



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Medicina

“Participación de las cisteínas en la estabilidad y  
estructura de la triosafosfato isomerasa de  
*Trypanosoma brucei*”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
BÁSICA

PRESENTA:

VALERIA GUZMÁN LUNA

Facultad de Medicina

---



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GEORGINA GARZA RAMOS MARTINEZ

MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Valeria Guzmán Luna

FECHA: 28 de marzo 2006

FIRMA: Valeria Guzmán L.

<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	I
<b>ABREVIATURAS</b>	III
<b>RESUMEN</b>	IV
<b>1.- ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
1.1.- El plegamiento de las proteínas	1
1.2.- Interacciones que estabilizan la estructura de las proteínas	1
1.3.- El experimento de Anfinsen y la paradoja de Levinthal	2
1.4.- Desnaturalizantes químicos y constante de equilibrio	3
1.5.- Modelos de plegamiento proteico y $\Delta G$ de estabilidad	3
1.6.- Estudios de estabilidad en mutantes	5
1.7.- Generalidades de la TIM	6
1.8.- Residuos de cisteína en la TbTIM	9
1.9.- Estudios de estabilidad en la TIM	9
<b>2.- HIPÓTESIS</b>	<b>11</b>
<b>3.- OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>12</b>
4.1.- Expresión y purificación	12
4.2.- Actividad catalítica	13
4.3.- Experimentos de desnaturalización química y replegamiento	13
4.4.- Efecto del PGA en la renaturalización	13
4.5.- Determinando el equilibrio termodinámico	14
4.5.1.- Renaturalización (D→N)	14
4.5.2.- Desnaturalización (N→D)	14
4.6.- Experimentos al equilibrio termodinámico	15
4.6.1.- Renaturalización (D→N)	15
4.6.2.- Desnaturalización (N→D)	15

4.7.-	Mediciones espectroscópicas	16
4.7.1.-	Espectroscopía de fluorescencia	16
4.7.2.-	Espectroscopía de dicroísmo circular	17
4.8.-	Análisis de secuencias	19
<b>5.-</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
5.1.-	Purificación de las proteínas recombinantes	20
5.2.-	Propiedades estructurales de las enzimas mutantes	20
5.3.-	Propiedades catalíticas	21
5.4.-	Efecto del PGA en la termoestabilidad y renaturalización	22
5.5.-	Alcanzando el equilibrio termodinámico en la renaturalización	25
5.6.-	Alcanzando el equilibrio termodinámico en la desnaturalización	26
5.7.-	Experimentos al equilibrio termodinámico	27
5.7.1.-	Renaturalización (D→N)	27
5.7.2.-	Desnaturalización (N→D)	29
5.8.-	Datos de renaturalización normalizados	30
5.9.-	Reversibilidad	31
5.10.-	Ajuste de datos	33
5.11.-	Cálculos de estabilidad	34
5.12.-	Determinación de las constantes de velocidad	38
5.13.-	$\Delta\Delta G^\circ$	40
5.14.-	Análisis de secuencias	41
<b>6.-</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>7.-</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>44</b>

## ABREVIATURAS

aa	aminoácido (s)
$\alpha$ -GPDH	$\alpha$ -Glicerol Fosfato Deshidrogenasa
C14+	mutante C126A/C39A, sólo conserva la cisteína 14
C126+	mutante C14A/C39A, sólo conserva la cisteína 126
CEM	Centro Espectral de Masas
Cys, C	Residuo del aminoácido cisteína
BsTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
DC	Dicroísmo circular
DHAP	Dihidroxiacetona Fosfato
EDC	Espectroscopia de dicroísmo circular
EF	Espectroscopia de Fluorescencia
EDTA	Ácido1-(4-Aminobenzil)etilendiamino -N,N,N',N'-tetraacético
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GAP	D-gliceraldehído-3-fosfato
Glu, E	Ácido Glutámico
Gly, G	Residuo del aminoácido glicina
HCl-Gdn	Hidrocioruro de guanidinio
His, H	Residuo del aminoácido histidina
IPTG	Isopropiltiogalactósido
LmTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>
Lys, K	Residuo del aminoácido lisina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
PfTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Plasmodium falciparum</i>
PGA	2- fosfoglicolato
Phe, F	Residuo del aminoácido fenilalanina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rTIM	Triosafosfato Isomerasa de conejo
Ser, S	Residuo del aminoácido serina
TIM	Triosafosfato Isomerasa
TbTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TmTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Thermotoga maritima</i>
yTIM	Triosafosfato Isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TED	Amortiguador de Trietanolamina, EDTA y ditiotreitól
Val, V	Residuo del aminoácido valina
Trp, W	Residuo del aminoácido triptofano
Tyr, Y	Residuo del aminoácido tirosina

## RESUMEN

El problema del plegamiento de las proteínas consiste en indagar los mecanismos por los cuáles un polipéptido que presenta una estructura extendida y desordenada alcanza la conformación nativa. Una forma de abordar este problema es la caracterización de los cambios estructurales que ocurren durante el plegamiento y las interacciones que gobiernan estos cambios.

