



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**CONTRIBUCIÓN DE LAS PORCIONES INTERFACIAL Y NO  
INTERFACIAL EN LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DEL  
DÍMERO DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA. EVIDENCIA  
DE INTERCOMUNICACIÓN DINÁMICA ENTRE MONÓMEROS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A**

**VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Armando Gómez-Puyou en los laboratorios 104 y 105 oriente del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante el proyecto doctoral, Viviana Zomosa Signoret, recibió una beca del **CONACyT**.

**I just want to understand life and its unfolding**

**François Jacob**

**DEDICO ESTA TESIS A MI ABUELITA MARTHA  
POILLON DE SIGNORET.**

TÚ SIEMPRE SERÁS MI EJEMPLO A SEGUIR, AUNQUE  
YA NO ESTÉS CONMIGO, TUS ENSEÑANZAS Y  
CONSEJOS PERMANECERAN VIVOS DENTRO DE MI.  
ERES LA BRÚJULA QUE SIEMPRE GUIARÁ MI CAMINO.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

☼ A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial, a la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular por haberme hecho la persona que soy.

☼ A los Dres. Marietta Tuena y Armando Gómez-Puyou, no sólo por enseñarme a hacer Ciencia, sino también por enseñarme a crecer como persona. Les agradezco de corazón todo el apoyo y toda la confianza que siempre me han brindado, fue hermoso haber trabajado con ustedes.

☼ Al Dr. Diego González-Halphein por la revisión pertinente a este trabajo y por todos los consejos que me ha dado.

☼ A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por la revisión a este trabajo, por el haberme iniciado en la investigación y por las pláticas tan bonitas que siempre hemos tenido.

☼ A la Dra. Adela Rodríguez Romero por todos sus comentarios y buenas sugerencias a lo largo de todo mi trabajo de tesis y por la revisión a este trabajo.

☼ A la Dra. Leticia Ramirez Silva por todo el apoyo que siempre me ha dado, por haber revisado esta tesis y por todas las pláticas. Muchísimas gracias Lety.

☼ Al Dr. Alejandro Fernández Velasco por todas las sugerencias durante todo el tiempo del doctorado, también muchas gracias por la revisión de este trabajo.

☼ Al Dr. Wilhelm Hansberg Torres por la revisión y las correcciones pertinentes que realizó a este trabajo.

☼ Al Dr. Juan Luis Rendón por haber sido parte de mi comité tutorial y por sus aportaciones a mi trabajo de doctorado.

☼ Al Dr. Antonio Peña por todas las sugerencias que me ha dado a lo largo del doctorado.

☼ Al Dr. Jorge Ramírez por todo el apoyo que siempre me ha brindado y por esas pláticas tan agradables.

☼ A la Dra. Georgina Garza Ramos por el apoyo de siempre. Geo, gracias por todo.

☼ A la técnico Beatriz Aguirre López por todo el apoyo.

☼ A la Sra Ma. Elena Orduña por todo el apoyo que siempre me ha dado en el laboratorio.

☼ A Juan e Ivette por todo el apoyo técnico que me han dado, porque de verdad no sé que hubiera hecho sin el apoyo de ustedes.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

☼ A mi mamá Chantal Signoret Poillon, por ser un ejemplo de fortaleza, por enseñarme a que debemos de luchar por nuestros sueños y por todo el apoyo que siempre me has dado, te quiero mucho.

☼ A mi tía Martha Signoret Poillon, por todas las aventuras que siempre hemos compartido juntas, por ser mucho más que una tía para mí.

☼ A mi hermana Andrea Zomosa Signoret, por ser mi mejor amiga, porque la vida me dio la alegría de tener una hermanita como tú.

☼ A mis sobrinitos Alan, Pablo, Kevin, Cristina y Nicole, porque son la alegría de la familia, porque con su inocencia logran robarnos una sonrisa aunque estemos tristes.

☼ A todos mis tíos, tías, primos y primas con los que he compartido momentos tan agradables y que he sentido su apoyo en los momentos difíciles.

☼ A Rosalba, por todo los momentos tan padres que compartimos, porque aunque no nos veamos tan seguido sé que cuento con tu apoyo siempre.

☼ A Laura, por todo lo que vivimos en la facultad, por la amistad de años.

☼ A Augusto, por ser una persona importante en mi vida, por todos los momentos que compartimos juntos, porque la distancia no separa por completo a las personas.

☼ A Héctor, por todo lo que me has enseñado, por lo que hemos compartido, por tu manera tan padre de ver la vida, por la importancia que le das a la amistad y por ser una de las personas más nobles que he conocido. Gracias por haberme ayudado a comprender que la única manera de resolver los problemas es enfrentándolos directamente.



☼ A Julián, gracias por todos los momentos que tengo grabados en mi corazón, por el apoyo de siempre, por darme la mano siempre que lo he necesitado, en fin, gracias por ser tú. Que bueno que la vida hizo que nuestros caminos se cruzaran.

☼ A Poncho, gracias por tu amistad, por las pláticas tan padres y profundas, por el apoyo de siempre. Ponch, gracias por ser tan buen amigo, por ser tan genuino y tan único.

☼ A Nohemí, gracias por todas las veces que hemos platicado, por todos los momentos que hemos compartido y por ser una amiga tan linda.

☼ A Agustín, gracias hermanito por todos los momentos y por todos los detalles que has tenido conmigo.

☼ A Rok, por la amistad que me brindaste, por todas las veces que me has hecho reír, por ser un amigo super lindo.

☼ A Bety y a Vane, por todas las pláticas tan padres que hemos tenido, por todas las veces que me han escuchado y que hemos hablado de cosas tanto profundas como vanales. Gracias por su amistad y por toda su ayuda en el laboratorio.

☼ A Alfredo, Horacio, Gabriel, Gerardo, Cony, Lenin, Claudia, Pau y Jesús por todos los momentos que compartimos en el laboratorio y por su ayuda.

☼ A Rod, Marianne y Kike por las pláticas geniales.

☼ A Sonia y Álvaro, por haberme dado la oportunidad de conocerlos, porque nos conozcamos cada vez más.

☼ A Víctor, por todas esas pláticas por chat, gracias por tu amistad.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	14 - 14
<b>ABSTRACT</b> .....	15 - 15
<b>ABREVIATURAS</b> .....	16 - 16
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Características generales de las proteínas .....	17 - 19
Plegamiento de las proteínas .....	19 - 20
La Paradoja de Levinthal .....	20 - 20
Modelos de plegamiento de las proteínas .....	20 - 23
Desnaturalización de las proteínas .....	23 - 25
Plegamiento de oligómeros .....	25 - 27
¿Cómo se ha tratado de resolver el problema de plegamiento de las proteínas? .....	27 - 28
Comparación entre los estudios de plegamiento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ...	28 - 29
Triosafosfato isomerasa (TIM) .....	29 - 31
Catálisis de la TIM .....	32 - 34
La interfase de la TIM y el asa 3 .....	34 - 35
El Asa 6 .....	35 - 36
La TIM como blanco para el diseño de fármacos .....	36 - 37
Semejanzas entre TcTIM y TbTIM .....	37 - 37
Diferencias entre TcTIM y TbTIM .....	37 - 39
Desnaturalización y reactivación de la TIM .....	39 - 40

Estudios con híbridos .....	40 - 42
Localización estructural de la Cys 15 .....	42 - 43
Importancia de la Cys 15 .....	43 - 44
Efecto del MMTS .....	44 - 47
<b>HIPÓTESIS</b> .....	48 - 48
<b>OBJETIVOS</b> .....	48 - 48
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	49 - 54
<b>RESULTADOS</b>	
<b>Control de la cinética de reactivación del homodímero de la triosafosfato isomerasa a partir de monómeros desplegados</b>	
Cinética de reactivación de TcTIM y TbTIM .....	55 - 60
Cinética de reactivación de una mutante de TcTIM en la cual los residuos de interfase son idénticos a los de TbTIM .....	60 - 61
Reactivación y agregación de la TIM .....	61 - 62
Formación de híbridos de monómeros de TcTIM y TbTIM.....	62 - 64
Características de los híbridos de TcTIM – TbTIM.....	65 - 65
Características espectroscópicas del híbrido TcTIM – TbTIM .....	65 - 66
<b>Derivatización de la Cisteína de Interfase: Evidencia de intercomunicación entre monómeros.</b>	
Efecto del MMTS sobre TcTIM y TbTIM .....	67 - 67
Efecto del MMTS sobre una mutante de TcTIM que tiene los residuos de interfase de TbTIM .....	67 - 69
Efecto del MMTS en híbridos formados a partir de monómeros de TcTIM y TbTIM .....	69 - 70

Sensibilidad al MMTS de los híbridos formados por un monómero	
C15A TcTIM y un monómero de TbTIM silvestre .....	70 - 72
Control de la actividad de los dos monómeros por las dos porciones	
de interfase Cys 15 – asa 3 .....	72 - 74
<b>DISCUSIÓN</b> .....	75 - 83
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	84 - 100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.-</b> Sobreposición de los homodímeros de TbTIM y TcTIM .....	31
<b>Fig. 2.-</b> Reacción catalítica de la TPI .....	33
<b>Fig. 3.-</b> Alineamiento de secuencias de TcTIM y TbTIM .....	38
<b>Fig. 4.-</b> Región de la Cys 15 rodeada por el asa 3 del monómero adyacente .....	43
<b>Fig. 5.-</b> Formación de híbridos .....	54
<b>Fig. 6.-</b> Cinética de reactivación de TcTIM y TbTIM a diferentes concentraciones de proteína .....	58
<b>Fig. 7.-</b> Relación de las constantes de velocidad de primer orden y la concentración de proteína .....	59
<b>Fig. 8.-</b> Formación y aislamiento de híbridos TcTIM y TbTIM .....	64
<b>Fig. 9.-</b> Estabilidad de TcTIM, TbTIM, y el heterodímero de monómeros de TcTIM y TbTIM a diferentes concentraciones de proteína .....	66
<b>Fig. 10.-</b> Fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular .....	66
<b>Fig. 11.-</b> Efecto del MMTS en la actividad de TbTIM, C15A TbTIM, TcTIM, C15A TcTIM y la mutante de interfase .....	68
<b>Fig. 12.-</b> Efecto del MMTS en la actividad del híbrido TbTIM – TcTIM .....	69
<b>Fig. 13.-</b> Efecto del MMTS en la actividad del híbrido C15A TcTIM – TbTIM y el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Residuos en contacto con la Cys 15 .....	45
<b>Tabla 2.</b> Puentes de hidrógeno que forma la Cys 15 .....	46
<b>Tabla 3.</b> Fluorescencia intrínseca de TcTIM, TbTIM y la mutante de interfase con y sin 6.0 M GdnHCl antes y después de la dilución del desnaturalizante .....	56
<b>Tabla 4.</b> Determinación de las constantes de velocidad de la reactivación de TcTIM, TbTIM y la mutante de interfase .....	60
<b>Tabla 5.</b> Diferencias entre los residuos que establecen contactos intersubunidades en TcTIM y TbTIM, y su posición en las estructuras cristalográficas de las enzimas .....	60
<b>Tabla 6.</b> Cinética de TcTIM, TbTIM, el híbrido TbTIM – TcTIM, la mutante de interfase de TcTIM, C15A TcTIM, el híbrido C15A TcTIM – TbTIM, E168D TbTIM y el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM .....	65

## RESUMEN

Las triosafosfato isomer asas de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) son enzimas homodiméricas que poseen propiedades catalíticas y una estructura tridimensional muy similar; su identidad en la secuencia de aminoácidos es del 68% y en la región interfacial del 85%. Sin embargo, se sabe que la formación de dímeros activos a partir de monómeros desplegados con hidrocloreuro de guanidina es mayor y más rápida en TcTIM que en TbTIM. En el presente trabajo encontramos que las cinéticas de reactivación a diferentes concentraciones de proteína mostraron que el proceso involucra tres reacciones: el plegamiento del monómero, la asociación de los monómeros plegados y la transición de dímeros inactivos en dímeros activos. Las constantes de velocidad de la reacción indicaron que a concentraciones de proteína relativamente bajas, el paso limitante de la velocidad de la reactivación fue la reacción de asociación; a altas concentraciones de proteína, el paso limitante de la velocidad fue la transición de dímeros inactivos a dímeros activos. Las velocidades de las últimas dos reacciones fueron mayores en TcTIM que en TbTIM. Estudios con una mutante de TcTIM con la interfase de TbTIM mostraron que la constante de velocidad de asociación fue similar a la de TbTIM. Sin embargo, la velocidad de la transición de dímeros inactivos en dímeros activos fue cercana a la de TcTIM. Por lo tanto, esta última reacción depende de la porción no interfacial de las enzimas. Cuando los monómeros desplegados de TcTIM y TbTIM se reactivaron juntos, se formó TcTIM, el híbrido TcTIM-TbTIM y TbTIM, en una proporción de 1.0 : 0.9 : 0.2. Cuando se pone a reactivar a TbTIM por si sola, el rendimiento es más bajo que el obtenido cuando se reactivan TbTIM y TcTIM en el mismo tubo. Esta distribución sugiere que en el híbrido, las características de los monómeros de TcTIM influyen en la cinética de reactivación de TbTIM.

Para explorar la intercomunicación dinámica entre los monómeros de TbTIM y TcTIM, construimos mutantes e híbridos de estas enzimas homólogas. En sus interfases, cada monómero posee una Cys 15 que está rodeada por residuos de la subunidad adyacente. En las dos TIM, el ambiente de la Cys es casi idéntico. Sin embargo, la susceptibilidad al agente tiol metil metano tiosulfonato (MMTS) es cerca de 100 veces mayor en TcTIM. La perturbación de la Cys de interfase causa la inhibición total de la catálisis además de cambios estructurales. Una mutante de TcTIM que tiene los residuos de interfase de TbTIM mostró la misma susceptibilidad al MMTS que TcTIM silvestre. Por lo tanto, la reactividad de la Cys 15 depende predominantemente de las porciones no interfaciales de la enzima. En un híbrido formado por monómeros de TbTIM y TcTIM, se conservaron las características de la Cys 15 de interfase de las enzimas originales. Las proteínas mutantes C15A de TcTIM y de TbTIM son completamente insensibles al MMTS. La susceptibilidad del híbrido C15A TcTIM – TbTIM, fue similar a la de TcTIM silvestre, pese a que la única Cys 15 pertenecía al monómero de TbTIM, lo que indica que la reactividad de la Cys 15 depende predominantemente de las características de la subunidad adyacente. En el híbrido C15A TcTIM–TbTIM, la máxima inhibición de la actividad que se induce por la perturbación de la única Cys de interfase es de aproximadamente 60 %. Para explorar si ésta era debida a que un monómero perdía la actividad o a un efecto parcial en ambos monómeros, se hibridizaron monómeros C15A TcTIM y monómeros inactivos E168D TbTIM. El MMTS inhibió su actividad aproximadamente 50 %. Por lo tanto, la mitad de la actividad de los dos monómeros depende de la integridad de las dos regiones interfaciales asa 3 - Cys 15 del dímero.

## ABSTRACT

Homodimeric triosephosphate isomerases from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) and *Trypanosoma brucei* (TbTIM) have markedly similar catalytic properties and 3-D structures; their overall amino acid sequence identity is 68 % and 85 % in their interface residues. Nonetheless, active dimer formation from guanidinium chloride unfolded monomers is faster and higher in TcTIM than in TbTIM. The kinetics of reactivation at different protein concentrations showed that the process involved three reactions: monomer folding, association of folded monomers and a transition from inactive to active dimers. The rate constants of the reactions indicated that at relatively low protein concentrations, the rate limiting step of reactivation was the association reaction; whereas at high protein concentrations the transition of inactive to active dimers was rate limiting. The rates of the latter two reactions were higher in TcTIM than in TbTIM. Studies with a mutant of TcTIM that had the interface residues of TbTIM showed that the association rate constant was similar to that of TbTIM; however, the rate of the transition from inactive to active dimers was close to that of TcTIM. Thus, its rate depends on the non-interfacial portion of the enzymes. When unfolded monomers of TcTIM and TbTIM were allowed to reactivate together, TcTIM, the TcTIM-TbTIM hybrid, and TbTIM were formed in a proportion of 1.0 : 0.9 : 0.2. When TbTIM was reactivated alone, the yield was lower than the yield obtained when TcTIM and TbTIM were reactivated together. This distribution suggests that in the hybrid, the characteristics of the TcTIM monomers enhance the kinetic properties of TbTIM monomers.

To explore the dynamic interplay between the monomers of TcTIM and TbTIM, we built mutants and hybrids of these enzymes. In their dimer interfaces, each monomer has a Cys 15 that is surrounded by residues of the adjoining subunit. In the two TIMs, the environments of the Cys are nearly identical, Nonetheless, the susceptibility to the thiol reagent methylmethane thiosulfonate (MMTS) is nearly 100-fold higher in TcTIM. The perturbation of the interface Cys causes abolition of catalysis and structural changes. A mutant of TcTIM that had the interface residues of TbTIM and wild type TcTIM exhibited similar sensitivities to MMTS. Thus, the reactivity of Cys 15 depends predominantly on the non-interfacial portions of the enzyme. In a hybrid of TcTIM and TbTIM monomers, the characteristics of the interfacial Cys of the original enzymes were conserved. C15A mutants of TcTIM and TbTIM are completely insensitive to MMTS. The sensitivity of C15A TcTIM - wild type TbTIM hybrids to MMTS was like that of TcTIM, albeit the only interface Cys belonged to the TbTIM monomer, this indicate that the reactivity of Cys 15 predominantly depends on the characteristics of the adjacent subunit. In the C15A TcTIM-TbTIM hybrid, the maximal inhibition of activity induced by perturbation of the sole interface Cys was around 60 %. To explore if this is due to abolition of activity of one monomer or to a partial effect on the two monomers, C15A TcTIM monomers and catalytically inert E168D TbTIM monomers were hybridized. MMTS inhibited their activity by 50 %. Thus, we show that about half of the activity of the two monomers depends on the integrity of the two Cys 15 – loop 3 interfacial regions of the dimer.



**ABREVIATURAS**

$\alpha$ GDH-	$\alpha$ -glicerolfosfato deshidrogenasa
DHAP-	Dihidroxiacetona fosfato
DTT-	Ditiotreitol
EDTA-	Ácido etilendiamintetracético
FI-	Intensidad de fluorescencia
G3P-	Gliceraldehído 3 fosfato
GdnHCl-	Hidrocloreuro de guanidina
HEPES-	Ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etano sulfónico
MMS-	Metil metano tiosulfonato
NADH-	Dinucleótido de nicotinamina adenina reducido
SCM-	Centro espectral de masas
TbTIM-	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM-	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA-	Trietanolamina
TIM o TPI-	Triosafosfato Isomerasa

## INTRODUCCIÓN

### **Características generales de las proteínas**

La palabra proteína proviene del griego *proteios*, que significa “lo primero”. Las proteínas desempeñan papeles esenciales en prácticamente todos los procesos biológicos. Son las moléculas orgánicas más abundantes en las células; constituyen más del 50% del peso seco de los organismos. Se encuentran en todos los organismos y organelos intracelulares y son fundamentales para las propiedades y las características de todos los seres vivos. Existen muchas clases de proteínas, cada una de ellas especializada en una función biológica diferente y específica. Las proteínas se encuentran asociadas con las membranas celulares o en forma soluble en el citoplasma o en el interior de organelos (Radford, 2000; Ellis y Pinheiro, 2002). Los ácidos nucleicos, que también son esenciales para la vida, contienen la información genética de cada organismo, pero la expresión de esta información depende casi completamente de las proteínas (Creighton, 1993(b)).

En relación a las múltiples funciones que llevan a cabo las proteínas, quisiera llamar la atención a una en particular. Todos los seres vivos usan reacciones químicas para proveerse de energía química y utilizarla eficientemente, pero bajo condiciones fisiológicas (soluciones acuosas, 37 °C, pH 7.0, presión atmosférica) no ocurren a velocidades compatibles con las necesidades de los seres vivos. Las enzimas son las proteínas encargadas de aumentar en varios órdenes de magnitud la velocidad a la que las reacciones ocurren.

Pese a sus funciones biológicas tan diversas (catálisis, contracción, captación de luz, transporte, etc), las proteínas son una clase de moléculas relativamente homogénea. Todas son polímeros lineales contruidos por varias combinaciones de sólo 20 aminoácidos

químicamente diferentes. Las proteínas difieren únicamente en la secuencia en que los aminoácidos se enlazan unos con otros al formar una cadena polipeptídica. El secreto de sus funciones tan variadas recae parcialmente en la gran diversidad química de los aminoácidos, pero principalmente en la estructura tridimensional que pueden adquirir. De hecho, las propiedades funcionales de las proteínas se pueden entender principalmente en términos de su estructura tridimensional (Corey, 1948).

