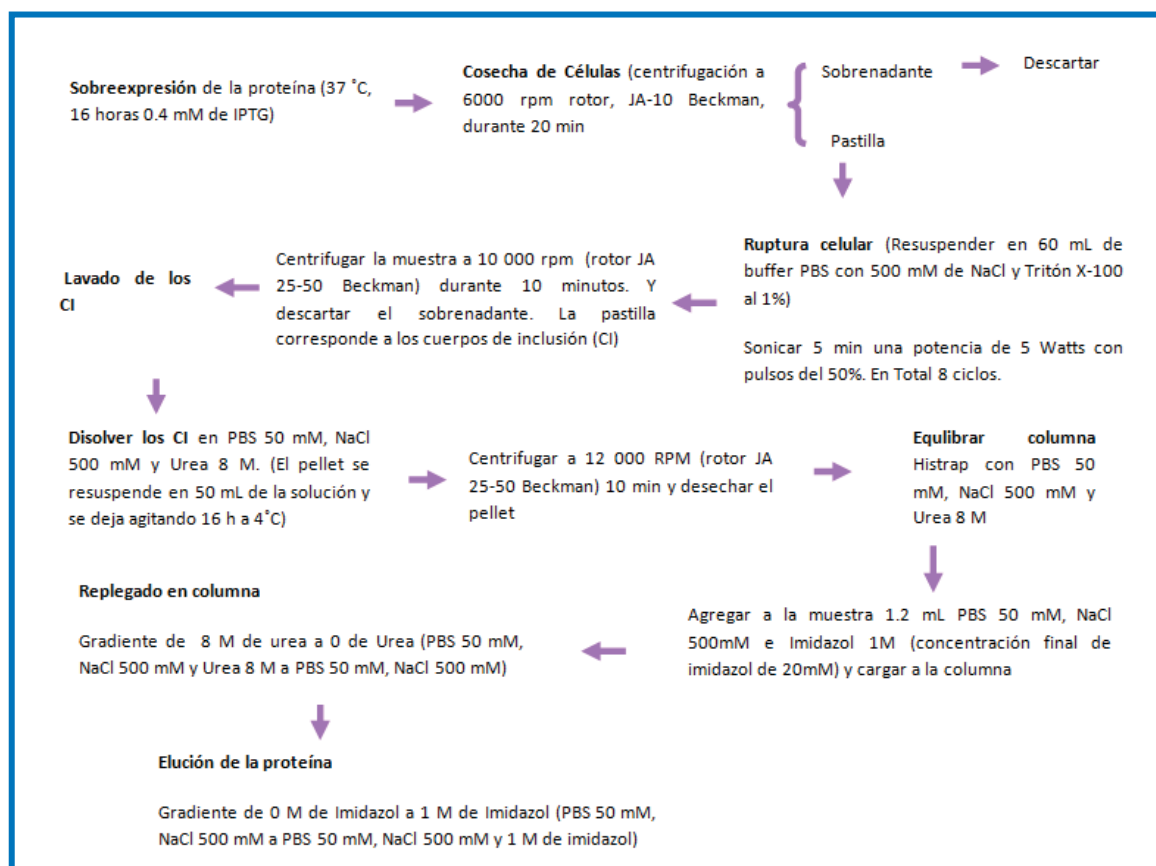
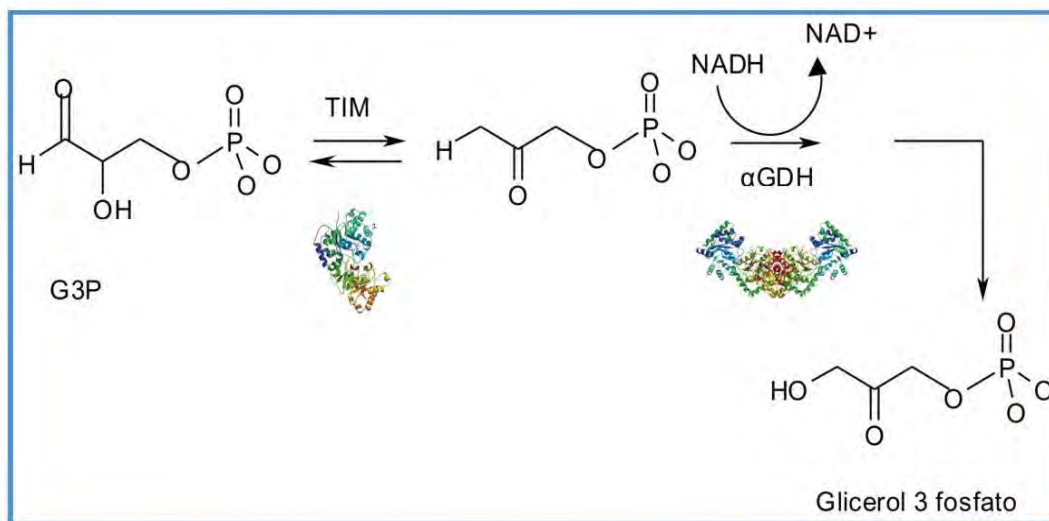


Figura 11.- Cuadro de purificación de la mutante TcTIM1,3-8 TbTIM 2 con etiqueta de histidinas

#### 6.4. Determinación de la actividad catalítica

La actividad catalítica de las enzimas se midió monitoreando la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup> en un ensayo acoplado a la enzima  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ GDH). La actividad de la TIM se

siguió en dirección de GAP a DHAP (figura 12). La cuantificación de la actividad se realizó utilizando 5 ng/mL de la proteína en la celda.



**Figura 12.-Ensayo acoplado de la TIM acoplada con la αGDH para determinar la actividad catalítica de la TIM.**

El cálculo de la actividad específica se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \left( \frac{\Delta OD}{\text{min} \cdot \epsilon \cdot 340 \cdot P \cdot l} \right) = \mu\text{mol/min mg}$$

En donde  $\Delta OD$  es el cambio de densidad óptica por minuto,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del NADH ( $6.22 \text{ mL}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$ ),  $P$  es la concentración de proteína utilizada en el ensayo ( $\text{mg/mL}$ ) y  $l$  es la longitud de paso de la luz de la celda ( $1 \text{ cm}$ ).

### 6.5. Caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM

La determinación de los parámetros cinéticos ( $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$ ) se efectuó mediante la cuantificación de la actividad (utilizando a la enzima a una concentración de  $5 \text{ ng/mL}$ ) realizando varios ensayos a diferentes concentraciones de sustrato (tabla 13). Las curvas obtenidas se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, obteniendo los parámetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  ajustando los datos al modelo de Michaelis-Menten mediante una regresión no lineal de los datos obtenidos con el programa Graph PadPrism5.



**Tabla 13.-Mezcla de reacción para la obtención de los parámetros cinéticos**

<b>[G3P] (mM)</b>	<b>Vol G3P(μL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O(μL)</b>	<b>Amortiguador TE (pH 7.4) (μL)</b>	<b>Enzima (ng)</b>
0.063	2.5	197.5	797.5	5
0.0759	3	197	797.5	5
0.1051	5	195	797.5	5
0.1261	6	194	797.5	5
0.25	12.5	187.5	797.5	5
0.5257	16.5	183.5	797.5	5
0.6325	25	175	797.5	5
1.265	50	150	797.5	5
1.385	65.86	134.14	797.5	5
2.103	100	100	797.5	5
3	152	48	797.5	5

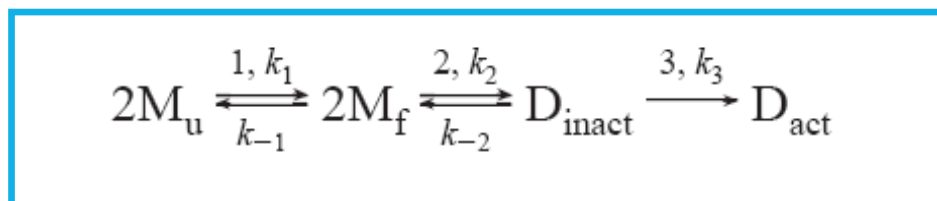
### **6.6. Ensayos de reactivación**

Las enzimas se incubaron a una concentración de 500 μg /mL con TEA 100 mM, EDTA 1 mM, GdnHCl 6 M y DTT 1 mM pH 7.4 a 25° C durante una hora para realizar su desnaturalización. Transcurrido este lapso de tiempo, la proteína se diluyó 100 veces (la dilución se efectuó en el amortiguador TEA 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM, pH 7.4) para realizar la reactivación y, a partir de esta dilución, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se les midió la actividad específica. La concentración de proteína durante la reactivación es de 5 μg/mL. En paralelo al ensayo de reactivación de la enzima problema, se realizaron dos controles, en el primero se incubó a la enzima con el amortiguador de actividad (TEA 100 mM y EDTA 1 mM y DTT 1 mM, pH 7.4) y en el segundo control se incubó a la enzima con la concentración residual de GdnHCl y

amortiguador TEA 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM a pH 7.4 (la concentración que queda tras diluir 100 veces, la cual en este caso es de 60 mM). Dichos controles se realizan con el fin de saber si existe una pérdida de la actividad específica de la proteína debida a la incubación a 25° C y el segundo control se realizó para determinar si la concentración residual de desnaturizante afecta a la reactivación de las enzimas y al sistema de medición (puesto que la medición de la actividad se realiza con un ensayo acoplado a otra proteína debemos saber si la concentración residual de GdnHCl afecta a la  $\alpha$ GDH). Al comparar las actividades específicas medidas de estos dos controles no se observa una diferencia, por lo que se puede concluir que, ni el sistema, ni la enzima son afectados por la concentración residual de desnaturizante.

### 6.7. Determinación de las constantes de velocidad de la reactivación de las mutantes de TcTIM y TbTIM.

Las constantes de velocidad se calculan a partir de gráficas de la actividad específica contra tiempo a diferentes concentraciones de proteína. En condiciones de estado estacionario la ecuación de Briggs-Haldane se puede utilizar para obtener las constantes de velocidad que describen al fenómeno de asociación de monómeros y el paso de dímero inactivo a dímero activo (figuras 13 y 14) (Zomosa., et al., 2003)



**Figura 13.- Secuencia de reacciones involucradas en la reactivación de TbTIM y TcTIM.**  $M_u$  se refiere a los monómeros desplegados,  $M_f$  a los monómeros plegados,  $D_{inac}$  a los dímeros inactivos y  $D_{act}$  a los dímeros activos. La primera reacción es unimolecular, el paso que describe la asociación de 2 monómeros plegados al dímero inactivo es una reacción bimolecular y la tercera reacción también es una reacción unimolecular. Modificado de Zomosa., et al (2003).

La ecuación de Briggs- Haldane (figura 14) describe la constante de velocidad observada para cualquier concentración de proteína, en donde K se encuentra definida por el siguiente cociente

$(k_2+k_3)/(k_2)$ . La constante de velocidad máxima observada es  $k_3$ . En las condiciones experimentales de trabajo,  $k_2 \ll k_3$  por lo que el valor de  $K$  es aproximadamente el cociente entre  $k_3/k_2$ .

Las constantes de pseudoprimer orden (asociada al fenómeno de transición del dímero inactivo a dímero activo) se obtuvieron a partir de la parte lineal de las gráficas de la aparición de la actividad en función del tiempo. A estos valores se les aplicó la función de logaritmo natural (ln) y éstos valores se graficaron contra el tiempo. La pendiente resultante de esta gráfica se define como la  $k_{obs}$  y se obtiene para cada concentración de proteína ensayada (figura 14).

$$k_{obs} = k_3[TIM][K/(1 + K[TIM])]$$

**Figura 14.- Ecuación Briggs-Haldane.**

Para obtener la constante de velocidad de segundo orden, los valores de  $k_{obs}$  se grafican contra la concentración del monómero. La gráfica obtenida se ajusta por regresión no lineal a una hipérbola rectangular, utilizando el programa GraphPad Prism 5.01. La constante de segundo orden se obtiene a partir el cociente entre los valores de  $(V_{max}/K_m)$ . Cabe mencionar que estas constantes no corresponden a las constantes cinéticas de Michaelis-Menten. En algunas mutantes puede observarse que las constantes de velocidad de pseudoprimer orden decaen conforme aumenta la concentración de proteína utilizada, por lo que el cálculo de la constante de segundo orden, solamente se lleva a cabo tomando en cuenta la parte lineal.

La forma de la curva hiperbólica describe los dos fenómenos limitantes relacionados con el replegamiento. A bajas concentraciones de proteína la velocidad de replegamiento se encuentra descrita por la asociación de los monómeros, mientras que a concentraciones altas, la velocidad se encuentra limitada por el paso del dímero inactivo a dímero activo.

## 6.8. Modelaje computacional de las mutantes de TcTIM y TbTIM

Se realizaron modelados computacionales de las mutantes de la triosafosfato isomerasa en los servidores Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>), I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) y Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>).

Los modelos se realizaron introduciendo sus secuencias polipeptídicas en los servidores antes mencionados; en seguida se menciona brevemente en que consiste cada uno de estos predictores de estructuras.

El predictor de estructura Robetta realiza la comparación mediante la fragmentación del polipéptido en dominios putativos utilizando para ello el protocolo de GinzU. El modelado lo hace por homología de estos dominios con dominios que se parezcan y que sean conocidos.

Para realizar el modelado el predictor I-Tasser primero busca secuencias de aminoácidos que posean estructuras supersecundarias similares a partir de una librería de archivos en formato PDB. Posteriormente, se genera un segundo análisis de fragmentación al cual se aplican simulaciones de Monte Carlo para tratar de unir los fragmentos en una estructura de modelaje.

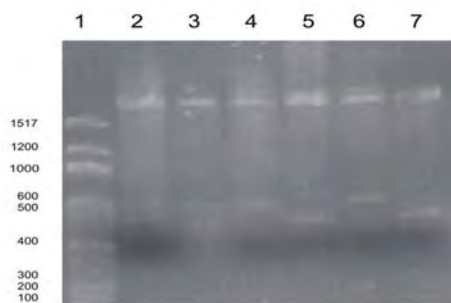
Por otro lado, Swiss-model es un predictor de estructura que se basa en el modelado por homología.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Construcción y clonación de las mutantes de la triosafosfato isomerasa

#### 7.1.1. Subclonación del grupo de mutantes sintetizadas comercialmente en el vector pET-3a

Los genes correspondientes a las enzimas quiméricas sintetizadas comercialmente (TcTIM2-8; TbTIM1, TcTIM1,3-8;TbTIM2 y TcTIM2;TbTIM1,3-8) se subclonaron en el vector pET-3a, al igual que los genes de las enzimas silvestres y las mutantes (TcTIM1;TbTIM2-8 y TcTIM1,2;TbTIM3-8). La figura 15 muestra la presencia de los insertos correspondientes en el vector pET-3a tras la digestión con las endonucleasas NdeI y BamHI.



