



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TITULO DE LA TESIS:

“CARACTERIZACIÓN DE MONOTcTIM UNA MUTANTE
MONOMÉRICA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Trypanosoma cruzi”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTADO POR:

P.Q.F.B. REYNA MIRIAM BASTIDA SANTOYO

ASESOR DE TESIS:

DR. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS

Morelia., Michoacán Junio 2012



Durante la realización de este trabajo tuve la grata experiencia de conocer, convivir y contar con la ayuda de numerosas y diferentes personas a las cuales les debo en gran parte de mi continuo desarrollo como persona íntegra en el aspecto educacional y personal.

Reyna Miriam Bastida Santoyo

AGRADECIMIENTOS

A MI DIOS

Por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

A MI MADRE ♠

GRACIAS por el apoyo, cariño y comprensión, que desde pequeña me brindaste, por guiar mi camino y estar siempre junto a mí en los momentos más felices.

A MI HIJO

Gracias, por la ternura de tu amor. Hoy me graduó, pero el esfuerzo y el mérito es de los dos. Quien me prestó el tiempo que le pertenecía para terminar y me motivó siempre con sus besos.

A CADA UNO DE MIS MAESTROS

Que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

A MI ASESOR DR. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS

Por permitirme ser parte del grupo de trabajo. Sus consejos, paciencia y opiniones sirvieron para que me sienta satisfecha en mi participación dentro del proyecto de investigación.

A LAS INSTITUCIONES

GRACIAS a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la oportunidad de formar parte de su Institución Educativa como estudiante. Este trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa.

*“No intentes ser una mujer de éxito.
Intenta ser una mujer de valor.”*

ALBERT EINSTEIN

CONTENIDO	Pagina
AGRADECIMIENTOS.....	3
CONTENIDO.....	6
LISTA DE TABLAS.....	35
LISTA DE FIGURAS.....	36
LISTA DE ABREVIACIONES.....	37
GLOSARIO DE TERMINOS.....	39
 Capítulo	
1.- RESUMEN.....	6
2.- INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Bioquímica.....	7
2.2. Proteína.....	7
2.2.1 Estructura.....	8
2.2.2 Función.....	11
2.2.3 Plegamiento.....	12
2.3. Triosafosfato isomerasa (TIM).....	12
2.3.1. Estructura.....	12
2.3.2. Función.....	13
2.3.3. Plegamiento.....	14
2.3.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM).....	15
3.- ANTECEDENTES.....	16
3.1. MonoTcTIM.....	16
4.- OBJETIVO.....	17
4.1 Objetivo General.....	17
4.2 Objetivo Específico.....	17

5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Preparación del medio Luria Bertani (LB).....	18
5.2 Obtención de la monoTcTIM.....	18
5.2.1 Sobreexpresión de la monoTcTIM.....	18
5.3 Purificación de monoTcTIM.....	18
5.4 Electroforesis.....	20
5.5 Cuantificación de la concentración de monoTcTIM.....	20
5.6 Caracterización de la monoTcTIM.....	21
5.6.1 Fluorescencia.....	21
5.6.2 Fluorescencia intrínseca.....	21
5.6.3 Fluorescencia extrínseca.....	21
5.6.4 Dicroísmo circular.....	21
6.- RESULTADOS.....	23
6.1 Caracterización de la proteína.....	25
6.1.1 Determinación de monoTcTIM por medio de su coeficiente de extinción molecular.....	25
6.1.2 Rendimiento de la purificación por litro de medio de cultivo.....	25
6.2 Estructura secundaria.....	25
6.3 Estructura terciaria.....	26
6.4 Desnaturalización térmica de monoTcTIM.....	27
7.- DISCUSIÓN.....	30
8.- CONCLUSIONES.....	31
9.- PERSPECTIVAS.....	32
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	33
11.- ANEXO.....	34

RESUMEN

En este trabajo se estudió la estructura y desnaturalización térmica de una mutante monomérica de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* denominada monoTcTIM. La proteína se purificó por medio de cromatografía de filtración. La estructura se caracterizó por medio de estudios de fluorescencia intrínseca y extrínseca. La desnaturalización se siguió por medio de cambios en la estructura terciaria a través de estudios de fluorescencia intrínseca y extrínseca como función de la temperatura. Se encontró que el protocolo de purificación permite la obtención de 0.375 µg por L de cultivo de monoTcTIM. Los estudios estructurales muestran que esta proteína está estructurada a pesar de las mutaciones que contiene, y tiende a agregarse a temperaturas mayores de 55°C, por lo que se caracterizó la parte de la desnaturalización que es reversible y se encuentra en el intervalo de 10 a 55°C. Este estudio es el primero en reportar la caracterización de la desnaturalización térmica de una mutante monomérica de la triosafosfato isomerasa.

INTRODUCCIÓN

2.1 BIOQUÍMICA

La bioquímica es la ciencia que estudia la base molecular de la vida. En los procesos vitales interaccionan un gran número de sustancias de alto peso molecular o macromoléculas con compuestos de menor tamaño, dando por resultado un número muy grande de reacciones coordinadas que producen tanto la energía que necesita la célula para vivir, como la síntesis de todos los componentes de los organismos vivos y la reproducción celular. (Murray y col., 2001). La bioquímica es el lenguaje básico de todas las ciencias biológicas. (ver Figura 1)



Figura 1. La bioquímica es un enfoque multidisciplinario que incluye la genética, la veterinaria y la medicina entre otras.

2.2 PROTEÍNAS

Las proteínas son biomoléculas muy abundantes en la naturaleza y son de vital importancia para la vida. Se encuentran formadas por residuos de aminoácidos, que son moléculas compuestas por carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y en algunos casos de azufre. (ver Figura 2). Las proteínas son las moléculas operadoras de las células y llevan adelante el programa de actividades codificado por los genes. (Lodish y col., 2003)

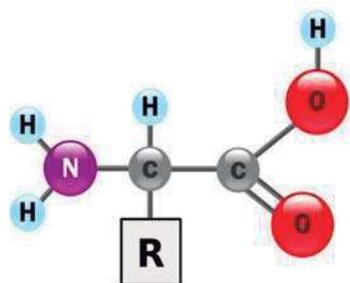


Figura 2. Representación de un aminoácido. La molécula está conformada por: Carbono (gris), Hidrógeno (azul), Oxígeno (rojo) y Nitrógeno (morado).

2.2.1. ESTRUCTURA

Los residuos de aminoácidos son la unidad mínima de una proteína. Distintas interacciones entre ellos en la secuencia lineal, en su mayor parte no covalentes, estabilizan una estructura tridimensional plegada que es específica para cada tipo de proteína. (Lodish y col., 2003)

Los 20 tipos de aminoácidos que se pueden encontrar en las proteínas se agrupan en tres categorías de acuerdo a su grupo o cadena lateral (R) como se observa en la Tabla 1:

Tabla 1. Los 20 aminoácidos proteínicos.

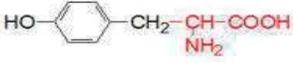
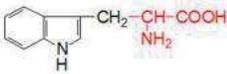
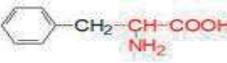
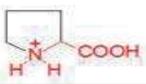
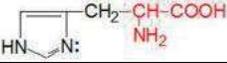
Nombre	Símbolo	Estructura	Polaridad
Glicina	Gly - G	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{COOH}$	Polar
Serina	Ser - S	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar
Treonina*	Thr - T	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar
Cisteína	Cys - C	$\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar
Glutamina	Gln - Q	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar
Asparagina	Asn - N	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar
Tirosina	Tyr - Y		Polar
Alanina	Ala - A	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	No polar
Valina*	Val - V	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	No polar
Leucina*	Leu - L	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	No polar
Isoleucina*	Ile - I	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	No polar
Metionina*	Met - M	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	No polar
Triptofano*	Trp - W		No polar
Fenilalanina*	Phe - F		No polar
Prolina	Pro - P		No polar
Ácido Aspártico	Asp - D	$\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar (-)
Ácido Glutámico	Glu - E	$\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar (-)
Arginina	Arg - R	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar (+)
Lisina*	Lys - K	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Polar (+)
Histidina*	His - H		Polar (+)

Tabla 1. Los 20 aminoácidos proteínicos. Aminoácidos con grupo Alifático (Gly, Ala, Val, Leu, Ile. Aminoácidos no Aromáticos con grupo -R (Ser y Thr). Aminoácidos con Grupo -R que contienen azufre (Cys y Met). Aminoácidos ácidos y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln.

Aminoácidos Básicos (Arg, Lys, His). Aminoácidos Aromáticos (Phe, Tyr, Trp). Iminoácido (Pro). Los * marcan a los aminoácidos esenciales.

Una proteína es un polímero lineal de residuos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos (ver Figura 3), que se forman entre el grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente. (Lodish y col., 2003)

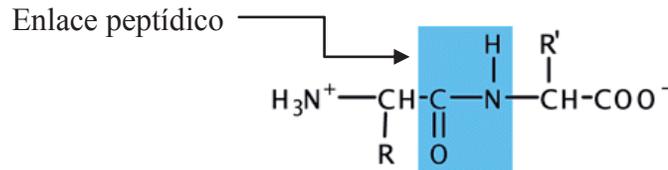


Figura 3. Un enlace peptídico está formado entre el grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino de otro.

La secuencia polipeptídica se puede representar por medio de un código de tres letras para los aminoácidos:

Lys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asn-Try-

Aunque también hay un código de una letra (ver Tabla 1) para identificarlos por ejemplo:

K-V-F-G-R-C-Q-L-A-A-A-M-K-R-H-G-L-D-N-Y-

Estructura primaria

La estructura primaria de las proteínas se refiere a la secuencia de aminoácidos, es decir la combinación lineal de los aminoácidos mediante el enlace peptídico. La estructura lineal definirá en gran medida las propiedades y niveles de organización superiores de la proteína. Este orden es consecuencia de la información contenida en el material genético. Cuando se produce la traducción del ARN se obtiene el orden de los aminoácidos que van a dar lugar a la proteína en cuestión. Se puede decir, que la estructura primaria de las proteínas no es más que el orden de aminoácidos que la conforman. (ver Figura 4 A) (Lodish y col., 2003)

Estructura secundaria.

La estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre los átomos de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos. Los tipos de estructuras secundarias más comunes son la hélice alfa y la lámina beta. (Lodish y col., 2003)

Hélice alfa

Los aminoácidos en una hélice α están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira, con 3.6 residuos de aminoácidos por vuelta. Cada aminoácido supone un giro de unos 100°

en la hélice y los carbonos α de dos aminoácidos contiguos están separados por 1.5Å. La hélice está estrechamente empaquetada, de forma que no hay espacio libre dentro de la misma. Todas las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas hacia el exterior de la hélice. El grupo amino del aminoácido (n) en el enlace peptídico establece un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo del aminoácido (n+4). De esta forma, cada aminoácido (n) de la hélice forma dos puentes de hidrógeno uno con el aminoácido en (n+4) y otro con aquel en (n-4). En general en una α -hélice hay un total de 7 enlaces de hidrógeno por vuelta. (ver Figura 4 A) (Lodish y col., 2003)

Lámina beta

La lámina beta se forma por el posicionamiento paralelo de dos partes de la cadena de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos amino de una de las partes forma enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo de la otra. Es una estructura muy estable. Las cadenas laterales de esta estructura están posicionadas sobre y bajo el plano de las láminas. Dichos sustituyentes no deben ser muy grandes, ni crear un impedimento estérico, ya que se vería afectada la estructura de la lámina. (ver Figura 4 B) (Lodish y col., 2003)

Estructura terciaria

Es el modo en que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio, es decir, cómo se adopta la estructura tridimensional de una determinada proteína, ya sea globular o fibrosa. Es la disposición de los dominios en el espacio. La estructura terciaria se realiza de manera general de forma que en las proteínas globulares los aminoácidos apolares se sitúan hacia el interior y los polares hacia el exterior de la proteína en medio acuoso. Esto provoca una estabilización por interacción hidrofóbica, de fuerzas de van der Waals y de puentes disulfuro (enlace covalentes, entre aminoácidos de cisteína convenientemente orientados) y mediante enlaces iónicos. (ver Figura 4 C) (Lodish y col., 2003)

Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas, conforman un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes. En general dichas subunidades se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes, como pueden ser puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos. Para el caso de una proteína constituida por dos monómeros, es decir un dímero, éste puede ser un homodímero, si los monómeros constituyentes son iguales, o un heterodímero si son desiguales. (ver Figura 4 D) (Lodish y col., 2003)

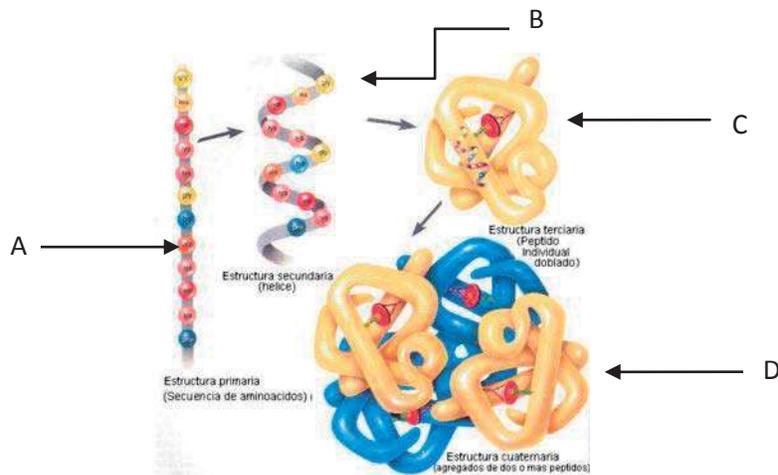


Figura 4. Niveles de organización de las proteínas. (A) Estructura primaria es la secuencia de una cadena de aminoácidos. (B) Estructura secundaria ocurre cuando los residuos de aminoácidos en la secuencia interactúan a través de enlaces de hidrógeno aquí se encuentra una α -hélice. (C) Estructura terciaria ocurre cuando ciertas atracciones están presentes entre los elementos de estructura secundaria (D) Estructura cuaternaria se presenta cuando una proteína consiste de más de una cadena de aminoácidos.

2.2.2. FUNCIÓN

La función de casi todas las proteínas depende de su capacidad para unir otras moléculas conocidas como ligandos. Los sitios de unión para éstos están ubicados sobre las proteínas y los ligandos correspondientes, son complementarios desde los puntos de vista químico y topológico con la proteína. La afinidad de una proteína por un ligando en particular se refiere a la fuerza de la unión y la especificidad, por lo que es solo para unos pocos de ellos.

Las enzimas son proteínas catalíticas que aceleran la velocidad de las reacciones celulares, al disminuir la energía de activación y estabilizar los intermediarios de estado de transición. Los sitios activos de las enzimas comprenden dos partes funcionales: una región de unión con el sustrato y una región catalítica. Los aminoácidos que componen el sitio activo no siempre son adyacentes en la secuencia pero se acercan en la conformación nativa. La cinética de muchas enzimas se describe mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Al graficar velocidad de reacción versus concentración de sustrato es posible determinar dos parámetros característicos de una enzima: la constante de Michaelis (K_m) una medida de la afinidad de la enzima por sustrato y la velocidad máxima (V_{max}). Muchas enzimas multiméricas y otras proteínas muestran alosterismo. En este fenómeno la unión de una molécula de ligando (sustrato, activador o inhibidor) induce un cambio de conformación o transición alostérica que altera la actividad de la proteína.

En las proteínas multiméricas que fijan múltiples ligandos, la unión de una molécula de ligando puede aumentar o disminuir la afinidad de unión para las posteriores moléculas de ligandos. Las enzimas que fijan sustratos en forma cooperativa muestran curvas de cinética sigmoidea. (Lodish y col., 2003)

2.2.3. PLEGAMIENTO

La secuencia de aminoácidos de una proteína determina el plegamiento en una conformación tridimensional específica, denominada como el estado nativo (ver Figura 5). El plegamiento de algunas proteínas *in vivo* requiere la ayuda de dos tipos de proteínas especiales. Las chaperonas moleculares se fijan a los polipéptidos nacientes que emergen de los ribosomas e impiden su plegamiento erróneo. Las chaperonas son grandes complejos de proteínas similares, que cubren las proteínas parcialmente plegadas o mal plegadas en una cavidad semejante a un barril y le proporcionan tiempo adicional para que alcancen un plegamiento correcto. Después de su vida útil todas las proteínas se modifican por distintas vías que alteran su estructura y función. La vida media de las proteínas intracelulares está determinada en gran parte por la susceptibilidad a la degradación proteolítica. La presencia de ciertas secuencias internas marca a las proteínas del citosol con el agregado de ubiquitina y para su posterior proteólisis dentro de un proteosoma. (Lodish y col., 2003)

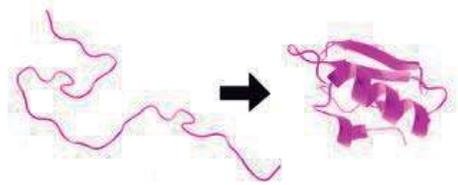


Figura 5. Esquema del plegamiento de una proteína. Transformación de una estructura desordenada a una estructura plegada.

2.3 TIM (TRIOSAFOSFATO ISOMERASA)

La triosafosfato isomerasa (TPI o TIM) es la enzima que cataliza la interconversión del Gliceraldehído-3 fosfato (GADP) y la Dihidroxiacetonafosfato (DHAP) en la glucólisis. Esta reacción tiene lugar a través de un intermedio enediol. La TIM es una enzima muy eficiente, la reacción lo es tanto que se le llama una enzima catalíticamente perfecta, porque está limitada solo por la cantidad de sustrato disponible.

La triosafosfato isomerasa se ha encontrado en todos los organismos donde se ha buscado, incluyendo animales, como mamíferos e insectos, así como hongos, plantas y bacterias. En los humanos, el déficit de triosafosfato isomerasa, es un proceso autosómico recesivo y está asociado a un grave trastorno neurológico progresivo y a una anemia hemolítica constante. (Vázquez, 2003)

2.3.1. ESTRUCTURA

La triosafosfato isomerasa (TIM) (ver Figura 6) es una enzima homódimerica donde cada subunidad posee un cilindro β paralelo con hélices α en los anexos de unión. Su sitio activo se encuentra en la parte superior del cilindro y posee un residuo de glutamato (165) y otro de histidina (95) que son esenciales para la catálisis. Esta reacción es la quinta de la glucólisis y la última de la primera etapa de este proceso. La TIM, se ha encontrado en todas las especies

analizadas hasta la fecha, y actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de la TIM de muchas más especies y la estructura tridimensional de 50 de ellas (pollo, levadura *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *E. coli*, *Bacillus stearothermophilus*, *Plasmodium falciparum*, *E. histolytica* y humano) etc. (Vázquez, 2003)

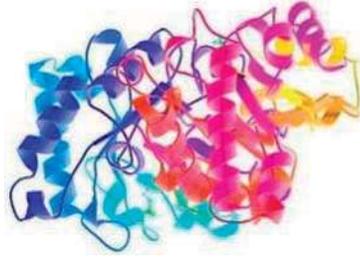
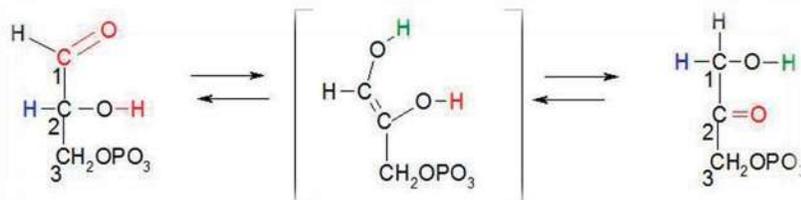


Figura 6. Esquema de la triosafosfato isómerasa. Conformación de diagramas de cintas esta proteína es una eficiente enzima que se involucra en el proceso de transformación de azúcares en energía en las células.