Una proteína se forma a partir de cadenas lineales de aminoácidos cuya secuencia está relacionada con su función. En todas las células, los aminoácidos que se encuentran enlazados por medio de uniones peptídicas dan lugar a una estructura tridimensional específica. Esta es la estructura funcionalmente activa que se conoce como estructura nativa. Para facilitar la descripción de la estructura de una proteína, se han usado los siguientes términos (Creighton, 1993a). La **estructura primaria** de una proteína es la secuencia de aminoácidos. La **estructura secundaria** de un segmento de una cadena polipeptídica es el arreglo espacial local de los átomos de su cadena principal, sin ponerle atención a las cadenas laterales o a su relación con otros segmentos. Algunas veces, la estructura secundaria es periódica en la naturaleza, dando lugar a estructuras bien definidas como las  $\alpha$ -hélices o las hojas  $\beta$ . La **estructura terciaria** es el arreglo en el espacio de todos los átomos en una cadena polipeptídica o en cadenas covalentemente unidas. Varias de las proteínas son oligómeros compuestos de subunidades que no están covalentemente unidas. La completa organización de estas subunidades se conoce como **estructura cuaternaria**. Ésta se refiere al arreglo de las subunidades en el espacio y al conjunto de los contactos entre las subunidades y las interacciones, sin ponerle atención a la geometría interna de las subunidades (Sanger, 1952; Fersht, 1985). Las estructuras de las proteínas más grandes ( $MM > 20\ 000$ ) parecen estar compuestas de unidades globulares plegadas

independientemente llamadas **dominios**. Los dominios contienen generalmente subestructuras pequeñas frecuentemente recurrentes a las que se les llama **estructuras super secundarias**. Éstas son combinaciones de estructuras  $\alpha$  y/o  $\beta$  (Sadana y Vo-Dinh, 2001). Al sitio de contacto entre proteína-proteína se le conoce como **interfase**; éstas se establecen a través de interacciones no covalentes.

### **Plegamiento de las proteínas**

El plegamiento es el proceso mediante el cual una cadena polipeptídica adquiere una estructura tridimensional específica (la forma nativa) con actividad biológica (Radford, 2000; Ellis & Pinheiro, 2002).

La cadena polipeptídica se pliega en una conformación que está determinada por la información incluida en la secuencia de los residuos de aminoácidos (Anfinsen, 1973). Aparentemente, para que la proteína se pliegue, no hay necesidad de información adicional o suministro de energía. Sin embargo, es necesario mencionar que la adquisición del estado nativo de muchas proteínas requiere de proteínas llamadas chaperonas cuya función es la de asistir a la organización espacial del producto final impidiendo que las proteínas se agreguen irreversiblemente (ver más adelante). La función de las chaperonas, por lo tanto, es la de rescatar a las proteínas de la pérdida irreversible de su estructura nativa (Beissinger y Buchner, 1998). Las chaperonas tienen el papel de prevenir la agregación de las proteínas parcialmente plegadas. Para ello, las chaperonas previenen las altas concentraciones de proteínas *in vivo*, uniéndose a las cadenas polipeptídicas nacientes (Ellis y Pinheiro, 2002; Dobson, 2003; Sadana y Vo-Dinh, 2001). Las proteínas desplegadas que escapan al sistema de chaperonas son degradadas en el proteosoma (Lansbury, 1999; Sanders y Nagy, 2000; Muchowski, 2002).

En el retículo endoplásmico (RE), el proceso de plegamiento / desplegado de una proteína comprende varios pasos que involucran tanto reacciones químicas como la participación de múltiples complejos de proteínas. Estos incluyen al complejo del translocón (a través del cual las proteínas nacientes entran a la membrana o al lumen del RE), chaperonas, enzimas involucradas en modificaciones post - traduccionales, y proteínas involucradas en el tráfico entre el RE y el aparato de Golgi (Sanders y Nagy, 2000).

Algunos autores consideran que el estado nativo de una proteína es la conformación de la cadena polipeptídica termodinámicamente más estable (Dobson, 2003). También se ha comprobado que el plegamiento de una cadena polipeptídica a una estructura tridimensional es un proceso reversible, que depende de las condiciones del ambiente (Anfinsen, 1973). Con base en muchos estudios, se considera que el plegamiento sigue una secuencia de pasos ordenados mediante los cuales la proteína adquiere su estructura funcional. Aunque este proceso ha sido objeto de múltiples estudios, la forma precisa por la que una proteína adquiere una estructura con función biológica permanece como uno de los enigmas de la bioquímica.

Está muy bien documentado que el plegamiento de las proteínas involucra una competencia cinética entre la vía correcta de plegamiento y vías incorrectas de plegamiento. Por lo tanto, la tendencia de las proteínas a la agregación es función de las velocidades relativas de las reacciones, que conducen a la estructura nativa o a su agregación (Baker y Agard, 1994).

### **La Paradoja de Levinthal**

En 1968, Levinthal planteó un problema: si el proceso de plegamiento de una proteína a partir de su estado desplegado se llevara a cabo por medio de la búsqueda azarosa a través

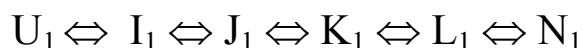
de todas las posibles conformaciones, el tiempo que se requeriría para obtener una proteína nativa sería mayor a la edad del universo. Esta observación, que se conoce como la paradoja de Levinthal, plantea que, debido a que las proteínas adquieren su estructura tridimensional en intervalos de tiempo que varían de segundos o minutos, no es posible que el plegamiento sea consecuencia de un proceso de búsqueda al azar (Levinthal, 1968). Desde que esta paradoja surgió, se ha propuesto para su resolución que existen alternativas a la búsqueda de conformaciones al azar. A pesar de que el espacio de conformaciones es vasto, no habría problema de búsqueda si cada residuo de aminoácido pudiera encontrar su conformación correcta independientemente de los otros, o si solamente las interacciones con los vecinos más cercanos estuvieran involucradas. De esta manera, se esperaría un plegamiento rápido (Zwanzig, *et al.* 1992). La paradoja se ha resuelto proponiendo la presencia de rutas de plegamiento. Las proteínas deben de plegarse por una vía ordenada en donde el acercamiento a la forma nativa esté acompañado por un aumento en la estabilidad conformacional (Goldenberg, 1985).

Se ha pensado que durante el proceso de plegamiento, las cadenas polipeptídicas extendidas, sintetizadas por los ribosomas, se colapsan en varios estados globulares cuyos arreglos están determinados por la secuencia de aminoácidos de cada cadena. Por ejemplo, los aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas tienden a agruparse espontáneamente en una estructura plegada evitando el ambiente acuoso (Jaenicke, *et al.* 1996). Una vez que la proteína está compacta, con pequeños o ningún parche hidrofóbico expuestos al solvente, la formación de la estructura nativa procede más lentamente (Privalov y Potekhin, 1986). Los principios básicos que determinan la estructura espacial son la minimización del área de superficie hidrofóbica, la distribución de residuos no polares dentro de la proteína, y la

de los residuos polares en la superficie de la molécula (Pace, *et al.* 1996 ; Privalov y Gill, 1988).

Se han propuesto varios modelos para entender el plegamiento de las proteínas. A continuación se mencionan los modelos más estudiados (Kim, y Baldwin, 1982).

Partiendo del siguiente modelo de plegamiento podemos explicar los distintos modelos:



Si todas las constantes de velocidad de U a I son lentas y todas las constantes más allá de I son más rápidas, se obtiene el modelo de nucleación, en donde las I's representan uno o más núcleos cinéticos. El paso inicial es el paso limitante de la velocidad. No se acumulan intermediarios en cantidad suficiente como para detectarlos.

En el modelo de difusión-colisión, las constantes de velocidad provienen de distintos intermediarios. En este modelo se enfatiza el proceso de difusión, y este se puede imaginar como un paso particular, por ejemplo,  $I_i \rightarrow I_j$ , en donde dos unidades simplemente difunden juntas en una colisión efectiva.  $J_i \rightarrow K_i$  sería la estabilización de ese complejo a través de rearrreglos locales. El modelo del colapso hidrofóbico asume que el efecto hidrofóbico es la fuerza dominante en el plegamiento. El agua es eliminada aparentemente sin afectar a la formación de la estructura secundaria. Ésta última se forma en varios pasos en una serie de reorganizaciones locales,  $K_i \rightarrow L_i \rightarrow N$ .

El modelo del rompecabezas (Harrison y Durbin, 1985) utiliza este pasatiempo como un indicador de cómo podría ocurrir el proceso de plegamiento. Si utilizamos esa analogía, las piezas deberían de estar unidas para representar la cadena y la secuencia, y obviamente sólo podría existir una estructura nativa. Por ejemplo, si las piezas tienen un color uniforme y

constante, no habría un punto de inicio preferente, cada plegamiento seguiría una vía distinta, y se requeriría la representación de la matriz completa.

Existen diversas maneras por las que una cadena polipeptídica se compacta. Una es la formación de hélices y de hojas que se forman espontáneamente por medio de puentes de hidrógeno. También son fundamentales las interacciones de van der Waals en la formación de estructuras compactas (Fersht, 1985).

El plegamiento de las proteínas es una característica esencial de la conversión de información genética en actividad biológica. Esto ha llevado a la idea de que cualquier falla en el proceso de plegamiento puede ser una causa de enfermedad (Dobson y Ellis, 1998; Lansbury, 1999; Vendruscolo *et al.* 2003; Sadana y Vo-Dinh 2001). En el ambiente intracelular, la competencia entre plegamiento, agregación y degradación determina si una cadena polipeptídica alcanza su estado funcional o si se agrega causando muerte celular o inclusive, la muerte del organismo.

### **Desnaturalización de las proteínas**

La estructura nativa de las proteínas se conserva únicamente bajo condiciones apropiadas de solvente, pH, temperatura y presión; de hecho, se ha observado en múltiples ocasiones que variaciones de dichas condiciones pueden provocar la desnaturalización de la proteína. Experimentalmente, la desnaturalización también se puede lograr mediante la utilización de agentes químicos como el hidrocloreuro de guanidina o la urea (Dill y Shortle, 1991).

El término desnaturalización se ha utilizado para referirse a cualquier cambio del estado nativo que es biológicamente activo, incluyendo las alteraciones irreversibles, como las modificaciones covalentes y la agregación (Dill y Shortle, 1991). La baja estabilidad de las



proteínas nativas las hace fácilmente susceptibles a la desnaturalización debido a una alteración en el balance de las fuerzas débiles que mantienen su conformación nativa (Voet y Voet, 2004). Varias proteínas son estables en un intervalo de 0 °C a 40 °C. A mayores temperaturas ocurre la desnaturalización que, en muchos casos, es reversible. Para algunas proteínas, el desplegamiento también ocurre a bajas temperaturas entre 0 °C a 10 °C, el fenómeno se conoce como desnaturalización en frío (Dill y Shortle, 1991).

La estabilidad de la estructura nativa de una proteína se debe principalmente a las interacciones hidrofóbicas entre los grupos no polares de las proteínas (Pace, *et al.* 1996 ; Privalov y Gill, 1988). El secreto de la estabilidad de una proteína no está en la magnitud de las interacciones intramoleculares, que siempre son débiles, sino en la cooperación efectiva de estas interacciones (Jaenicke, 1991a ; Jaenicke, 1991b).

Para desnaturalizar una proteína existen diferentes técnicas; una de ellas es la utilización del hidrocloreto de guanidina (GdnHCl). Las soluciones concentradas de hidrocloreto de guanidina o de urea promueven la desnaturalización de una proteína al incrementar la estabilidad del estado desnaturalizado (U). Estos desnaturalizantes solubilizan todos los constituyentes de las proteínas, desde el esqueleto polipeptídico hasta sus cadenas laterales hidrofóbicas; aumentando la solubilidad de los residuos no polares en agua (Kyte, 1995). Se supone que en presencia de este agente, los estados desnaturalizados son conformaciones de hebras al azar (*random coil*). En este estado, los ángulos de rotación alrededor de cada enlace del esqueleto polipeptídico y las cadenas laterales tienen completa libertad de rotación. Esto indica que una proteína desnaturalizada representa un conjunto de conformeros que rápidamente se convierten en otros que tienen una energía similar (Tanford, 1968; Dill y Shortle; 1991 y Matthews, 1993).

El desplegamiento / replegamiento es en principio, un proceso reversible. En la práctica, sin embargo, el proceso puede no ser totalmente reversible. La razón principal suele ser la ocurrencia de eventos secundarios, tales como modificaciones químicas de las cadenas laterales de los aminoácidos, hidrólisis de la cadena polipeptídica y agregación. Estos procesos secundarios irreversibles son usualmente más lentos que el desplegamiento de las proteínas. Por lo tanto, no afectan significativamente el desplegamiento cuando la proteína se expone a condiciones extremas por un periodo de tiempo corto (Tanford, 1970).

### **Plegamiento de oligómeros**

Las estructuras nativas de muchas proteínas se componen de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas a través de enlaces no covalentes; éstas se conocen como oligómeros. Las cadenas que forman los oligómeros pueden ser idénticas o diferentes y sus tamaños pueden variar entre 50 y 3000 residuos. Las estructuras más frecuentes son dímeros y tetrámeros (Garel, 1992).

De acuerdo a Jaenicke y Lilie (2000), las ventajas que tienen las enzimas oligoméricas con respecto a las enzimas monoméricas, son:

- 1) La existencia de múltiples subunidades que les confiere la capacidad de regular la actividad catalítica.
- 2) En el caso de los complejos multienzimáticos, la eficiencia catalítica de las reacciones secuenciales puede aumentar significativamente.
- 3) En algunas enzimas, la formación de los sitios catalíticos requiere de residuos que pertenecen a distintas cadenas polipeptídicas, por lo tanto, la catálisis requiere de la asociación de las subunidades.

- 4) En las proteínas pequeñas puede quedar expuesta al solvente una gran área hidrofóbica, se ha pensado que el ocultamiento de dichos residuos por medio de la asociación de las subunidades podría ocultar dichas áreas contribuyendo más a la estabilidad de dichas proteínas.

La formación de proteínas monoméricas requiere únicamente del plegamiento intramolecular. El plegamiento de las oligoméricas requiere además del reconocimiento entre dos o más de sus subunidades y su asociación. En muchos casos, las reacciones de asociación están relacionadas con la aparición de la actividad catalítica o con su regulación.

La formación de las proteínas oligoméricas involucra interacciones intra-subunidad e inter-subunitarias. En la reacción intermolecular debe existir un ajuste preciso entre las porciones de las proteínas que van a formar las interfases. Por lo tanto, la asociación de dos proteínas requiere de un sitio específico de reconocimiento en cada uno de los monómeros. En la mayoría de los casos, la asociación se lleva a cabo después del plegamiento de cada uno de los reactantes. En consecuencia, la formación de una proteína oligomérica a partir de sus cadenas desnaturalizadas y separadas, probablemente empieza con los cambios que sufre cada una de las cadenas polipeptídicas hasta que se llegue a formar un sitio específico de unión que reconoce al otro monómero. Una vez que ocurre la asociación, el homo o hetero oligómero necesitará llevar a cabo arreglos internos para convertirse en una proteína nativa (Bennett, *et al.* 1995). Con mucha frecuencia, la velocidad de plegamiento de las proteínas oligoméricas está limitada por la asociación de sus subunidades (Ferreira y De Felice, 2001; Zomosa-Signoret, *et al.* 2003).

Los estudios de plegamiento de proteínas oligoméricas son más difíciles que los estudios realizados en las proteínas monoméricas debido a las siguientes razones: i) los procesos

cinéticos complejos en ocasiones son poco reversibles, ii) las proteínas oligoméricas poseen una alta tendencia a la precipitación y a la agregación durante los estudios de desnaturalización-renaturalización, provocando así una irreversibilidad total o parcial del proceso y, en consecuencia, resulta complicada la determinación de los parámetros termodinámicos (Jaenicke y Lilie, 2000).

Los homodímeros representan el modelo más sencillo para estudiar el proceso de la oligomerización. En términos simples, la adquisición de su estado nativo consta únicamente de dos procesos: el de plegamiento y el de asociación.

Los experimentos de desnaturalización / renaturalización constituyen una herramienta poderosa para dilucidar el mecanismo de plegamiento de las proteínas: en ambas direcciones, los experimentos cinéticos y al equilibrio permiten distinguir al plegamiento y a la asociación, haciendo uso de la dependencia de la velocidad de la reacción con la concentración de proteína (Rudolph, *et al.* 1997).

### **¿Cómo se ha tratado de resolver el problema del plegamiento de las proteínas?**

Hoy en día, el mecanismo de plegamiento de las proteínas es un problema sin resolver. Por lo tanto, uno de los principales propósitos en los estudios sobre el plegamiento y desplegamiento de las proteínas es entender en detalle los principios que dictan la formación de la estructura nativa, y el de determinar el mecanismo del plegamiento. Nos propusimos determinar el mecanismo de plegamiento de la triosafosfato isomerasa y distinguir qué parte de la enzima es la que contribuye en las diferentes etapas del modelo de plegamiento. Para abordar el problema del plegamiento de proteínas, es necesario conocer los principios que determinan la estructura de estas moléculas (Jaenicke, 1987).

Los análisis cinéticos de las características espectroscópicas o de la actividad biológica durante el plegamiento de las cadenas polipeptídicas proveen una manera sencilla de monitorear la adquisición de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, así como la recuperación de la actividad catalítica durante el proceso de plegamiento / asociación. (Baldwin, 1995). Estos datos permiten establecer la relación entre la estructura y la función durante el proceso de la formación de la estructura nativa (Shao, *et al.* 1997). El perfil de los cambios en función del tiempo puede también revelar si en el plegamiento existen intermediarios parcialmente plegados y cuáles son sus características estructurales.

### **Comparación entre los estudios de plegamiento *in vivo* e *in vitro***

Se ha discutido mucho la validez de la comparación del plegamiento *in vitro* e *in vivo*. El problema surge del hecho de que en los estudios *in vitro* la renaturalización se inicia a partir de una cadena polipeptídica completa. *In vivo* el proceso involucra el crecimiento de la cadena a partir del amino terminal hacia el carboxilo terminal y de un plegamiento que progresa en la medida en la que la cadena polipeptídica se alarga (Jaenicke y Rudolph, 1986 ; Chothia, 1980).

Para considerar si el plegamiento *in vitro* corresponde al plegamiento *in vivo*, se deben cumplir cuando menos dos condiciones: i) que la cinética de renaturalización esté dentro de un intervalo de tiempo similar al que ocurre el plegamiento *in vivo* y ii) que el producto final de la renaturalización sea indistinguible del estado nativo inicial (Jaenicke, 1999). Además se debe tomar en cuenta que el plegamiento *in vivo* es facilitado por varias proteínas que ayudan a que el plegamiento se lleve a cabo en el lugar y tiempo adecuados y que, además, ayudan a evitar la agregación irreversible de las cadenas recién sintetizadas.

Es posible que *in vivo*, el plegamiento empiece en la medida en que la cadena de aminoácidos se va formando. En las bacterias, el ensamblaje de la cadena polipeptídica está acoplado a la transcripción y procede a una velocidad de aproximadamente 15 aminoácidos por segundo. Cuando se libera del ribosoma, ocurre el último paso del plegamiento del monómero. Los dominios pueden plegarse por sí mismos y el plegamiento puede ser relativamente rápido, por lo tanto, pareciera que el plegamiento parcial de los dominios se lleva a cabo al salir del ribosoma. El plegamiento completo de la cadena, sin embargo, requiere de la reacción lenta de la asociación de los dominios. Esto sugiere que la asociación de los monómeros ocurre después de que se ha completado la síntesis (Fischer y Schmid, 1990).

### **Triofosfato isomerasa (TIM)**

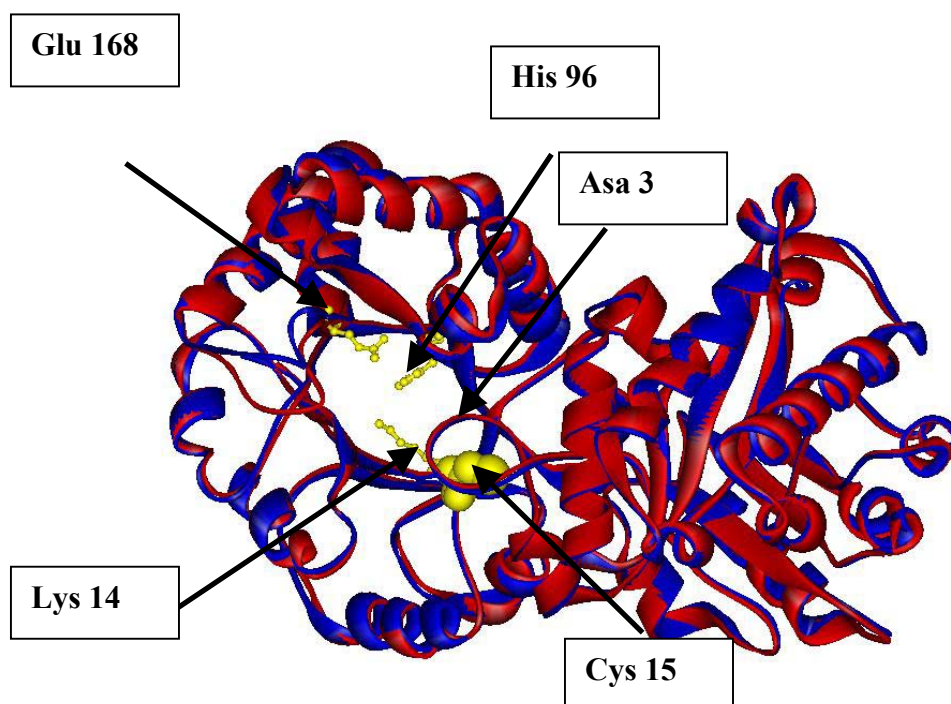
La TIM es un prototipo de proteínas con estructuras tipo barril  $\alpha / \beta$ , que constituye uno de los patrones de plegamiento más comunes; cerca del 10 % de las enzimas que se conocen presentan este arreglo estructural. Dependiendo de la proteína, la longitud del dominio estructural varía desde un barril de 250 amino ácidos (TIM) hasta barriles con 327 amino ácidos (dominio  $\alpha / \beta$  de la xilosa isomerasa). La primera proteína en la que se describió la estructura de barriles  $\alpha / \beta$  fue la triosafosfato isomerasa de pollo (Banner, *et al.* 1975) de ahí el nombre de “TIM barrel”.