En general las proteínas oligoméricas desarrollan procesos de desnaturalización y/o plegamiento donde la agregación conduce a transiciones irreversibles. La trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) es una enzima homodimérica de 250 aminoácidos por monómero, por lo que el estudio de su plegamiento es una aproximación para abordar el problema del plegamiento de proteínas más complejas.

En este trabajo se obtuvieron los parámetros asociados a la estabilidad de la TbTIM y dos dobles mutantes de cisteína, se determinó la participación en el plegamiento de residuos de Cys conservados en la estructura de la TIM, así como del 2-fosfoglicolato, una molécula análoga del estado de transición. En un análisis de todas las secuencias de TIMs reportadas en el GenBank, encontramos una correlación negativa entre carga e hidrofobicidad promedio que se relacionan con la reversibilidad de las transiciones en TIMs desnaturalizadas por HCl-Gdn.

## **1.- ANTECEDENTES**

### **1.1.- El plegamiento de las proteínas**

Las proteínas son polímeros de aminoácidos esenciales en la bioquímica celular, la gran mayoría de ellas son funcionales sólo si han adoptado una conformación nativa (estructura estable específica). El plegamiento de las proteínas es el proceso por el que cual una cadena polipeptídica sin estructura específica altera su conformación para alcanzar su estado nativo. El problema del plegamiento de las proteínas consiste en determinar cómo y porqué mecanismos se alcanza la conformación nativa, en otras palabras se busca caracterizar los cambios estructurales que ocurren durante el plegamiento y las interacciones que gobiernan estos cambios. Una vía de plegamiento es la secuencia de cambios estructurales que ocurren durante el plegamiento de una proteína. Ya que las proteínas conforman una clase heterogénea de moléculas, las vías de plegamiento difieren drásticamente entre ellas. Sin embargo, todas las estructuras proteicas están gobernadas por las mismas interacciones físicas y sus estructuras nativas tienen varias características en común, como la presencia de estructuras secundarias y de uno o más núcleos hidrofóbicos. La caracterización de una vía de plegamiento, así como de los parámetros termodinámicos y cinéticos involucrados, provee información valiosa para abordar el problema del plegamiento de las proteínas.

### **1.2.- Interacciones que estabilizan la estructura de las proteínas**

Las proteínas tienen una estructura nativa marginalmente estable, resultado de un balance entre las distintas fuerzas no covalentes: interacciones iónicas y dipolares, enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas. Las interacciones iónicas son relativamente débiles en soluciones acuosas debido al efecto solvatante del agua. Las distintas interacciones entre dipolos permanentes e inducidos, llamadas normalmente fuerzas de van der Waals, son aún más débiles y sólo son efectivas en rangos muy cortos. Sin embargo, debido a su gran cantidad, su fuerza se acumula y determinan la energética y conformación de las proteínas. Los enlaces de hidrógeno son las interacciones más direccionales entre las fuerzas no covalentes, individualmente aportan poca estabilidad a la estructura y son sólo marginalmente más fuertes que los que una proteína desplegada puede formar con el agua. Éstos participan en la formación de la estructura nativa de las proteínas. El efecto hidrofóbico surge del ordenamiento desfavorable de las moléculas de agua que resulta de la hidratación de grupos no polares, al plegarse dichos grupos la proteína minimiza éstas interacciones desfavorables (1).

La conformación nativa de las proteínas es marginalmente estable en condiciones particulares. Un cambio en la temperatura, pH, la adición de urea, cloruro de guanidinio u otro agente caotrópico, desnatura la proteína. La desnaturalización de algunas proteínas es reversible (en particular proteínas globulares pequeñas y monoméricas), éstas proteínas se repliegan a su conformación nativa en condiciones apropiadas. Los cambios en energía libre, entalpía y entropía de la reacción de plegamiento/desplegamiento son determinados en las proteínas cuyo proceso de desnaturalización es reversible.