**Figura 15.- Clonación de los insertos de las mutantes de TcTIM y TbTIM en el vector pET-3a.** Carril 1.- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de NEB. Carriles 2,3,4,5,6 y 7 .- digestión con NdeI y BamHI de TcTIM, TbTIM, TcTIM1;TbTIM2-8, TcTIM2-8;TbTIM1, TcTIM1,2;TbTIM3-8 y TcTIM2;TbTIM1,3-8, respectivamente.

#### 7.1.2 Construcción y amplificación del gen de la enzima quimérica TcTIM3-8;TbTIM1,2

La construcción del gen de la quimera TcTIM3-8; TbTIM1,2 se realizó en base a tres reacciones de PCR. La primera reacción se hizo utilizando el DNA de TbTIM como templado para amplificar las primeras 2 regiones (figura 16). La segunda reacción de PCR se utilizó para realizar la amplificación del resto del gen (regiones 3 a 8) usando como templado el DNA de TcTIM (figura 17). Y el tercer PCR fue utilizado para unir el gen.

```

atgtccaagccacaacccatcgcagcagccaactggaagtgcaacggctcccaacagtct
ttgtcggagcttattgatctgtttaactccacaagcatcaaccacgacgtgcaatgcgta
gtggcctccacctttgttcaccttgccatgacgaaggagcgtctttcacacccaaat
gtgattgcggcgcagaacgccattgcaaagagcggccttcaccggcgaagtctccctg
cccattcctcaaagatttcgggtgtcaactggattgttctgggtcactccgagcgcgcgca
tactatgggtgagacaaacgagattgttgccgacaagggttgcgcgcgcgttgetctctgt
ttcatggttattgcttgcacgcgaaacgctgcaggagcgtgaatcaggtcgcaccgct
gttgttgtgctcacacagatcgcctgctattgctaagaaactgaagaaggctgactgggccc
aaagttgtcatcgcctacgaacccgcttggggccattggtaccggcaagggtggcgacacca
cagcaagcgcaggaagcccacgcactcatccgcagctgggtgagcagcaagattggagca
gagtgcgcgggagagctccgcattctttacggcgggtctgttaatggaagaatgcgcgc
actctttaccaacagcagacgtcaacggcttccttgggtgggtgcctcacttaagcca
gaatttgtggacatcatcaaagccactcagtgatcttcttcatgtgtcaatgaggtttg

```

**Figura 16.- Secuencia nucleotídica de TbTIM.** La región resaltada en color amarillo muestra los nucleótidos que conforman a la región 1 y 2 y en color azul se muestra la región de alineamiento con el cebador (Tc3-8; Tb1,2 Rv)

```

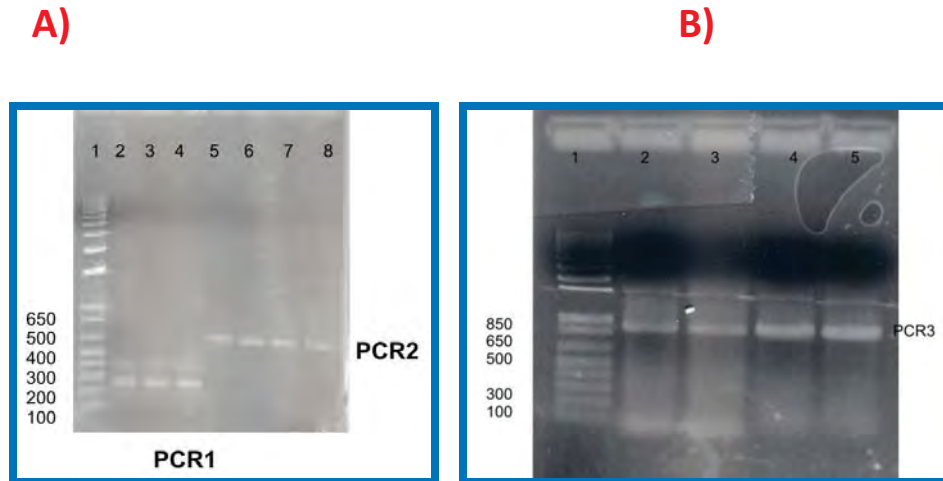
atggcatcgaagcctcaaccatcgcgcgcgcaactggaagtgcaacggctccgagagt
ttgcttgaccactcatcgagacgctcaatgcagcgcacttttgatcacgatgtgcaatgc
gtggttgcgcccactttctccacatcccaatgacgaaggcagaggctcaccaa
ttccagattgcccgcacagaacgcgatcacaaggctcggggcgttttcacggggggaagtctct
ctgcagatcctcaaggactatggaatcagctgggttgtgttggggccattcggaacggcgt
ttgtactacggcgaacgaacgaaatcgttgcggaaaagggtggcgcaggcctgcgctgcc
ggcttccatgtcatcgtctgtgttggcgaacccaacgaggagcgggaagctggcgcacg
gcagccgtcgtgttgacgcagctcgcgcgtgtcgcgcagaagcttagtaaggaggcgtgg
tctcgcgctgcttattgectacgagcccgtgtgggcaatcggcaccggtaaaagtggcaacc
ccgcagcaggcgcaggagggtccatgaattgctgcgcgcgttgggtgaggagcaaatgggc
actgacatcgcgcgcaactgcgcactcttgtatggcgggtccgtgaccgcaaaaatgca
cgcacgctatatcagatgcgcgacatcaacggcttccttgtggggcgggtgcctcgtcaag
ccggagtttgttgaatcattgaggccacgaagtag

```

**Figura 17.- Secuencia nucleotídica de TcTIM.** La secuencia resaltada en color amarillo indica las regiones 3 a 8 de TcTIM; destacado en color azul la región de empalme con el cebador (Tc3-8; Tb1,2Fw).

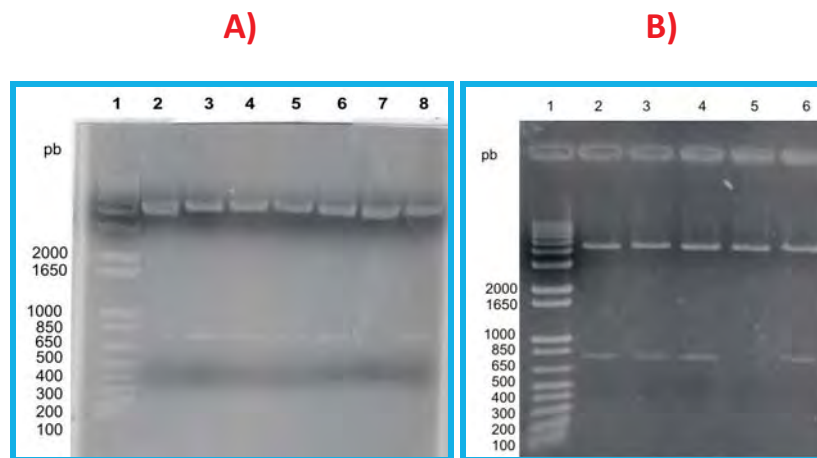
### Clonación en el vector pET-3a( Novagen)

En la figura 18 se muestran los productos de PCR<sub>1</sub>, PCR<sub>2</sub> y PCR<sub>3</sub> obtenidos durante la construcción del gen de la mutante TcTIM3-8; TbTIM1,2. Una vez purificado, el producto de PCR<sub>3</sub> se clonó en el vector pET-3a. En la figura 19 se muestra la digestión del DNA de diferentes clones con las endonucleasas NdeI y BamHI para buscar el inserto.



**Figura 18.- Amplificación de la mutante TbTIM1,2;TcTIM3-8.** *Gel A Carril 1.- Marcador de peso molecular (1 Kb ladder plus, Invitrogen), carriles 2, 3 y 4 producto de PCR1 (250 pb), carriles 5 a 8 producto de PCR 2 (650 pb).* *Gel B Carril 1.- Marcador de peso molecular (1 Kb ladder plus, Invitrogen). Carriles 2 a 5, productos de PCR3 (800 pb).*

Tras realizar la digestión de los DNAs de las colonias transformantes con las endonucleasas pertinentes, podemos ver que casi todas ellas son portadoras del inserto del peso molecular esperado excepto en el carril 5 del gel B (que no contiene inserto).



**Figura 19.- Transformantes de la construcción en pET-3a.** *Gel de agarosa al 1%. Gel A) Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen. Carril 2 a 8 digestión del DNA de las colonias transformantes con las endonucleasas BamHI y NdeI.* *Gel B) Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen. Carril 2 a 6 digestión del DNA de las colonias transformantes con las endonucleasas BamHI y NdeI.*

### **7.1.3 Mutagénesis dirigida**

La introducción de las mutaciones se realizó, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez obtenidas todas las construcciones de las quimeras y de las mutantes de la región 1 se realizaron los cultivos pertinentes para secuenciar el DNA y corroborar la incorporación adecuada de las mutaciones. En todos los casos la incorporación de las mutaciones fue exitosa.

### **7.2. Ensayos de sobreexpresión**

En general, las quimeras no presentaron problemas con su sobreexpresión; al variar algunas condiciones fue posible obtener proteína suficiente para realizar los ensayos. Sin embargo, se observó que la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2, aunque presentó un excelente rendimiento al sobreexpresarla en cualquier condición, en todos los casos la proteína producida formaba siempre cuerpos de inclusión, obteniéndose una cantidad muy pequeña en la parte soluble. En la tabla 14 se muestran las condiciones de sobreexpresión utilizadas para cada una de las proteínas.



Tabla 14.- Condiciones de sobreexpresión de las mutantes de las región 1 y 2

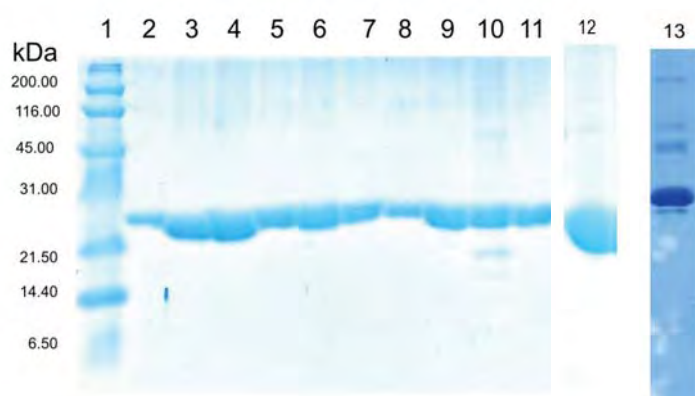
Mutante	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (horas)	[IPTG] mM	Rendimiento (mg/L de cultivo)
TcTIM	37	16	0.4	30 a 40
TbTIM	37	16	1	30
TcTIM1;TbTIM2-8	37	16	1	10
TcTIM2-8;TbTIM1	37	16	0.4	50
TcTIM2;TbTIM1,3-8	21	16	0.4	20
TcTIM1,3-8;TbTIM2	10	24	0.1	0.2 *
TcTIM1,2;TbTIM3-8	37	16	0.4	15
TcTIM3-8;TbTIM1,2	30	16	0.4	5
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q)	37	16	0.4	5
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q)	37 ó 30	16	0.4	2.5
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S)	30	16	0.4	66
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S)	17	16	1	1.8
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S,P23E)	37 ó 30	16	0.4	5

\* Proteína soluble obtenida a partir de 10 L de cultivo.

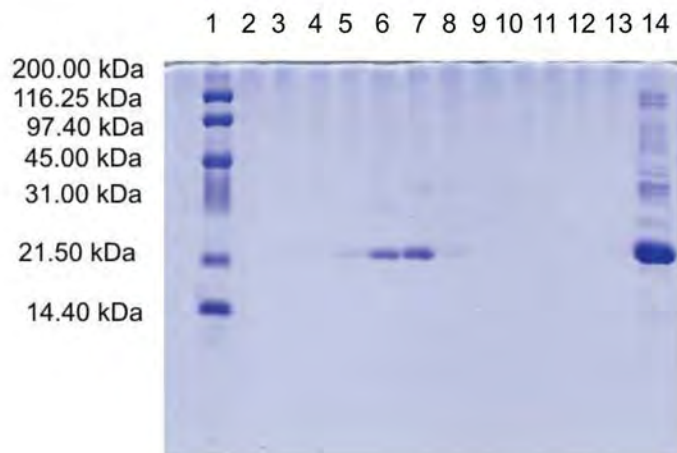
### 7.3 y 7.3.1 Purificación de las mutantes y purificación de la mutante TcTIM1,3-8; TbTIM2

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó como se describe en la figura 10. En un principio todas las mutantes recibieron un tratamiento con NaCl 300 mM al momento de llevarse a cabo la ruptura celular. En la figura 20 se pueden observar las proteínas que se han podido purificar exitosamente. En el caso de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2, como ya se mencionó anteriormente, se observó un comportamiento muy diferente con respecto al observado para el resto de las enzimas quiméricas. Al realizar la purificación de ésta con las modificaciones antes mencionadas (a partir de 10 litros de cultivo), no se logró obtenerla pura (figura 21) y además tuvo

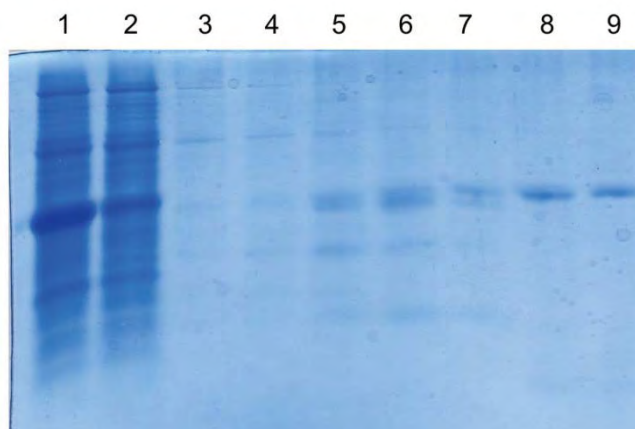
un rendimiento bajo. La medición de la actividad enzimática reveló que la proteína obtenida no se encontraba correctamente plegada ya que fue muy baja (28  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  de proteína). Por lo que se decidió probar la metodología descrita para la construcción de esta misma mutante con etiqueta de histidina para obtenerla a partir de cuerpos de inclusión. Al igual que en la metodología anterior, no se pudo obtener a la proteína completamente pura (figura 22) y tampoco se logró obtener un rendimiento adecuado ya que la mayoría de la enzima se precipitó en la columna de níquel al realizar el replegado. Tras concentrar a la proteína plegada, se le midió actividad enzimática y también resultó ser muy baja (31.8  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  de proteína).