La estructura de los barriles  $\alpha / \beta$  se forma por 8 hebras  $\beta$ , rodeadas de 8 hélices  $\alpha$ . Las hebras  $\beta$  se componen principalmente de aminoácidos de carácter hidrofóbico que se localizan en el interior del barril. Estos se rodean por  $\alpha$ -hélices anfipáticas que se empaquetan

formando la interfase proteína-solvente (Nagano, *et al.* 2002). Normalmente, se encuentra una hélice  $\alpha$  entre 2 hebras  $\beta$  vecinas (Reardon y Farber, 1995).

En la mayoría de las especies, la TIM es exclusivamente una proteína homodimérica, de 27 kDa, de naturaleza soluble, que cataliza la isomerización reversible entre la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) (Knowles, 1991) (Figura 1). La dihidroxiacetona fosfato también proviene de la degradación de los ácidos grasos, después de la transformación del glicerol de los triacilglicéridos en dihidroxiacetona fosfato. El G3P que se forma continúa en la vía glucolítica. La TIM es por lo tanto necesaria para la obtención del ATP en la vía glucolítica (Knowles y Alberly, 1977; Knowles, 1991).

La TIM se ha encontrado en todos los organismos en los que se ha buscado (Lolis, *et al.* 1990). A la fecha, se ha reportado la secuencia de aminoácidos de esta proteína de más de 200 especies y se tiene la estructura tridimensional con una alta resolución de la TIM de pollo (Banner *et al.* 1975), levadura (Lolis, *et al.* 1990), *Trypanosoma brucei* (Wierenga, *et al.* 1991), *Escherichia coli* (Noble, *et al.* 1993), humano (Mande, *et al.* 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni, *et al.* 1995), *Methanothermus fervidus* (Kohloff, *et al.* 1996), *Plasmodium falciparum* (Velanker, *et al.* 1997), *Vibrio marinus* (Alvarez, *et al.* 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado, *et al.* 1998), *Leishmania mexicana* (Williams, *et al.* 1999), *Thermotoga maritima* (Maes, *et al.* 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden, *et al.* 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero, *et al.* 2002), *Caenorhabditis elegans* (Symersky, *et al.* 2003), conejo (Aparicio, *et al.* 2003), *Thermoproteus tenax* (Walden, *et al.* 2004) y *Giardia lamblia* (Reyes-Vivas, comunicación personal).



**Fig. 1. Sobreposición de los homodímeros de TbTIM (azul) y TcTIM (rojo).** Se muestran los residuos catalíticos de TcTIM, los residuos catalíticos y la región del asa 3 y la Cys de la interfase.

La mayoría de las TIM que se han analizado son dímeros formados por dos cadenas idénticas de entre 25 y 27 kDa, con excepción de *Methanothermobacter fervidus* (Kohlhoff, *et al.* 1996), *Pyrococcus woesei* (Walden, *et al.* 2001) y *Thermoproteus tenax* (Walden, *et al.* 2004), que son tetrámeros, y de *Thermotoga maritima* (Maes, *et al.* 1999), que también es un tetrámero formado a partir de un dímero de dímeros que se encuentra fusionado con la fosfoglicerato cinasa. Todas estas enzimas también tienen la estructura barril  $\alpha/\beta$ .



## Catálisis de la Triosafosfato isomerasa

### a) El sitio activo

En su forma nativa, la TIM tiene dos sitios catalíticos, uno en cada subunidad. Los residuos catalíticos pertenecen a la estructura primaria de cada monómero y se encuentran en los extremos amino de las asas 1, 4 y 6 que conectan las hebras  $\beta$  con las siguientes hélices  $\alpha$ . Se han identificado 3 residuos catalíticos; el glutamato 168 (Glu 168), la histidina 96 (His 96) y la lisina 14 (Lys 14), siguiendo la numeración de TcTIM (Fig. 1). Este último residuo tiene la función de neutralizar la carga del fosfato del sustrato para que éste se una correctamente al sitio activo (Lodi, *et al.* 1994; Joseph-McCarthy, *et al.* 1994). El Glu 168 y la His 96 actúan como ácidos y bases generales. La conversión de G3P al intermediario enediol (Fig. 2), es catalizada por una base general, que abstrae un protón del carbono 2 del G3P, y por un ácido general, que protona el átomo del oxígeno de su carbonilo. Los estudios de rayos X revelan que el Glu 168 se sitúa en una posición que facilita la remoción del protón del carbono 2 del G3P.

### b) Catálisis

La triosafosfato isomerasa es una enzima muy eficiente; la velocidad a la que cataliza la isomerización del G3P es entre  $10^8$  y  $10^9$  veces mayor que la que ocurre en ausencia de enzima. La relación  $k_{cat} / K_m$  para el G3P como sustrato es de  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Este valor es comparable al calculado para las reacciones bimoleculares en solución que sólo están limitadas por la difusión ( $10^8$  a  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Knowles y Albery, 1977). Debido a esto, se ha considerado que la TIM es un catalizador “perfecto”, ya que cualquier aumento en la velocidad de los pasos catalíticos no tendría efecto en la velocidad de la reacción.

La TIM presenta una cinética que se ajusta a un modelo estricto del tipo Michaelis-Menten; sin embargo, Harris y colaboradores (1998) describieron que puede existir comunicación entre los monómeros y que ésta puede modular la transferencia intramolecular del protón entre los carbonos C1 y C2 del G3P. La TIM no requiere cofactores ni coenzimas y no hay evidencia de que en el proceso catalítico haya alosterismo o cooperatividad entre las subunidades (Mande, *et al.* 1994). Los parámetros cinéticos de la TIM de diferentes especies son semejantes (Lambeir, *et al.* 1987).

La función de la TIM es la de disminuir las barreras energéticas que limitan la velocidad de protonación y deprotonación del G3P y de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La reacción procede a través de la formación de un intermediario *cis*-enediol (Rose y O'Connell, 1961; Knowles y Albery, 1977) (Fig. 2). El anillo imidazol de la His 96 es un catalizador electrofílico que polariza al grupo carbonilo del sustrato, permitiendo su enolización. El Glu 168 cataliza la transferencia intramolecular entre los carbonos C1 y el C2 del G3P, mientras que la His 96 cataliza la transferencia del protón entre los oxígenos O1 y el O2 del G3P (Knowles, 1991; Harris, *et al.* 1998).

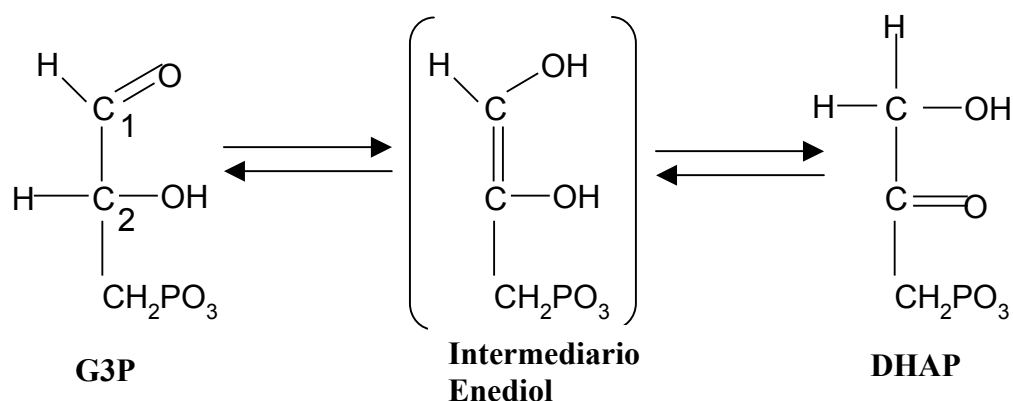


Fig. 2. Reacción catalítica de la TPI. Se muestra el intermediario enediol.

Cada monómero tiene un sitio activo y funciona independientemente del otro. Sin embargo, sólo la forma dimérica es activa (Waley, 1973). De hecho, los monómeros que se han construido por mutagénesis dirigida poseen una actividad catalítica aproximadamente mil veces menor que la de la enzima nativa (Borchert, *et al.* 1994; Borchert, *et al.* 1995; Schliebs, *et al.* 1996; Saab-Rincon, *et al.* 2001). Esto podría indicar que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad o la estabilidad del sitio activo de la subunidad vecina. En este trabajo quisimos aproximarnos a entender la razón por la cual esta enzima sólo es activa como dímero.

### **La interfase de la TIM y el asa 3**

La interfase del dímero se compone principalmente por las asas 1, 2 y 3. Las asas 3 y 6 sobresalen de la superficie del monómero (Wierenga, *et al.* 1992). La superficie de contacto entre los dos monómeros ocupa un espacio relativamente grande; el área que se esconde al solvente durante la dimerización es de aproximadamente  $1400 \text{ \AA}^2$ . La mayoría de los contactos entre las dos subunidades de la TIM se encuentran en el asa 3, también conocida como asa de interfase o interdigitante, ya que penetra en el interior del otro monómero. Algunos de los residuos del asa 3 establecen interacciones de tipo Van der Waals con residuos del sitio activo de la otra subunidad (Lolis, *et al.* 1990) (ver Figura 3). Las cavidades hidrofóbicas generadas por las asas de la interfase de cada monómero proporcionan la mayoría de los contactos entre los monómeros y se encuentran en los extremos de la interfase.

El asa 3 se extiende del residuo 68 hasta el 80 de cada una de las subunidades. El asa penetra en una hendidura que se localiza cerca del sitio activo de la otra subunidad (Lolis, *et al.* 1990) lo que da como resultado que los sitios activos y la interfase se encuentren

cercanos. Debido a que el dímero de la TIM es simétrico, es importante enfatizar que la interfase tiene dos regiones idénticas que se encuentran formadas por un asa 3 de cada monómero, cada una de las cuales rodea al residuo número 15 del monómero adyacente. Existen numerosos datos que ilustran la importancia del asa 3 en la actividad y en la estabilidad de la TIM. Por ejemplo, el Glu 98, que se encuentra cercano al sitio activo forma un puente de hidrógeno con la Thr 76 de la subunidad adyacente (Aqvist y Fothergill, 1996). Otro dato de interés es que, en la TIM de levadura, el reemplazo de la Asn 77 por un Asp incrementó la velocidad de inactivación térmica, disminuyó la  $k_{cat}$  y la desnaturalización inducida con la dilución (Ahern, *et al.* 1987).

### **El Asa 6**

El asa 6 de la TIM es de tipo  $\Omega$  (residuos 170 a 180) y se localiza cerca del sitio activo de la enzima. El asa se mueve como un cuerpo rígido tapando al sitio activo. Este movimiento se produce por cambios en el ángulo de torsión de la cadena primaria de algunos de los residuos que tienen un papel de “bisagra” (Sun y Sampson, 1998). Se sabe que durante el proceso catalítico, el asa 6 aísla al sitio activo del solvente, estableciendo un puente de hidrógeno entre la Gly 174 del asa 6 y el grupo fosfato del sustrato. Estos arreglos permiten que el intermediario enediol adquiera una conformación planar (ver Fig. 2). Esto favorece la transformación eficiente del sustrato y disminuye la eliminación del grupo fosfato del intermediario, previniendo la formación del metilglioxal que es tóxico aún a concentraciones muy bajas (Pompliano, *et al.* 1990; Knowles, 1991; Lolis, *et al.* 1990). El asa 6 o asa catalítica se mueve cerca de 7 Å de una posición “abierta” hacia una posición “cerrada”. Estas conformaciones se han visto en las estructuras tridimensionales de la TIM de pollo, levadura, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, humano, *Escherichia coli* y *Bacillus*

*stearothermophilus* (Lolis, *et al.* 1990; Lolis y Petsko, 1990; Noble, *et al.* 1991; Wierenga, *et al.* 1991; Mande, *et al.* 1994; Zhang, *et al.* 1994; Delboni, *et al.* 1995; Velanker, *et al.* 1997). La posición cerrada se observó en presencia de análogos del sustrato o de fosfato, mientras que la posición abierta se observa en ausencia del ligando (William y McDermott, 1995; Wierenga y Noble, 1992). Los datos obtenidos a partir del estudio del asa 6 sugieren que el sustrato desplaza el equilibrio hacia la forma “cerrada” de la tapa, en tanto que en su ausencia el equilibrio se desplaza hacia la forma “abierta” (Eaazhisai, *et al.* 2004; Kursula, *et al.* 2004; Aparicio, *et al.* 2003).

### **La TIM como blanco para el diseño de fármacos**

Se ha demostrado que la deficiencia de esta enzima en el ser humano incrementa los niveles de dihidroxiacetona fosfato. La deficiencia en la actividad de la TIM se acompaña de anemia crónica y debilitamiento neuromuscular (Ahmed, *et al.* 2003). Debido a su importancia en la ruta glucolítica, se ha considerado la TIM como un blanco atractivo para el diseño de fármacos contra algunos parásitos. En particular se ha tratado de diseñar moléculas que sean efectivas contra el *Trypanosoma cruzi*, el *Trypanosoma brucei* y la *Leishmania mexicana*, que son los agentes causales del mal de Chagas o tripanosomiasis americana, la enfermedad del sueño, y la leishmaniasis cutánea, respectivamente (Mande, *et al.* 1994; Téllez-Valencia, *et al.* 2002; Téllez-Valencia, *et al.* 2004). El control de estas enfermedades es actualmente un gran problema y ha enfocado la atención de varias instituciones incluyendo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992).

En el caso de los tripanosomas, se ha demostrado que la interrupción de la vía glucolítica permite la eliminación del parásito (Fairlamb y Opperdoes, 1977; Guerra-Giraldez, 2002). La forma hemática predominante en el hospedero, depende completamente de una rápida

glucólisis para abastecerse de energía (Eisenthal y Cornish-Bowden, 1998). La fuente principal de energía de estos parásitos son los azúcares presentes en la sangre del hospedero, de ahí que se espere que, al bloquear la vía glicolítica del parásito se pueda llegar a la eliminación de éste (Mande, *et al.* 1994). Se ha observado que *Trypanosoma brucei*, no sobrevive en ausencia de TIM (Helfert, *et al.* 2001).

### **Semejanzas entre TcTIM y TbTIM**

En este proyecto se utilizaron dos enzimas: la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM). La identidad de la estructura primaria entre TcTIM y TbTIM es aproximadamente del 73 % (Fig. 3) y la identidad de los residuos de la interfase es del 85 % (ver Tabla 5). Los carbonos  $\alpha$  en las estructuras cristalográficas respectivas se superponen con un rms de 0.96 Å, las áreas ocultas al solvente son casi idénticas (Maldonado, *et al.* 1998). Finalmente, la geometría de los residuos del asa 3 que rodean a la Cys 15 es muy similar en ambas proteínas.

### **Diferencias entre TcTIM y TbTIM**

Uno de los hallazgos mas interesantes de nuestro grupo de trabajo es que, pese a sus similitudes estructurales, estas enzimas muestran grandes diferencias en varios aspectos. Una de ellas es la susceptibilidad a la proteólisis con subtilisina. La TcTIM es más

Figura 3

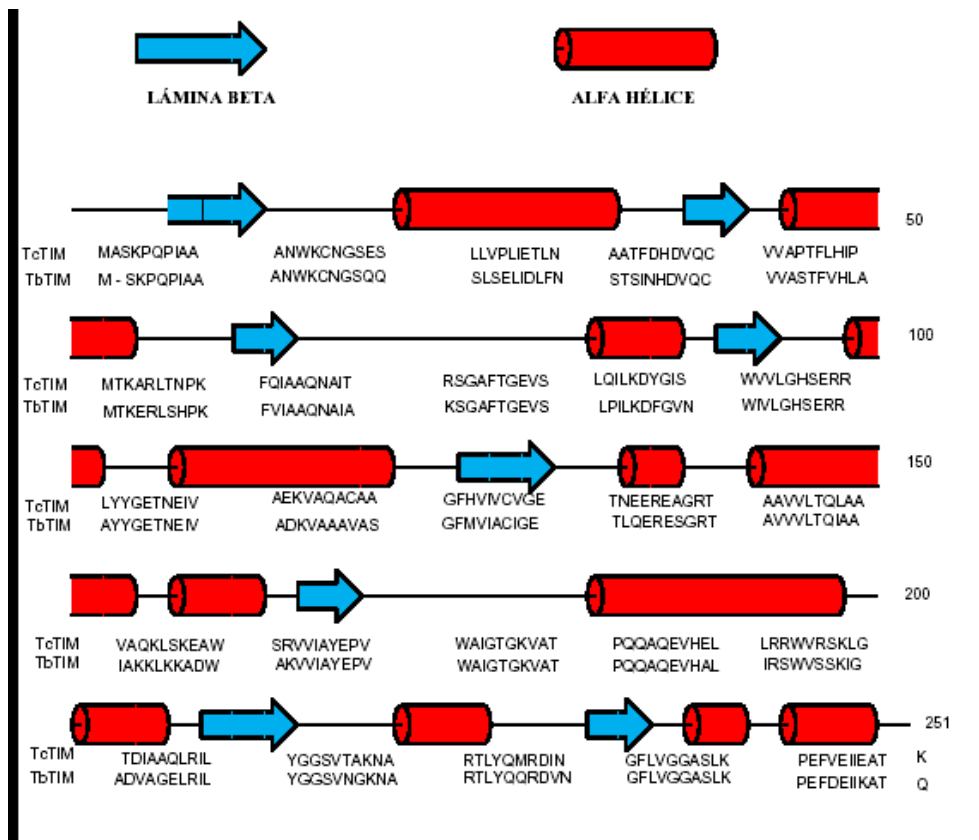


Fig. 3. Alineamiento de secuencias de TcTIM y TbTIM. El alineamiento se hizo con el programa ccp4i

susceptible a la digestión proteolítica que la TbTIM; lo que sugiere que TcTIM tiene una mayor flexibilidad intrínseca (Reyes-Vivas, *et al.* 2002). También se han observado diferencias importantes en la reactividad de la Cys 15 con agentes derivatizantes de grupos tiol (ver más adelante); la TIM de *T. cruzi* es casi 100 veces más sensible que la enzima de *T. brucei*. Estas diferencias se observan a pesar de que el arreglo entre el asa 3 y la región de la interfase, que contiene a la Cys 15, es casi idéntico en las dos enzimas (Maldonado, *et al.* 1998). También se han observado diferencias en cuanto a la reactivación de las dos enzimas desnaturalizadas con hidrocloreuro de guanidina. La formación de dímeros activos

a partir de monómeros desnaturalizados es mayor y más eficiente en TcTIM que en TbTIM (Gao, *et al.* 1998, Zomosa-Signoret, *et al.* 2003).

### **Desnaturalización y reactivación de la TIM**

Debido a que la TIM es un homodímero, esta enzima es uno de los modelos más sencillos para estudiar el plegamiento y desplegamiento de una proteína oligomérica. Se ha descrito la vía de desnaturalización de la TIM de diversos organismos (Rietveld, *et al.* 1996; Beauchamp, *et al.* 1997; Gokhale, *et al.* 1999; Morgan, *et al.* 2000; Vázquez-Contreras, *et al.* 2000; Benítez-Cardoza, *et al.* 2001; Chánez-Cárdenas, *et al.* 2002). Los experimentos mostraron que la desnaturalización es un proceso de tres estados en donde inicialmente los dímeros se disocian en monómeros catalíticamente inactivos y luego, los monómeros se desnaturalizan (Morgan, *et al.* 2000; Chánez-Cárdenas, *et al.* 2002; Vázquez-Contreras, *et al.* 2000; Rietveld y Ferreira, 1996; Nájera H, *et al.* 2003).

La reactivación de la TIM a partir de monómeros desnaturalizados con hidrocloreuro de guanidina también ha sido objeto de varios estudios (Mc Vittie, *et al.* 1977; Waley, 1973; Zabori, *et al.* 1980; Gao, *et al.* 1998; Rietveld y Ferreira, 1998). Los datos indican que la remoción o la dilución del desnaturalizante produce el plegamiento de los monómeros. En un siguiente paso, los monómeros plegados se asocian para producir dímeros activos. Se concluyó que el paso limitante en la renaturalización es la asociación de los monómeros. Zabori y colaboradores (1980) cuantificaron las constantes de velocidad de primer y de segundo orden para el proceso y sus datos indican que los monómeros plegados son intermediarios que no poseen actividad catalítica. De acuerdo con Jaenicke y Lilie (2000), la reactivación de otros oligómeros sigue una secuencia similar de reacciones. Sin embargo, los eventos moleculares que controlan la velocidad y la extensión de la formación



de los oligómeros, o de la formación de estructuras incorrectas no son completamente conocidos. Esto es particularmente cierto con respecto a la contribución de las porciones no interfaciales a la oligomerización de la proteína.

La reactivación de las TIM de diferentes especies a partir de sus monómeros desplegados muestra diferencias importantes (Gao, *et al.* 1998; Zomosa-Signoret, *et al.* 2003). Esto es sorprendente porque todas las TIM tienen la misma estructura básica y el nivel de conservación de sus aminoácidos entre algunas TIM es bastante alto. Una de las diferencias más notables a este respecto se puede observar entre TcTIM y TbTIM. La reactivación de la TcTIM fue más eficiente que la de TbTIM. Por lo tanto, uno de los propósitos de este trabajo fue el de estudiar la cinética de formación de los dímeros activos, con el fin de profundizar sobre los mecanismos y las características estructurales que expliquen los distintos perfiles de reactivación.