### 1.3.- El experimento de Anfinsen y la paradoja de Levinthal

En 1957 Christian Anfinsen realizó experimentos de desnaturalización en la RNasa A pancreática bovina, una proteína monomérica globular de 124 aminoácidos. Anfinsen la desnaturalizó por completo y redujo los cuatro puentes disulfuro de la RNasa A al exponerla a una solución 8M de urea y 2-mercaptoetanol, después mediante diálisis retiró la urea y expuso esta solución a O<sub>2</sub>, con lo cual obtuvo una enzima 100% activa y físicamente indistinguible de la RNasa A nativa. Este experimento demostró que la estructura primaria de las proteínas determina la estructura terciaria.

La explicación más simple respecto al mecanismo de plegamiento, sería que una proteína explorara todas sus conformaciones posibles hasta encontrar aleatoriamente su estado nativo. Sin embargo, mediante un experimento teórico Cyrus Levinthal demostró que el plegamiento no es un proceso aleatorio: asumió que los dos ángulos de torsión  $\phi$  y  $\psi$  de una proteína formada por  $n$ -residuos de aminoácidos, podían adoptar tres conformaciones estables, esto resulta en  $3^{2n} \approx 10^n$  posibles conformaciones para la proteína. Si una proteína puede explorar nuevas conformaciones a la velocidad a la cual los enlaces sencillos pueden reorientarse, ésta podría visitar  $10^{13}$  conformaciones por segundo. Finalmente, calculó el tiempo en segundos para que una proteína explore todas sus posibles conformaciones:

$$t = 10^n / 10^{13} \text{s}^{-1}$$

Para una proteína pequeña, de  $n=100$  residuos, el tiempo obtenido es  $t = 10^{87}$  s, un tiempo inmensamente mayor a la edad del universo. Obviamente, aún la proteína más pequeña no podría alcanzar su conformación nativa por un proceso de búsqueda aleatoria, esta inferencia es conocida como la Paradoja de Levinthal. Por lo tanto, Levinthal propuso que las proteínas debían plegarse siguiendo una (s) trayectoria (s) ordenada en la que la aproximación al estado nativo es acompañado de un incremento en la estabilidad conformacional. (1)

Sin embargo, existen proteínas que no se repliegan después de ser desnaturalizadas, en ocasiones debido a que son sujetas a procesamiento celular posterior a la biosíntesis ( Ej. La subtilisina tiene una secuencia requerida para dirigir el plegamiento, al término ésta secuencia es removida por autólisis). En otros casos, proteínas grandes o multiméricas requieren ayuda para plegarse y son asistidas por chaperonas moleculares.

El objetivo primordial al estudiar el plegamiento y desnaturalización de las proteínas es conocer en detalle los principios que gobiernan la formación de la estructura nativa, así como los mecanismos por el cual ocurre el plegamiento, esto resulta de interés particular, ya que lo anterior constituye una interrogante científica importante cuya resolución aportaría avances significativos en la ingeniería de proteínas y la predicción de estructuras tridimensionales a partir de secuencias de aminoácidos. Para ello, es importante detectar y caracterizar los intermediarios en las reacciones de plegamiento que pueden presentarse bajo ciertas condiciones de desnaturalización y que difieren en algunas de sus características de los estados nativo y desplegado.

#### 1.4.- Desnaturalizantes químicos y constante de equilibrio

A pesar del uso común de los desnaturalizantes químicos, su mecanismo de acción aún no es del todo claro. Los primeros trabajos se enfocaron en el potencial de estas sustancias para interferir con la red de enlaces de hidrógeno que estabiliza la proteína al formar enlaces de hidrógeno con el esqueleto peptídico y con las cadenas de aminoácidos. Trabajos recientes indican que ni la urea ni el ión guanidinio son más potentes que el agua para formar puentes de hidrógeno. Un factor más importante parece ser la capacidad de éstos desnaturalizantes para incrementar la solubilidad de las cadenas principales y laterales incluyendo las de naturaleza hidrofóbica, reduciendo la magnitud del efecto hidrofóbico (2).

Los iones guanidinio y la urea pueden disminuir las interacciones desfavorables de las cadenas laterales hidrofóbicas con el agua hasta por un tercio, por tanto una solución acuosa de éstos desnaturalizantes es un mejor solvente para una cadena polipeptídica que el agua pura. La tendencia a adoptar una estructura empacada por los residuos que forman el núcleo de la proteína es mucho menos pronunciada.

Las constantes de equilibrio describen el efecto de la concentración de desnaturalizante en las proporciones de los estados nativo, desnaturalizado e intermedios estables y pueden obtenerse a partir de dos tipos de experimentos; de desnaturalización cuando el estado inicial es la proteína nativa y se incuba a distintas concentraciones de desnaturalizante (N→D) y de replegamiento, en los que la proteína totalmente desnaturalizada es el estado inicial y luego se repliega a distintas concentraciones de desnaturalizante (D→N). Si la desnaturalización y el replegamiento son reversibles y el tiempo de incubación es suficiente para alcanzar el equilibrio, ambos experimentos deben dar los mismos resultados.