2.3.2. FUNCIÓN

En la catálisis a pH=7, el glutamato está desprotonado y, por tanto, cargado negativamente, con lo cual contribuye a atraer el protón del carbono 2 del gliceraldehído-3-fosfato; la histidina, básica, actúa como un grupo donador de protones para transferirlos entre el grupo carbonilo del sustrato y el hidroxilo del carbono 2 de la TIM.

En la glucólisis solo uno de los productos de la catálisis de la aldolasa, el Gliceraldehído-3-fosfato, (GADP) continúa a lo largo de la vía glucolítica. La Dihidroxiacetonafosfato (DHAP) y el GADP son isómeros cetosa-aldosa exactamente igual que la Fructosa-6-Fosfato y la Glucosa-6-Fosfato. Las concentraciones de GADP y DHAP se mantienen en la célula en una relación de GADP / DHAP de 0.473, es decir existe más DHAP que GADP; sin embargo, debido a que el GADP se consume en la siguiente reacción de la glucólisis, la mayor parte de la DHAP se debe transformar en GADP por medio de la acción catalítica de la TIM. La interconversión de GADP y DHAP ocurre vía un intermediario enediol o enediolato, (ver Figura 7) en analogía a la reacción catalizada por la PGI en el paso dos de la vía: (Vázquez, 2003)



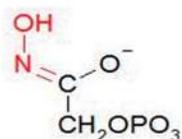
Gliceraldehído-3-Fosfato
(GADP)

Intermediario Enediol
o Enediolato

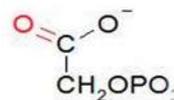
Dihidroxiacetonafosfato
(DHAP)

Figura 7. Representación de la reacción catalizada por la triosafosfato isomerasa. El GAPD y la DHAP son los isómeros que provienen de la catálisis de la aldolasa en la vía glucolítica. La diferencia química entre ellos es que en el primero, el grupo carboxilo pertenece a un aldehído, es decir está flanqueado por un C y un H. La DHAP, por el contrario tiene un grupo carboxilo cetónico, está rodeado por dos C, de ahí que de forma neta lo que hace la TIM es mover un protón de una parte de la molécula a otra.

Evidencias para soportar la anterior observación provienen de resultados obtenidos al utilizar análogos del estado de transición, el fosfoglucohidroximato y el 2-fosfoglicolato (ver Figura 8) que son compuestos estables cuyas estructuras geométricas recuerdan la del intermediario enediol o enediolato revisado en Vázquez, 2003.



Fosfoglucohidroximato



2-fosfoglicolato

Figura 8. Análogos del estado de transición de la reacción catalizada por la TIM. Dado que la reacción que cataliza la TIM es muy rápida, es muy difícil aislar al estado de transición. Por lo tanto se han sintetizado compuestos que se unen con firmeza a la TIM y que se parecen químicamente y estructuralmente a dicho estado. La unión de estas moléculas en el sitio activo de la TIM detiene su funcionamiento, lo que ha permitido estudiar a la proteína en un estado parecido al catalítico.

2.3.3. PLEGAMIENTO

Los barriles TIM son considerados plegamientos α/β , debido a que incluyen un modelo de alternancia de hélices alfa y láminas beta en un único dominio. En un barril TIM las hélices y láminas (por lo general, ocho de cada uno) forman un solenoide que se curva para cerrarse sobre sí mismo en forma de toroide. Las láminas beta paralelas forman la pared interior del toroide, que le dan su forma de barril, mientras que las hélices alfa forman la pared exterior. Cada lámina beta se conecta con la adyacente en el barril a través de un largo bucle, que incluye una de las hélices. El barril TIM también puede ser pensado, como formado por la superposición de ocho estructuras supersecundarias $\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta$ en el sentido de las manecillas del reloj. (ver Figura 9)

Cabe destacar que, aunque el diagrama de cintas muestra un hueco en el núcleo central, las cadenas laterales de los aminoácidos no se muestran en esta representación por lo que esta cavidad realmente no existe. (ver Figura 9). El núcleo de la proteína está en realidad ajustadamente empaquetado, en gran medida con residuos de aminoácidos hidrofóbicos y voluminosos, aunque unas pocas glicinas son necesarias para permitir cierto espacio para un limitado desplazamiento en el centro donde encajan las ocho repeticiones beta. Las interacciones de empaquetamiento entre las láminas y las hélices están también dominadas por la hidrofobicidad y las ramificaciones de los residuos alifáticos de valina, leucina,

isoleucina que conforman alrededor del 40% del total de residuos en las láminas beta. (Carl & John, 1999)

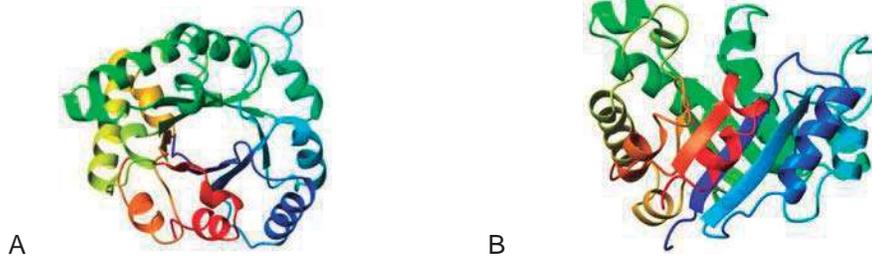


Figura 9. Vista superior (A) y vista lateral (B) del barril TIM de la triosa fosfato isomerasa. Coloreado desde el azul (N-terminal) al rojo (C-terminal)

2.3.4. LA TcTIM

Los estudios realizados sobre la función y la estructura de las enzimas de los parásitos, han demostrado por una parte que algunas de ellas poseen características que difieren de otros organismos como los humanos. Por otra parte se ha observado que algunas enzimas de parásitos son muy parecidas a los de otros organismos. El objetivo de estudiar enzimas de parásitos es conocer mejor los sistemas que tienen ventajas particulares de evolución y también para diseñar fármacos que pueden ser utilizados en las enfermedades producidas por estos organismos.

En algunas etapas del ciclo de vida de los tripanosomas la energía proviene totalmente de la glucólisis. La triosafosfato isomerasa del *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) es una proteína homodimérica, cuenta con dos subunidades polipeptídicas idénticas, cada monómero tiene un peso de 27 KD con una estructura $(\beta/\alpha)_8$.

La TcTIM tiene 5 residuos de triptofano, 7 de fenilalanina y 6 tirosina en cada monómero. Estos residuos son fluorescentes por lo cual esta enzima es capaz de emitir fluorescencia.

Los monómeros de TcTIM se asocian entre sí por interacciones no covalentes (Maldonado y col., 1998) y cada uno contiene su sitio activo completo localizado cerca de la interface que comparten las dos subunidades. Usando el sistema de numeración de la enzima de *T. brucei* se constató que Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* tiene los mismos tres residuos de cisteína que la enzima de *T. brucei* sin embargo tiene, una cisteína adicional en la posición 117. Estudios de la Triosafosfato isomerasa de varias especies han demostrado que los residuos del sitio activo, los mecanismos catalíticos y la estructura tridimensional se han conservado a lo largo de la evolución. La TIM de *T. cruzi* no es una excepción. Es un homodímero cuya secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y cinética son similares a otras TIM. La sensibilidad a la derivatización de las cisteínas de la TIM de Tripanosomátidos por agentes químicos es mayor que en otras especies. La TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) posee una sensibilidad de alrededor de 200 veces más alta que otras especies. (Ostoa y col., 1997)

ANTECEDENTES

3.1. MonoTcTIM

La diferencia en la secuencia tanto en el ADN como en las proteínas son parte del cambio evolutivo. Las proteínas altamente conservadas normalmente no contienen cambios drásticos en la estructura o la función. El homodimero de la enzima triosafosfato isomerasa (TIM) está altamente conservado. Para estudiar los efectos de mutaciones equivalentes en una enzima altamente homóloga, el gen de TcTIM fue mutado en la interface en el bucle de la región 3 de forma equivalente a la realizada para generar a monoTbTIM una mutante monomérica de la TIM de *T. brucei* con el fin de producir una mutante monomérica, para analizar las diferencias entre las propiedades de las subunidades aisladas. La naturaleza monomérica de monoTcTIM se demostró previamente utilizando cromatografía de exclusión, dispersión de luz, por el hecho de que la actividad no depende de la concentración y por el comportamiento monofásico de la desnaturalización con clorhidrato de guanidina (Gnd-HCl). (Zarate y col., 2009). La estabilidad de la enzima monomérica (monoTcTIM) fue alrededor de 15 % la del dímero nativo. Se observó un aumento en la unión del ANS lo que indica la exposición del área hidrofóbica correspondiente a la interface entre los monómeros. Se encontró que la catálisis de monoTcTIM es 10 veces mejor que la de monoTbTIM. La transición entre el estado plegado y el desplegado de monoTcTIM es un proceso unimolecular pues coinciden los parámetros seguidos por los cambios en la estructura terciaria y secundaria. La desnaturalización y la renaturalización muestran un comportamiento monofásico. La actividad de monoTcTIM, presenta una K_{cat} 10 veces mayor que la observada para monoTbTIM. En cuanto a la afinidad por el sustrato (K_m), en monoTcTIM este parámetro es el doble del valor reportado para monoTbTIM sin embargo, la V_{max} de monoTcTIM es 83 veces mayor que la observada en monoTbTIM lo que indica que las mutaciones producen una proteína equivalente pero más eficiente en TcTIM aunque con menor afinidad que la misma proteína en TbTIM. (Zarate y col., 2009)

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Caracterizar la desnaturalización térmica de la mutante monoTcTIM.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Generar un nuevo protocolo de purificación de monoTcTIM.
- ❖ Verificar que las propiedades estructurales de la proteína purificada concuerden con la obtenida por el método utilizado anteriormente.
- ❖ Estudiar por medio de experimentos de fluorescencia intrínseca y extrínseca el desplegamiento de monoTcTIM como función de la temperatura.