### **Estudios con híbridos**

Se han utilizado híbridos para observar si existe complementariedad entre los sitios activos de otras enzimas de las diferentes especies. Por ejemplo, en la ornitina descarboxilasa homodimérica, el sitio activo se forma por residuos que pertenecen a las dos subunidades. Se observó que los híbridos formados por monómeros de *Trypanosoma brucei* y ratón son catalíticamente activos. Sin embargo, los autores no pudieron obtener híbridos de monómeros de *Trypanosoma brucei* y de *Leishmania mexicana* (Osterman, *et al.* 1994). Otros investigadores formaron híbridos del homodímero de la timidilato sintasa a partir de monómeros de las enzimas de *E. coli* y *Lactobacillus casei*, pero no con monómeros del fago T4 (Greene, *et al.* 1993). También se probó la complementación tanto *in vitro* como *in vivo* en la reductasa mercúrica (Distefano, *et al.* 1990). Otro ejemplo, es el

de la complementación *in vitro*. Partiendo de mutantes inactivas de la sintasa de ácidos grasos y haciendo híbridos que reconstituyan la actividad (Witkowski, *et al.* 1996). A partir de estos estudios, los autores concluyen que el nivel de conservación de los aminoácidos en la interfase es central para la formación del heterodímero.

Los híbridos formados con monómeros de distintas especies son herramientas poderosas para entender cómo es que las características de un monómero influyen en las propiedades del monómero vecino. Por lo tanto, no es de extrañar que existan muchos estudios sobre la formación de híbridos tanto *in vivo* como *in vitro*. Varios de los estudios muestran que los monómeros de enzimas homólogas pueden interactuar dando origen a híbridos catalíticamente competentes. Sin embargo, en algunas ocasiones, los monómeros no hibridan. Unos datos que ilustran la complejidad del sistema son los siguientes: los monómeros de la TIM de levadura pueden hibridar con monómeros de conejo y pollo, pero los monómeros de conejo y pollo no hibridan entre sí. Se ha señalado que lo anterior se debe a que no existe complementaridad entre sus interfases (Sun, *et al.* 1992).

Mediante el uso de híbridos se ha estudiado también si los monómeros que son catalíticamente inertes pueden hibridar con monómeros catalíticamente productivos y producir una enzima activa. Por ejemplo, Sun *et al.* (1992), observaron que los monómeros a los que se le había modificado su sitio activo hibridan fácilmente con monómeros de enzimas silvestres. Es de interés que el monómero silvestre mantuvo su actividad en el híbrido. Los datos de Sun *et al.* (1992) indican que, a pesar de que se requiere la forma dimérica para que la enzima sea activa, los dos sitios catalíticos operan de manera independiente.

Nosotros pensamos que el poder de los híbridos puede ser particularmente útil si éstos se forman con monómeros que tienen características muy diferentes. Por lo tanto, parte de este

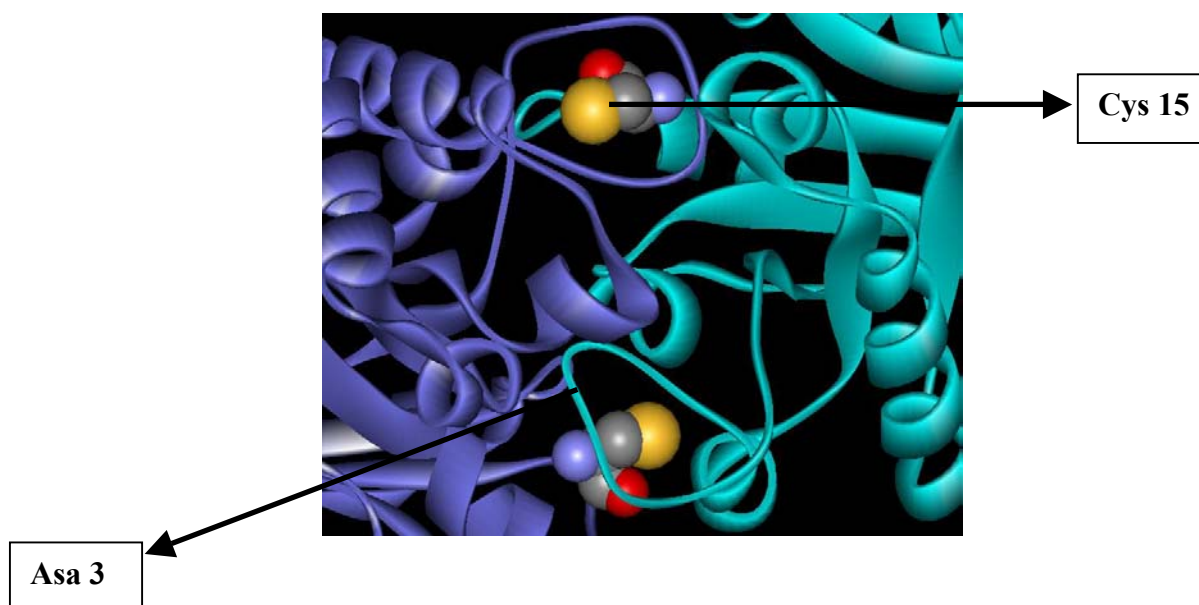
trabajo de tesis consistió en el estudio de los híbridos de dos enzimas que exhiben diferencias en su cinética de reactivación y en la susceptibilidad de su Cys de interfase a agentes derivatizantes. Uno de los motivos de estos estudios fue el de conocer cómo la interacción de monómeros con diferentes constantes de reactivación afecta a la formación de híbridos catalíticamente activos, y si las características de la Cys 15 de interfase dependen de la dinámica del propio monómero o de la otra subunidad. Asimismo, exploramos si durante la catálisis existe una interacción dinámica entre los dos monómeros de la TIM. Para una mayor comprensión de la importancia de la Cys 15 para estas enzimas, se describirán sus características estructurales y su ubicación.

### **Localización estructural de la Cys 15**

Se ha encontrado que en las TIM existe un residuo en la zona de interfase que es fundamental para la estabilidad del dímero y la asociación de los monómeros. Este residuo se encuentra en la posición 15 (numeración de TcTIM). En algunos parásitos, como en los tripanosomátidos, el residuo que se localiza en ésta posición es una cisteína (Cys 15); en los mamíferos, el residuo es una metionina (Mande, *et al.* 1994). Así, el residuo en la posición 15 es un aminoácido no conservado, pero en todas las TIM forma parte del asa 1, que se encuentra entre la primera hebra  $\beta$  y la primera hélice  $\alpha$ . La cadena lateral del residuo en la posición 15 de una subunidad se encuentra rodeada por el asa 3 de la otra subunidad (Fig. 4). El asa 3 de la TIM de humano tiene un residuo más que en las TIM de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana* (LmTIM). Se ha considerado que las diferencias en la interfase de la TIM de los tripanosomátidos y del humano se pueden utilizar para el diseño de fármacos.

El residuo se localiza a 4.3 Å de la superficie molecular mas cercana y es adyacente a la Lys 14 que es uno de los residuos catalíticos (Maldonado, *et al.* 1998). La cadena lateral de la Cys 15 hace contacto con algunos residuos del asa 3 del otro monómero. De hecho, el extremo del asa 3 forma un hueco hidrofóbico alrededor de la cadena lateral del residuo 15 de la subunidad adyacente (Fig. 4).

Las estructuras tridimensionales de TcTIM y TbTIM muestran que la cadena lateral de la Cys 15 está rodeada estrechamente por el asa 3 del otro monómero. Las Cys 15 de ambas enzimas tienen contacto con los mismos residuos (Tabla 1) y establecen los mismos puentes de hidrógeno en TcTIM y en TbTIM (Tabla 2).



**Fig. 4. Región de la Cys 15 rodeada por el asa 3 del monómero adyacente.** Se muestra la estructura de TcTIM; en TbTIM el empaquetamiento es equivalente.

### Importancia de la Cys 15

Los estudios sobre la modificación química de la Cys 15 han demostrado su importancia en la estabilidad y en la actividad de las TIM de *T. brucei* y *T. cruzi* (Ostoa-Saloma, *et al.*

1997; Garza-Ramos, *et al.* 1998; Pérez-Montfort, *et al.* 1999; Reyes-Vivas, *et al.* 2001). Asimismo, las alteraciones en el asa 3 produjeron monómeros que tienen constantes de asociación bajas (Borchert, *et al.* 1995; Schliebs, *et al.* 1996). Estos datos indican que la porción de la interfase que se forma con el asa 3 y la Cys 15 de la otra subunidad es de importancia en las interacciones entre los dos monómeros y en la estabilidad del dímero.

Lo anterior lo muestra muy claramente los estudios de Hernández-Alcántara, *et al.* (2002), quienes llevaron a cabo una mutación exhaustiva de la Cys 15 de TbTIM. El residuo se cambió por los otros 19 aminoácidos con el fin de determinar las características que dicho residuo debe tener para obtener una enzima estable y catalíticamente competente. Lo que surgió de este trabajo fue que para obtener enzimas con características similares a las de las enzimas silvestre, los residuos deben tener una baja polaridad y un radio de Van der Waals entre 65 y 110 Å<sup>2</sup>. Otra observación interesante del trabajo es que la substitución de la Cys 15 por una Phe genera una enzima monomérica estable (Hernández-Alcántara, *et al.* 2002).

Otro ejemplo de la importancia de la Cys de interfase en las TIM es que si ésta se metila, en el caso de la enzima de *Plasmodium falciparum* y *Entamoeba histolytica*, se obtiene la formación de especies monoméricas detectables por filtración en gel (Maithal, *et al.* 2002 ; Rodríguez-Romero, *et al.* 2002). Por otra parte, si este residuo se muta por un Asp, se obtiene una enzima inestable cuya actividad catalítica disminuye cerca de 7 veces.

### **Efecto del metil metano tiosulfonato**

El efecto del agente derivatizante de los grupos sulfhidrilo, el metilmetano tiosulfonato (MMTS) sobre TcTIM y TbTIM induce la derivatización de la Cys 15, lo que produce alteraciones estructurales que llevan a la pérdida de la estructura terciaria y cuaternaria y a una inhibición de la catálisis (Pérez-Montfort, *et al.* 1999). Aunque la identidad entre

TcTIM y TbTIM es del 73%, la primera es cerca de 100 veces más susceptible a la acción del MMTS que TbTIM. El análisis de los efectos del MMTS sobre TcTIM y TbTIM ha proporcionado información sobre el papel que tiene la Cys 15 en las interacciones de la interfase del dímero y sobre la forma de penetración de estos reactivos hasta la Cys 15 (Reyes-Vivas, *et al.* 2001; Pérez-Montfort, *et al.* 1999; Garza-Ramos, *et al.* 1998). Todos estos datos sugieren que diferencias mínimas en la interfase de la TIM de los tripanosomátidos influyen significativamente en la sensibilidad a los agentes derivatizantes de las cisteínas. Sin embargo, también es posible que las diferencias en la interfase de estas enzimas se regulen por otras interacciones, y lejanas a dicha región.

Tales interacciones se podrían llevar a cabo mediante una red de uniones no covalentes en la proteína. Por ejemplo, la presencia del sustrato (G3P) o de sus análogos induce una protección parcial al MMTS. Lo anterior demuestra que la ocupación del sitio catalítico con el sustrato o con algún análogo influye en el acceso de dicho reactivo hasta la Cys 15, que se encuentra inmersa en la zona de la interfase y rodeada por el asa 3 (Pérez-Montfort, *et al.* 1999).

Átomo de la Cys	Residuo con quien tiene contacto	Átomo del Residuo con quien Cys tiene contacto	Distancia (Å)
N	LYS 14A	C	1.3
N	LYS 14A	CA	2.4
N	LYS 14A	CB	2.7
N	GLY 73B	O	2.9
N	PHE 75B	N	4.1
CA	ASN 16 A	N	2.3
CA	LYS 14 A	C	2.3
CA	LYS 14 A	O	2.6
CA	GLU 78B	O	4.0
CA	THR 45 A	CG2	4.4
C	ASN 16 A	N	1.3
C	ASN 16 A	CA	2.4
C	ASN 16 A	CB	3.3
C	ASN 16 A	CG	3.4
C	GLY 73B	O	3.5
C	ILE 83B	CD1	3.7
O	ASN 16 A	N	2.3
O	GLY 73B	N	2.7
O	ASN 16 A	CA	2.8
O	SER 72B	CB	2.9
CB	GLY 73B	O	3.3
CB	LYS 14 A	C	3.5
CB	GLU 78B	O	3.6
CB	GLY 74B	O	3.4
CB	PHE 75B	N	3.8
CB	GLY 73B	N	3.8
CB	PHE 75B	CB	3.9
CB	PHE 75B	CD1	4.2
SG	GLU 78B	O	2.9
SG	GLU 78B	C	3.4
SG	SER 80B	N	3.7
SG	VAL 79B	CA	3.7
SG	VAL 79B	N	3.7
SG	VAL 79B	C	3.8
SG	SER 80B	CB	3.9
SG	ILE 83B	CD1	4.1
SG	ILE 69B	CD1	4.1
SG	SER 72B	CA	4.5

**Tabla 1. Residuos en contacto con la Cys 15 del monómero A.** Los contactos con la Cys 15 del monómero B son los mismos. Se muestran los residuos de TcTIM, los contactos de la Cys 15 en TbTIM son equivalentes.

Átomo de la Cys	Residuo con quien la C forma el puente de hidrógeno	Átomo del residuo con quien forma el puente de hidrógeno	Distancia (Å)
N	GLY 73 B	O	3.0
N	PHE 75 B	O	4.1
O	ASN 16 A	N	2.2
O	GLY 73 B	N	3.0

**Tabla 2. Puentes de hidrógeno que forma la Cys 15 del monómero A de TcTIM.** Los puentes de hidrógeno en TbTIM son equivalentes. El programa considera que un puente de hidrógeno se puede formar a una distancia de 4 Å.



## HIPÓTESIS

- En las diferentes cinéticas de reactivación que presentan TcTIM y TbTIM, influyen tanto la porción interfacial como la porción no interfacial de la enzima.
- La perturbación de una de las dos regiones Cys 15 – Asa 3, afecta a ambos monómeros de la triosafosfato isomerasa, es decir, existe una intercomunicación entre los monómeros.

## OBJETIVOS

El presente trabajo tiene dos objetivos principales:

- 1) Determinar la contribución de la porción interfacial y de la no interfacial en la cinética de formación del dímero de la triosafosfato isomerasa a partir de monómeros desplegados.
  - a) Determinar la cinética de reactivación de TcTIM y TbTIM.
  - b) Determinar la contribución de los residuos de la interfase en la cinética de reactivación de la TIM.
  - c) Explorar si, en la cinética de reactivación de la TIM, las características de un monómero afectan monómero vecino.
- 2) Determinar la causa de las grandes diferencias entre TcTIM y TbTIM a la susceptibilidad de la Cys de interfase (Cys 15) a agentes tioles.
  - a) Determinar la contribución de la interfase en la diferencia a la susceptibilidad al MMTS entre TbTIM y TcTIM.
  - b) Determinar si las características de un monómero influyen sobre las propiedades del monómero contiguo.
  - c) Determinar cómo la perturbación de una región específica de la interfase afecta los eventos catalíticos en cada uno de los dos monómeros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las enzimas que se usaron en este trabajo se purificaron a partir de células de *Escherichia coli* en las que las enzimas se habían sobre-expresado. (Ostoa, *et al.* 1997; Borchert, *et al.* 1993). Después de su purificación todas las enzimas se mantuvieron a 4° C como precipitado en 70 % de saturación en sulfato de amonio que además contenía 100 mM trietanolamina, 10 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól y 1 mM de azida de sodio, pH 8.0. Para los experimentos, la suspensión se centrifugó y la pastilla se disolvió en 100 mM de trietanolamina/10 mM EDTA, pH 7.4 y se dializó contra el mismo amortiguador.

**Construcción y purificación de mutantes de TcTIM y TbTIM.** La mutante de TcTIM que tenía los residuos de interfase de TbTIM se preparó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el sistema de PCR de alta fidelidad (Boehringer). Los oligonucleótidos mutagénicos fueron 5' GGCTCCCAGCAGTTGCTTGTA 3' [S20Q forward (Fw)] y 5' TACAAGCAACTGCTGGGAGCC 3' [S20Q reverse (Rv)], 5' CCCACCTTTGTGCACATCCCA 3' (L47V Fw) y 5' TGGGATGTGCACAAAGGTGGG 3' (L47V Rv), 5' ACCTTTGTGCACCTGGCGATGACG 3' (L47V/149L y P50A Fw) y 5' CGTCATCGCCAGGTGCACAAGGT 3' (L47V/149L y P50A Rv), y 5' AAGGACTTTGGAGTGAGCTGG 3' (Y87F/189V Fw) y 5' CCAGCTCACTCCAAAGTCCTT 3' (Y87F/189V Rv). Se utilizaron el T7 promotor y el T7 terminador como oligonucleótidos externos (Novagen). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 30 ciclos por un minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C y una incubación por 10 minutos a 72 °C. Estos cambios se introdujeron también en la

mutante de TcTIM E19Q que se había obtenido previamente. Los productos de PCR se clonaron en el vector de expresión pET-3a como fragmentos NdeI-Bam HI y se introdujeron con la transformación en las células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen). Para comprobar la mutación, se secuenció el gen completo.

Las células transformadas BL21(DE3) pLysS con la mutante de interfase se crecieron a 37 °C en el medio Luria-Bertani complementado con ampicilina 100 µg/mL hasta una absorbencia de  $A_{600} = 0.8 - 1$ . El crecimiento se continuó por toda la noche a 30 °C. La purificación de la mutante de interfase de TcTIM se hizo siguiendo la metodología para la purificación de TcTIM (Ostoa-Saloma, *et al.* 1997). El rendimiento de la enzima fue de 8 mg/L de cultivo. La construcción y purificación de la mutante C15A TbTIM se describió previamente (Hernández-Alcántara, *et al.* 2002), y la mutante C15A TcTIM se purificó siguiendo el protocolo para la purificación de TcTIM silvestre (Ostoa-Saloma, *et al.* 1997). La sustitución del glutámico catalítico de TbTIM [168] por un aspártico se llevó a cabo mediante la PCR utilizando el sistema de alta fidelidad (Boehringer). Los oligonucleótidos mutagénicos fueron 5' CCAAACGGGATCGTAGGCGAT 3' [E168D reverse (Rv)] y 5' ATCGCCTACGATCCCGTTTGG 3' [E168D forward (Fw)]. Se utilizó el promotor T7 y el terminador T7 como oligonucleótidos externos (Novagen). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 30 ciclos por un minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, y 1 minuto a 72 °C y una incubación de 10 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR se clonaron en el vector de expresión pET-3a como fragmentos NdeI-Bam HI y se introdujeron por la transformación en células BL21 (DE3) pLyS (Novagen). Para rectificar la mutación, se secuenció el gen completo mutante.

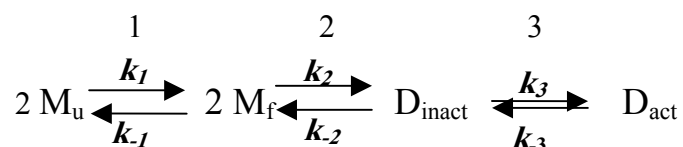
Las células transformadas BL21(DE3) pLysS con la mutante E168D se crecieron a 37 °C en el medio Luria-Bertani complementado con ampicilina 100 µg/mL hasta una

absorbencia de  $A_{600} = 0.8 - 1$ . El crecimiento se continuó toda la noche a 37 °C. La purificación de la mutante se llevó a cabo siguiendo la metodología para la purificación de TbTIM (Borchert, *et al.* 1993). El rendimiento de la enzima fue de 12 mg/L de cultivo.

**Actividad enzimática.** La actividad se midió a pH 7.4 en 1 mL de una mezcla que contenía 100 mM TEA, 10 mM EDTA, 1 mM gliceraldehído 3-fosfato, 0.2 mM NADH y 0.9 unidades de  $\alpha$ -GDH, pH 7.4. Generalmente, se usaron 5 ng de proteína para determinar la actividad. Los parámetros cinéticos de las enzimas en la dirección de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona se determinaron en las mismas condiciones; la concentración del sustrato se varió desde 0.1 hasta 5 mM. La reacción se inició con la adición de la TIM.

**Desnaturalización y reactivación de las enzimas.** Las enzimas se desnaturalizaron incubando 0.5 ó 1 mg de proteína por mL a 25 °C por 1 hora en 100 mM de TEA, 10 mM EDTA, 1 mM ditioneitol y 6 M hidrocloreuro de guanidina (Gdn HCl), pH 7.4. Para la reactivación, se tomaron alícuotas de la mezcla anterior y se diluyeron 100 veces en un medio con la misma composición del anterior, pero sin desnaturalizante. La concentración de la proteína en la mezcla de reactivación varió entre 0.2 y 10  $\mu$ g/mL (8 a 400 nM en concentración de monómero). Después de la dilución se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se midió su actividad. En todos los experimentos la concentración de GdnHCl en el medio de reactivación fue de 60 mM. Esta concentración de desnaturalizante no afecta la actividad de la enzima. Esto se sabe porque al poner una muestra control con esta concentración de desnaturalizante, su actividad fue la misma que la que tiene una enzima sin desnaturalizante.

**Determinación de las constantes de velocidad en la reactivación de la TIM.** Las constantes de velocidad se calcularon de gráficas de ln de la actividad contra tiempo, a diferentes concentraciones de proteína, y considerando que la reactivación involucra la siguiente secuencia de reacciones:



En donde  $M_u$ ,  $M_f$ ,  $D_{\text{inac}}$  y  $D_{\text{act}}$  son monómeros desplegados, monómeros plegados, dímeros inactivos y dímeros activos, respectivamente.