#### 1.5.- Modelos de plegamiento proteico y $\Delta G^\circ$ de estabilidad

Las transiciones de plegamiento y desnaturalización de varias proteínas pequeñas globulares son altamente cooperativas, éstas siguen un mecanismo de dos estados que involucra sólo a los estados nativo y desplegado. La constante de equilibrio que relaciona estos dos estados termodinámicos, es representada por la ecuación [1], donde [D] y [N] son las concentraciones al equilibrio de la proteína desnaturalizada y nativa, respectivamente (figura 1).

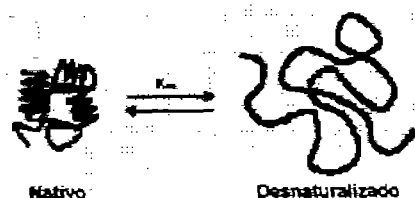


Figura 1. Representación esquemática de una transición de desnaturalización reversible de dos estados. El estado nativo corresponde a una estructura plegada, el estado desnaturalizado representa una estructura desplegada y desordenada. La constante de equilibrio  $K_{eq} = [D]/[N]$  depende de la concentración de desnaturalizante en el solvente. En ausencia de desnaturalizante  $K_{eq} \ll 1$ .

$$K_{eq} = \frac{[D]}{[N]} \quad \text{Ec. [1]}$$

La estabilidad del estado nativo es determinada por la diferencia en energía libre entre los estados desnaturalizados y nativos,  $\Delta G^\circ = G^\circ_D - G^\circ_N$ . Para que el estado nativo sea estable,  $\Delta G^\circ$  tiene que ser positivo. La relación entre la energía libre de desnaturalización y la constante de equilibrio se expresa en la ecuación [2].

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad \text{Ec. [2]}$$

En la ecuación [2], R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. En ausencia de desnaturalizantes, la desnaturalización es endérgica ( $\Delta G^\circ > 0$ ,  $K_{eq} \ll 1$ ).

Se ha encontrado empíricamente que la energía libre de desnaturalización depende linealmente de la concentración de desnaturalizante, ecuación [3].

$$\Delta G^\circ = \Delta G^\circ_{agua} - m[D] \quad \text{Ec. [3]}$$

Donde  $\Delta G^\circ_{agua}$  es la energía libre de desnaturalización en ausencia de desnaturalizante y [D] es la concentración de desnaturalizante. El valor de m en la ecuación refleja la dependencia de  $\Delta G^\circ$  en la concentración de desnaturalizante, m es proporcional al cambio en área accesible al solvente de la proteína debido a la desnaturalización, es también un indicador del grado de cooperatividad del proceso (3).

En el caso de proteínas oligoméricas, se ha estudiado principalmente la desnaturalización, ya que comúnmente se observa un bajo rendimiento en el repliegamiento debido a la formación de interacciones irreversibles no productivas entre los intermediarios de plegamiento (4). Otro problema frecuente es la lentitud de las cinéticas de plegamiento y desnaturalización, complicando así la identificación de estados al equilibrio.

Algunas proteínas oligoméricas presentan procesos de desplegamiento/disociación que se ajustan a un modelo de dos estados, sin la

detección de intermediarios (5), pero en la mayoría de los casos se han reportado intermediarios estables. En general las proteínas oligoméricas desarrollan procesos de desnaturalización complejos, en los que la precipitación y/o agregación generan irreversibilidad parcial o completa. Cuando tres o más estados son observados, es posible estimar la contribución del plegamiento de los monómeros y su asociación, a la estabilidad total de la proteína a través del cálculo de los parámetros termodinámicos asociados al proceso, siempre y cuando sea reversible y el sistema alcance el equilibrio. El estudio del plegamiento de proteínas homodiméricas resulta interesante como una aproximación para abordar el plegamiento de proteínas más complejas.

Es generalmente aceptado que la información que determina al estado nativo se encuentra en la secuencia de aminoácidos, por esto se ha planteado que la capacidad de las proteínas para adoptar intermediarios estables en la vía de plegamiento y desnaturalización también debería ser una propiedad intrínseca de la estructura primaria. En los últimos años algunos grupos de investigación (dirigidos por Uversky y Dunker, principalmente) se han dado a la tarea de buscar características en la estructura primaria que pudieran correlacionarse con la presencia de intermediarios parcialmente plegados (6). En particular el análisis de secuencias de aminoácidos realizado por Uversky fue tomado como modelo en la búsqueda de correlaciones en las distintas TIMs reportadas en el GenBank que llevamos a cabo en esta tesis.