MATERIALES Y METODOS

5.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO LURIA BERTANI (LB)

Se pesan 30 gr de Agar Bertani (LB) en 150 mL de agua y 20 gr de medio Bertani modificado (LB) en 1 L de agua con agitación constante y se esterilizan, en una autoclave por 20 min a 103 kPa a 121 °C. Se toma el matraz con el Agar Bertani (LB), se lleva a la campana de esterilización y se agrega la ampicilina (50 mg/mL). El medio se agrega a las cajas Petri, una vez tibias, se rotulan y se refrigeran por 1 día. Al día siguiente se toma una muestra de la bacteria recombinante S49 III fzp con fecha 24/10/06 de *Escherichia coli* (BL21(DE3)) y se estriaron las cajas que previamente contenían el medio (LB) más ampicilina.

5.2 OBTENCIÓN DE LA MonoTcTIM

5.2.1 Sobreexpresión de la MonoTcTIM

La monoTcTIM es una proteína que no se encuentra disponible en el mercado, por lo que fue necesaria su sobreexpresión en la bacteria recombinante *Escherichia coli* (BL21(DE3)). La bacteria tiene un plásmido que contiene el gen mutante de monoTcTIM. En la campana de esterilización se agrega ampicilina (50 mg/mL) al medio LB. Con una azada estéril es suficiente para 200 mL de medio para el precultivo (se toma una colonia y se revuelve bien), se tapa y se incuba a 37°C con agitación constante por un día.

Estos 200 mL son suficientes para inocular 1 L de medio LB; se deja incubar el precultivo por 12 h a 37°C y 250 rpm, la ampicilina se agregó justo en el momento de la inoculación. Cuando terminó la incubación se procedió a inocular el cultivo con el precultivo. Esto se incubó por 4 h (en este tiempo se alcanza una densidad óptica de aproximadamente 1.0 a una longitud de onda de 560 nm) a 37°C con agitación constante.

Una vez transcurrido el tiempo se agregó el IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), el cual funciona como inductor de la expresión de monoTcTIM en la bacteria, a una concentración de 0.4 mM. Una vez agregado el IPTG se dejó incubar el cultivo por 12 hrs adicionales a 37°C y 250 rpm.

5.3 PURIFICACIÓN DE MonoTcTIM

El cultivo bacteriano obtenido en el paso anterior fue centrifugado a 5000 rpm/10 min en una centrífuga EPPENDORF #5810R1 para la obtención de un precipitado que es el paquete celular (pellet). El precipitado se disolvió con amortiguador de lisis. El amortiguador de lisis se elaboró según la Tabla 2.

Tabla 2. Amortiguador de lisis

REACTIVO	[CONCENTRACIÓN]
Ácido etanosulfónico (2-N-morpholino) (MES)	25 mM
Ácido etilendiaminotetra acético (EDTA)	1 mM
Ditiotreitol (DTT)	1 mM
Fenilmetilsulfonilfloruro (PMSF)	0.2 mM

Tabla 2. Reactivos y concentraciones para la elaboración del amortiguador utilizado para la lisis celular.

Una vez disuelto el precipitado en el amortiguador de lisis se llevó a cabo el rompimiento celular por medio de un sonicador Branson sonifier 250, con 10 ciclos (1 min de sonicar x 1/2 min de descanso). La muestra una vez sonicada se ultracentrifugó a 40000 rpm x 1 h a 4°C y con un vacío (200 vacuum) en una ultracentrífuga beckman rotor 70 ti. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se eliminó el precipitado (el cual contiene los desechos celulares). El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 45% (26.5 g de sulfato de amonio para 100 mL) durante 24 h. Trascurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 15,000 rpm por 20 min y se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se llevó a una concentración de 75% de sulfato de amonio (12.35 g de sulfato de amonio para 100mL).

Trascurrido el tiempo se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se utilizó el precipitado, el cual fue disuelto en 2 mL de amortiguador A. El amortiguador A se preparó según la Tabla 3.

Tabla 3. Amortiguador A

REACTIVOS	[CONCENTRACIÓN]
Trietanolamina (Amortiguador)	25 mM
Acido etilendiaminotertra acético (EDTA) (Quelante)	2 mM
Azida de sodio (Bactericida)	1 mM
Ditriotreitól (DTT) (Agente reductor)	0.5 mM
Agua destilada	Aforar *

Tabla 3. Reactivos y concentraciones para elaborar el amortiguador A (* pH 8.0)

Con la finalidad de separar a la monoTcTIM de otras proteínas se realizó una cromatografía de exclusión molecular, se realizó con un FPLC General Electric UPC-900 y P-920 utilizando una columna se Superdex 200 que separa proteínas globulares de 4000 a 150000 Dalton, el tamaño de las esferas de Superdex 200 es de 40 a 120 µm.

La columna debe estar equilibrada previamente con amortiguador A (volumen 1 L con un flujo 0.5 mL/min durante 4 h). La muestra fue cargada en la columna de 2 mL y se llevó a cabo la colecta del eluido en fracciones de 2 mL a un flujo de 0.5 mL/min y se produjeron 50 tubos en 4 h.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel desnaturizante de acrilamida y se seleccionaron las fracciones que contenían a monoTcTIM. Después se reunieron las fracciones y se colocaron en tubos de centrífuga con un volumen de aproximadamente 3 mL cada uno. Se centrifugó estos tubos a 10,000 rpm, 10 min a 4°C, se tomó la solución concentrada y se aplicó por segunda vez a la columna Superdex 200 la misma forma que en el paso anterior pero el flujo fue de 0.3 mL/min, recolectando 2 mL para cada fracción.

5.4 ELECTROFORESIS

Los geles electroforéticos desnaturizantes de poliacrilamida (PAGE) son un tipo de electroforesis desnaturizante en el que las proteínas previamente desnaturizadas por calor y en presencia de agentes desnaturizantes como el beta-mercaptoetanol (que reduce los puentes disulfuro) y el SDS, un detergente que ayuda a la desnaturización y cubre a la proteína con cargas negativas, son separadas en una matriz de poliacrilamida de acuerdo a su tamaño por medio de un campo eléctrico (Laemmli, 1970).

Para identificar la pureza de la proteína, en el proceso de purificación se corrieron experimentos PAGE con grosor de 1.5 mm. Se utilizó el equipo mini-protean3cell (bio rad). Para la elaboración de los geles se utilizaron 2.5 mL de solución concentradora y 5 mL de solución separadora por cada placa de gel (Tabla 4).

Tabla 4. Reactivos para la elaboración de un gel Electroforético

COMPONENTES	Solución Separadora 15%	Solución Concentradora 4%
Acilamida 30 % /bis-acilamida 0.8%	5 µl	0.39 µl
Tris-HCl/SDS 4x pH=8.8	2.5 µl	0 µl
Tris- HCl/SDS 4x pH=6.8	0 µl	0.75 µl
Agua	2.5 µl	1.83 µl
Persulfato de amonio 10% (p/v)	32 µl	15 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Tabla 4. Reactivos para la preparación de las soluciones para la elaboración de un gel de electroforesis Laemmli (1970). Las soluciones deben ser preparadas al momento de su uso para obtener una adecuada polimerización.

Antes de aplicar las muestras al gel, fueron desnaturizadas añadiéndoles a 40 µL de una solución desnaturizante la cual contiene glicerol, SDS, azul de bromofenol y β-mercaptoetano 120µL de las muestras problema. Las soluciones se calentaron 10 min en agua recién hervida.

Los pozos del gel se llenaron con 45 µL de las mezclas anteriores en los experimentos siempre se colocó un marcador de peso molecular en los extremos del gel; se procedió a correr las muestras por 1 1/2 h aproximadamente, a un voltaje constante de 103 volts utilizando una fuente de poder Termo Electrón Comporación EC-105.

5.5 Cuantificación de la concentración de monoTcTIM

Una vez que se purificó a monoTcTIM se cuantificó su concentración por medio de espectrofotometría. Este proceso se basa en la Ley de Lambert –Beer.

$$A = C \epsilon l$$

A=la absorción obtenida experimentalmente

C= la concentración con unidades determinadas por el ϵ

ϵ = el coeficiente de extinción molar, que es un valor teórico ya reportado.

l = es la longitud de paso de luz de la celda, en este caso es 1 cm.

Nota: la ϵ a 280 nm (TcTIM) = $33460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Rodríguez y col, 2007)

Se realizó la lectura de la absorbancia con el espectrofotómetro Evolución 300. Se calibró con aire y después con amortiguador A, se tomaron las lecturas de los tubos seleccionados y se cuantificó a una longitud de onda de 280 nm.

5.6 CARACTERIZACIÓN DE LA monoTcTIM

5.6.1 Fluorescencia

La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en un Espectrofluorómetro Chronos BH Fluorescence Lifetime Spectrometer utilizando una celda de cuarzo de 10 mm con una camisa a una temperatura de 20°C.

5.6.2 Fluorescencia intrínseca

Al excitar a 280 nm a una proteína que contenga triptófano, fenilalanina y tirosina como monoTcTIM se observa la fluorescencia de estos aminoácidos aromáticos (ver Tabla 1). El espectro de emisión fue obtenido en el intervalo de 300 a 400 nm utilizando ventanas de 0.5 nm en la excitación y 2.0 nm en la emisión a una intensidad de 15 amperes. Al excitar a monoTcTIM a 295 nm se observó la fluorescencia de solo los Triptofanos presentes. El espectro de emisión fue obtenido en el intervalo de 310 a 410 nm utilizando ventanas e intensidad iguales a los espectros a 280 nm.

5.6.3 Fluorescencia extrínseca

En estos espectros se utilizó al ANS (1-Anilino-8-naftalensulfonato) que es un fluoroforo extrínseco que se puede unir a las áreas hidrofóbicas de la proteína. La concentración que se utilizó fue 100 μM de ANS en los ensayos de fluorescencia extrínseca.