En todas las condiciones, la constante de velocidad de la primera reacción unimolecular ( $k_1$ ) fue mas rápida que las otras dos reacciones (ver resultados). El paso de  $M_f$  a  $D_{\text{inac}}$  es una reacción bimolecular que es seguida por una reacción unimolecular en donde  $D_{\text{inac}}$  se transforma a  $D_{\text{act}}$ . En condiciones de estado estacionario, la ecuación de Briggs - Haldane se puede utilizar para determinar los pasos 2 y 3 (Segel, 1993; Jencks, 1987).

Por lo tanto, la siguiente ecuación describe la constante de velocidad observada para cualquier concentración de la proteína.

$$k_{\text{obs}} = k_3 [\text{TIM}] \left[ \frac{K}{1 + K [\text{TIM}]} \right]$$

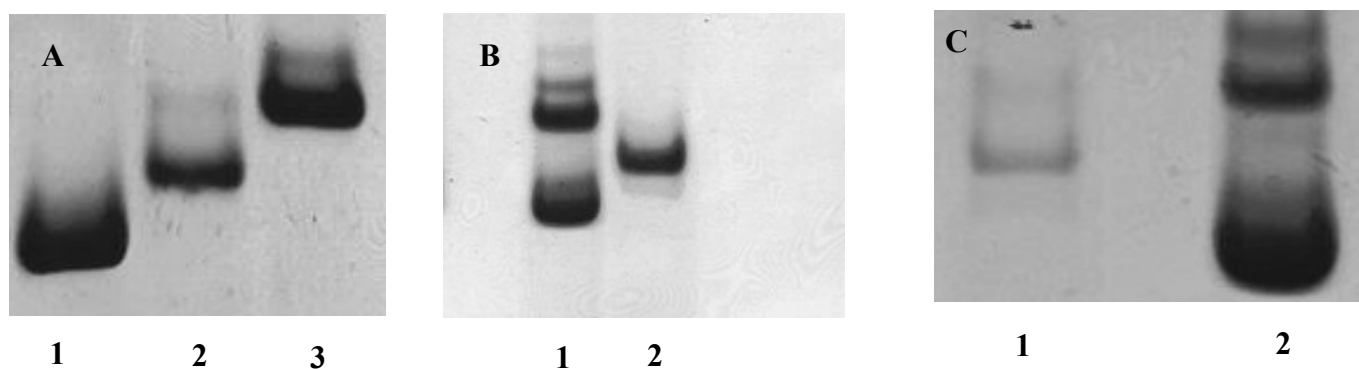
Donde  $K = (k_{-2} + k_3) / k_2$ , y  $k_3$  es la constante de velocidad máxima observada. Debido a que, en nuestras condiciones experimentales,  $k_{-2}$  es mucho menor que  $k_3$ , entonces,  $K \cong k_3 / k_2$ .

**Formación, purificación e identificación de los híbridos TcTIM-TbTIM y de híbridos de sus respectivos monómeros mutantes.** El punto de partida para la preparación de híbridos fue el trabajo de Sun, *et al.* (1992) en el que los autores lograron

formar heterodímeros de monómeros de TIM de levadura y de conejo. Las enzimas TcTIM y TbTIM nativas o sus respectivas mutantes, a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se incubaron en 100 mM TEA, 10 mM EDTA, 1 mM DTT y 6 M GdnHCl pH 7.4, por una hora a 25 °C. Se mezclaron volúmenes iguales de las enzimas desnaturalizadas, generalmente 0.5 mL de cada una. Esta mezcla se dializó contra 250 mL del mismo amortiguador sin desnaturalizante a 25 °C por 4 horas y luego contra 250 mL del mismo amortiguador por 12 horas a 4 °C. Se repitió el mismo procedimiento para controles de TbTIM y TcTIM por separado. Un procedimiento alternativo que también se utilizó fue el de pasar la mezcla desnaturalizada por columnas de centrifugación de Sephadex G-50 que se encontraban previamente equilibradas con amortiguador que contenía 100 mM TEA, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4. Las columnas se centrifugan a 3500 rpm por 1 minuto y medio con el fin de eliminar el desnaturalizante. El sobrenadante se pasa por una columna de intercambio iónico (ver mas adelante) para separar los productos solubles de la reacción.

Para separar los híbridos TcTIM-TbTIM de los homodímeros TbTIM y TcTIM, utilizamos una columna de intercambio iónico (carboxi-metilsefarosa) tomando en cuenta que los puntos isoeléctricos de TcTIM y TbTIM (pI) son 8.2 y 9.8, respectivamente, y que el pI del híbrido se encuentra entre estos dos valores. El producto obtenido de la diálisis o de las columnas de centrifugación, se cargó en la columna de carboximetilsefarosa equilibrada con buffer de 25 mM de TEA, 1 mM EDTA y 1 mM de DTT, pH 8.0. A continuación, se pasaron 25 mL de amortiguador. Posteriormente, se pasó por la columna 50 mL de amortiguador que contenía 30 mM, 50 mM y 80 mM de NaCl y se colectaron fracciones de 5 mL. Así se logró la separación de TcTIM, el híbrido y TbTIM, que se desprendieron en ese orden. Las fracciones se concentraron en filtros Centricon hasta una concentración aproximada de 1mg/mL (ver Fig. 8).

**Identificación de los híbridos.** Los híbridos se identificaron por medio de una electroforesis en geles nativos de acrilamida al 10%. El gel se pre-corrió una hora a 160 V a 4 °C y se corrió 2.75 horas. El buffer utilizado fue imidazol 153 mM / HEPES 400 mM, pH 7.0. Se invirtieron los polos para correr el gel. Debido a que TcTIM y TbTIM tienen puntos isoeléctricos de 8.2 y 9.8, respectivamente, la migración de TbTIM fue mas rápida que la de TcTIM. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. La Figura 5 muestra la electroforesis en geles nativos de la banda de proteína del híbrido, así como de las enzimas que se utilizaron para su preparación.



**Fig. 5. Formación de híbridos TcTIM-TbTIM, C15A TcTIM -TbTIM y C15A TcTIM- E168D TbTIM.** Las mezclas de diferentes especies se hicieron por procedimientos de centrifugación y se aplicaron a geles nativos en donde fueron separados electroforéticamente

Fig. 5A representa la formación del híbrido TcTIM-TbTIM. El carril 1 es TbTIM, el carril 2 es el híbrido TcTIM-TbTIM y el carril 3 es TcTIM. Fig. 5B representa el híbrido C15A TcTIM - TbTIM. El carril 1 es C15A TcTIM y TbTIM; el carril 2 es el híbrido C15A TcTIM - TbTIM. Fig. 5C representa el híbrido C15A TcTIM - E168D TbTIM. El carril 1 es el híbrido C15A TcTIM - E168D TbTIM y el carril 2 es C15A TcTIM y E168D TbTIM.

**Dicroísmo circular.** Las enzimas se dializaron contra 25 mM de amortiguador de fosfatos, pH 7.2 y se filtraron a través de una membrana de 0.22  $\mu$ m. Los espectros se corrieron en un espectropolarímetro Jasco J-715 en celdas de cuarzo de 0.1 mm a 25 °C en un intervalo desde 260 hasta 190 nm.

**Fluorescencia intrínseca.** El espectro de emisión se determinó en un espectrofluorómetro RF5000U Shimadzu en celdas de cuarzo de 4 mm a temperatura ambiente. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm. La concentración de las enzimas fue de 5 o 20  $\mu\text{g/mL}$  en el amortiguador que se utilizó para los experimentos de reactivación.

Para los experimentos, se utilizó una solución amortiguadora previamente filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se prepararon blancos que no contenían proteína y el espectro del blanco se restó del espectro de las muestras. El centro espectral de masas (SCM) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{SCM} = \frac{\sum \lambda \cdot I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$$

donde  $I_{\lambda}$  es la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda  $\lambda$ .

#### **Ensayo del efecto del metilmetano tiosulfonato (MMTS) en la actividad de la TIM.**

Las condiciones estándar para medir el efecto del MMTS en las enzimas indicadas y en los híbridos fueron las siguientes: las enzimas se incubaron a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  en 0.25 mL de TEA 100 mM/10 mM EDTA (pH 7.4), con el MMTS a las concentraciones indicadas por 2 h a 25 °C. A continuación, se tomó una alícuota para medir la actividad. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.



## RESULTADOS

### Cinética de reactivación de TcTIM y TbTIM

McVittie y colaboradores (1977), Waley (1973) y Zabori y colaboradores (1980), estudiaron la cinética de reactivación de la TIM de pollo y conejo a partir de monómeros desplegados. Los datos de estos tres grupos indicaron que la reactivación de la TIM involucra los siguientes pasos: el paso de los monómeros desplegados a monómeros plegados, la asociación de monómeros plegados y, finalmente, la formación del dímero activo. Estudiamos si la reactivación de TcTIM y TbTIM seguía la misma secuencia de reacciones. Se hicieron espectros de fluorescencia intrínseca de las enzimas en su estado nativo y después de ser desnaturalizadas con GdnHCl 6.0 M. En las dos enzimas, el desnaturalizante provocó un desplazamiento del centro de masa espectral hacia el rojo, lo que indica la exposición de los residuos aromáticos. También se observó una disminución en la intensidad máxima de fluorescencia (Tabla 3). Esta tabla también muestra cómo la dilución del desnaturalizante (1:100) indujo, en 1 min o menos, un desplazamiento hacia el azul de los espectros y un aumento en la intensidad de fluorescencia, que indica que en este tiempo los residuos aromáticos se habían ocultado nuevamente del solvente.

**Tabla 3. Fluorescencia intrínseca de TcTIM, TbTIM y la mutante de interfase con y sin GdnHCl 6.0 M antes y después de la dilución del desnaturalizante.**

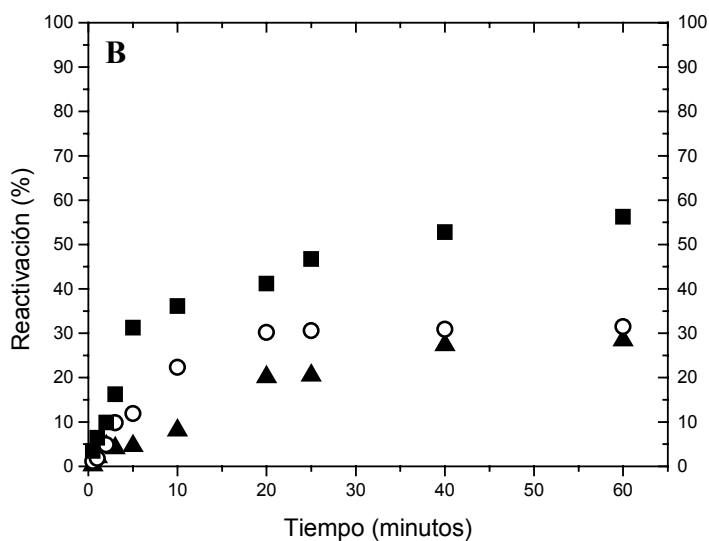
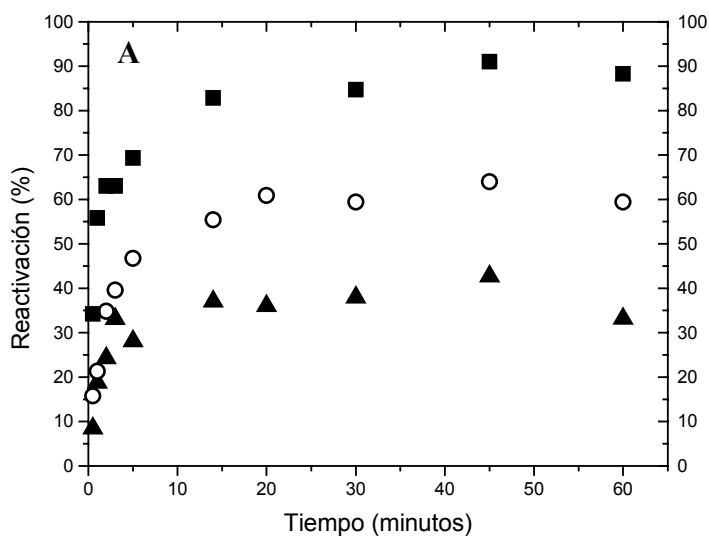
concentración de enzima		TcTIM		TbTIM		Mutante	
		SCM	% FI	SCM	% FI	SCM	% FI
5 µg/mL	Nativa	332	100	339	100	341	100
	Gdn/HCl	370	20	369	20	380	10
	Dilución	341	102	343	90	344	103
20 µg/mL	Nativa	337	100	339	100	341	100
	Gdn/HCl	363	29	362	20	378	10
	Dilución	343	95	348	74	344	85

SCM: Centro espectral de masa FI: Intensidad de fluorescencia

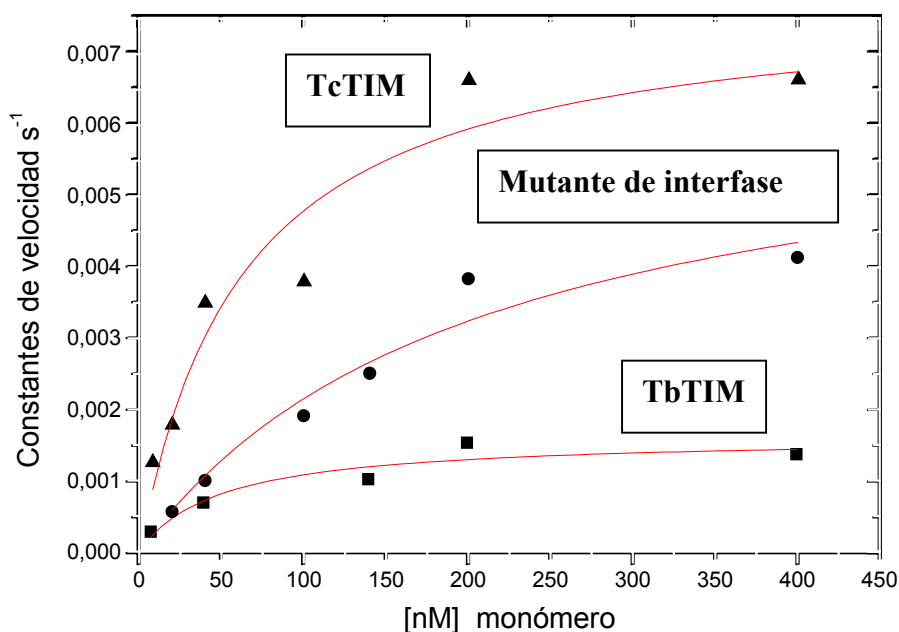
La dilución de las mezclas desnaturalizadas provocó una aparición progresiva de la actividad; sin embargo, los tiempos de reactivación (Fig. 6) fueron mucho más largos que aquellos en los que se ocultan los residuos aromáticos. Tanto en TcTIM como en TbTIM, la velocidad y magnitud de reactivación aumentó conforme se aumentó la concentración de proteína. Se hace notar que, a las mismas concentraciones de proteína, la reactivación de TcTIM fue mayor y más rápida que la de TbTIM (Fig. 6A y B, respectivamente).

De las gráficas de  $\ln$  de la aparición de actividad en función del tiempo en los primeros minutos de la reactivación, se calcularon las constantes de pseudo primer orden de la formación del dímero activo a diferentes concentraciones de TbTIM y TcTIM. Estos valores se graficaron en función de la concentración de proteína para obtener las constantes de segundo orden para la formación del dímero activo (Fig. 7). Se observó que los puntos se ajustaban a una curva con pendiente decreciente hasta llegar a un punto en donde el proceso se volvía independiente de la concentración de proteína. La forma de la curva indica que a concentraciones de proteína relativamente bajas, la velocidad de formación de dímeros activos está limitada por una reacción de segundo orden (asociación de los monómeros), mientras que a concentraciones altas de proteína, el paso limitante de la velocidad es una reacción de primer orden. Esta constante se calculó utilizando los datos de la figura 7.

En la secuencia de reactivación de la TIM existen dos reacciones unimoleculares, el plegamiento del monómero y la transformación de dímero inactivo a activo. Para determinar cuál de las dos es el paso limitante, la constante de velocidad de primer orden para el plegamiento del monómero ( $k_1$ ) se estimó suponiendo que en el tiempo máximo de un minuto, los residuos aromáticos se habían ocultado, es decir, en un minuto los monómeros ya se habían plegado.



**Figura 6. Cinética de reactivación de TcTIM (A) y TbTIM (B) a diferentes concentraciones de proteína.** Las enzimas se desnaturalizaron a una concentración de 500 µg/mL con GdnHCl 6.0 M por una hora a 25°C. En el tiempo cero, las enzimas se diluyeron para dar las concentraciones indicadas (1 µg/mL (▲), 2.5 µg/mL (○) y 5 µg/mL (■) a pH 7.4 y 25 °C. Todas las mezclas contenían 60 mM de GdnHCl. En los tiempos indicados, se tomaron alícuotas a las que se les determinó su actividad. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad recuperada, en donde el 100 % es la actividad de las enzimas nativas.



**Figura 7. Relación de las constantes de velocidad de primer orden y la concentración de proteína.** Los experimentos se hicieron como en la Figura 6. El ln de las actividades en los primeros minutos de la reactivación se graficaron en contra del tiempo y se determinaron las constantes de velocidad de primer orden. Estos valores se graficaron en contra de la concentración de proteína y mediante el ajuste teórico de las curvas se obtuvieron las constantes de segundo orden.

Tanto en TbTIM como en TcTIM, en un minuto, que fue el tiempo mas corto en que se pudieron tomar los espectros de fluorescencia, los monómeros desplegados se transformaron en monómeros plegados, por lo tanto, el valor de esa constante de primer orden fue de cuando menos  $8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las velocidades pueden ser mas rápidas, pero nuestras condiciones experimentales no permitieron distinguir diferencias entre TcTIM y TbTIM. Las velocidades pueden ser mas rápidas, pero nuestras condiciones experimentales no permitieron distinguir diferencias entre TcTIM y TbTIM. Sin embargo, en todos los casos la velocidad del plegamiento de los monómeros de ambas enzimas fue mayor que  $k_3$ , la reacción de primer orden que limita la formación del dímero activo a altas concentraciones de proteína (Tabla 4). Por lo tanto, a altas concentraciones de proteína el

paso limitante de la velocidad de aparición de dímeros activos es la transformación de dímero inactivo a dímero activo ( $k_3$ ). También es evidente que esta constante, así como la constante de la reacción bimolecular, son mayores en TcTIM que en TbTIM.

	<b>TcTIM</b>	<b>TbTIM</b>	<b>Mutante de interfase</b>
$k_1$	$0.08 \text{ s}^{-1}$	$0.08 \text{ s}^{-1}$	$0.08 \text{ s}^{-1}$
$k_2$	$2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_3$	$7.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$6.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

**Tabla 4. Determinación de las constantes de velocidad de la reactivación de TcTIM, TbTIM y la mutante de interfase.**  $k_1$  se calculó a partir de los experimentos de fluorescencia,  $k_2$  y  $k_3$  de los resultados obtenidos de las figuras 6 y 7 (ver Materiales y Métodos).

**Cinética de reactivación de una mutante de TcTIM en la cual los residuos de interfase son idénticos a los de TbTIM.** De los datos anteriores surgió una pregunta: ¿Cómo participan las distintas porciones de la enzima en la cinética de formación del dímero? Para esto, se construyó una mutante de TcTIM a la cual se le cambiaron los residuos de interfase por los que tiene la TbTIM. Las dos enzimas difieren en 7 de 32 residuos que establecen contactos con la otra subunidad (Tabla 5).

**Tabla 5. Diferencias entre los residuos que establecen contactos entre las subunidades de TcTIM y TbTIM y su posición en la estructura cristalográfica de las enzimas.**

<b>TcTIM</b>	<b>TbTIM</b>	<b>Posición</b>
Glu19	Gln18	Hélice 1
Ser20	Gln19	Hélice 1
Leu47	Val46	Hélice 2
Ile49	Leu48	Hélice 2
Pro50	Ala49	Hélice 2
Tyr87	Phe86	Hélice 3
Ile89	Val88	Hélice 3

\*Se utilizó la numeración de las secuencias de aminoácidos de TcTIM y TbTIM. TcTIM tiene un residuo de más que TbTIM y está en la posición 2.

La cinética de reactivación de la mutante de interfase se determinó siguiendo el mismo protocolo utilizado para las enzimas silvestres. Dentro de nuestros límites experimentales, la transición de  $M_u$  a  $M_f$  de la mutante de interfase fue tan rápida como la observada para las enzimas silvestres (Tabla 4). De igual forma que para las enzimas silvestres, la velocidad de reactivación de la mutante de interfase aumentó con respecto a la concentración de proteína hasta que se alcanzó una meseta (Fig. 7). De estos datos, se calcularon tanto la constante de segundo orden como la constante de primer orden que es la limitante de la velocidad a altas concentraciones de proteína. Estos valores se compararon con los de las enzimas silvestres (Tabla 4). La comparación mostró dos hechos importantes. El primero es que la constante de segundo orden (la asociación de los monómeros) de la mutante de interfase es similar al valor obtenido para TbTIM. Debido a que la mutante posee la interfase de TbTIM y la porción no-interfacial de TcTIM, los datos sugieren fuertemente que la formación de dímeros inactivos a partir de monómeros plegados está predominantemente controlada por los residuos que forman parte de la interfase. El otro punto interesante es que la velocidad de la transición de  $D_{inac}$  a  $D_{act}$  de la mutante es significativamente mayor que en TbTIM, y sólo un poco menor que en TcTIM. Esto sugiere que la porción no-interfacial de la enzima contribuye fuertemente en la velocidad en la cual el  $D_{inac}$  se transforma a  $D_{act}$ .