**Figura 20.- Mutantes de TcTIM y TbTIM purificadas (gel SDS-PAGE 14%, sistema Von-Jagow).**  
*Carril 1.- Marcador SDS-PAGE Broad range (Bio-Rad). Carril 2.- TcTIM. Carril 3.-TbTIM. Carril 4.- Mutante TcTIM1; TbTIM2-8. Carril 5.-TcTIM1, 2; TbTIM3-8. Carril 6.- TcTIM2; TbTIM1, 3-8. Carril 7.- TcTIM2-8; TbTIM1. Carril 8. TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q) - Carril 9.- TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q) Carril 10.- TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S) Carril 11.- TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S,P23E). Carril 12.- TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S) Carril 13.- TcTIM3-8;TbTIM1,2.*



**Figura 21.- Purificación de la proteína TcTIM1,3-8;TbTIM2. (gel SD-PAGE al 12%, sistema Von Jagow).** Carril 1.- Marcador de peso molecular Carriles 2 a 13.- Fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular (superose 12 10/300). Carril 14.- Muestra original cargada en la columna.



**Figura 22.- Purificación de la proteína TcTIM1,3-8;TbTIM2 a partir de cuerpos de inclusión. (gel SD-PAGE al 12%, sistema Von Jagow).** Carril 1.- Cuerpos de inclusión disueltos con urea 8 M. Carril 2.- Primer eluido de la columna. Carriles 3 a 9.- Fracciones eluidas de la columna de afinidad his Trap.

Al calcular los parámetros físico-químicos teóricos de las enzimas quiméricas y de las mutantes de la región 1 mediante el programa Protparam en el servidor Expasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) se observa que no presentan una variación significativa de sus puntos isoeléctricos con respecto a los valores reportados para las enzimas silvestres (tabla 15).

**Tabla 15.- Puntos isoeléctricos de las mutantes de TcTIM y TbTIM**

<b>Quimera</b>	<b>Punto isoeléctrico</b>
TcTIM1;TbTIM2-8	8.91
TcTIM2-8; TbTIM1	8.87
TcTIM2;TbTIM1,3-8	9.22
TcTIM1,3-8;TbTIM2	8.32
TcTIM1,2;TbTIM3-8	9.08
TcTIM3-8;TbTIM1,2	8.65
TbTIM	9.08
TcTIM	8.64
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q)	9.08
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q)	9.08
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S)	9.08
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S)	9.08
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S,P23E)	8.91

#### **7.4 y 7.5. Determinación de la actividad catalítica y caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM.**

Al grupo de enzimas purificadas se les evaluaron sus parámetros cinéticos. En la figura 23 y tabla 16 se muestran los datos obtenidos. Como puede observarse los valores obtenidos para las proteínas recombinantes cambian ligeramente con respecto a los valores obtenidos para las enzimas silvestres. Tanto las afinidades de las enzimas por su sustrato como el número de recambio varían; sin embargo, estos cambios no son significativos como para considerar que la catálisis de las enzimas quiméricas se encuentra afectada.

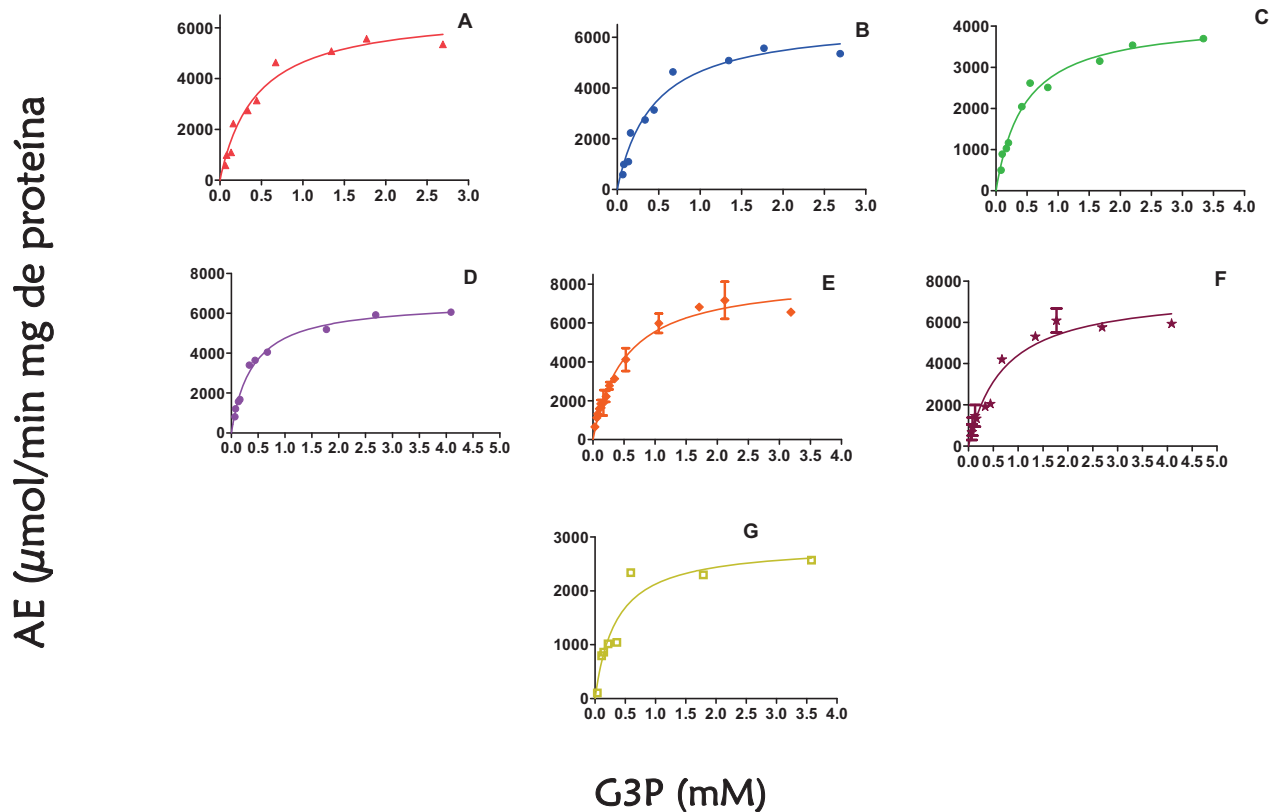


Figura 23.- Cinéticas de saturación de las mutantes de TcTIM y TbTIM. A.- TcTIM. B.- TbTIM C.- TcTIM1,TbTIM2-8. D.- TcTIM2-8;TbTIM1 E.- TcTIM2;TbTIM1,3-8 F.- TcTIM1,2;TbTIM3-8 G.- TcTIM3-8;TbTIM1,2. Para la obtención de los parámetros cinéticos se midió la actividad de las enzimas con concentraciones crecientes de sustrato.

Tabla 16.- Parámetros cinéticos de las enzimas quiméricas de TcTIM y TbTIM.

Enzima	$K_m$ (mM)	$K_{cat} \times 10^5 (\text{min}^{-1})$	$(K_{cat}/K_m) \times 10^7 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
<b>TcTIM</b>	0.4381	3.6	1.3
<b>TbTIM</b>	0.45	3.1	1.15
<b>TcTIM1;TbTIM2-8</b>	0.4556	2.28	0.83
<b>TcTIM2-8;TbTIM1</b>	0.3955	3.62	1.5
<b>TcTIM2;TbTIM1,3-8</b>	0.5100	4.5	1.47
<b>TcTIM1,2;TbTIM3-8</b>	0.7072	4.1	0.96
<b>TcTIM3-8;TbTIM1,2</b>	0.3462	5.7	1.65

## 7.6. Ensayos de reactivación

Al corroborar que las enzimas quiméricas presentaban un comportamiento cinético similar al de las enzimas silvestres se realizaron los ensayos de reactivación. Primero se realizó la reactivación de las enzimas silvestres y se observó que TcTIM se reactiva de manera más rápida y eficiente que TbTIM, lo cual está de acuerdo con lo descrito por Zomosa y colaboradores (2003) (figura 24). Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad recuperada en donde el 100 % de la actividad es la actividad del control con guanidina remanente.

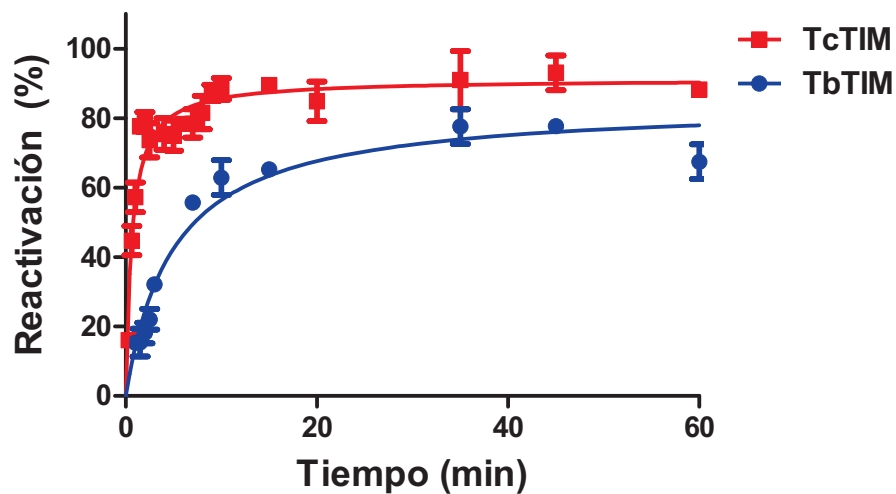
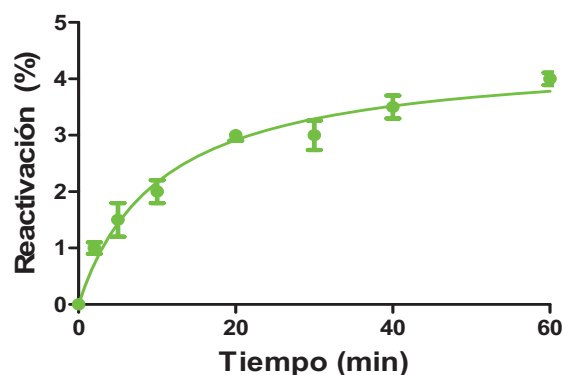


Figura 24.- Cinética de reactivación de las enzimas silvestres.

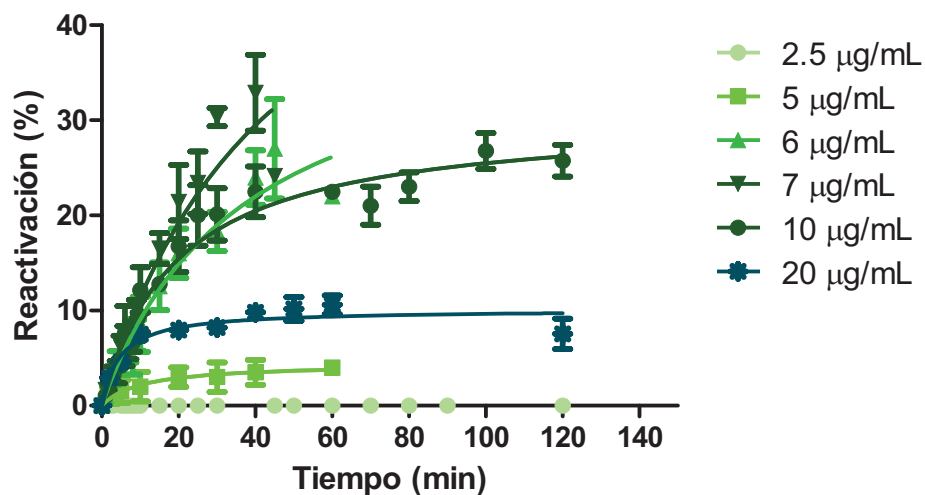
En la figura 24 se observa que TcTIM se reactiva con mayor rapidez y eficiencia que TbTIM. Durante los primeros 5 minutos de la cinética de reactivación TcTIM alcanza un 80% mientras que TbTIM en el mismo lapso se reactiva sólo un 30%. En ambos casos el valor máximo de la reactivación se alcanza aproximadamente a los 45 minutos. Una vez que los datos de los controles fueron reproducibles, se procedió a realizar la cinética de reactivación de la mutante TcTIM1; TbTIM2-8, figura 25.

Con el objeto de conocer el efecto de la concentración de proteína sobre la reactivación de esta quimera, se hicieron los experimentos con concentraciones menores y mayores de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (figura 26).



**Figura 25.-** Cinética de reactivación de la mutante TcTIM1;TbTIM2-8. La reactivación de esta mutante fue hecha a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína a pH 7.4 y 25° C.

A diferencia de las enzimas silvestres, la reactivación de esta mutante es menos eficiente y más lenta. El valor máximo de reactivación fue del 4% el cual se alcanza en un tiempo cercano a los 60 minutos. A las 24 horas reactivación el valor máximo obtenido no se modificó (datos no mostrados). Al realizar el experimento con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la proteína no se reactivó. Al aumentar la concentración de proteína, se observó una correlación entre la cantidad de proteína y la reactivación; ya que conforme aumentó la concentración de enzima la reactivación fue más eficiente hasta llegar a un límite en donde se observó la formación de agregados durante el experimento (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (figura 26).