La longitud de onda de excitación utilizada fue 360 nm y el espectro de emisión fue tomado de 400 a 560 nm. Los resultados obtenidos de esta determinación fueron cuantificados en relación al porcentaje de unión del ANS.

5.6.4 Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular se utiliza para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas ya que cuantifica por medio de un espectropolarímetro la cantidad de estructura α -hélices y β -plegadas existentes. Una muestra de proteína (240 $\mu\text{g/ml}$) fue introducida es el espectro-

polarímetro Jasco J-815 para obtener un espectro de la distribución de estructura secundaria en la proteína nativa.

Los reactivos que se utilizaron durante los experimentos son:

Agar LB, Agar Borth, PMSF, Trietanolamina, Glicerol, Azul de Bromofenol, ANS, Fosfato de sodio bibásico son de SIGMA.

EDTA, DTT, Acrilamida, Tris-HCl/SDS pH=8.8, Tris-HCl pH=6.8, Persulfato de amonio (10%), TEMED, SDS, β -mercaptoetanol son de BIO-RAD.

MES es de FLUKA. Sulfato de amonio, Fosfato de sodio monobásico SIGMA-ALDRICH.

Todos los experimentos que se muestran, son representativos de un conjunto de ellos que se elaboraron.

RESULTADOS

Cuando se logró la sobre-expresión de la monoTcTIM, se lisó a las bacterias por medio de la sonicación. Se realizó una precipitación con sulfato de amonio para eliminar las proteínas no deseadas. Se tomó una fracción de la solución precipitada y se centrifugo a 15,000 rpm, el precipitado se resuspendió en 2 mL de amortiguador A y se inyectó a la columna Superdex 200 en las condiciones reportadas en materiales y métodos. En la Figura 10 se muestra un cromatograma representativo en donde se observa la presencia de 4 picos.

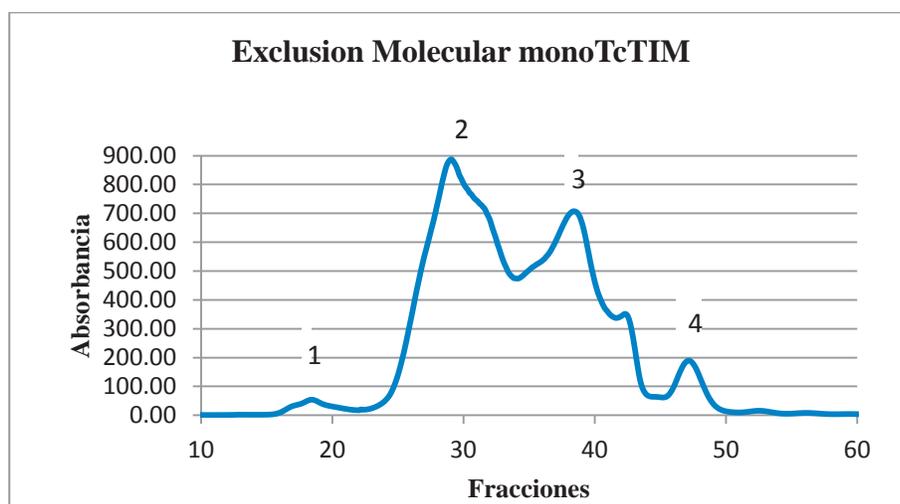


Figura. 10. Filtración en la columna Superdex 200 de las proteínas contenidas en la solución después de la precipitación con sulfato de amonio.

Las fracciones colectadas en la exclusión molecular fueron reunidas y analizadas por medio de un gel de SDS. (ver Figura 11)

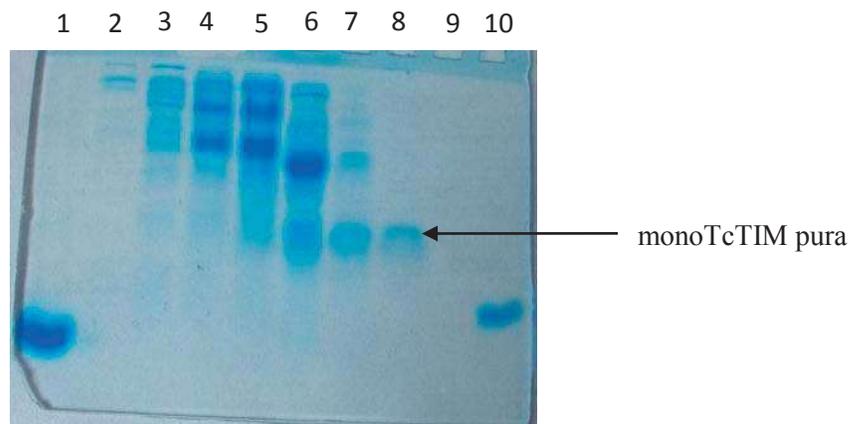


Figura.11. Gel de SDS de las fracciones obtenidas en la Figura 10. Marcadores de peso molecular a una concentración 10 μ L de Lisozima (1) y Mioglobina 10 μ L (10), Fracción 12 del pico 1 (2) obtenida de la exclusión molecular que contiene a monoTcTIM en poca o nula concentración,

Fracciones 21 (3), 22 (4), 27 (5), 32 (6) y 34 (7) del pico 2 que contienen monoTcTIM en mayor concentración, Fracción 35 (8) del pico 3 monoTcTIM pura.

Después se reunieron las muestras de las fracciones (27, 32,34 y 35) pico 2 de la exclusión anterior y se repitió el procedimiento de filtración pero a una velocidad menor que la anterior. (ver Figura 12) En este experimento a diferencia de la primera cromatografía, se observan solo 2 picos.

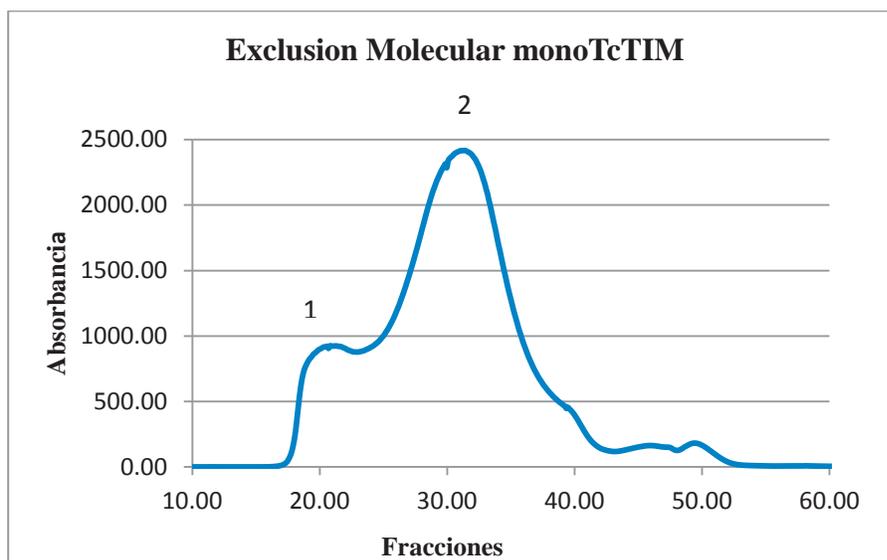


Figura.12. Recromatografía en Superdex 200 de las fracciones (27, 32,34 y 35) (ver Figura10). El experimento se realizó a una velocidad de flujo de 0.3 mL / min.

Para verificar la pureza de monoTcTIM, se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en la cual se puede observar la pureza total de esta enzima (ver Figura 13)

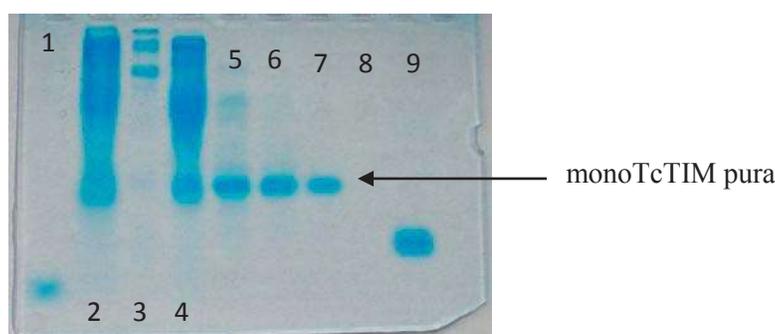


Figura.13. Gel de SDS de las fracciones provenientes de la recromatografía en Superdex 200 (ver Figura.12). Marcadores de peso molecular a una concentración de 10 μ L de Lisozima (1) y 10 μ L de Mioglobina (2), carriles 2 y 3 del pico 1 obtenidas de la exclusión molecular que contiene monoTcTIM en poca o nula concentración, carriles 4 y 5 del pico 1 que contiene en mayor concentración, carriles 6 y 7 del pico 2 obtenidas que contienen monoTcTIM pura.

Se encontró que a diferencia del protocolo utilizado anteriormente (Zarate y col., 2009) que utiliza una cromatografía de exclusión molecular y una de intercambio iónico, al utilizar la columna Superdex 200 se obtienen fracciones con monoTcTIM pura. Con la recromatografía se incrementa en el rendimiento en la purificación.

6.1 Caracterización de la proteína

6.1.1 Determinación de monoTcTIM por medio de su coeficiente de extinción molecular.

Con los datos obtenidos de la cuantificación de la absorbencia de las muestras a 280 nm. Como ejemplo se muestran los datos para la muestra dialisada en amortiguador de fosfatos:

Se utilizó la ley de Lambert-Beer:

$$A = C \epsilon l$$

En donde:

A: La absorbencia obtenida experimentalmente

C: La concentración con unidades determinadas por el ϵ .

ϵ : El coeficiente de extinción molecular ϵ (monoTcTIM)

l: Es la longitud de paso de luz de la celda, en esto caso es 1 cm.