**Reactivación y agregación de la TIM.** En los experimentos de reactivación de la TIM, está claro que la reactivación y la formación del dímero activo a partir de monómeros desplegados no fue del 100 % (Fig.6). Excepto con TcTIM a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  (200 nM de concentración de monómero) en donde la reactivación fue cercana al 90

%, en TbTIM la reactivación fue cercana al 50 % o menor, a más bajas concentraciones. Se ha demostrado que la fracción de la proteína que no forma enzimas catalíticamente competentes se agrega a través de una reacción de segundo orden que compite con las reacciones que llevan a la formación de dímeros activos (Zetmeiss, *et al.* 1979). A simple vista, nosotros nos percatamos de que si se eliminaba el desnaturizante por diálisis, se formaban agregados.

**Formación de híbridos de monómeros de TcTIM y TbTIM.** Los experimentos de reactivación con TcTIM y TbTIM indican que TcTIM se reactiva más rápidamente que TbTIM y que esto puede deberse a una mayor velocidad en las reacciones que involucran la asociación de los monómeros y la transición del dímero inactivo al activo. Por lo tanto, estudiamos las características de la formación de híbridos a partir de monómeros que poseen distintas cinéticas de reactivación. Primero estudiamos si los monómeros de TbTIM y TcTIM hibridaban. Una mezcla de cantidades iguales de TcTIM y TbTIM se desnaturizó con 6.0 M de GdnHCl. La mezcla se dializó extensivamente y los productos se analizaron por electroforesis en geles nativos. Se utilizó este sistema debido a que los puntos isoeléctricos de TbTIM y TcTIM son 9.8 y 8.2, respectivamente. La movilidad de TbTIM hacia el cátodo fue más rápida que la de TcTIM (Fig. 8, inserto). Los resultados muestran que en estas condiciones hay una clara separación entre TcTIM y TbTIM, y por lo tanto, el híbrido se podía identificar fácilmente como una banda que migraba entre TcTIM y TbTIM.

Cuando se desnaturizó y renaturalizó a una mezcla de TbTIM y TcTIM; y se analizó mediante geles nativos, se observaron dos bandas (Fig. 8, inserto). Una tenía la movilidad de TcTIM. La otra proteína migraba entre TcTIM y TbTIM, por lo tanto, correspondía al

heterodímero. Un punto importante es que el gel no mostró la banda correspondiente a TbTIM (en ciertas preparaciones se observó una banda muy tenue). Con respecto a la observación anterior, es importante notar que durante la diálisis de TbTIM sola, la proteína se agregaba. Cuando TbTIM y TcTIM desnaturalizadas se dializaron juntas, la cantidad de proteína agregada fue mucho menor.

Estas observaciones junto con los datos electroforéticos indican que los monómeros de TcTIM reclutan una cantidad importante de monómeros de TbTIM, y por lo tanto, disminuyen la agregación de esta última.

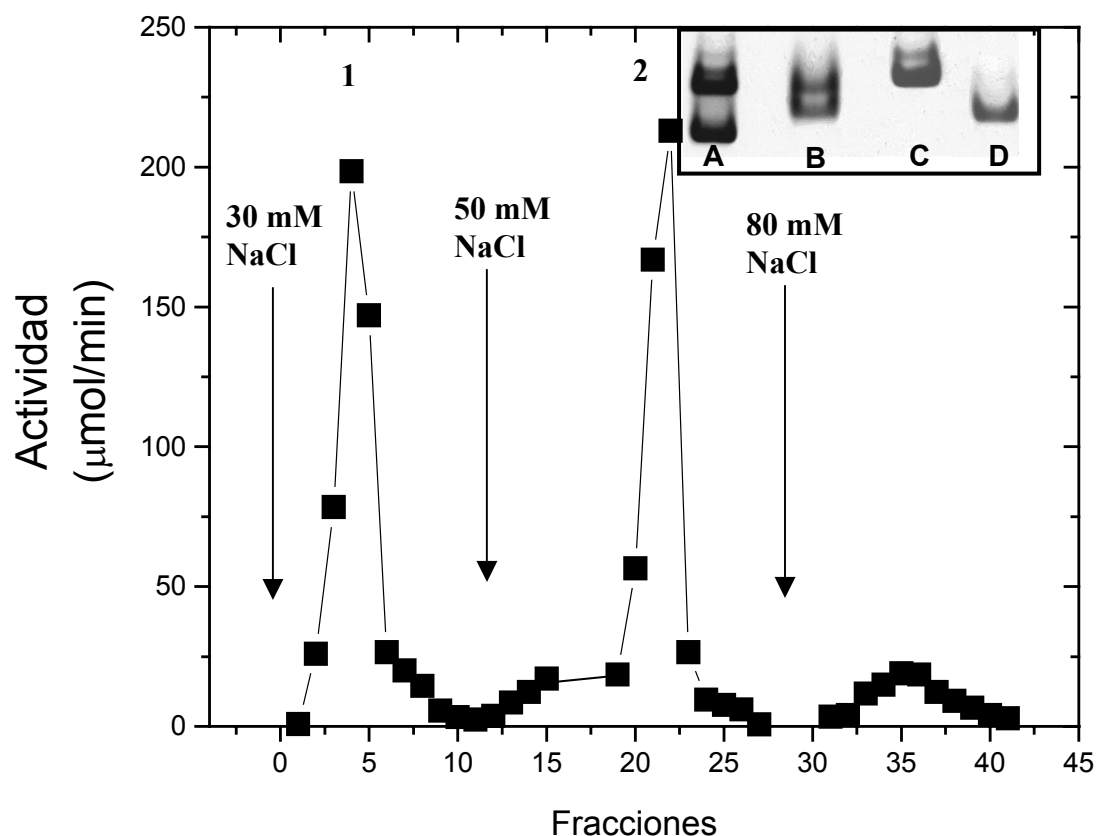
La migración electroforética que es característica del híbrido sugirió que éste se podría separar de las enzimas silvestres por medio de una cromatografía de intercambio iónico. Una mezcla de TcTIM y de TbTIM se desnaturalizó, se dializó y se aplicó a una columna de carboximetilsefaroza. La proteína se cargó a la columna, y se pasaron 25 mL del amortiguador sin observar actividad de TIM. Se continuó pasando la misma solución pero que contenía concentraciones crecientes de NaCl; se obtuvieron tres picos. En geles nativos, la proteína que se desprendió de la columna con una concentración de 30 mM de NaCl poseía la movilidad de TcTIM. La proteína que se desprendió con 50 mM de NaCl migraba entre TcTIM y TbTIM. Finalmente, con 80 mM NaCl, se desprendió un pequeño pico con actividad. Este último pico correspondía a TbTIM; ya que se demostró en un experimento control que esta proteína requiere una concentración de NaCl relativamente alta, mayor que 50 mM, para salir de la columna (Fig. 8).

Características de los híbridos de TcTIM-TbTIM. Los parámetros cinéticos en la dirección de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato; del híbrido aislado, fueron



muy similares a los de las enzimas silvestres, es decir, éste tiene una afinidad por el sustrato y un número de recambio muy similares a los de las enzimas silvestres (Tabla 6).

Cuando se realizó la prueba de estabilidad a la dilución, se observó que el híbrido TcTIM-TbTIM era igual de resistente a la dilución que las enzimas silvestres, es decir, la formación del híbrido no afectó la constante de asociación de los monómeros (Fig. 9).



**Figura 8. Formación y aislamiento de híbridos de TcTIM y TbTIM.** Una mezcla de cantidades iguales de monómeros desplegados de TcTIM y TbTIM se dializó en contra de 25 mM TEA, 1mM DTT, 10 mM EDTA pH 7.4 y se aplicó a una columna de carboximetil sefarosa. La proteína con actividad se desprendió con amortiguador que contenía las concentraciones de sal indicadas. Se determinó la actividad en las fracciones. Las fracciones que mostraron actividad se juntaron, se concentraron y se analizaron por electroforesis en geles nativos. El inserto muestra el gel teñido con azul de Coomassie. El carril A tiene una mezcla de TcTIM y TbTIM nativas, el carril B los productos de la diálisis de la mezcla que contenía monómeros desnaturalizados de TcTIM y TbTIM, el carril C muestra la proteína que salió con 30 mM NaCl (pico 1), y D, la proteína que salió con 50 mM NaCl (pico 2). Notar que la migración de la proteína es intermedia entre TcTIM y TbTIM.

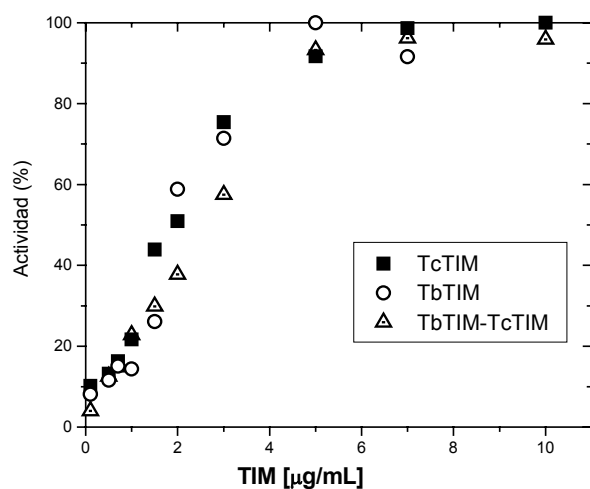
### Características espectroscópicas del híbrido TcTIM-TbTIM

El centro espectral de masas de las fluorescencias intrínsecas de TcTIM y TbTIM difieren por 3 nm. También hay diferencias en su intensidad de fluorescencia; es mayor en TbTIM que en TcTIM (Fig. 10 A). El centro de masa espectral del híbrido fue similar a TbTIM, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión fue intermedia entre TcTIM y TbTIM.

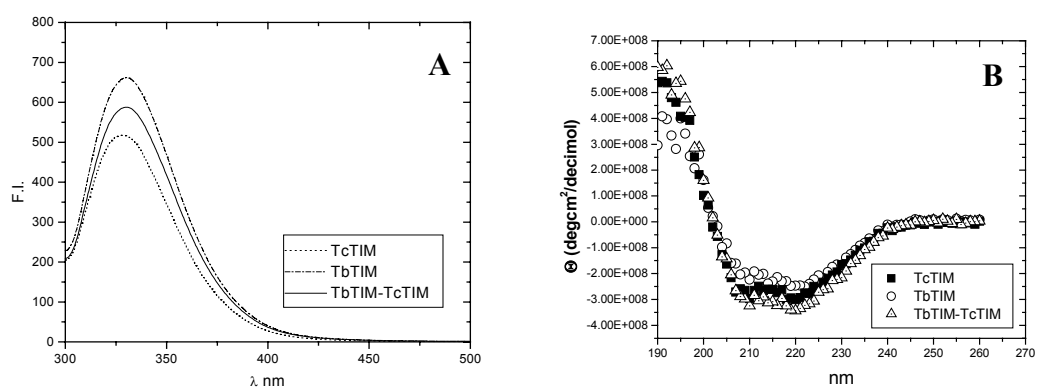
<b>TIM</b>	<b>K<sub>m</sub> (mM)</b>	<b>K<sub>cat</sub> x 10<sup>5</sup> (min<sup>-1</sup>)</b>
<b>TcTIM</b>	0.45 ± 0.03	2.7 ± 0.02
<b>TbTIM</b>	0.46 ± 0.01	3.1 ± 0.05
<b>Mutante de interfase</b>	0.40 ± 0.01	3.1 ± 0.03
<b>TbTIM-TcTIM</b>	0.31 ± 0.02	3.0 ± 0.02
<b>C15A TcTIM</b>	0.42 ± 0.09	1.6 ± 0.02
<b>C15A TcTIM – TbTIM</b>	0.28 ± 0.09	1.3 ± 0.02
<b>C15A TcTIM – TbTIM + MMTS</b>	0.62 ± 0.09	0.5 ± 0.02
<b>E168D TbTIM</b>	0.18 ± 0.03	0.0065 ± 0.0001
<b>C15A TcTIM- E168D TbTIM</b>	0.69 ± 0.07	0.45 ± 0.02

Tabla 6. Determinación de las constantes cinéticas de TcTIM, TbTIM, el híbrido TbTIM-TcTIM, la mutante de interfase de TcTIM, C15A TcTIM, el híbrido C15A TcTIM-TbTIM, E168D TbTIM y el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM. **Las constantes se determinaron siguiendo un modelo tipo Michaelis-Menten.**

Aparentemente, en el híbrido, cada monómero conserva el ambiente de sus residuos aromáticos. El dicroísmo circular de TcTIM, TbTIM, y el híbrido fue muy similar (Fig. 10 B). Por lo tanto, todos los datos indican que el híbrido es una enzima catalíticamente competente que posee las características estructurales de las enzimas nativas.



**Figura 9. Estabilidad de TcTIM, TbTIM, y el heterodímero de TcTIM y TbTIM a diferentes concentraciones de proteína.** Las enzimas se incubaron a las concentraciones indicadas por dos horas a 36 °C. A éste tiempo, se les determinó su actividad. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad final (■) TcTIM, (○) TbTIM, y (Δ) el híbrido.



**Figura 10. Fluorescencia intrínseca (A) y dicroísmo circular (B) de TcTIM, TbTIM y el híbrido con monómeros de TcTIM y TbTIM (TcTIM-TbTIM).** La longitud de onda de excitación en los espectros de fluorescencia fue de 230 nm.

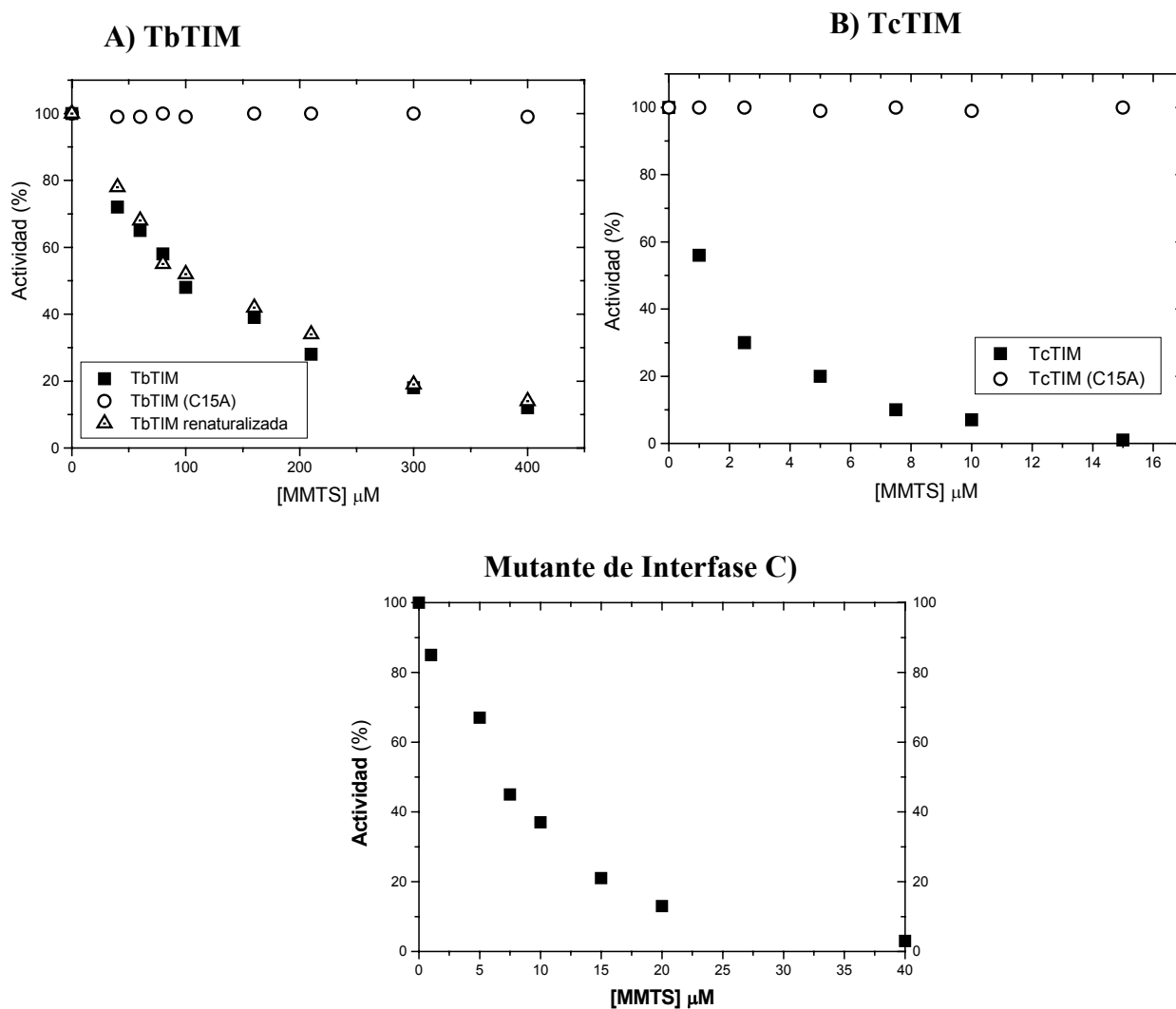
## **Derivatización de la cisteína de interfase: evidencia de intercomunicación entre monómeros.**

### **Efecto del MMTS sobre TcTIM y TbTIM**

De acuerdo con los datos publicados (Pérez-Montfort, *et al.* 1999), observamos que la exposición de TcTIM y TbTIM al MMTS produce la pérdida de la catálisis. También observamos que se necesitan concentraciones más altas de MMTS para inducir un efecto equivalente en TbTIM (Fig. 11 A y B, respectivamente).

Los datos en la figura 11 muestran también que mutantes de TcTIM y TbTIM en donde su Cys de interfase fue reemplazada por Ala fueron insensibles al MMTS. Esto muestra que el efecto causado por el MMTS es debido a la derivatización de la Cys de interfase.

**Efecto del MMTS sobre una mutante de TcTIM que tiene los residuos de interfase de TbTIM.** Para conocer si la composición de los residuos interfaciales es la responsable de las diferencias en susceptibilidad de la Cys de interfase a agentes tioles, produjimos una mutante de TcTIM en la que sus residuos interfaciales se sustituyeron por los de TbTIM. En TcTIM y TbTIM, 25 de los 32 residuos que establecen contactos intersubunidades son idénticos. Se utilizó la misma mutante que se menciona en la primera parte de la tesis (ver Tabla 5). La mutante se expresó en *E. coli* y se purificó a homogeneidad siguiendo el protocolo de purificación de la enzima silvestre. La enzima mutante no mostró una tendencia a agregarse. Los parámetros cinéticos de la enzima purificada fueron similares a aquellos de TcTIM y TbTIM indicando que las mutaciones no causan alteraciones en la estructura general y en la actividad catalítica de la enzima (Tabla 6).

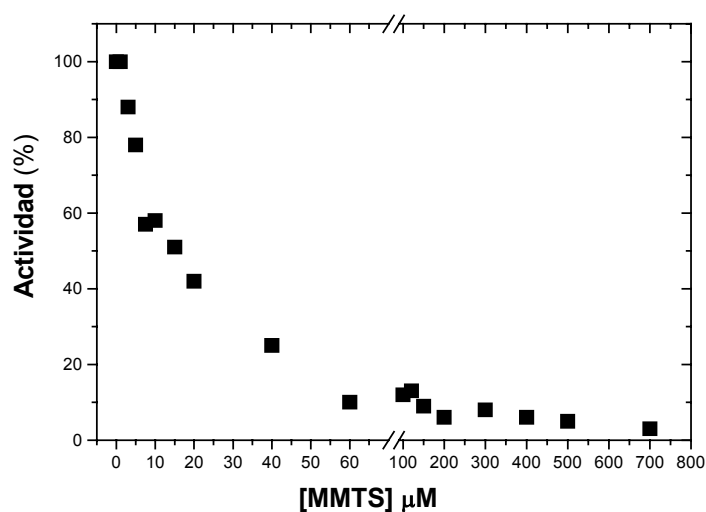


**Fig. 11. Efecto del MMTS en la actividad de TbTIM, C15A TbTIM, TcTIM, C15A TcTIM y la mutante de interfase.** Las enzimas se incubaron a una concentración de  $5 \mu\text{g/mL}$  en una mezcla de  $100 \text{ mM}$  de TEA y  $10 \text{ mM}$  EDTA,  $\text{pH } 7.4$ . Después de dos horas de incubación, se tomó una alícuota para medir la actividad. Esta última se midió a una concentración de  $5 \text{ ng/mL}$ . Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad, en donde  $100 \%$  fue  $2765$ ,  $2930$ ,  $3786$ ,  $3855$  y  $2071 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  para TcTIM, C15A TcTIM, TbTIM, C15A TbTIM y la mutante de interfase, respectivamente.

Cuando se determinó el efecto de distintas concentraciones de MMTS en la mutante de interfase, encontramos que la susceptibilidad al MMTS fue similar a la de la enzima silvestre de TcTIM (Fig. 11 C). Por lo tanto, las diferencias en susceptibilidad al MMTS en TcTIM y en TbTIM no dependen de las diferencias en los residuos que conforman la

interfase. Al parecer, la accesibilidad del MMTS a la Cys de la interfase está modulada por las características de la porción no interfacial de la enzima.

**Efecto del MMTS en híbridos formados a partir de monómeros de TcTIM y TbTIM.** En TcTIM y TbTIM, la Cys de interfase (o su equivalente en otras TIMs) de un monómero está fuertemente empacada entre los residuos del asa 3 de la subunidad adyacente (Fig. 4). Por lo tanto, la reactividad de la cisteína de interfase a agentes tioles podría depender de las características de su monómero, o de las de la otra subunidad. Para dilucidar entre estas dos posibilidades, preparamos un híbrido de monómeros de TcTIM y TbTIM y examinamos su susceptibilidad al MMTS (Fig. 12).