**Figura 26.-** Cinética de reactivación de la mutante TcTIM1;TbTIM2-8 a diferentes concentraciones. Las concentraciones de proteínas utilizadas fueron 2.5, 5,6,7, 10 y 20 µg/mL la reactivación se hizo a pH 7.4 y 25°C.

La reactivación del resto de las mutantes de TcTIM y TbTIM también se llevaron a cabo como se describió anteriormente en la sección correspondiente de materiales y métodos. Las figuras 27 y 28 muestran las cinéticas de reactivación de estas mutantes. Todos los experimentos fueron realizados con una concentración de proteína de 5 µg/mL.



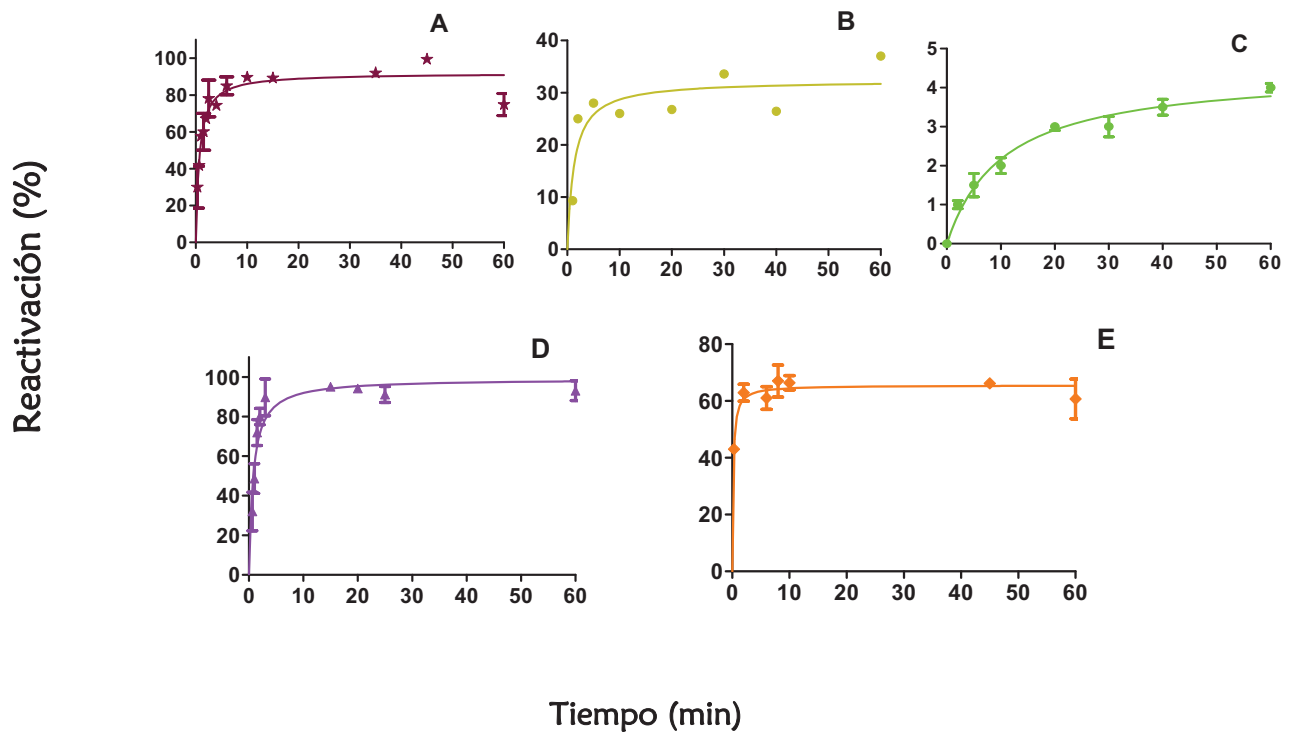


Figura 27.- Reactivación de la mutante las mutantes de las regiones 1 y 2 de TcTIM y TbTIM. A.- *TcTIM1,2;TbTIM3-8*. B.-*TcTIM3-8;TbTIM1,2* C.- *TcTIM1;TbTIM2-8* D.- *TcTIM2-8;TbTIM1* E.- *TcTIM2;TbTIM1,3-8*.

La mutante *TcTIM1, 2; TbTIM3-8* tuvo un comportamiento muy similar al de *TcTIM*, es decir se reactiva rápidamente y alcanza el mismo porcentaje que *TcTIM*, sin embargo, se observó una ligera pérdida de actividad al final del ensayo.

Por otro lado la mutante *TcTIM2;TbTIM1,3-8* presenta un comportamiento intermedio entre *TcTIM* y *TbTIM*. Durante los primeros minutos de la cinética es muy similar a *TcTIM*, es decir, se reactiva rápidamente, sin embargo el porcentaje de reactivación que alcanza al final de la cinética es similar al que presenta *TbTIM*.

La mutante *TcTIM2-8; TbTIM1* mostró un comportamiento diferente al observado en las otras quimeras ya que desde un inicio presentó un comportamiento similar al de *TcTIM*, es decir, su reactivación fue muy rápida e incluso más eficiente que la de *TcTIM* (durante los primeros minutos

esta se reactivo cerca del 100%, sin embargo, a los 60 minutos del ensayo su actividad disminuyo un 10 %) (figura 27).

En la figura 28 pueden observarse juntos todos los resultados obtenidos para las primeras cinco quimeras de las regiones 1 y 2. Los ensayos fueron realizados con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína a 25 °C a pH 7.4.

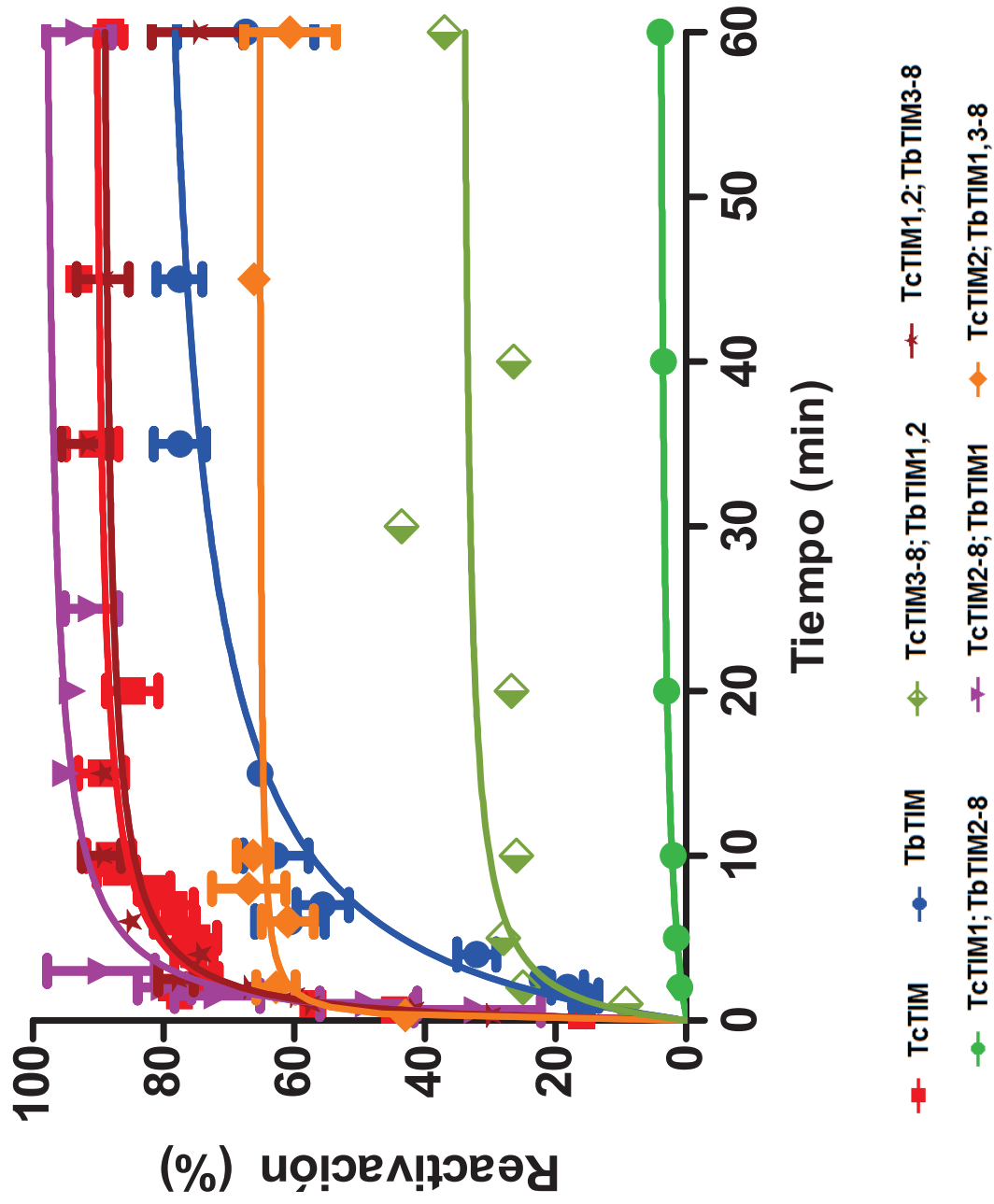


Figura 28.- Cinéticas de reactivación de las mutantes de las regiones 1 y 2

También se realizó el ensayo de reactivación con las cinco mutantes puntuales de la quimera de la región 1 TcTIM1;TbTIM2-8. Los resultados se muestran en la figura 29. Como puede observarse la inserción de la primera mutación, generó la recuperación de casi el 50% de la actividad (comparando con TbTIM), lo que muestra que el residuo en la posición 18 es importante para la reactivación. Los siguientes dos residuos (en posiciones 19 y 20) no parecen tener efecto sobre la reactivación, porque fue igual a la de la mutante de la posición 18. Sin embargo, la mutante con cuatro mutaciones (posiciones 18, 19, 20 y 22) presenta un decaimiento con respecto a la reactivación. Con el fin de verificar este resultado, el ensayo se realizó con dos lotes de enzima diferentes y, en ambos casos, se observó el mismo comportamiento. Esto nos indica que esta última mutación impide la reactivación de la proteína. Sin embargo, la enzima con cinco mutaciones (en las posiciones 18, 19, 20, 22 y 23) se reactiva igual que TbTIM. Esto indica que el amino ácido en posición 23 también es importante para la reactivación. Con respecto a la purificación de estas mutantes, también hay que mencionar, que todas tuvieron rendimiento muy bajo tras la sobreexpresión, en especial la mutante cuádruple la cual requirió una mayor cantidad de IPTG y diferente temperatura de expresión (tabla 14) a diferencia de la mutante quántuple que se comportó como las enzimas silvestres, pero, aun así, tuvo un rendimiento bajo.

#### **7.7. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las mutantes de TcTIM y TbTIM.**

Las constantes de velocidad fueron calculadas a partir de los gráficos de reactivación de la proteína a diferentes concentraciones (Figuras 30, 31, 32 y tabla 17).