Nota: la ϵ (monoTcTIM) a 280 nm = 33460 M⁻¹ cm⁻¹ (Rodríguez y col., 2007)

$$C = (0.150 \text{ nm}) / (33460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} * 1 \text{ cm}) = 4.48 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$4.48 \times 10^{-6} \text{ M mol/L} * 27000 \text{ g/mol} = 0.12 \text{ g/L}$$

$$C = 0.12 \text{ g/L y/o } 120 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

6.1.2 Rendimiento de la purificación por litro de medio de cultivo fue:

0.375 $\mu\text{g/L}$ esta es la purificación de monoTcTIM por litro.

6.2 Estructura Secundaria

Se utilizó al Dicroísmo Circular (CD) para tratar de obtener el contenido de la hélice α y lamina β en monoTcTIM. Se intentó observar el espectro de dicroísmo circular de esta proteína. La experiencia previa estudiando a la TIM recomienda realizar las mediciones de CD tomando en cuenta dos situaciones la primera es realizar los estudios con la proteína en amortiguador de fosfatos, estos porque disminuye el “ruido” en la señal de helipticidad, la segunda observación es que mientras más alta sea la concentración de la proteína, la señal de CD es mejor. Los esfuerzos por concentrar a monoTcTIM provocaron la agregación de la proteína. Debido a lo anterior se dializó una muestra de monoTcTIM a la mayor concentración posible después de la purificación (240 $\mu\text{g/mL}$), contra amortiguador de fosfatos (2 mM) para tratar de determinar el contenido de estructura secundaria. Después de la diálisis

la concentración de la muestra disminuyó a la mitad. Se trató de obtener el espectro de CD en estas condiciones. Desafortunadamente la cantidad de proteína no permitió realizar esta determinación espectroscópica, el ruido de fondo era mayor a la señal de la proteína. En la experiencia del laboratorio, la concentración mínima a utilizar en estos experimentos es alrededor de 200 $\mu\text{g/mL}$.

6.3 Estructura Terciaria

Se utilizó la Fluorescencia intrínseca a 280 y 295 y extrínseca agregando ANS. Se observó el empaquetamiento de la estructura terciaria. (ver Figura 14)

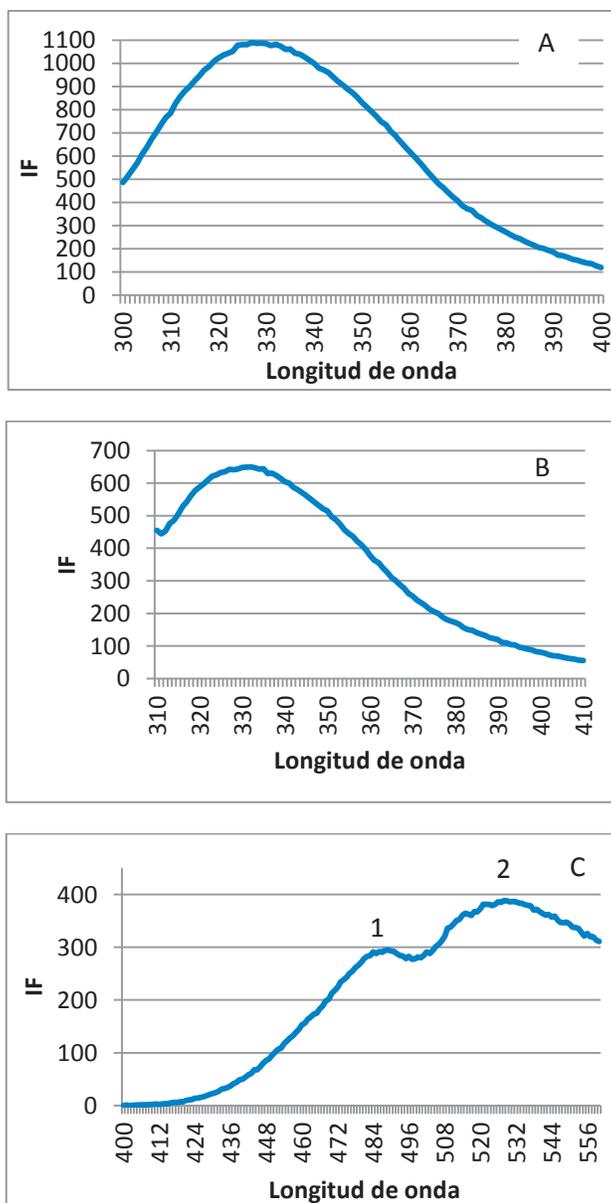


Figura 14. Espectro de Fluorescencia intrínseca (A y B) y extrínseca (C) de monoTcTIM. Se utilizaron ventanas en la emisión de 2.0 y en la excitación de 0.5. A: espectro que muestra la

fluorescencia de todos los fluorofóros a una longitud de onda de 280 nm, B: espectro que muestran la fluorescencia de solo los triptófanos que fluorescen a una longitud de onda de 295 nm, C: espectro que muestran la emisión del ANS a una longitud de onda 360 nm.

6.4 Desnaturalización térmica de mono TcTIM

Los experimentos se realizaron utilizando una concentración de 240 $\mu\text{g/mL}$ de monoTcTIM. Se monitoreó el desplegamiento por medio de cambio en la fluorescencia intrínseca (excitación 280 nm y 295 nm) y extrínseca añadiendo ANS (excitación 360 nm). Los barridos térmicos se siguieron a una velocidad de calentamiento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$.

En un primer análisis se barrió en el intervalo de temperatura de 20 a 90°C . (ver Figura 15)

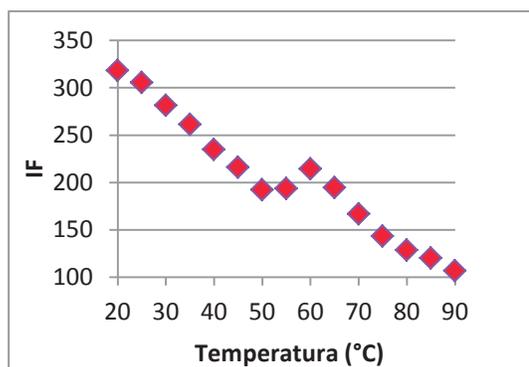


Figura 15. Desnaturalización térmica de monoTcTIM a una concentración de $100\ \mu\text{g/mL}$ en un intervalo de 20 a 90°C .

Como se puede observar en la Figura 15 la fluorescencia intrínseca de la proteína decrece como función de la temperatura hasta 50°C luego este parámetro aumenta, llegando a un máximo a 60°C para luego seguir disminuyendo.

Al enfriar esta muestra a temperatura ambiente tanto a una velocidad de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ como de forma inmediata, la estructura terciaria de monoTcTIM no se recupera. Se observó que la muestra se agrego después del calentamiento pues la solución se torno turbia (Figura 16).



Figura 16. Agregación de monoTcTIM después de calentarla 90°C y enfriarla a temperatura ambiente. Primeramente la muestra se tornó turbia, posteriormente, la proteína agregada se sedimentó.

Se realizó el espectro de desnaturalización en las mismas condiciones pero únicamente en el intervalo de 10 a 55 °C. Se enfrió a la muestra a la misma velocidad (ver Figura 17)

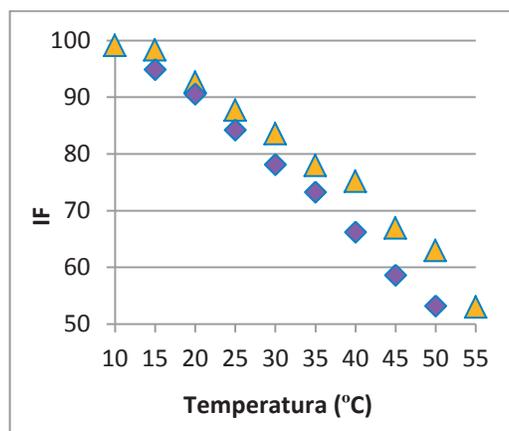


Figura 17. Calentamiento (▲) y enfriamiento (◆) de monoTcTIM a una concentración 60 µg/mL. Se siguieron los cambios en la intensidad de fluorescencia a 280 nm en función de la temperatura.

Como puede apreciarse en la Figura 17 los cambios de calentamiento y enfriamiento no son iguales, a esto se le denomina histéresis, pero la muestra no se agregó (no se enturbió); las características de la proteína antes de calentar y después de calentada son indistinguibles lo que sugiere una reversibilidad total del proceso de desnaturalización de monoTcTIM.

Una vez que se conoció que la desnaturalización es un proceso reversible, se realizó el barrido térmico (10 a 55 °C) en presencia de ANS para verificar que sucede con la exposición de área hidrofóbica en monoTcTIM durante la desnaturalización y la renaturalización.

MonoTcTIM une ANS en su estado nativo pues como se demostró anteriormente (Zarate y col., 2009) pues expone la región de la interface entre los monómeros. Como se puede observar en la Figura 18, al calentar a la proteína, la fluorescencia de la longitud de onda fluorescente decrece. Al enfriar a la proteína el ANS se vuelve a unir a la proteína. Los caminos de desnaturalización y renaturalización no son iguales verificando la histéresis observada en los espectros de fluorescencia intrínseca, pero las características de unión ANS por la proteína antes de calentar y después de hacerlo son indistinguibles, sugiriendo la reversibilidad total de la desnaturalización térmica de monoTcTIM.