**Fig. 12. Efecto del MMTS en la actividad del híbrido TbTIM-TcTIM.** El híbrido se incubó a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  en una mezcla de 100 mM TEA y 10 mM EDTA, pH 7.4 en presencia de MMTS. Después de dos horas de incubación, se tomó una alícuota para medir la actividad. Esta última se midió a una concentración de 5  $\text{ng/mL}$ . Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad, en donde 100 % fue 2300  $\mu\text{mol min}^{-1}$ .

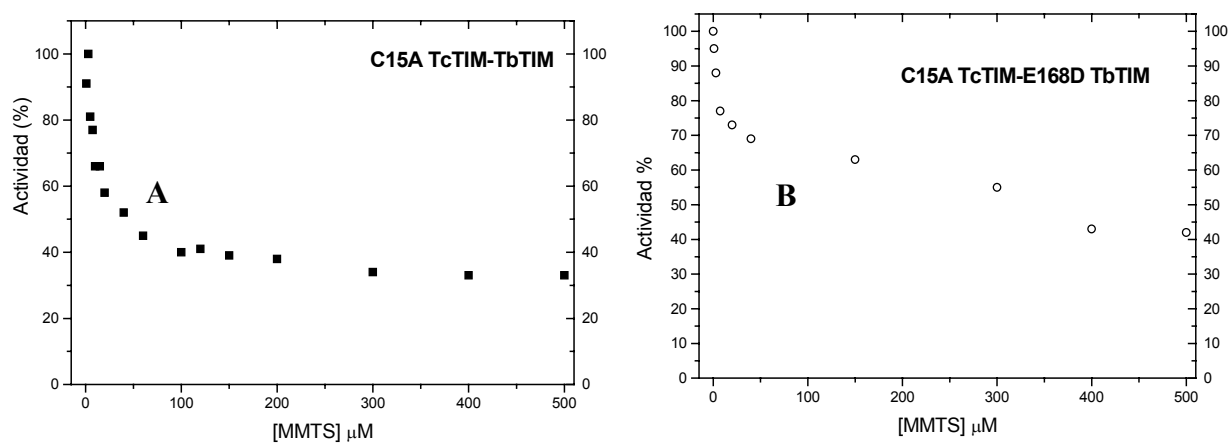
La figura 12 muestra que el MMTS induce un decremento importante en la actividad del híbrido a concentraciones que afectan a la TcTIM y no a la TbTIM (comparar figuras 11 y 12). Sin embargo, con 15  $\mu\text{M}$  de MMTS, el híbrido conserva cerca del 50 % de su actividad, mientras que en TcTIM, esta concentración de MMTS, induce la inhibición completa de la actividad. En el híbrido, se requieren concentraciones del orden de 150  $\mu\text{M}$  para su inactivación completa. Estos datos sugieren que en el híbrido, las dos cisteínas de interfase no son equivalentes. Parecería que en el híbrido hay una coexistencia de las dos regiones interfaciales Cys 15-asa 3 que no son equivalentes y que cada una conserva las características de las enzimas silvestres.

Es importante hacer notar que debido a que el híbrido se prepara por dilución de una mezcla de monómeros desnaturalizados, su sensibilidad al MMTS, así como la de otros híbridos (ver adelante), se podría deber a alteraciones que ocurren durante los pasos de desnaturalización - renaturalización. Para explorar esta posibilidad, determinamos la susceptibilidad que TbTIM tuvo frente a un tratamiento idéntico, es decir, una TbTIM que se sometió al proceso de desnaturalización y renaturalización. Los resultados indican que su susceptibilidad fue idéntica a la de TbTIM (Fig. 11 A, triángulos). Por lo tanto, el ciclo desnaturalización - renaturalización no altera la susceptibilidad de las enzimas al MMTS.

**Sensibilidad al MMTS de los híbridos formados por un monómero de C15A TcTIM y un monómero de TbTIM silvestre.** Los experimentos de la figura 12 indican que a concentraciones de MMTS relativamente bajas, el híbrido TcTIM-TbTIM pierde una parte considerable de su actividad, pero se requieren concentraciones de MMTS relativamente altas para obtener una inhibición completa. Estas observaciones podrían implicar que la derivatización de una de las cisteínas de interfase induce una inhibición *parcial* de la

actividad y que la inhibición completa requiere la perturbación de las dos Cys de interfase. Para examinar esta posibilidad, preparamos una enzima con una sola Cys en su interfase. Esto se logró hibridando un monómero de TbTIM silvestre con un monómero de una mutante C15A TcTIM. El híbrido C15A TcTIM-TbTIM también sirvió para observar si la accesibilidad al MMTS hacia la única cisteína de interfase depende de la dinámica del propio monómero o de la dinámica de la subunidad adyacente. Es importante hacer hincapié que se trata de la Cys 15 de TbTIM que se encuentra rodeada por el asa 3 de TcTIM. Los parámetros cinéticos de este híbrido son similares a los de la mutante C15A TcTIM (Tabla 6).

En los experimentos sobre el efecto del MMTS en el híbrido C15A TcTIM - TbTIM, observamos que el híbrido muestra un decremento espontáneo de la actividad después de dos horas de incubación. Por lo tanto, los valores que se obtuvieron sobre el efecto del MMTS se calcularon considerando a la actividad del control (Fig. 13).



**Fig. 13. Efecto del MMTS en la actividad del híbrido C15A TcTIM-TbTIM (■) y el híbrido C15A TcTIM-E168D TbTIM (○).** Las enzimas se incubaron a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en una mezcla de 100 mM de trietanolamina y 10 mM EDTA, pH 7.4 y MMTS a las concentraciones indicadas. Después de dos horas de incubación se tomó una alícuota para medir la actividad. Esta última se midió a una concentración de 5  $\text{ng}/\text{mL}$ . Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad, en donde 100 % fue  $1200 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el híbrido C15A TcTIM-TbTIM y  $400 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para el híbrido C15A TcTIM-E168D TbTIM.



Los resultados mostraron que a concentraciones de MMTS cercanas a 50  $\mu\text{M}$  se inhibe cerca del 60% de la actividad del híbrido C15A TcTIM – TbTIM (Fig. 13, A). Ésta fue la máxima inhibición que se produjo; es decir, la actividad permaneció a este nivel a concentraciones de MMTS de cuando menos 700  $\mu\text{M}$ . Estos resultados indican que una enzima con una Cys de interfase perturbada expresa una actividad catalítica importante. Es de interés señalar que la perturbación de la única cisteína de interfase induce un incremento de 2 veces en la  $K_m$  y una reducción de aproximadamente el 60 % en la  $k_{cat}$  (ver C15A TcTIM-TbTIM + MMTS en la Tabla 6).

Con respecto a la interacción entre los dos monómeros, es de llamar la atención que la máxima inhibición de la actividad del híbrido C15A TcTIM-TbTIM por el MMTS se alcanzó a concentraciones que fueron aproximadamente dos veces mayores que aquellas que inducen una inhibición completa en la TcTIM silvestre (Fig.13, A), esto es, mucho menores que las requeridas para inhibir a TbTIM. Por lo tanto, el híbrido C15A TcTIM-TbTIM exhibe una susceptibilidad al MMTS más cercana a la que posee TcTIM silvestre, pese a que su única Cys de interfase pertenece al monómero de TbTIM.

### **Control de la actividad catalítica de los dos monómeros por las dos porciones de interfase Cys 15 - asa 3.**

Los datos sobre el efecto del MMTS en el híbrido C15A TcTIM - TbTIM mostraron que la perturbación de la única Cys de interfase disminuyó su actividad cerca del 60% (Fig. 13 A). El porcentaje de inhibición sugiere que la perturbación de una Cys de interfase da lugar a una enzima en donde sólo uno de los monómeros es funcional. En este caso, sería importante determinar cuál de los dos monómeros es el afectado. Sin embargo, las observaciones también podrían indicar que la perturbación de una sola región de la

interfase afecta la actividad de ambos monómeros. Cualquiera de estas posibilidades proporcionaría información sobre el mecanismo de catálisis en los dímeros de la TIM, por lo tanto, estudiamos cuál era la causa de la inhibición parcial en el híbrido con el MMTS. Para nuestros estudios, aprovechamos la observación de Raines *et al.* (1986) que mostraron que la substitución del glutámico catalítico de la TIM de pollo por un Asp produce una enzima con una actividad que es aproximadamente 1000 veces menor que la de la enzima silvestre. Produjimos y purificamos a homogeneidad la mutante E168D de TbTIM (ver Material y Métodos). En confirmación con los datos de Raines y colaboradores (1986), la  $k_{cat}$  de la mutante fue aproximadamente 500 veces menor que la de la enzima silvestre (Tabla 6). Los monómeros de esta mutante se hibridaron con monómeros de C15A TcTIM.

Las propiedades cinéticas del híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM se muestran en la tabla 6. La  $K_m$  fue de aproximadamente dos veces mayor que la de la silvestre y su  $k_{cat}$  fue cerca de tres veces menor que en el híbrido C15A TcTIM – TbTIM. También se observó que el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM era inestable. A una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ , la actividad del híbrido decae cerca del 40 % en 5 minutos. Después de este tiempo, la actividad permanece constante por lo menos por 2 horas. Por lo tanto, en los experimentos en donde se estudió el efecto del MMTS, se determinó la actividad en presencia de MMTS en relación a la actividad que presentaba el control en el tiempo de la medición.

El propósito de estudiar el efecto del MMTS en el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM fue el de saber si la inhibición parcial de la actividad que resulta de la perturbación de una sola cisteína de interfase en el híbrido C15A TcTIM – TbTIM (Fig. 13 A), es debida a la supresión de la actividad de uno de los dos monómeros o a una inhibición parcial en la actividad de los dos monómeros. El razonamiento detrás de los experimentos con el híbrido

C15A TcTIM – E168D TbTIM, fue el siguiente: Si la actividad del híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM se inhibe por completo con MMTS, se podría concluir que el monómero funcional en el híbrido derivatizado C15A TcTIM – TbTIM silvestre es el monómero de C15A TcTIM. Por el contrario, si el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM es insensible al MMTS, entonces, el monómero funcional en el híbrido C15A TcTIM – TbTIM derivatizado es el monómero de TbTIM. En el caso de que la inhibición parcial de la actividad en el híbrido C15A TcTIM – TbTIM se deba a alteraciones en la actividad de los dos sitios, sólo observaríamos una inhibición parcial de la actividad.

Los resultados del efecto del MMTS sobre el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM mostraron que el agente tiol produjo una inactivación de aproximadamente el 60 % (Fig. 13 B). Es importante notar que ésta fue la mayor inactivación que se indujo por el MMTS. Por lo tanto, los datos en el híbrido C15A TcTIM – E168D TbTIM indican que la perturbación de la región de la interfase Cys 15 – asa 3 afecta aproximadamente el 50 % de la actividad de cada uno de los dos sitios catalíticos del dímero.

## DISCUSIÓN

### **Control de la cinética de reactivación del homodímero de la triosafosfato isomerasa a partir de los monómeros desplegados.**

Se acepta que la renaturalización de la TIM a partir de monómeros desplegados con GdnHCl se lleva a cabo por un mecanismo cinético secuencial uni-bimolecular. Inicialmente, los monómeros desplegados se pliegan en un intermediario monomérico. En un segundo paso, los monómeros plegados se asocian dando lugar a dímeros activos (Rietveld y Ferreira, 1998; Gao, *et al.* 1998; Gokhale, *et al.* 1999).

Los estudios de reactivación con TcTIM y TbTIM, muestran que la formación de dímeros activos a partir de los monómeros desplegados es una secuencia de reacción uni – bi - uni molecular. La primera reacción unimolecular involucra el plegamiento de los monómeros. Subsecuentemente, en la reacción bimolecular, dos monómeros se unen para formar un dímero inactivo. Esto es seguido por arreglos internos que finalizan en la obtención de un dímero catalíticamente competente (ver secuencia de reacciones en la página 37). Los experimentos de reactivación muestran que las constantes de velocidad  $k_2$  y  $k_3$  son mayores en TcTIM que en TbTIM. Esto indica que la asociación, como los arreglos internos del dímero inactivo para transformarse en dímero activo son más rápidos en TcTIM que en TbTIM. De hecho, mis datos ilustran bien como la cinética del proceso se relaciona con la agregación. Los valores de  $k_2$  (la constante de velocidad de la asociación de los monómeros) son de  $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para TcTIM y de  $0.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para TbTIM. Estas constantes son similares a las obtenidas para el proceso de renaturalización de la TIM de músculo de conejo, cuyo valor es de  $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Zabori, *et al.* 1980); al valor obtenido para la enzima de músculo de pollo a 30 °C, que es de  $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Mc Vittie, *et al.* 1977) y al valor obtenido para la renaturalización térmica en

levadura, que es de  $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Benítez-Cardoza, *et al.* 2001). Es importante recalcar que el valor más bajo de  $k_2$  es el que corresponde a TbTIM. Esta enzima es la que muestra mayor tendencia a la agregación, lo que concuerda con que su asociación es más lenta y, por lo tanto, se favorece el proceso de agregación.

### **¿Está involucrada la interfase de la TIM en las diferencias cinéticas de reactivación de TcTIM y TbTIM?**

Los estudios sobre la cinética de la reactivación de una mutante de TcTIM que tiene la interfase de TbTIM indicaron que la asociación entre los dos monómeros ( $k_2$ ) está controlada principalmente por los residuos que conforman a la interfase. Esto parece congruente debido a que los residuos de la interfase son aquellos involucrados en el reconocimiento y la asociación de los monómeros. Sólo 7 de los 32 residuos que conforman la interfase son distintos entre TcTIM y TbTIM. Por lo tanto, la diferencia que se observó en las constantes de velocidad, para la asociación de los monómeros entre TcTIM y TbTIM, se debe fundamentalmente a estos residuos.

Por otro lado, los valores de  $k_3$  de la mutante de interfase y de la TcTIM son muy semejantes. Esto quiere decir que los arreglos internos que ocurren en la transición del dímero inactivo al dímero activo están controlados por la porción no interfacial.

Debido a que realizamos un estudio detallado sobre la cinética de formación de los dímeros de TcTIM y de TbTIM, pudimos observar qué porción de la estructura de la enzima contribuye en los diferentes pasos de la cinética de plegamiento. Se incluyó un paso adicional que fue el de la transición del dímero inactivo al dímero activo. Este paso fue incluido debido a que en los datos obtenidos en la Figura 7 se muestra que a concentraciones de proteína relativamente bajas existe un paso cuya velocidad es dependiente de la concentración de la

enzima, que corresponde a la asociación de los monómeros. A altas concentraciones de proteína (por arriba de 200 nM en concentración de monómero) existe otra reacción, independiente de concentración, que es el paso limitante en la formación de los dímeros activos. Conjuntando los datos anteriores, proponemos la siguiente secuencia de reactivación para TbTIM y TcTIM: primero se pliegan los monómeros, y en una segunda reacción, se asocian para formar un dímero inactivo, que finalmente, da origen a un dímero catalíticamente competente a través de rearreglos intramoleculares.



### **¿ Influyen las propiedades cinéticas de un monómero de la TIM en las propiedades cinéticas del monómero adyacente?**

Con respecto a los estudios con híbridos de TcTIM / TbTIM, nuestro propósito fue conocer cómo la interacción de monómeros con diferentes características, afecta la cinética de formación de híbridos catalíticamente competentes. Debido a la alta identidad de los residuos de la interfase de las dos enzimas, no nos sorprende que los híbridos se hayan formado. Es posible obtener híbridos de la TIM si existe una alta identidad de los residuos que forman parte de la interfase (Sun *et al.* 1992). Lo sorprendente, en nuestro caso, fue que, cuando se reactivó una mezcla de monómeros de TbTIM y TcTIM desplegados, el rendimiento de los híbridos activos fue alto en una proporción semejante a la formación de homodímeros de TcTIM y muy superior a la de TbTIM.

Ya que existen diferencias entre TcTIM y TbTIM en cuanto a sus residuos interfaciales, esperábamos que cada monómero fuera más afín al monómero de su propia especie, o que la formación del dímero fuera al azar (esto sucedería si la afinidad entre los monómeros de las diferentes especies fuera la misma). Si la formación del dímero fuera al azar, se esperaría una

distribución estadística 1 (TcTIM) : 2 (Híbridos) : 1 (TbTIM). Sin embargo, en nuestros experimentos, la proporción de TcTIM : híbrido : TbTIM fue de 1.0 : 0.9 : 0.2. Esto indica que existe una preferencia de los monómeros de TbTIM por los monómeros de TcTIM y no por sus propios monómeros. En este sentido, es importante señalar que, cuando se reactiva a TcTIM junto con TbTIM, se obtiene un mayor rendimiento de monómeros de TbTIM que cuando se reactivan solos. Parecería que los monómeros de TcTIM reclutan a los monómeros de TbTIM, impidiendo así su agregación. Por lo tanto, los resultados indican que para la formación de los dímeros, las propiedades de cada monómero afectan la cinética del proceso.

### **Evidencia de intercomunicación entre monómeros.**

La mayoría de las enzimas de los organismos son oligómeros (Bennet, *et al.* 1995) y, dentro de los oligómeros, los más abundantes son los homodímeros. En varios homodímeros, los sitios catalíticos se forman por los residuos de las dos subunidades y, por lo tanto, estas enzimas son necesariamente dímeros. Sin embargo, no está claro por qué otras enzimas, como por ejemplo la TIM, son dímeros obligados. En la TIM, los residuos que participan en la catálisis se encuentran en cada subunidad. Sin embargo, los monómeros de la TIM son catalíticamente inertes, y la enzima es activa sólo en su forma dimérica.

Para explicar por qué la TIM es un dímero, se ha propuesto que la dimerización induce la orientación correcta de los residuos catalíticos (Borchert, *et al.* 1993; Schliebs, *et al.* 1997). También se ha sugerido que la dimerización aumenta la estabilidad de los monómeros (Mainfroid, *et al.* 1996; Vázquez-Contreras, *et al.* 2000). Sin embargo, se ha estudiado poco cómo las distintas porciones de la enzima contribuyen en la expresión de la catálisis (Pérez-Montfort, *et al.* 1999; Reyes-Vivas, *et al.* 2001). Para explorar la contribución de las distintas partes de la enzima en la expresión catalítica, en particular de la región interfase – asa 3,

utilizamos la formación de híbridos de monómeros de TcTIM y/o TbTIM que modificados en algunos aminoácidos de la interfase.

Los híbridos son de mucha utilidad para estudiar cómo las características de los monómeros se afectan entre sí en la formación del dímero. De hecho, los estudios con híbridos han tenido aplicaciones múltiples. Por ejemplo, los híbridos se han utilizado para explorar la contribución de los aminoácidos de la interfase en el reconocimiento monómero-monómero y en la estabilidad del oligómero (Greene, *et al.* 1993; Distefano, *et al.* 1990; Osterman, *et al.* 1994). En las enzimas en las que el sitio catalítico está formado por los residuos de los dos monómeros, se han utilizado híbridos para probar cómo los residuos de cada monómero participan en la reacción catalítica y si ésta es afectada por residuos distantes (Sun, *et al.* 1992). El poder de los híbridos puede aumentar aún más si se forman con monómeros que poseen características que son drásticamente diferentes. Nosotros estudiamos los híbridos formados por los monómeros de dos enzimas que muestran diferencias en accesibilidad al solvente de su Cys de interfase. El objetivo fue el determinar si las características de la cisteína de interfase dependen de la dinámica del propio monómero o de la otra subunidad y también el explorar si durante la catálisis existe una interacción dinámica entre los dos monómeros de la TIM.

Pese a que la composición de aminoácidos y la estructura de TcTIM y TbTIM son muy similares, la susceptibilidad de la Cys de interfase a los agentes tioles de TcTIM es aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que en TbTIM (Reyes-Vivas, *et al.* 2001). Nuestros estudios sobre el efecto del MMTS sobre una mutante de TcTIM con la interfase de TbTIM mostraron que la mutante posee una susceptibilidad al MMTS similar a TcTIM silvestre. Esto indica que el tiempo de exposición de la Cys de interfase a agentes externos depende de las propiedades de las porciones no interfaciales de las enzimas, y no de la composición de aminoácidos de la interfase.



**¿Contribuyen las distintas partes de la triosafosfato isomerasa a la diferencia en reactividad de un residuo de la interfase?**

Con el fin de responder esta pregunta se generó un híbrido TcTIM – TbTIM. Los estudios con el híbrido TcTIM – TbTIM mostraron que, a concentraciones de MMTS a las que se inactiva TcTIM, el híbrido todavía posee actividad. De hecho, se requieren concentraciones por arriba de 100  $\mu$ M para la inactivación del heterodímero. Al parecer, en este híbrido, la Cys 15 de cada monómero conserva la reactividad de su enzima original, y, por lo tanto, las cisteínas de interfase del híbrido no son equivalentes.

En este sentido, los experimentos del efecto del MMTS sobre el híbrido C15A TcTIM – TbTIM son bastante ilustrativos. En este híbrido, la máxima inhibición de la actividad causada por el MMTS se logró a concentraciones ligeramente mayores a las que inhiben a la TcTIM silvestre. Es importante recordar que en este híbrido, se está estudiando la susceptibilidad de la Cys 15 de TbTIM que se encuentra rodeada por el ambiente de TcTIM. Se encontró que la susceptibilidad al MMTS del híbrido es mucho mayor que la de TbTIM silvestre. Por lo tanto, la reactividad de la Cys de interfase depende predominantemente de las características de la subunidad adyacente.