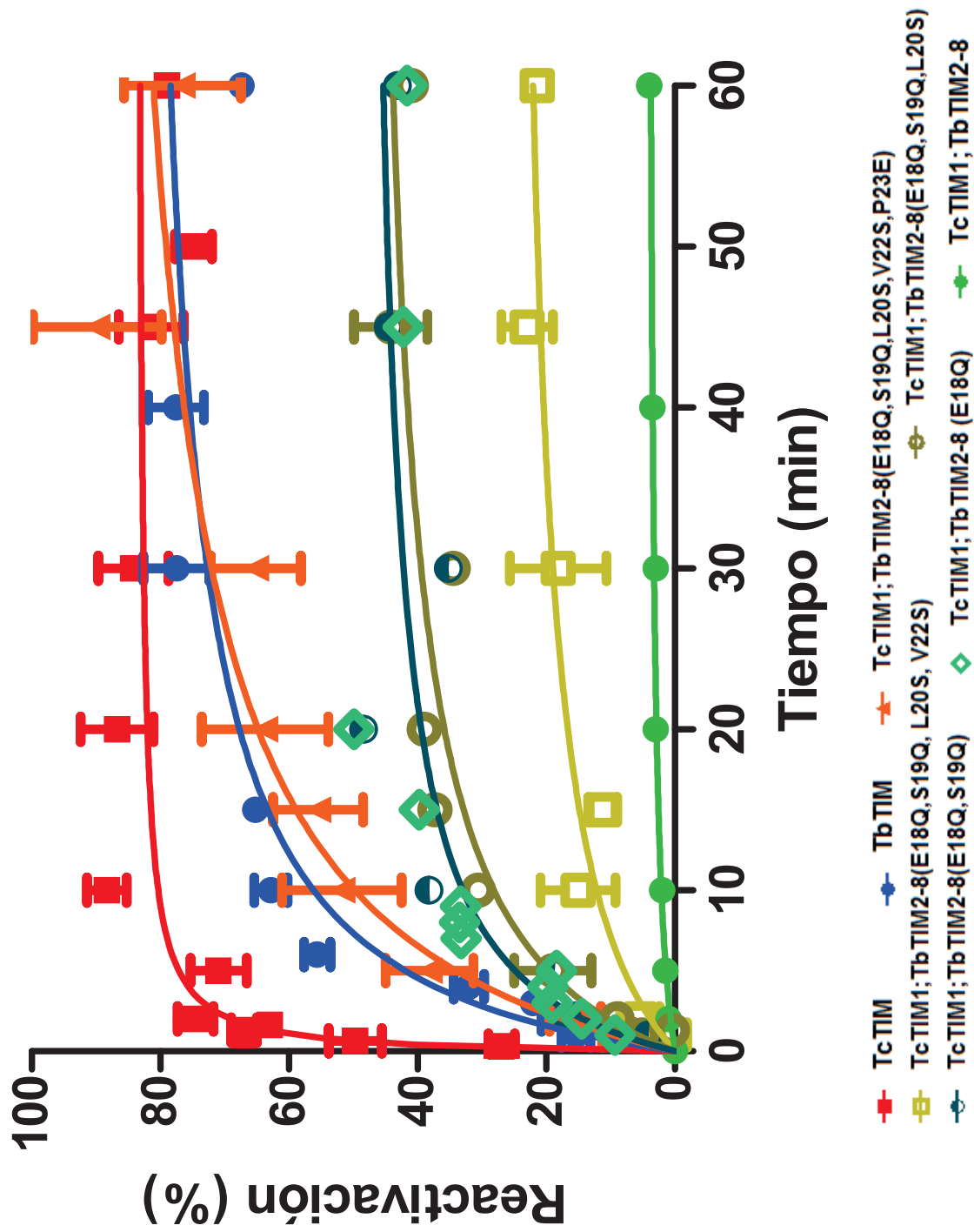


Figura 29.- Cinéticas de reactivación de las mutantes de las región 1

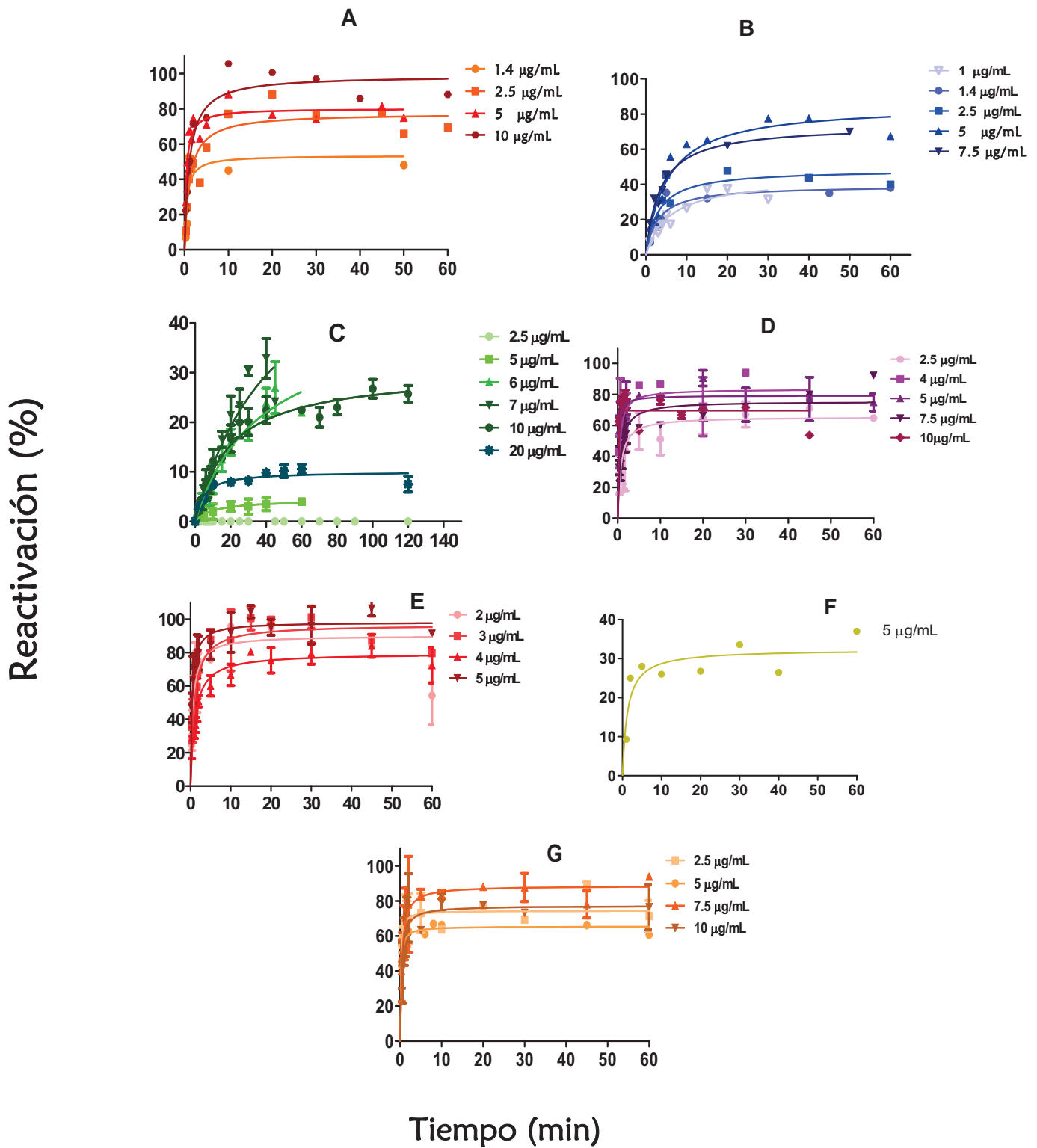


Figura 30.- Cinéticas de reactivación de *tbTIM*, *tcTIM*, y de las quimeras de las regiones 1 y 2 a diferentes concentraciones de proteína. A.- *TcTIM* B.- *TbTIM* C.- *TcTIM1;TbTIM2-8* D.- *TcTIM2-8;TbTIM1* E.- *TcTIM1,2;TbTIM3-8* F.- *TcTIM3-8;TbTIM1,2* G.- *TcTIM2;TbTIM1,3-8*.

Ln de AE

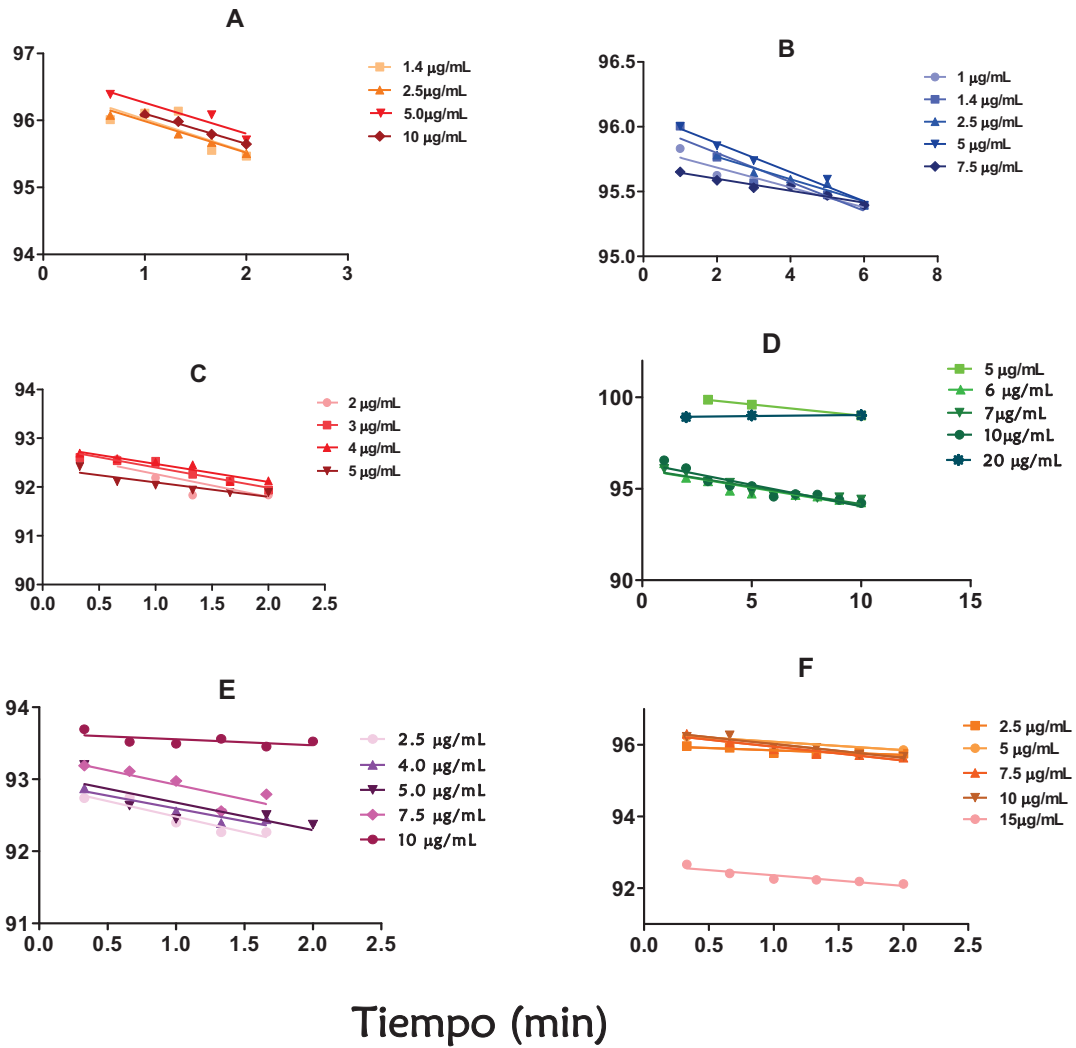
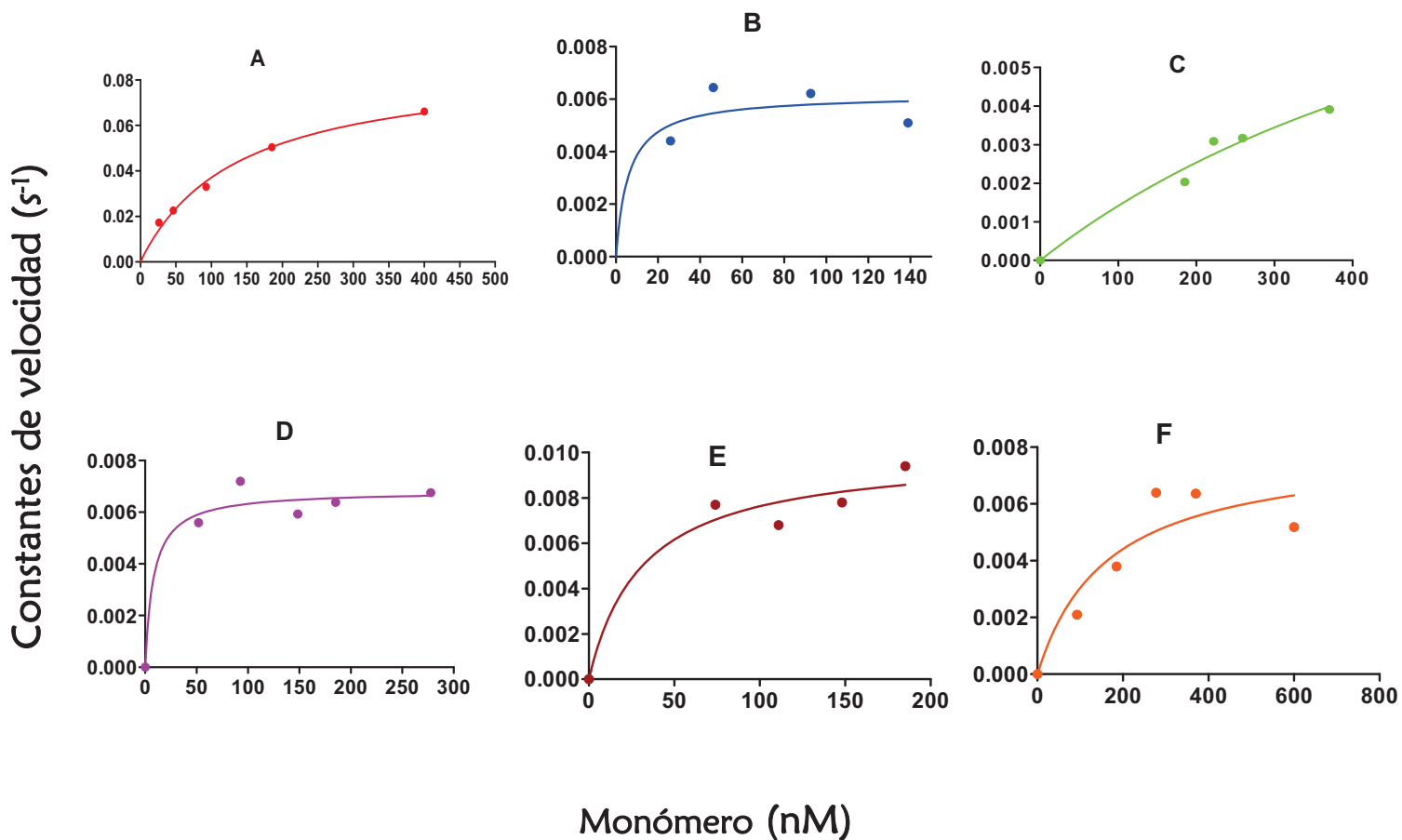


Figura 31.- Ln de la actividad específica de los primeros tiempos de reactivación contra tiempo. Las pendientes de esta familia de rectas describen las constantes de velocidad observadas a cada concentración. A.- TcTIM B.- TbTIM C.- TcTIM1,2;TbTIM3-8 D.-TcTIM1;TbTIM2-8 E.- TcTIM2-8;TbTIM1 F.- TcTIM2; TbTIM1,3-8.



**Figura 32.- Relación de las constantes de primer orden y la concentración de proteína.** Los valores de las constantes de velocidad observadas en la figura 31, se graficaron contra la concentración de proteína y mediante el ajuste teórico de las curvas a una hipérbola rectangular, se obtuvieron las constantes de segundo orden. A.- TcTIM B.- TbTIM C.- TcTIM1;TbTIM2-8 D.- TcTIM2-8;TbTIM1 E.- TcTIM1,2;TbTIM3-8 F.- TcTIM2;TbTIM1,3-8.



**Tabla 17.- Comparación de los valores obtenidos de las constantes de velocidad de reactivación de TcTIM y TbTIM a partir de las gráficas mostradas en las figuras 30, 31 y 32.**

Enzima	$K_2(M^{-1}s^{-1})$	$K_3 (s^{-1})$
TcTIM	$6.4 \times 10^5$	$8.7 \times 10^{-3}$
TbTIM	$1.36 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-3}$
TcTIM1,2;TbTIM3-8	$3.18 \times 10^5$	$9.4 \times 10^{-3}$
TcTIM1;TbTIM2-8	$1.59 \times 10^4$	$3.9 \times 10^{-3}$
TcTIM2-8;TbTIM1	$8.5 \times 10^5$	$6.5 \times 10^{-3}$

En el caso de las mutantes TcTIM1,TbTIM2-8 y TcTIM2-8;TbTIM1, se observa que a altas concentraciones de proteína estas se agregan, disminuyendo así su velocidad; por lo tanto, los puntos correspondientes a las concentraciones entre 300 y 400 nM del monómero no se tomaron en cuenta para el cálculo de la constante de segundo orden. Para el caso de la mutante TcTIM2-8;TbTIM1, el ajuste de hipérbola rectangular no se pudo construir con exactitud, ya que, incluso a concentraciones bajas (1.4 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la mutante es muy veloz y fue muy difícil lograr obtener puntos por debajo de una concentración de monómero 50 nM. En el caso de la mutante TcTIM3-8;TbTIM1,2 no se pudo realizar la reactivación a diferentes concentraciones ya que la proteína parece agregarse mientras es incubada a 25 °C (ambos controles con y sin Gdn HCl pierden actividad). Al realizarse la misma cinética con temperaturas más bajas como 16 °C la reactivación mejora, e incluso los controles presentan actividad (datos no mostrados).