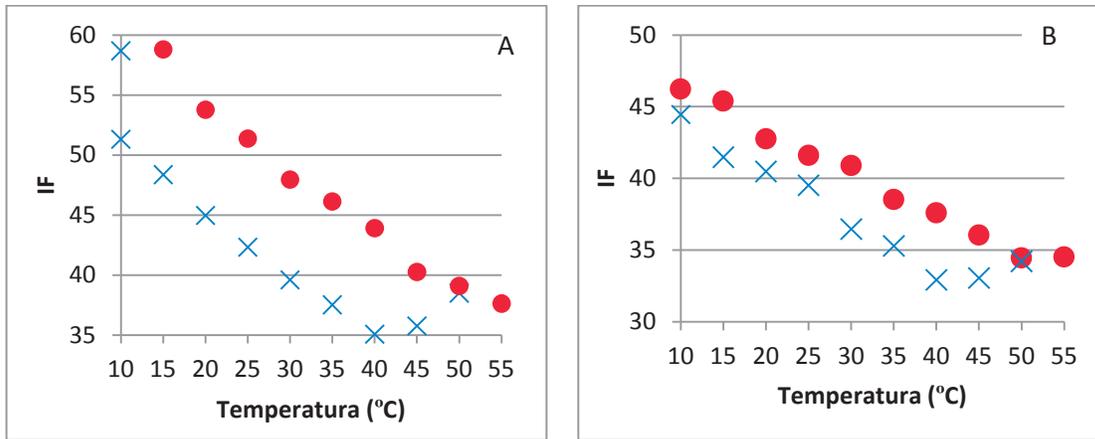


Figura 18. Desnaturalización y renaturalización de monoTcTIM. La muestra (60 $\mu\text{g/mL}$) fue calentada (●) y enfriada (X) a 1°C/min. Se siguió la fluorescencia correspondiente al pico 1 (480 nm) en el panel A y al pico 2 (515 nm) en el panel B del espectro del ANS (ver Figura 14 C)

Para verificar el efecto de la concentración en la desnaturalización, las propiedades espectroscópicas de monoTcTIM se muestran en la Figura 19 a dos diferentes concentraciones 80 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$. Como se puede observar, ninguna de las propiedades del espectro de emisión (λ_{max} , área o IF) cambian a otras concentraciones, lo cual indica que la concentración no tiene un efecto en la desnaturalización.

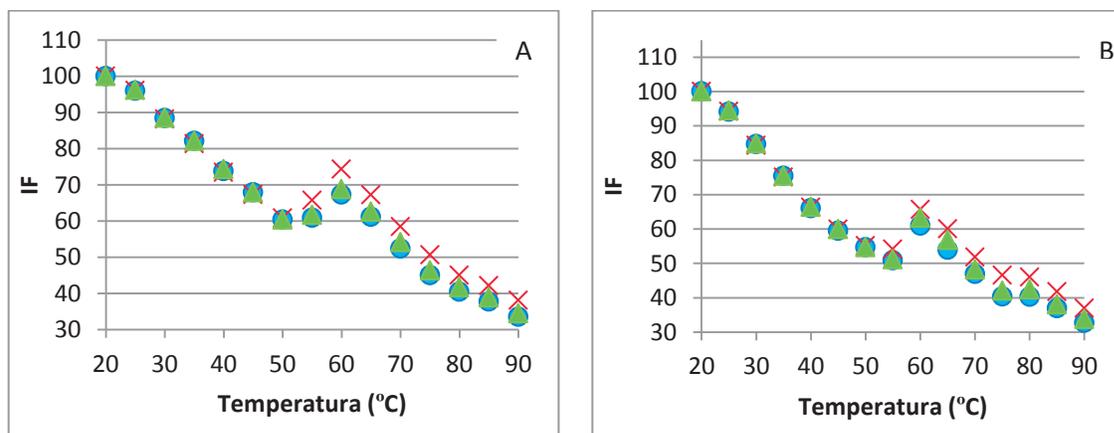


Figura 19. Comparación del porcentaje de λ_{max} (●), Área (X) e IF máxima (▲). A una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ (A) y otra concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (B) ambas en un intervalo de temperatura de 20 a 90 °C. Aumento de 10 °C por 5 minutos con emisión de luz de 2.0 nm y de excitación de 0.5 nm

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo se refiere a una mejora en la purificación de monoTcTIM. Después de intentar mejorar el protocolo por medio de diversas metodologías, se encontró que utilizando una columna de filtración Superdex200 y a diferencia de la purificación realizada anteriormente (Zarate y col., 2009), con este protocolo en una sola elusión se purifica completamente a monoTcTIM. Además, se obtiene un buen rendimiento de proteína en la purificación. Una vez purificada monoTcTIM, se procedió a realizar la caracterización estructural de la mutante. Se encontró que estudiando la fluorescencia intrínseca y extrínseca (utilizando al ANS), las propiedades estructurales de monoTcTIM obtenida por esta metodología, son iguales a las reportadas anteriormente (Zarate y col., 2009). Aunque por ambas metodologías se obtienen una proteína que posee idénticas características, la purificación aquí reportada es ventajosa pues permite reducir tiempos y costos en la obtención de monoTcTIM.

Dado que monoTcTIM fue diseñada para realizar experimentos de desnaturalización con la parte monomérica de la TIM, se realizaron experimentos de desplegamiento térmico en solución de esta mutante. Los estudios previos con la enzima TIM silvestre muestran que la desnaturalización de este homodímero es un evento irreversible causado por agregación inespecífica. Por otra parte se conoce que la desnaturalización con clorhidrato de guanidina de monoTcTIM es reversible (Zarate y col., 2009), pero utilizando a la temperatura como perturbante, al calentar a monoTcTIM después de 55 °C se agrega irreversiblemente. La caracterización de la desnaturalización térmica de monoTcTIM se desarrolló siguiendo cambios en la estructura terciaria por medio de fluorescencia intrínseca y extrínseca por medio de la exposición del área hidrofóbica al solvente. Aunque más allá de 55 °C la reacción de desplegamiento es irreversible, tanto el ambiente de los triptofanos (después de excitar a 295 nm) como de las tirosinas (después de excitar a 280 nm) así como la cantidad de área hidrofóbica expuesta, regresan de forma indistinguible a aquellos valores que presenta la monoTcTIM nativa, después de calentarla a 55 °C y enfriarla a diferentes velocidades a la temperatura ambiente. Es decir que la desnaturalización de monoTcTIM tiene una parte completamente reversible por debajo de 55 °C. Por arriba de esta temperatura, el proceso se vuelve irreversible debido a la agregación inespecífica. Finalmente este es el primer estudio donde se caracteriza el plegamiento térmico de una mutante monomérica de la triosafosfato isomerasa.

CONCLUSIONES

- El nuevo método para purificar a monoTcTIM aquí reportado funciona más rápido que en estudio previo y se obtiene la proteína pura.
- El efecto de temperaturas mayores a 50 °C en la desnaturalización termica de monoTcTIM causa su agregación irreversible.
- La desnaturalización de monoTcTIM a temperaturas menores de 55 °C es totalmente reversible.
- Las características de la estructura de la proteína purificada son iguales a las reportadas previamente.
- Los procesos de desnaturalización y renaturalización no son idénticos, se observa histéresis, pero las características estructurales de monoTcTIM son idénticas antes y después de calentarlas.

PERSPECTIVAS

Estudiar la posible oligomerización de esta nueva proteína por medio de su:

- ✓ Función
- ✓ Inhibición
- ✓ Estructura secundaria y terciaria
- ✓ Estructura cuaternaria
- ✓ Exposición de área hidrofóbica al solvente.

BIBLIOGRAFIAS / REFERENCIAS

Carl Branden & John Tooze. (1999). Introduction to Protein Structure 2nd ed. Garland Publishing: New York, NY. pp 47-50.

Laemmli (1970). Nature 277 p680 (<http://webpage.ull.es/users/bioquibi/practic4.pdf>)

Lodish Haevey, Berk Arnol, S.Lawrence Zipursky, Matsudaira Paul, Baltimore David & Darnell James. (2003). Biología Celular y Molecular. P G1-G17.

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. p 283,193-203.

Murray Robert K, Peter A. Mayer, Daryl K. Granner & W. Rodwell Victor, (2001). Bioquímica de Harper.15 a. P 1-5, 31-40, 43-54, 55-67.

Ostoa Saloma P.; Garza Ramos G.; Ramirez J.; Becker I.; Berzunza M.; Landa A.; Gomez Puyou A.; Tuena de Gomez Puyou M. & Perez Montfort R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Biochem (244) p 700-705.

Rodríguez Almazán C.; J. Torner F.; Costas M.; Pérez Montfort R.; Tuena de Gómez Puyou M. & Gómez Puyou A. (2007). La estabilidad y la formación de proteínas nativas, desplegada a partir de monómeros se incrementa a través de interacciones con proteínas no relacionadas.

Vázquez Contreras Edgar (2003, Octubre 15). Bioquímica y Biología Molecular en Línea. Recuperado Septiembre 22, 2011 de <http://www.laguna.fmedic.unam.mx>

Zárate Pérez F.; Chánez Cárdenas M.; Arreola R.; Torres Larios A. & Vázquez Contreras E. (2008). The Folding Pathway of Triosephosphate Isomerase. Progress in Molecular Biology and Translational Sciences Vol. 84 p: 251-267.

Zarate Pérez F.; Chánez Cárdenas M.; Arreola R.; Torres Larios A. & Vázquez Contreras E. (2009). Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. Biochemical and Biophysical Research Communications 382 p 626-630.

Zomosa Signoret V.; Hernández Alcántara G.; Reyes Vivas H.; Martínez Martínez E.; García 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 vol.42, p: 3311-3318.

ANEXO

Este trabajo se presentó en:

**242nd ACS National Meeting, Denver, CO, agosto-septiembre de 2011 con el título:
Properties of monoTcTIM. A monomeric variant of triosephosphate isomerase.**

Además la tesista asistió:

“2^{do} Congreso Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas.” 2009.

“3^{er} Congreso Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas.” 2011.