También es importante remarcar que las características observadas en el híbrido no son el resultado del procedimiento de la formación de híbridos, es decir, de las reacciones de desnaturalización y de renaturalización de las enzimas. Una TbTIM que fue desnaturalizada y reactivada posee la misma baja susceptibilidad al agente desnaturalizante que una TbTIM que no ha sufrido este proceso.

### **¿ La perturbación de una porción de la interfase de la TIM afecta la actividad catalítica de un monómero o de ambos?**

Como se mencionó anteriormente, cada uno de los dos monómeros de la TIM posee los residuos que participan directamente en la química de la reacción catalítica; sin embargo, las enzimas son activas solamente cuando se encuentran en estado dimérico. En este contexto, es relevante que Sun *et al.* (1992) mostraron que los monómeros de la TIM son catalíticamente competentes cuando se encuentran unidos a monómeros que tienen su Glu catalítico modificado covalentemente con un análogo de sustrato. Por otro lado, Borchert, *et al.* 1993, mostraron que la dimerización induce la orientación correcta de los residuos catalíticos. En conjunto, estos trabajos indican que cada monómero es un punto de apoyo para la otra subunidad. Sin embargo, es posible que, además de servir como soporte del otro monómero, cada monómero sea un participante activo de la reacción catalítica de la otra subunidad. Esta hipótesis implica que durante la catálisis existe una intercomunicación entre las dos subunidades. Cabe mencionar que la hipótesis de que exista intercomunicación entre los sitios catalíticos de los monómeros de la TIM ha sido mencionada previamente por Harris *et al.* (1998).

Nuestros datos con el híbrido C15A TcTIM – TbTIM silvestre muestran que cuando se perturba con el MMTS una sola de las cisteínas de interfase, la actividad del híbrido decae aproximadamente en un 60 %. La inhibición parcial podría tener dos explicaciones: a) la perturbación de una de las regiones de la interfase Cys 15 – asa 3 suprime la actividad de uno de los dos monómeros o b) la perturbación afecta la actividad de ambos monómeros. Bajo este contexto, los experimentos con el híbrido formado por el monómero C15A TcTIM y el monómero esencialmente inactivo de la E168D TbTIM son interesantes. Es importante

recordar que este híbrido es análogo al híbrido C15A TcTIM – TbTIM silvestre, excepto que el monómero de TbTIM es catalíticamente inactivo.

El 40 % restante de la actividad del híbrido C15A TcTIM – TbTIM inactivo puede pensarse que la perturbación de la única región de interfase Cys 15 – asa 3 afecta de igual manera a la actividad de ambos monómeros. La actividad total del dímero de la TIM es entonces la suma de las actividades de cada uno de los dos sitios catalíticos que dependen de la integridad de cada una de las regiones de la interfase Cys 15 – asa 3. Por lo tanto, esta podría ser otra razón por la cual la TIM es un dímero obligado.

En este contexto, Aqvist y Fothergill (1996) llamaron la atención al hecho de que el grupo hidroxilo de la Thr 76, que se encuentra en el extremo del asa 3, forma un puente de hidrógeno con la His 96 de la otra subunidad, cuando se encuentra desprotonada, que durante la catálisis, el puente de hidrógeno se mueve hacia el Glu catalítico. De acuerdo con los autores, estos arreglos son necesarios para la actividad. En un trabajo anterior, el grupo de Brown (1987) y el de Borchert, et al. (1993), llegaron a conclusiones similares con respecto a que la Thr 76 estuviera involucrada en la catálisis. Ambos grupos indicaron que ésta podría ser una razón por la que la TIM es un dímero.

En relación con nuestros resultados, es posible que la modificación de la Cys 15 de la primera subunidad se transmita al asa 3 de la otra subunidad, la que a su vez afecta la función del sitio catalítico de la primera subunidad. Una comunicación entre el sitio catalítico y la región Cys 15 – asa 3 también fue inferida en los estudios en los que se demostró que la ocupación del sitio catalítico con el sustrato o con un análogo del sustrato modifica la reactividad de la cisteína de interfase a los agentes tioles (Pérez-Montfort, et al. 1999). Estas observaciones indican que existe una comunicación entre el sitio catalítico y la región de la interfase Cys 15 – asa 3. Nuestros datos concuerdan con estos reportes. Sin embargo, también

muestran que la región de la interfase Cys 15 – asa 3 contribuye a la expresión de la catálisis en los dos sitios catalíticos del dímero de la TIM, ésta podría ser una razón por la que la TIM es activa solamente en su forma dimérica. Aunque cada monómero contiene un sitio catalítico independiente, la función catalítica requiere de la región de la interfase Cys 15 – asa 3. Al alterar esta región, la enzima pierde sus propiedades catalíticas. Por lo tanto, para tener una enzima funcional es necesaria la intercomunicación dinámica entre monómeros.

En este trabajo se pudo disecar la contribución de distintas partes de la enzima tanto en la cinética de formación del dímero, como en su susceptibilidad al MMTS. Además, se usaron híbridos para indagar si un monómero es capaz de modificar las propiedades del monómero vecino. El uso de híbridos con estos fines no ha sido muy utilizado, y éstos pueden ser de gran utilidad para estudiar si una propiedad particular de un monómero puede ser conferida al monómero adyacente. Se piensa que el uso de híbridos podría ayudar a responder si una característica que posea un monómero, por ejemplo, una mayor termoestabilidad, podría ser conferida a un monómero de una enzima con distintas características. Los híbridos también resultan ser de utilidad para estudiar la intercomunicación entre monómeros.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahern, TJ., Casal, JL., Petsko, GA., Klibanov, AM (1987) Control of oligomeric thermostability by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 675-679
- Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horányi, M., Baróti, K., Hollan, S., Thornalley, PJ (2003) Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1639: 121-132
- Alvarez, WJ., Zelen, JP., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, JA., Wyns, L., Wierenga, RK., Maes, D (1998) Triosephosphate isomerase of the Psychrophilic Bacterium *Vibrio Marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem* 273: 2199-2206
- Anfinsen (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181: 223-230
- Aparicio, R., Ferreira, ST., Polikarpov, I (2003) Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity. *J. Mol. Biol.* 334: 1023-1041
- Aqvist, J., y Fothergill, M (1996) Computer simulation of the triosephosphate isomerase catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* 26, 271 (17): 10010-6
- Banner, DW., Bloomer, AC., Petsko, GA., Phillips, DC., Pogson, CI., Willson, IA., Conan, PH., Furth, AJ., Milmar, JD., Offord, RE., Priddle, JD., Waley, SG (1975) Structure of chicken triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution. *Nature*, 255, 609-614

- Baker, D., Sohl, JL., Agard, DA (1992) A protein – folding reaction under kinetic control. *Nature* 356, 263-265
- Baker, D y Agard, DA (1994) Influenza hemagglutinin kinetic control of protein function. *Biochemistry*, 33: 7505-7509
- Baldwin, RL (1980) *In Protein Folding (R, Jaenicke, et al.) Elsevier, Amsterdam*, 369-384
- Baldwin, RL (1995) The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. *J. Biomol. NMR*, 103-109
- Beaucamp, N., Schurig, H., Jaenicke, R (1997) The PGK-TIM fusion protein from *Thermotoga maritime* and its constituent parts are intrinsically stable and fold independently. *Biol. Chem.* 378: 679-685
- Beissinger, M y Buchner, J (1998) How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379, 245-259
- Benitez-Cardoza, CG., Rojo-Domínguez, A., Hernández-Arana, A (2001) Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry*, 40: 9049-58
- Bennett, MJ., Schlunegger, MP., Eisenberg, D (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci.* 4, 2455-2468
- Borchert, TV., Pratt, K., Zeelen, JP., Callens, M., Noble, MEM., Opperdoes, FR., Michels, PAM., Wierenga, RK (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* 211: 703-710

- Borchert, TV., Abagyan, R., Jaenicke, R., Wierenga, RK (1994) Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1515-1518
- Borchert, TV., Celen, JP., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., Wierenga, RK (1995) An interface point mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *FEBS Letts.* 367: 315- 318
- Brown, F y Kollman, PA (1987) Molecular dynamics simulations of “Loop Closing” in the enzyme triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 198. 533-546
- Cháñez-Cárdenas, ME., Fernández-Velasco, DA., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., Pérez-Montfort, R (2002) Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 117-129
- Chothia, C (1980) In “*Protein Folding*” (Jaenicke, R., ed) Elsevier, North-Holland, Amsterdam, New York, 583-585
- Corey, RB (1948) *Adv. Protein Chem.* 4: 385-406
- Creighton (1993a) *Protein Folding* 2<sup>a</sup> ed. W.H. Freeman and Co. NY
- Creighton (1993b) *Proteins: Structure and molecular properties*, 2a ed. W.H: Freeman and Co. NY
- Delboni, LF., Mande, SC., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, FM., Martial, JA., Hol, WGJ (1995) Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional

- structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Prot. Sci.* 4: 2592-2604
- Dill, KA y Shortle, D (1991) Denatured states of proteins. *Annual Reviews in Biochemistry*, 60: 795-825
  - Distefano, MD., Moore, MJ., Walsh, CT (1990) Active site of mercuric reductase resides at the subunit interface and requires Cys 135 and Cys 140 from one subunit and Cys 558 and Cys 559 from the adjacent subunit. *Biochemistry*, 29: 2703-2713
  - Dobson CM (2003) Protein folding and disease: a view from the first Horizon symposium. *Nature Review Drug Discovery* 2 (2) : 154-160
  - Dobson, CM y Ellis, J (1998) Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *The EMBO Journal*, 17: 5251-5254
  - Eaazhisai, K., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, MR (2004) Structures of unliganded and inhibitor complexes of W168F, a loop 6 hinge mutant of plasmodium falciparum triosephosphate isomerase: observation of an intermediate position of loop 6. *J. Mol. Biol.*, 343 (3) : 671-684
  - Ellis, RJ y Pinheiro, TJT (2002) Medicine: danger-misfolding proteins. *Nature*, 416 (6880): 483-484
  - Eienthal, R y Cornish-Bowdenm A (1998) Prospects fos antiparasitic drugs. The case of Trypanosoma brucei, the causative agent of Africans sleeping sickness. *JBC.* 273: 5500 – 5505
  - Fairlamb, AH., Oduro, KK., Bowman, IBR (1979) *FEBS Spec. Meet. Enzymes, Dubrovnik, Abstr.*, S4-10.
  - Farber, GK y Petsko, GA (1990) The evolution of alpha beta barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.*, 15: 228-234



- Ferreira, S y De Felice, F (2001) PABMB Lecture: Protein dynamics, folding and misfolding, from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS Letters*, 498: 129-134
- Fersht, A (1985) *Enzyme, Structure and Mechanism*. W.H. Freeman and Co.
- Fischer, G y Schmid, F (1990) The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 29: 2205-2212
- 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*. *Eur. J. Biochem.* 253: 684-91
- Gao, X., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A (1998) Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of suramin. *Biochem. J.* 331: 1-6
- Garel, JR (1992) *In Protein Folding (T.E. Creighton, ed)* 405-454. Freeman, NY
- Gokhale, RS., Ray SS., Balaram, P (1999) Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry*, 38: 423-431
- Goldberg, ME (1985) The second translation of the genetic message: protein folding and assembly. *Trends Biochem. Sci.* 10: 388 - 391

- Greene, PJ., Maley, F., Pedersen-Lane, J., Santi, DV (1993) Catalytically active cross-species heterodimers of thymidylate synthase. *Biochemistry*, 32: 10283-10288
- Guerra-Giraldez, C., Quijada, L., Clayton, CE (2002) Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.* 115: 2651-8
- Harris, TH., Cole, RN., Comer, FI., Mildvan, AS (1998) Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 37: 16828-16838
- Harrison, SC y Durbin, R (1985) Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4028-4030
- Helfert, S., Estévez, AM., Bakker, B., Michels, P., Clayton, Ch (2001) Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 357, 117-125
- 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
- Jaenicke, R y Rudolph (1986) *Methods in Enzymology*, 131: 218-250
- Jaenicke, R (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 49: 117-237
- Jaenicke, R (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 155-241
- Jaenicke, R (1991a) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 202, 715-728

- Jaenicke, R (1991b) Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry*, 30: 3147-3161
- Jaenicke, R (1996) Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Curr. Topics Cell. Reg.* 34, 209-314
- Jaenicke, R y Lilie, H (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein. Chem.* 53: 329-390
- Jencks, WP (1987) *Catalysis in chemistry and enzymology*. Dover Publication, Inc., New York
- Joseph-McCarthy, D., Lolis, E., Komives, AE., Petsko, AG (1994) Crystal structure of the K12M/G15A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry*, 33: 2815-2823
- Kelly, J (1998) The environmental dependency of protein folding best explains prion and amyloid diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 930-932
- Kim, PS y Baldwin, RL (1982) Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 459-489
- Knowles, JR y Albery, JW (1977) Efficiency and evolution of enzyme catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 10:105-111
- Knowles, JR (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 350: 121-124
- Kohloff, M., Dahm, A., Hensel, R (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett.* 383, 245-250

- Kyte, J (1995) *Structure in Protein Chemistry*. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Kursula, I., Salin, M., Sun, J., Norledge, BV., Haapolainen, AM., Sampson, NS., Wierenga, RK (2004) Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng. Des. Sel.* 17 (4) : 375-82
- Lambeir, A., Opperdoes, FR., Wierenga RK (1987) Kinetic properties of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. A comparison with the rabbit muscle and yeast enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 168: 69-74
- Lansbury, P (1999) Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 3342-3344
- Levinthal, C (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys* 65, 44-45
- Levinthal, C (1986) "Dry" enzymes. *J. Chem. Phys.*, 65, 44-45
- Lodi, P., Chang, CL., Knowles, RJ., Komives, AE (1994) Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, 33: 2809-2824
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, RC., Rose, D., Hartman, FC., Petsko, GA (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, 29: 6609-6618.
- Lolis, E y Petsko, GA (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, 29: 6619-6625
- 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 Mol. Biol.* 283: 193-203

- Maes, D., Zeelen, JP., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, MH., Backmann, J., Martial, JA., Wyns, L., Jaenicke, R., Wierenga, RK (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 37: 441-453
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, JM., Mande, SC., Hol, WG., Martial, JA., Goraj, K (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 29; 257 (2) : 441-56
- Mande, SC., Mainfroid, V., Kalk, KH., Goraj, K., Martial, JA., Hol, WGJ (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci.* 3: 810-821.
- Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P (2002) Inhibition of plasmodium falciparum triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *J. Biol. Chem.* 277(28) : 25106-14
- Matthews, RC (1993) *Annual Reviews in Biochemistry*, 62: 653-683.
- McVittie, JD., Esnouf, MP., Peacocke, AR (1977) The denaturation-renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* 81: 307-315

- Morgan, C.J., Wikins, D.K., Smith, L.J., Kawata, J., Dobson, C.M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 300, 11-16.
- Muchowski, P.J. (2002) Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron* 35, 9-12
- Nagano, N., Hutchinson, G.E., Thornton, J.M. (1999) Barrel structures in proteins: automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels. *Protein Science*, 8:2072-2084
- Nagano, N., Orengo, C.A., Thornton, J.M. (2002) One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* 321 (5): 741-65
- Nájera, H., Costas, M., Fernández-Velasco, D.A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability. *Biochem. J.* 370: 785-92
- Noble, M.E., Wierenga, R.W., Lambeir, A.M., Opperdoes, F.R., Thunnissen, A.M.W., Kalk, K.H., Groendijk, M., Hol, W.G.J. (1991) The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins Struct, Funct. Genet.*, 10: 50-69
- Noble, M.E., Celen, J.P., Wierenga, R.K. (1993) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.* D49: 403-417
- Osterman, A., Grishin, N.V., Kinch, L.N., Phillips, M.A. (1994) Formation of functional cross-species heterodimers of ornithine decarboxylase. *Biochemistry*, 33: 13662-13667

- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 244: 700-5
- Pace, CN., Shieley, BA., McNutt, M., Gajiwala, K (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* 10, 75-83
- Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Gao, XG., Maldonado, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Pouyou A (1999) Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry*, 38: 4114-4120
- Pompliano, D.L., Peyman, A., Knowles, JR (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 29: 3186-3194
- Privalov, PL y Gill, SJ (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* 39, 193-231
- Privalov, PL y Potekhin, SA (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* 134, 4
- Putman, SJ., Coulson, AFW., Farley, IRT., Riddleston, B., Knowles, JR (1972) Specificity and kinetics of triosephosphate isomerase from chicken muscle *Biochemical Journal*, 129: 301-310
- Radford, S (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 25 (12): 611-8

- Raines, RT., Sutton, EL., Straus, DR., Gilbert, W., Knowles, JR (1986) Reaction energetics of a mutant triosephosphate isomerase in which the active-site glutamate has been changed to aspartate. *Biochemistry*, 25, 22: 7142-7154
- Reardon, D y Farber, GK (1995) The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* 9: 497-503
- Reyes-Vivas, H., Hernández-Alcántara, G., López-Velazquez, G., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., de Gómez-Puyou, MT (2001) Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, 40 (10): 3134-40
- 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 a nicked monomer. *Proteins*, 48, 580-590,
- Rietveld, AWH y Ferreira, ST (1996) Deterministic pressure dissociation and unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry*, 35: 7743-7751
- Rietveld, AWH y Ferreira, ST (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, 37: 933-937
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, DA (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 322: 669-675



- Rose, IA y O'Connell, EL (1961) Intramolecular hydrogen transfer in the phosphoglucose isomerase reaction. *J. Mol. Biol.*, 236: 3086-3092
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., Jaenicke, R (1997) In *“Protein Structure: A Practical Approach”*, 2<sup>nd</sup> Ed (TE Creighton, ed) IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 57-99
- Saab-Rincon, G., Juárez, VR., Sánchez, F., Soberon X (2001) Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Eng*, 14 (3) : 149-55
- Sadana, A y Vo-Dinh, T (2001) Biomedical implications of protein folding and misfolding *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33: 7-16
- Sanders, CG y Nagy, J (2000) Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 438-442
- Sanger, F (1952) The arrangement of amino acids in proteins. *Adv. Protein Chem.* 7: 1-67
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., Wierenga, RK (1996) Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein. Sci.* 5: 229-239
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., Wierenga, RK (1997) A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*, 36: 9655-9662
- Schnackerz, KD y Gracy, RW (1991) Probing the catalytic sites of triosephosphate isomerase by <sup>31</sup>P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *European Journal of Biochemistry*, 199: 231-238
- Segel, IH (1993) *Enzyme Kinetics*. Wiley-Interscience Publication, Davis, CA

- Shao, X., Hensley, P., Matthews, CR (1997) Construction and characterization of monomeric tryptophan repressor: a model for an early intermediate in the folding of a dimeric protein. *Biochemistry*,36: 9941-9949
- Sun, AQ., Yüksel, KU., Gracy, RW (1992) Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *J. Biol. Chem*, 28: 20168-20174
- Sun, J y Sampson, S (1998) Determination of the amino acid requirements for a protein hinge in triosephosphate isomerase. *Protein Science*, 7: 1495-1505
- Symersky, J., Li, S., Carson, M., Luo, M (2003) Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: structure of dihydropteridine reductase. *Proteins*, 15: 484-486
- Tanford (1970) Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advances in protein chemistry*, 24: 1-95
- Téllez-Valencia, A., Ávila-Ríos, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., López-Calahorra, F., Gómez-Puyou, A (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *BBRC*, 295: 958-963
- Téllez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A (2004) Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J.Mol.Biol.* 27; 341 (5): 1355-1365
- Thornton, JM (1992) *Protein Folding*. Editor Creighton, TEWH Freeman and Company. EUA 1-58.

- Valdar, WSJ y Thornton, JM (2001) Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins: Struct. Funct. & Genet.* 42: 108-124
- Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, RA., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., Fernández-Velasco, DA (2000) *Prot. Peptide Letters*, 7: 57-64
- Velanker, SS., Ray, SS., Gokhale, RS., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, MRN (1997) Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure*, 5: 751-761
- Vendruscolo, M., Zurdo, J., MacPhee, CE., Dobson, CM (2003) Protein folding and misfolding: a paradigm of self-assembly and regulation in complex biological systems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 361: 1205-1222
- Walden, H., Bell, GB., Rusell, RJM., Siebers, B., Hensel, R., Taylor, GL (2001) Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 306: 745-757
- Walden, H., Taylor, G., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubble, K., Tjaden, B., Hensel, R (2004) Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* 342: 861-875
- Waley SG (1973) Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* 135: 165-172
- Wierenga, RK., Noble, MEM., Vriend, G., Nauche, S., Hol, WGJ (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. *J. Mol. Biol.* 220: 995-1015
- Wierenga, RK y Noble, MEM (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 224: 1115-1126
  - Williams, JC y McDermott, AE (1995) Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry*, 34: 8309-8319
  - Williams, JC., Zeelen, JP., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, PA., Lambeir, AM., Wierenga, RK (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* 12:243-250
  - Witkowski, A., Joshi, A., Smith, S (1996) Fatty acid synthase: in vitro complementation of inactive mutants. *Biochemistry*, 35: 10569-10575
  - Zabori, S., Rudolph, R., Jaenicke, R (1980) Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch*, 35: 999-1004
  - Zetmeiss, G., Rudolph, R., Jaenicke, R (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry*, 18: 5567-5571
  - Zhang, Z., Sugio, S., Komives, EA., Liu, KD., Knowles, JR., Petsko, GA., Ringe, D (1994) Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution. *Biochemistry*, 33: 2830-2837

- 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
- Zwauzig, R., Szaba, A., Bagchi, B (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 20