### 7.8 Modelaje de las mutantes de TcTIM y TbTIM

Los modelados computacionales de las mutantes de la triosafosfato isomerasa se realizaron en los servidores Robetta, I-Tasser y Swiss-model. En las tablas 18, 19 y 20 se muestra un resumen de los resultados obtenidos. El programa Robetta, para cada una de las quimeras, arrojó 5 modelos, de los cuales, todos utilizaron como base el archivo PDB 2J27A (1.15 Å) (Tabla 18). El puntaje más cercano a 100 corresponde a la mayor similitud.

**Tabla 18.- Resultados del modelado de las mutantes en el servidor Robetta.**

Enzima	Puntaje (0 a 100)	Moldes
TbTIM	75.1	2J27A, 1NEYA, 2VXNA, 1NEYA, 1M6JA
TcTIM	78.52	2J27A, 1NEYA, 1M6JA, 2V5BA, 1MO0A
TcTIM1,3-8;TbTIM2	78.52	2J27A, 1MO0A, 1M6JA, 1M6JA, 1MO0A
TcTIM1;TbTIM2-8	73.4	2J27A, 1NEYA, 1NEYA, 1R2RA, 1R2RA
TcTIM2-8;TbTIM1	79.00	2J27A, 2VXNA, 1M6JA, 2DP3A, 1NEYA
TcTIM2;TbTIM1,3-8	75.15	2J27A, 1R2RA, 2DP3A, 1R2RA, 1R2RA
TcTIM3-8;TbTIM1,2	77.30	2J27A, 2V5BA, 2DP3A, 1NEYA, 2V5BA
TcTIM1,2;TbTIM3-8	81	2J27A, 1R2RA, 1R2RA, 1MO0A, 1R2RA

El servidor I-Tasser, en todos los casos, sólo generó un modelo para las mutantes. Al igual que Robetta, también en un principio se basó en varios códigos PDB de otras TIMs. Los puntajes logrados tras la comparación con estos archivos PDB fueron muy buenos (entre más cercano a dos es más parecido).

**Tabla 19.- Resultados del modelado de las mutantes en el servidor I-Tasser.**

<b>Enzima</b>	<b>Puntaje (-5 a 2)</b>	<b>Moldes</b>
TbTIM	1.93	1tpfA, 2j27A, 3m9yA, 3krsA, 1tpfA, 2dp3A, 1b9bB, 5timA, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM	1.968	1tpfA, 2vxnA, 3m9yA, 3krsA, 1amkA, 2dp3A, 1b9bB, 5tcdA, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM1,3-8;TbTIM2	1.964	1tpfA, 2vxnA, 3m9yA, 3krsA, 1amkA, 2dp3A, 1b9bB, 5tcdA, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM1,TbTIM2-8	1.973	1tpfA, 2vxnA, 3m9yA, 3krsA, 1amkA, 2dp3A, 1b9bB, lif2A, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM2-8;TbTIM1	1.945	1tpfA, 2j27A, 3m9yA, 3krsA, 1tpfA, 2dp3A, 1b9bB, lif2A, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM2;TbTIM1,3-8	1.938	1tpfA, 2j27A, 3m9yA, 3krsA, 1tpfA, 2dp3A, 1b9bB, 5timA, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM3;8TbTIM1,2	1.945	1tpfA, 2j27A, 3m9yA, 3krsA, 1tpfA, 2dp3A, 1b9bB, lif2A, 3m9yA, 1mo0A
TcTIM1,2;TbTIM3-8	1.937	1tpfA, 2vxnA, 3m9yA, 3krsA, 1amkA, 2dp3A, 1b9bB, 5timA, 3m9yA, 1mo0A

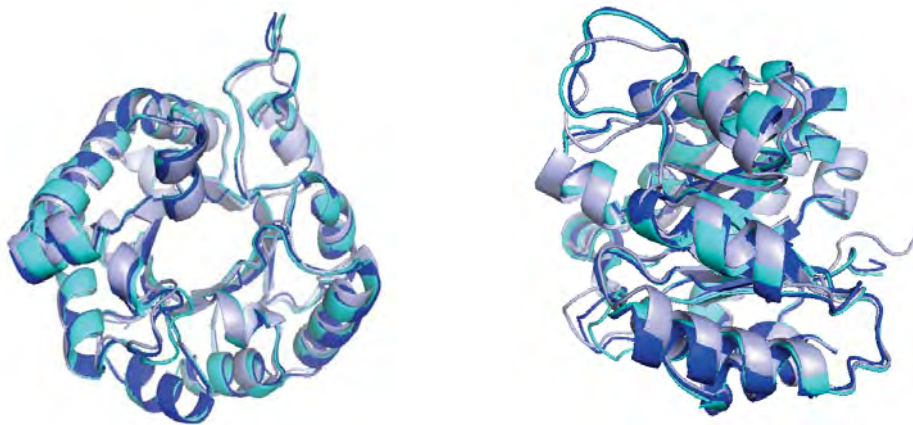
Cabe resaltar que para los servidores Robetta e I-Tasser, los modelos que se generaron, fueron modelos de un sólo monómero, a diferencia de los resultados de Swiss-model el cual generó mayoritariamente modelos diméricos.

Swiss-model, como se mencionó con anterioridad, solamente realiza el modelado con base en la homología con otros archivos PDB encontrados. En la tabla 19 podemos observar lo resultados obtenidos tras el modelado (entre más pequeños sean los errores reportados mayor homología existe).

**Tabla 20.-Resultados del modelado de las mutantes en el servidor Swiss-model.**

Enzima	Error	Molde
TbTIM	1.09e-122	[2j27B] (1.15 Å) Dímero
TcTIM	4.27e-136	[1tcdB] (1.83 Å) Dímero
TcTIM1,3-8;TbTIM2	1.29e-131	[1tcdB] (1.83 Å) Dímero
TcTIM1;TbTIM2-8	5.99e-116	[2j27B] (1.15 Å) Dímero
TcTIM2-8;TbTIM1	1.12e-129	[3q37C] (1.65 Å) Monómero
TcTIM2;TbTIM1,3-8	7.37e-122	[1tpfA] (1.80 Å) Dímero
TcTIM3-8;TbTIM1,2	2.27e-125	[3q37C] (1.65 Å) Monómero
TcTIM1,2;TbTIM3,8	5.10e-113	[2j27B] (1.15 Å) Dímero

Como puede observarse en la figuras 33 y 34 no existe gran variación entre los modelos generados para TbTIM por los tres servidores, ya que puede observarse que existe un empalme casi perfecto de todos los modelos. Una de las pocas diferencias que se pueden ver es el movimiento de las estructuras correspondientes a las asas catalíticas, sin embargo, podemos concluir que dichas variaciones no son relevantes ya que entre los distintos archivos PDB utilizados para realizar la comparación pueden existir aquellos realizados en presencia o ausencia de sustrato, lo cual podría estar generando estas variaciones en la posición de las asas. Con respecto al modelado de las enzimas quiméricas, tampoco se observa una diferencia clara entre ellas (figura 35).



**Figura 33.-Empalme de los modelos realizados por los tres servidores para TbTIM.** *En azul marino, se observa el modelo de I-Tasser, en gris el de Robetta y en cian el modelo de Swiss model.*



**Figura 34.- Empalme de los tres modelos generados por los tres servidores y el modelo cristalográfico de TbTIM (PDB 5TIM).** *En azul marino, se observa el modelo de I-Tasser, en gris el de Robetta, en azul claro el modelo de Swiss model y en amarillo la estructura del archivo PDB 5TIM.*



**Figura 35.- Empalme de los modelos computacionales generados de las enzimas quiméricas.** *En azul se muestra a TbTIM, en rojo TcTIM, en marrón a TcTIM1,2;TbTIM3-8, en naranja a TcTIM2;TbTIM1,3-8, en verde a TcTIM1;TbTIM2-8, en rosa a TcTIM1,3-8;TbTIM2, en morado a TcTIM2-8;TbTIM1 y en verde oscuro a TcTIM3-8;TbTIM1,2.*

## 8. DISCUSIÓN

El plegamiento de las proteínas se ha considerado como el último paso del dogma central de la biología molecular, en el cual el DNA codifica para un RNA que es traducido a proteína, la cual debe ser plegada de manera adecuada para poder alcanzar su forma funcional o nativa.

A pesar de tener un elevado grado de similitud estructural, las triosafosfato isomerasas de *T. cruzi* y *T. brucei* presentan diferencias en sus cinéticas de replegamiento tras haber sido desnaturalizadas con GdnHCl. En trabajos previos de nuestro laboratorio se encontró que las regiones 1 y 2 se encuentran altamente implicadas en esta diferencia de comportamiento (Vigueras–Meneses, 2010). El propósito del presente trabajo fue el profundizar en el estudio de la influencia de estas dos regiones en la reactivación de estas enzimas. Para ello se realizó el cambio de las regiones 1 y 2 de una TcTIM a TbTIM y viceversa; posteriormente se intercambiaron estas regiones en todas las combinaciones posibles, generando un total de seis mutantes de las regiones 1 y 2 (tabla 5). Una vez realizada la caracterización de este primer grupo de mutantes, se efectuó la mutagénesis dirigida de cinco de los residuos de la región 1 utilizando como DNA templado el de la mutante TcTIM1;TbTIM2-8.

La primera observación del comportamiento de las proteínas quiméricas fue que la cantidad de proteína producida variaba de manera considerable de una mutante a otra, e incluso las condiciones de inducción también resultaron ser diferentes (tabla 14). Esto quizá se deba al cambio de propiedades de las proteínas, lo cual se vio reflejado directamente en la alteración de estabilidad global debido a los cambios producidos tales como: polaridad, cambios en la capacidad de formación de estructura secundaria, variación en la formación de algún complejo o interacciones (Arun Konagurthu., *et al.*, 2012). En el caso de la mutante TcTIM1,-3-8; TbTIM2 es evidente que la proteína no se pliega de manera adecuada en la bacteria, generando así agregados no solubles. Es posible purificar estas enzimas en condiciones desnaturalizantes y se ha observado que el uso de ciertos aditivos puede favorecer el plegamiento *in vitro* (Arakawa y Tsumoto, 2003, Alibolandi y Hasan Mirzahoseini, 2011). En algunos casos, es posible recuperar completamente la actividad de la proteína (Rodríguez –Almazán *et al*, 2007, Kumar., *et al*, 2010). Sin embargo, esta estrategia no se probó con esta enzima, aunque, a futuro, puede ser una buena estrategia para intentar la reactivación de esta proteína.

También para evaluar si el efecto de los cambios generados en la producción de proteína soluble eran debidos a la carga neta de las proteínas se realizó el cálculo teórico del punto isoeléctrico de todas las mutantes mediante el programa Prot param (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Tabla 15) donde no se observó una diferencia importante con respecto a los valores reportados para las enzimas silvestres, por lo que es posible que la propensión de agregarse o disminución de proteína soluble tenga que ver directamente con la capacidad de adquirir cierta conformación tras ser sintetizadas, y no con las cargas superficiales.

La purificación de las enzimas quiméricas se realizó tal como se describe en materiales y métodos, con excepción de las mutantes: TcTIM1; TbTIM2-8 (E18Q, S19Q, L20S, V22S) y TcTIM1, 3-8; TbTIM2, las cuales no se pudieron purificar completamente (figuras 20, 21 y 22). La mutante cuádruple de la región 1 (TcTIM1; TbTIM2-8 (E18Q, S19Q, L20S, V22S)) presenta algunas impurezas que no pudieron ser eliminadas por el método de purificación de las proteínas antes descrito (figura 20); tal vez dicha situación se deba a que la cantidad de proteína obtenida era muy baja y por ello no se lograron saturar a las matrices utilizadas, lo cual favoreció el pegado inespecífico de varios contaminantes con características similares a la enzima. La mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2, también presentó problemas similares (figuras 21 y 22). Por el contrario, la mutante TcTIM1; TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S), presentó un excelente rendimiento de tal modo que ésta pudo ser purificada utilizando solamente la columna de intercambio catiónico Sp Sepharosa FF (Figura 20).

Al realizar la cuantificación de la actividad enzimática ninguna de las proteínas mostró inestabilidad ni tuvo pérdida de actividad tras ser incubada a 25°C durante una hora (con excepción de las mutantes TcTIM3-8;TbTIM1,2 y TcTIM1,3-8;TbTIM2). En general, no se observó una diferencia significativa en los parámetros cinéticos de las proteínas quiméricas, comparados con los valores reportados para las enzimas silvestres (García-Torres., *et al.*, 2011); es decir, que el intercambio de estas regiones no genera cambios drásticos en la función de la proteína. Las mutantes TcTIM1; TbTIM2-8 y TcTIM1,2;TbTIM3-8 presentan los valores más altos de  $K_m$ ; por otro lado, al comparar los valores de  $k_{cat}$ , se aprecia que éstos son mayores que los de las enzimas silvestres, con excepción de la enzima TcTIM1;TbTIM3-8 (tabla 16). Al evaluar el cociente  $K_{cat}/K_m$  se observa que la constante de especificidad de todas las enzimas es muy similar. En el caso de la mutante TcTIM1, 3-8; TbTIM2, se obtuvieron dos lotes, cada uno fue purificado con un protocolo distinto, sin embargo, al realizar la medición de la actividad enzimática de ambos lotes se



determinó un valor muy bajo (alrededor de 30  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  de proteína), lo cual podría indicar que la proteína que se obtiene no logra dimerizarse de manera adecuada, sin importar el método de purificación.