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Los 20 aminoácidos proteínicos.....	3
2. Reactivos para la elaboración del buffer de lisis.....	13
3. Reactivos para elabora el buffer A.....	14
4. Reactivos para la preparación de las soluciones para la elaboración de un gel electroforesis.....	15

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Significado de la bioquímica.....	2
2. Representación de un aminoácido.....	2
3. Un enlace peptídico.....	4
4. Niveles de organización de las proteínas.....	6
5. Esquema de un plegamiento de una proteína.....	7
6. Esquema de la Triosafosfato isomerasa (TIM).....	8
7. Representación de la reacción catalizada por la TIM.....	8
8. Análogos del estado de transición de la reacción catalizada por la TIM.....	9
9. Vista superior y vista lateral del barril TIM.....	10
10. Filtración en la columna en la Superdex 200.....	18
11. Gel de SDS de la filtración en la Superdex 200.....	18
12. Recromatografía en Superdex 200.....	19
13. Gel de SDS de la recromatografía de la Superdex 200.....	19
14. Espectros de Fluorescencia intrínseca y extrínseca.....	21
15. Desnaturalización térmica de monoTcTIM a diferentes concentraciones.....	22
16. Agregación de monoTcTIM después de calentarla 90 °C y enfriarla.....	22
17. Calentamiento y enfriamiento de monoTcTIM con ANS.....	23
18. Desnaturalización y renaturalización de monoTcTIM.....	24
19. Comparación de propiedades λ_{max} , área e IFmaxima de la desnaturalización térmica.....	24

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
α	Alfa
Å	Angstroms
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARN _m	Ácido Ribonucleico mensajero
APS	Persulfato de amonio
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Ans	Asparagina
ANS	Anillo-8 naftaensulfanato
Asp	Ácido Aspártico
β	Beta
Cis	Cisteína
DC	Dicroismo Circular
DHAP	Dihidroxiacetonafofato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra acético
<u>E. coli</u>	<i>Escherichia coli.</i>
Fen	Fenilalanina
GADP	Gliceraldehído-3 fosfato
Glu	Glucosa
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
K _{pa}	Kilo pascales
K _{cat}	Actividad catalítica
KD	Kilo Dalton
K _m	Constante de Michaelis
LB	Luria Bertani
Leu	Leucina
Lis	Lisina
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
μ g/mL	Microgramo sobre mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mg/mL	Miligramo sobre mililitro
mL	Mililitro
M	Molar

MES	(2-N-Morfolino) Ácido Etanosulfónico
Met	Metionina
Mol	Mol (es)
N	Nitrógeno
nm	Nanómetros
O	Oxígeno
PM	Peso Molecular
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro
Pro	Prolina
Rpm	Revoluciones por Minuto
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
TbTIM	Triosafosfato isomerasa <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	N, N, N, N- tetrametilendiamina
Tir	Tirosina
Tre	Treonina
Trp	Triptofano
Val	Valina
VACUUM	Vacio
V _{max}	Velocidad Máxima
Volts	Voltaje

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alostéricos: son enzimas (proteínas globulares que catalizan reacciones químicas) que presentan centros alostéricos, activadores e inhibidores, además del habitual centro activo.

ADN: Es el portador de la información genética en las células, compuesto por dos cadenas complementarias de nucleótidos enrolladas en una doble hélice capaz de autorreplicación y de dirigir la síntesis de RNA.

Agar: Una sustancia gelatinosa preparada con ciertas algas rojas que se usa para solidificar medios nutritivos para el crecimiento de microorganismos.

Aminoácidos: Molécula orgánica que contiene nitrógeno en forma de $-NH_2$ y un grupo carboxilo $COOH$, unidos al mismo átomo de carbono; los “bloques estructurales” de las moléculas de proteína.

Ampicilina: es un antibiótico beta-lactámico que ha sido extensamente utilizado para tratar infecciones bacterianas desde el año 1961.

Bioquímica: es una ciencia que estudia la composición química de los seres vivos, especialmente las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, además de otras pequeñas moléculas presentes en las células y las reacciones químicas que sufren estos compuestos (metabolismo) que les permiten obtener energía (catabolismo) y generar biomoléculas propias (anabolismo).

Catálisis: es el proceso por el cual se aumenta o disminuye la velocidad de una reacción química.

Citosol: Contenido de citoplasma, excluidas las organelas delimitadas por membrana como las mitocondrias y el retículo endoplasmático.

Dímero: en este caso es una proteína compuesta por dos subunidades proteínicas.

Dicroísmo Circular: es una técnica de espectroscopía de absorción electrónica, basada en el cambio de configuración electrónica molecular de un estado fundamental a un estado excitado, debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada. Es decir que la luz polarizada a ciertas longitudes de onda es absorbida por ciertos componentes estructurales, la quiralidad por ejemplo está involucrada con este proceso. En las proteínas las alfa hélices absorben señal de dicroísmo circular en una longitud de onda diferente de las hojas beta (222 nm y 228 nm respectivamente).

Energía Cinética: energía de movimiento.

Enediol: son alquenos con un grupo hidroxilo colocada en uno de los átomos de carbono que componen el doble enlace.

Enlace covalente: Enlace químico formado como resultado de compartir uno o más pares de electrones.

Enlace peptídico: El tipo de enlace que se forma cuando dos aminoácidos se unen por los extremos: el grupo ácido ($-\text{COOH}$) de un aminoácido se une covalentemente al grupo básico ($-\text{NH}_2$) del siguiente y se elimina una molécula de agua.

Enzima: Molécula de proteínas globular que acelera una reacción química específica.

Estructura: La secuencia de aminoácidos de una proteína

Fenotipo: Características observables de un organismo que resulta de las interacciones entre el genotipo y el ambiente.

Fluorescencia: es la propiedad que tiene una sustancia para emitir luz cuando se expone a algún tipo de radiación electromagnética incidente.

Gen: unidad de la herencia en un cromosoma; secuencia de nucleótidos en la molécula de DNA que desempeña una función específica; como la de codificar una molécula de RNA o un polipéptido.

Glucólisis: proceso por el cual una molécula de glucosa se convierte anaeróbicamente en dos moléculas de ácido pirúvico, liberando una pequeña cantidad de energía útil; catalizado por enzimas citoplasmáticas.

Hélice Alfa (α): estructura secundaria frecuente de las proteínas, en la cual la secuencia lineal de los aminoácidos se pliegan en una espiral con giro hacia la derecha, estabilizada mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo y amida de la columna vertebral.

Heterodímero: es una proteína compuesta por subunidades diferentes.

Homodímero: es una proteína compuesta por subunidades idénticas.

Intrón: segmento de DNA que es transcrito a RNA pero es eliminado enzimáticamente de esta última molécula dando el RNA maduro también conocido como secuencia interpuesta.

Isómero: moléculas que tienen el mismo número y tipo de átomos pero difieren en la manera en que los átomos están combinados.

K_m : parámetro que describe la afinidad de una enzima por el sustrato y equivale a la concentración del sustrato que produce la mitad de la velocidad de reacción máxima; también se denomina *constante de Michaelis*.

Lamina beta (β): estructura secundaria plana de proteínas, creada por enlaces de hidrógeno entre los átomos pertenecientes a las columnas vertebrales de dos cadenas polipeptídicas diferentes o segmentos de una misma cadena plegada.

Macromoléculas: molécula extremadamente grande, se refiere específicamente a las proteínas, los ácidos nucleídos, los polisacáridos y sus complejos

Molécula: partícula formada por dos o más átomos que se mantiene unidos por enlaces químicos; la unidad más pequeña de un compuesto que exhibe sus propiedades.

Monofásico: es un sistema de producción, distribución y consumo de energía eléctrica formado por una única corriente alterna o fase y por lo tanto todo el voltaje varía de la misma forma.

Monómero: molécula simple, relativamente pequeña, que puede unirse a otras y formar un polímero en este caso una cadena de aminoácidos.

Nucleótidos: molécula compuesta por un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos (ribosa o desoxirribosa) y una base purica o pirimidica; los nucleótidos son los bloques estructurales de los ácidos nucleicos.

Oligómeros: Se dice que una molécula constituye cuando los radicales asociados son distintos entre sí.

Organismo: cualquier criatura viva, unicelular o multicelular.

Parásito: organismo que vive a expensas de otros o en otros organismos de una especie distinta y adquiere de este sus nutrientes.

Peso Molecular: la suma de los pesos atómicos de los átomos constituyentes de una molécula.

pH: símbolo que denota la concentración de iones hidrógeno en una solución; los valores van de 0 a 14; cuanto más bajo sea el valor más ácida será una solución, o sea, contendrá mayor cantidad de iones de hidrógeno; el pH= 7 es neutro es ácido y el superior a 7 es alcalino.

Plegamiento: es el proceso por el que una proteína alcanza su estructura tridimensional.

Polímero: una molécula compuesta por muchas subunidades moleculares similares o idénticas en este caso la unión de varios aminoácidos.

Polipéptidos: molécula formada por una cadena larga de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Proteína: compuesto orgánico complejo constituido por una o más cadenas polipeptídicas, cada una formada por muchos (100 o más) aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Proteólisis: es la degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas proteasas, o por medio de digestión intramolecular.

Proteosoma: es un complejo proteinico grande presente en todas las células eucariotas y Archaea, así como en algunas bacterias, que se encarga de realizar la degradación de proteínas (denominada proteólisis) no necesarias o dañadas

Ribosoma: es una ribonucleoproteina, sitio de traducción en la síntesis de proteínas, en las células eucarióticas, unido frecuentemente al retículo endoplasmático. Un conjunto de ribosomas unidos a una sola cadena de mRNA constituyente un polirribosoma o un polisoma.

RNA: clase de ácidos nucleicos que se distingue por la presencia del azúcar ribosa y la pirimidina uracilo; incluye mRNA, tRNA y rRN.

RNA mensajero (RNAm): un tipo de molécula de RNA, es complementaria de una hebra de DNA. Lleva la información genética del cromosoma a los ribosomas, donde se traduce a proteína.

Sitio activo: la región de una enzima que se une temporalmente al sustrato durante la reacción catalizada por la enzima.

Sustrato: sustancia sobre la cual actúa una enzima.

Ubiquitina: Pequeña proteína muy conservada que se une mediante enlaces covalentes a restos de lisina de otras proteínas intracelulares. Las proteínas a las que se agrega una molécula de ubiquitina suelen ser degradadas en un proteosoma.

Urea: compuesto orgánico formado en el hígado de los vertebrados, la principal forma de eliminación de desechos nitrogenados por los mamíferos en este caso es también un agente desnaturante de la proteína.

V_{max} : parámetro que describe la velocidad máxima de una reacción catalizada por una enzima u otro proceso; por ejemplo el transporte mediado por proteínas de moléculas a través de una membrana.