Como se sabe, el desplegamiento producido por desnaturalizantes químicos tales como la urea y GdnHCl, puede ser utilizado como una buena aproximación en el estudio de plegamiento *in vitro* (Pavorova., *et al.*, 2010). El mecanismo de cómo actúa el GdnHCl como desnaturalizante (en altas concentraciones), no se conoce por completo pero se propone que se debe a la solvatación preferencial de algunos de los componentes de la proteína.

Al realizar las cinéticas de reactivación de ambas enzimas silvestres se observó un cambio en el porcentaje máximo de reactivación con respecto al obtenido por Zomosa y colaboradores en 2003. En nuestro caso TcTIM se reactiva hasta un 90 % mientras que TbTIM alcanza un 70%, es decir, casi una diferencia del 10% en ambos casos. Lo cual quizás pueda ser debido a que la metodología de purificación de las enzimas es mucho más rápida y esto permite tener una proteína de mejor calidad o simplemente a la diferencia en los equipos utilizados durante la medición.

Al realizar un primer análisis del comportamiento de las mutantes durante su reactivación (tabla 21) podemos observar varias cosas, una de ellas es que la interacción entre la región 1 de TcTIM con la región 2 de TbTIM no favorece el plegamiento de las proteínas quiméricas. En las mutantes en donde se presenta esta combinación, su comportamiento ante la reactivación suele ser poco eficiente y la solubilidad de la de proteína recombinante es mucho muy baja. El replegamiento de la mutante TcTIM1; TbTIM2-8 es lento y tiene baja eficiencia, así como que la quimera TcTIM1,3-8;TbTIM2 no se pliega adecuadamente en el sistema de expresión bacteriano. Con el fin de mejorar la sobreexpresión de la proteína soluble de esta quimera (TcTM1,3-8;TbTIM2), se probaron una gran cantidad de estrategias entre las cuales se incluyeron la disminución de la temperatura de inducción y la concentración de agente inductor (Terpe., 2006), sin embargo, en la mayoría de los casos no se logró mejorar la cantidad de proteína soluble. Por otro lado, es necesario considerar que esta agregación pudiera ser debida a cambios en el uso de codones de la bacteria (Jana y Deb., 2005).

El comportamiento antes descrito para estas quimeras sugiere que los cambios que existen entre los residuos de la región 1 de TcTIM con los residuos de la región 2 de TbTIM conllevan a la

pérdida de comunicación entre ambas regiones y, a su vez, con el resto de la proteína, lo cual se traduce en la disminución del porcentaje de replegamiento. En cambio cuando la región 1 de TbTIM se combina con la región 2 de TcTIM, las mutantes se reactivan con mayor eficiencia. Por ejemplo, la mutante TcTIM2; TbTIM1,3-8 presentó un comportamiento intermedio entre TcTIM y TbTIM, es decir, que, a pesar de que se encuentra compuesta mayoritariamente por las regiones de TbTIM, ésta se pliega rápidamente (figura 28 y tabla 21) y el porcentaje de reactivación máximo es similar al que presenta TbTIM. En cambio, la mutante TcTIM2-8;TbTIM1, que comparte la misma combinación de regiones 1 y 2 pero que se compone en su mayoría por regiones de TcTIM, también se reactiva rápidamente pero el porcentaje máximo de reactivación que alcanza es similar al que presenta TcTIM. En ambos casos, se observa que el resto de la proteína (la secuencia local de aminoácidos) es la que define cuál es el tope de la reactivación que presentan (Anfinsen., 1973).

Los resultados anteriores sugieren que, aparentemente, los residuos de la región 2 están relacionados con la velocidad de reactivación de la enzima. Si se compara el comportamiento obtenido de todas las mutantes observamos que, aquellas que tienen la región 2 de TcTIM presentan una reactivación rápida (TcTIM, TcTIM<sub>1,2</sub>;TbTIM3-8, TcTIM2-8;TbTIM1 y TcTIM2;TbTIM1,3-8), mientras que en los casos en donde se tiene la región 2 de TbTIM la reactivación es lenta (TbTIM, TcTIM1;TbTIM2-8, TcTIM1,3-8;Tb2 y TcTIM3-8;TbTIM1,2).

Por otro lado, al observar el efecto de las mutantes cuyas regiones 1 y 2 tienen el mismo origen, es decir, las mutantes TcTIM<sub>1,2</sub>;TbTIM3-8 y TcTIM3-8;TbTIM1,2; la primera presenta un comportamiento tipo TcTIM, es decir: que se reactiva rápida y eficientemente, mientras que la quimera TcTIM3-8; TbTIM 1,2 sólo recupera un 40% de su actividad y, además, se reactiva lentamente como lo hace TbTIM (figura 28). En estos casos se observó que el cambio de las regiones 1 y 2 de TcTIM a una TbTIM generan una mutante muy eficiente, mientras que de la manera opuesta (cambio de regiones 1 y 2 de TbTIM a una TcTIM), afectan de manera importante a la proteína, haciéndola lenta y poco eficaz.

Lo anterior, nos indica que, el plegamiento *in vivo* se encuentra dirigido por el extremo amino terminal, e, *in vitro*, esta consideración se cumple. La formación rápida de interacciones locales, que sirven como sitios de nucleación en las regiones 1 y 2 parece ser uno de los puntos cruciales que determinan si el péptido se pliega o no (Levinthal., 1968, Rooman *et al.*, 2002). Por otra parte, las regiones 3 a 8 de la proteína parecen indicarnos el porcentaje máximo que se puede alcanzar

durante la reactivación, ya que, al ser un modelo cooperativo, es imposible descartar la influencia del resto de las interacciones que la proteína va construyendo con sus nuevos alrededores durante el proceso de replegado (Rooman *et al.*, 2002). Como es sabido, para cada proteína existen numerosas vías o caminos de plegamiento energéticamente accesibles o favorables que le permiten llegar a la estructura nativa; dentro de estos caminos se encuentran intermediarios que favorecen o que, en su defecto, impiden el plegamiento (Dill y Sun Chan 1997). De acuerdo a Chanez, 2002 y Zomosa 2003, una de las diferencias importantes entre las vías de plegamiento y desplegamiento de TcTIM y TbTIM, es que en TbTIM existe un intermediario que genera una reacción colateral durante el desplegamiento y replegamiento que lleva a la agregación de la proteína. Por lo anterior, es posible plantear que sólo el cambio de un par de residuos (o el cambio de interacciones locales) puede generar la preferencia por alguno de estos caminos de plegamiento, o simplemente generar un camino divergente; este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en diversos grupos de trabajo (Radford., *et al* 1992, Mirny y Shakhnovich., 1999, Martínez y Serrano 1999, Clarke., *et al* 1999 y McCallister., *et al* 2000).

Existen múltiples estudios en los que se propone la existencia de segmentos que dirigen el plegamiento, muchos de ellos se han hecho en una gran variedad de modelos proteicos los cuales tienen en común la existencia de un motivo estructural barril TIM (Satoshi y Akihiko, 2010, Rojsajakul *et al.*, 2004, Höker 2001.). Satoshi y Akihiko en el 2010 realizaron el estudio de la fragmentación de la fosforibosil antranilato isomerasa (la cual posee un motivo barril  $(\alpha/\beta)_8$ ) en varios módulos y observaron que la eliminación de algunos fragmentos cambia la capacidad que tiene la enzima para plegarse. Sus ensayos llegaron a la conclusión de que la escisión del amino terminal (los primeros dos módulos en conjunto o sólo el módulo uno, los cuales corresponden a nuestras regiones 1 y 2 respectivamente), genera un intermediario de plegamiento poco estable, que lleva hacia la agregación. Por otra parte, la escisión del extremo carboxilo terminal no genera cambio alguno en el patrón de plegamiento. Lo anterior demuestra la importancia de estas dos regiones como sitios iniciadores del plegamiento, incluso en modelos que no son TIMs, pero que comparten el motivo estructural. En otras investigaciones existe evidencia de algunas TIMs de otros organismos que prefieren comenzar su plegamiento por el extremo carboxilo terminal, como la TIM de conejo (Silverman y Harbury., 2002) así como la aldolasa de músculo de conejo (Pan y Smith., 2003), la cual también presenta un motivo barril  $(\alpha/\beta)_8$ .

Tabla 21 -. Comparación del comportamiento relativo de las enzimas quiméricas de TcTIM y TbTIM y de las mutantes puntuales de la región 1.

Enzima	% de reactivación	Velocidad aparente	Rendimiento (mg/L de cultivo)
TcTIM	90	Rápida	40 -50
TbTIM	70	Lenta	30
TcTIM1,2;TbTIM3-8	90	Rápida	15
TcTIM3-8;TbTIM1,2	25	Lenta	5
TcTIM1;TbTIM2-8	4	Lenta	10-15
TcTIM2-8;TbTIM1	100	Rápida	50
TcTIM2;TbTIM1,3-8	60	Rápida	20
TcTIM1,3-8;TbTIM2	0	No se pliega	0.02
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q)	40	Lenta	5
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q)	40	Lenta	2.5
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S)	40	Lenta	66
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S)	20	Lenta	1.8
TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S,V22S,P23E)	70	Lenta	5

Por otro lado, al revisar el efecto de las mutaciones puntuales sobre la región 1 en la quimera TcTIM1,TbTIM2-8 (Figura 29) se observa que la presencia de la primera mutación, genera un aumento en la reactivación de casi 10 veces con respecto el porcentaje alcanzado por la mutante predecesora TcTIM1;TbTIM2-8. Sin embargo, la velocidad con la que se reactiva es lenta, tal como

lo hace TbTIM y su mutante precursora (lo cual es algo esperado ya que, en ambos casos se observa la influencia de la región 2 de TbTIM).

Al revisar el comportamiento de las mutantes con dos y tres mutaciones (TcTIM1; TbTIM2-8 (E18Q,S19Q) y TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q, L20S)) vemos que presentan un comportamiento similar en la reactivación, sin embargo, en cuanto a la cantidad de proteína producida por litro de cultivo, la triple mutante dio un mejor rendimiento (completamente diferente al resto de las mutantes de la región 1). Esto parece indicar que, este residuo tiene como función el estabilizar a la proteína, a pesar de que este no se encuentra relacionado con la reactivación. La adición de la cuarta mutación parece generar una desestabilización en el sistema, lo cual se ve reflejado en la reactivación, ya que este cambio produce un decaimiento de casi un 50 % con respecto al valor de reactivación máximo alcanzado por las primeras tres mutantes (Figura 29). Finalmente, la adición de la quinta mutación parece corregir este problema, generando así a una mutante con las características de una enzima silvestre.

De las trece diferencias presentes en la región 1 se realizó la restitución gradual de los primeros cinco residuos de aminoácido por sus contrapartes en TbTIM, y, de estas mutaciones, al parecer sólo tres de ellas son las que tienen mayor efecto sobre la reactivación (E18Q, V22S y P23E). Aunque, al estar observando los efectos de mutaciones aditivas no podemos tener la seguridad de que los cambios en la reactivación sean debidos únicamente al cambio de estos tres residuos, y no a la interacción de los cinco con sus alrededores, esta observación se debería complementar con la mutación puntual de estos tres residuos únicamente.

El residuo 18 en TbTIM (19 en TcTIM) se sitúa al inicio de la hélice 1 y al final de el asa 1, lo cual le permite generar varios contactos con las hélices 1 y 3 de la otra subunidad y la hélice 2 de su propio monómero. La existencia de una glutamina en la posición 18 en TbTIM y un ácido glutámico en la misma posición en TcTIM genera una variación importante en el ambiente de la hélice 1, ya que se crea un decremento en los contactos formados entre las hélices 1 y 3 de la otra subunidad (Maldonado., *et al.*, 1998). En la tabla 22 se enlistan las interacciones de estos cinco aminoácidos con sus alrededores. En ambos casos la glutamina y el glutamato interaccionan con al ácido aspártico 85 del otro monómero y con la metionina 50 de la región 2 de la misma cadena polipeptídica. Además de lo mencionado anteriormente, el glutamato 19, presente en TcTIM, forma una interacción con otro de los residuos del segundo monómero (tirosina 87), el cual es uno de los residuos no conservados en TbTIM (presente en la hélice 3); al buscar esta misma

interacción de la glutamina en TbTIM con el residuo equivalente en esa posición (fenilalanina 86), la interacción no existe (tabla 22). En tamaño ambos residuos (glutamina y glutamato), son equiparables por lo que la diferencia observada en la reactivación quizá no tenga que ver con las distancias entre los aminoácidos, sino más bien en el tipo y cantidad de interacciones que estos pueden formar debido a su naturaleza. Por otro lado se puede observar que si existe una diferencia en la carga de estos aminoácidos; se ha observado que la disposición de grupos cargados al exterior de la proteína ayudan a estabilizarla mediante la generación de numerosas interacciones con otros grupos cargados mientras que la disposición de estos residuos en interiores hidrofóbicos la desestabiliza (Gromiha M., 2001) por lo anterior la presencia del glutamato en TcTIM podría favorecer el plegamiento por el tipo de vecindad que se forma en etapas tempranas del plegamiento a diferencia de lo que se observa en TbTIM.

Al parecer el glutamato es capaz de formar una mayor cantidad de interacciones con sus alrededores las cuales estabilizan a la enzima silvestre, sin embargo, cuando cambia el ambiente local de este, se genera la desestabilización de la proteína, esto quizás se deba a la formación de interacciones poco favorables con los nuevos aminoácidos vecinos, por ello al realizar el cambio del glutamato por la glutamina en el mutante TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q), se observa un aumento en la eficiencia del plegamiento de la enzima ya que la glutamina es capaz de formar los contactos propicios que ayudan a estabilizar a la proteína.

El cambio de la valina (residuo hidrofóbico) por la serina (residuo polar sin carga) genera un cambio significativo en la reactivación al provocar el abatimiento de ésta. A pesar de que ambos residuos presentan tamaños similares, el número de interacciones que forman cada uno con sus alrededores varía, debido a sus características particulares (tabla 21). Una de las diferencias importantes observadas es que la serina 22 forma varios contactos que la valina no realiza. Por ejemplo, uno de estos se forma con la arginina 54 (región 2), el cual resulta ser relevante, ya que este residuo establece una comunicación con otros residuos de la región 2, como la metionina 50 (residuo de interfase). Es posible que este tipo de contactos sean cruciales para establecer la ruta preferencial de plegamiento entre una enzima y la otra; quizá TcTIM no genera este tipo de contactos porque resultan ser perjudiciales en su ruta de plegamiento, mientras que TbTIM necesita realizarlos para estabilizar su estructura, sin embargo, esto solamente podría aclararse obteniendo las constantes fisicoquímicas (como el  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$ ) asociadas a este cambio de residuos.

Otra de las diferencias importantes en el patrón de reactivación es la que se genera debido al cambio de la prolina 23 por el glutamato. La presencia de la prolina 24 en TcTIM provoca un rearrreglo poco común en la hélice 1, produciendo un cambio a la altura de la vuelta correspondiente haciéndola 1.2 Å más larga que la equivalente en TbTIM (Maldonado, *et al.*, 1998). Esto produce una cavidad más abierta, lo cual podría estar generando una variación de los contactos que se forman con vecinos, aunado al cambio de la naturaleza de ambos residuos (aminoácido no polar vs aminoácido cargado).

**Tabla 22.-** Interacción de los residuos 19, 20, 21, 23 y 24 de TcTIM y 18, 19, 20, 22 y 23 de TbTIM con sus vecinos cercanos. Los datos se obtuvieron a partir de las coordenadas cristalográficas de los archivos PDB: 5TIM y 1CI1.

Residuo en TcTIM	Residuos cercanos a 3.2 Å	Residuos cercanos a 4 Å	Residuo en TbTIM	Residuos cercanos a 3.2 Å	Residuos cercanos a 4 Å
<b>Glutamato 19</b>	M51,V23, L21	M51,V23,L 22, Y87 y D86 (cadena B)	<b>Glutamina 18</b>	S22 y D85 (cadena B)	S20,L21,S22,E 27,M50, H <sub>2</sub> O 280 y D85 (cadena B)
<b>Serina 20</b>	P24,S18 y H <sub>2</sub> O 280	P24,S18, H <sub>2</sub> O 280 y L22	<b>Glutamina 19</b>	S17, L21, E23 y H <sub>2</sub> O 887	S17, L21,S22, E23 y H <sub>2</sub> O 887
<b>Leucina 21</b>	S18,L25 y P24	S18,L25,V23,P24 y E19	<b>Serina 20</b>	S17, L24 y H <sub>2</sub> O 813	S17,E18,S22,E23, L24 y H <sub>2</sub> O 813
<b>Valina 23</b>	E27y E19	E 27,E19,S20 L25 I26	<b>Serina 22</b>	Q18, S22 y D29	Q18,Q19,S20, S22, D29, L24, I25, R54 y H <sub>2</sub> O 809
<b>Prolina 24</b>	S20,T28 y H <sub>2</sub> O 299	S20, V23,L22,S20, L21, I26,E27, T28 y H <sub>2</sub> O 280	<b>Glutamato 23</b>	L21, Q19 y H <sub>2</sub> O 920	L21, I25,D26, L27,Q19, S20 y H <sub>2</sub> O 920

Durante el protocolo de reactivación de las enzimas el GdnHCl residual no tuvo influencia en el proceso de reactivación, ya que al comparar la actividad de ambos controles no existe una diferencia significativa. Se ha propuesto que, a bajas concentraciones (cerca de 100 mM), el GdnHCl ayuda a estabilizar a las proteínas, evitando la formación de interacciones electrostáticas con los grupos cargados de la superficie (Mona Alibolandi y Hasan Mirzahoseini, 2011).



## 9. CONCLUSIONES

La formación rápida de interacciones locales entre las regiones 1 y 2 es uno de los puntos cruciales que determinan el plegamiento de las TIMs de *T.cruzi* y *T.brucei*.

La comunicación de las regiones 1 y 2 con el resto de la proteína también genera un aporte importante al repliegamiento conservando la identidad de la proteína.

La región 2 es determinante en modular la rapidez con la que se reactivan las enzimas.

En el caso de TcTIM1;TbTIM2-8 las mutaciones aditivas de los residuos de 18, 22 y 23 permiten la recuperación de la capacidad de repliegamiento a los niveles que presenta la TbTIM silvestre después del tratamiento con GdnHCl.

Los contactos generados entre los primeros 5 residuos 18, 19, 20, 22 y 23 y sus alrededores parecen ser cruciales en el repliegamiento de TbTIM. El efecto producido por el cambio de estos 5 residuos genera una mutante deficiente (poco estable, difícil de expresar y purificar, catalíticamente poco eficiente y propensa a la agregación).

## 10. PERSPECTIVAS

- Continuar con la mutagénesis aditiva de la región 1.
- Realizar la mutagénesis puntual de los residuos 18, 22 y 23 para tratar de elucidar el papel de cada uno de estos residuos y también intercambiar estos residuos por aminoácidos con características distintas (como tamaño y polaridad).
- Purificar a la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2 en condiciones desnaturalizantes a partir de cuerpos de inclusión y buscar las condiciones para replegarla.
- Realizar la mutagénesis aditiva de la región 2.
- Intentar cristalizar las proteínas mutantes TcTIM1;TbTIM2-8 y TcTIM1;TbTIM2-8 (E18Q,S19Q,L20S, V22S, P23E). Llevar a cabo un análisis más detallado de las interacciones que forman los aminoácidos de interés y compararlos con las de las enzimas silvestres.
- Obtener los parámetros fisicoquímicos asociados al repliegamiento, mediante estudios de fluorescencia.

## 11. REFERENCIAS

- Albert T., Banner D., Bloomer A., Petsko G., Philips D., River P., Wilson I. (1981) On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **293**: 159-171.
- Alibolandi Mona y Mirzahoseini Hasan. (2011) Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochemistry Research International* **631607**:1-6.
- Anfinsen C. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**:223-230.
- Arakawa T., Tsumoto K. (2003) The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**:148-152.
- Ávila-Ríos S., (2001) Purificación y caracterización de las triosafosfato isomerasas mutantes de humano y levadura con una cisteína en la posición 14. Tesis de licenciatura en Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.
- Cháñez-Cárdenas M.E., Fernández-Velasco A., Vázquez-Contreras E., Coria R., Saab-Rincón G., Pérez-Montfort R. (2002) Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identificación of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **339**: 117-129.
- Clarke J., Cota E., Fowler S.B., Hamill S.J. (1999) Folding studies of immunoglobulin-like  $\beta$ -sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure* **7**: 1145-1153.
- Farber G.K., Petsko G.A. (1990) The evolution of  $\alpha/\beta$  barrel enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* **15**: 228-234.
- García Torres I. (2006) Producción y caracterización de una triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei* con la interfase de la triosafosfato isomerasa

de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.

- García Torres I., Cabrera N., Torres-Larios A., Rodríguez-Bolaños M., Díaz-Mazariegos S., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. (2011) Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *PlosOne* **6** e18791:1-12.
- Garza-Ramos G., Cabrera N., Saavedra-Lira E., Tuena de Gómez-Puyou M., Ostoa-Saloma P., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *European Journal of Biochemistry* **253**: 684-691.
- Gromiha M.M. (2001) Important inter-residue contacts for enhancing the thermal stability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry* **91**:71-77
- Hernández-Alcántara G., Garza-Ramos G., Mendoza-Hernández G., Gómez-Puyou A., 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 monomeric enzyme. *Biochemistry* **41**: 4230-4238.
- Höcker B., Beismann-Driemeyer S., Hettwer S., Lustig A., Sterner R. (2001) Dissection of a  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel enzyme into two folded halves. *Nature Structural and Molecular Biology*, **8**:32-36.
- Jana S y Deb J.K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**:289-298.
- Knowles J.R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**: 121-124.
- Konagurthu Arun S., Lesk Arthur M., Allison Lloyd. (2012) Minimum message length inference of secondary structure from protein coordinate data. *Bioinformatics* **28**:i97-i105.

- Kumar Kishore., Bhargava Prachi., Roy Uma. (2011) In vitro refolding of triosephosphate isomerase from *L.donovani*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**:1207-1214.
- Levinthal C. (1968) Are there pathways for protein folding? *Journal of Chemical Physics* **65**: 44-45
- Lolis E., Alber T., Davenport R. C., Rose D., Hartman F.C., Petsko G. A.(1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**: 6609-6618.
- Maldonado E., Soriano-García M., Moreno A., Cabrera N., Garza-Ramos G., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. (1998) Differences in the Intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology* **283**:193-203.
- Martinez J.C., Pisabarro M.T., Serrano L. (1998) Obligatory steps in protein folding and the conformational diversity of the transition state. *Nature Structural Biology* **5**: 721-729.
- McCallister E.L., Alm E., Baker D., (2000) Critical role of  $\beta$ -hairpin formation in protein G folding. *Nature Structural Biology*, **7**: 669-673.
- Mirny L.A., Shakhnovich E.I. (1999) Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *Journal of Molecular Biology* **291**: 177-196.
- Pan H., Smith D.L. (2003) Quaternary structure of aldolase leads to differences in its folding and unfolding intermediates. *Biochemistry* **42**:5713-5721.
- Povarova O.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. (2010) Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: Molten globule state and aggregates. *PlosOne*, **5e15035**:1-4.

- Radford S.E., Dobson C.M., Evans P.A. (1992) The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature*, **358**:302-307.
- Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Mendoza-Hernández G., López-Velázquez G., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. (2002) Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and nicked monomer. *Proteins* **48**: 580-590.
- Rodríguez-Almazán C., Torner F.J., Costas M., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. (2007) The stability and formation of native proteins from unfolded monomers is increased through interactions with unrelated proteins. *PlosOne* **6e497**:1-7
- Rojsajjakul T., Wintrose P., Vadrevu R., Matthews R.C., Smith D.L. (2004) Multi-state unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase, a TIM barrel protein: insights into the secondary structure of the stable equilibrium intermediates by hydrogen exchange mass spectrometry. *Journal of molecular biology* **341**:241-253.
- Rooman M., Dehouck Y., Kwasigroch J.M., Biot C., Gilis D. (2002) What is paradoxical about Levinthal paradox? *Journal of biomolecular structure and dynamics* **20**:327-329.
- Rozovsky S., Mc Dermott A.E. (2001) The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology* **310**: 259-270.
- Satoshi Akunuma y Akihiko Yamagishi. (2010) Roles for the two N-terminal ( $\beta/\alpha$ ) modules in the folding of a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel protein as studied by fragmentation analysis. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, **79**:221-231.
- Silverman J.A., Harbury P.B. (2002) Rapid mapping of protein structure, interactions, and ligand binding by misincorporation proton-alkyl exchange. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:30968-30975.

- Schagger and von Jagow. (1987) Tricine- sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**:368-379.
- Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**:211-222.
- Viguera-Meneses L. G., (2010) Caracterización de la cinética de reactivación de las quimeras de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Tesis de licenciatura en Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.
- Wierenga R.K., Noble M.E.M., Vriend G., Nauche S., Hol W.G.J. (1991) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-Ammonium sulphate: a comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *Journal of Molecular Biology* **220**: 995-1015.
- Zomosa-Signoret V., Hernández-Alcántara G., Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Garza-Ramos G., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez- Puyou A. (2003) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* **42**: 3311-3318.

## Apéndice A

### *Soluciones utilizadas:*

#### **Medio Luria Bertani (LB)**

Bacto triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 1%

Medio LB sólido

Adicionar con agar al 2% .

#### **Antibióticos:**

Ampicilina. Preparar una solución concentrada con 100 mg/mL, filtrar y almacenar a -20°C .

#### **Amortiguador, electroforesis de ácidos nucleídos en gel de agarosa.**

Amortiguador Tris-borato (TBE).		
Sustancia	Concentración (M)	Masa molecular (g/mol)
Ácido bórico	0.089	61.8
EDTA	0.002	380.2
Tris	0.089	121.14

#### **Solución concentrada para preparación de TBE:**

Para un litro

Tris base 54 g

Acido bórico 27.5g

EDTA 0.5 M (pH=8.0) 20mL

**Amortiguadores utilizados en la purificación de las enzimas:**

<b>Amortiguador de lisis adicionado con NaCl 500 mM de pH 6.3</b>		
<b>Sustancia</b>	<b>Concentración (mM)</b>	<b>Masa molecular (g/mol)</b>
mes	100	195.2
DTT	1	154.25
NaCl	500	58.44
EDTA	0.5	380.2
<b>Amortiguador de lisis pH 6.3</b>		
MES	100	195.2
DTT	1	154.2
PMSF	0.2	174.19
EDTA	0.5	380.2
<b>Amortiguador A pH= 6.3</b>		
MES	50	195.2
<b>Amortiguador B pH=6.3</b>		
NaCl	500	58.4
MES	50	195.2
<b>Amortiguador C pH7.4</b>		
Trietanolamina-HCl	100	185.6
EDTA	1	380.2
<b>Buffer D pH 7.4</b>		
Trietanolamina HCl	100	185.6
EDTA	1	380.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.2 M	132.1



Amortiguador de fosfatos pH 7.8		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	50	358.14
NaCl	500	58.44
Amortiguador de fosfatos con Urea pH 7.8		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	50	358.14
NaCl	500	58.44
Urea	8 M	60.06
Amortiguador de fosfatos e Imidazol pH 7.8		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	50	358.14
NaCl	500	58.44
Imidazol	1 M	68.08

#### Gel de poliacrilamida SDS von-Jagow

Sustancia	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
Acrilamida (30%) - bisacrilamida (1%)	400 µL	3 mL
Amortiguador Tris 3M, SDS 0.3 % pH 6.8	750 µL	3.5 mL
Glicerol (80%)	-----	1 mL
Agua destilada	1.85 mL	-----
Persulfato de amonio (10%)	25 µL	25 µL
TEMED	5 µL	5 µL

### Amortiguadores de electroforesis SDS

Sustancia	Amortiguador de cátodo	Amortiguador de ánodo
TRIS	0.1 M	0.2 M
Tricina	0.1 M	-----
SDS	0.1 %	-----

### Amortiguador TE (medición de actividad enzimática)

Sustancia	Concentración
Trietanolamina	100 mM
EDTA	10 mM