En los trabajos teóricos reportados por Uversky se utilizan las secuencias de aminoácidos de proteínas que han sido estudiadas al equilibrio en experimentos de desnaturalización, éstas presentan cualquier cantidad de intermediarios estables (6). Entre las secuencias se exploran las posibles correlaciones entre número de aminoácidos, masa molecular, carga promedio de la proteína, hidrofobicidad promedio y la presencia o no de intermediarios. Entre estas características, sobresalen las correlaciones entre la hidrofobicidad y carga promedio con la presencia de intermediarios al equilibrio. Al parecer las proteínas que exhiben un modelo de plegamiento de dos estados son en promedio menos hidrofóbicas y tienen mayor carga neta que las que presentan estados intermediarios. Dicha correlación ha sido explicada en términos de menor participación del efecto hidrofóbico en la estabilidad de la enzima y las posibles repulsiones electrostáticas que impedirían la formación de otros estados al equilibrio, por tanto cambios pequeños en el ambiente vencerían las interacciones que estabilizan al estado nativo y conducirían al desplegamiento total de la proteína, en otras palabras se favorece la cooperatividad del proceso de desnaturalización.

#### **1.6.- Estudios de estabilidad en mutantes**

La estabilidad de las proteínas también ha sido estudiada midiendo el efecto de alterar la estructura primaria por mutaciones o por agentes químicos. Al realizar mutaciones específicas se puede investigar la contribución de un (s) aminoácido (s) en la función o estabilidad, por ejemplo para determinar si un aminoácido particular es crítico en el plegamiento la aproximación más directa es construir mutantes de este aminoácido y medir las energías libres de plegamiento de la enzima silvestre y todas las mutantes. La diferencia en el

cambio en energía libre de plegamiento entre las enzimas mutante y silvestre, es una medida de la perturbación energética introducida por una mutación, este parámetro es conocido como  $\Delta\Delta G^\circ$  (7) y es definido a continuación en [4]:

$$\Delta\Delta G^\circ = (\Delta G^\circ_{\text{pleg}})_{\text{mut}} - (\Delta G^\circ_{\text{pleg}})_{\text{sil}} \quad \text{Ec. [4]}$$

una mutación que no afecte la energética del plegamiento, tendrá valores de  $\Delta\Delta G^\circ$  cercanos a cero.

Proteínas como la lisozima del fago T4 (8), la nucleasa de staphylococcus (9) y el citocromo c (10), han sido caracterizadas energéticamente por mutagénesis aleatoria. Se ha encontrado que la mayoría de las mutaciones (o conjunto de éstas) tienen un efecto desestabilizante. Muy pocas mutantes son significativamente más estables que la enzima silvestre y aquellas que lo son exhiben cinéticas de plegamiento muy lentas o carecen de función biológica.

El efecto en la estabilidad por una mutación particular depende de la participación en el estado nativo del residuo mutado, la contribución del residuo introducido y las alteraciones conformacionales causadas por el reemplazo. En general se ha observado que el empaqueo de los átomos cambia alrededor de los residuos introducidos, pero la magnitud del cambio depende del tipo de mutación y de su ubicación en la estructura plegada. Normalmente los reemplazos en la superficie afectan muy poco o nada a la estabilidad, los residuos con carga que aquí se localizan, pueden ser intercambiados por residuos no polares y viceversa generando pequeños cambios en la estabilidad, a excepción de los residuos con carga que participan en la formación de puentes salinos (3). Por otra parte, el interior de la proteína es más sensible a las mutaciones, la estabilidad neta de las proteínas disminuye al sustituir las cadenas laterales hidrofóbicas ubicadas en el núcleo, por una de mayor tamaño que no ajusta con el entorno, una menor que genera cavidades o por aminoácidos polares o con carga que están en ambientes hidrofóbicos. Los mayores efectos energéticos ocasionados por mutaciones normalmente ocurren en los sitios más empacados, es decir en la parte menos flexible de la proteína (3).

Con frecuencia los efectos energéticos de dos alteraciones simultáneas son aditivos, las excepciones son ocasionadas principalmente porque los reemplazos ocurren en regiones adyacentes de la conformación plegada, en estos casos el residuo que está presente en un sitio, interfiere con el reemplazo del sitio contiguo.

### 1.7.- Generalidades de la TIM

La triosafosfato isomerasa es una enzima altamente eficiente, presente en todas las células. Cataliza una reacción central en la glucólisis, la interconversión de los azúcares de tres carbonos dihidroxiacetona fosfato y el D-gliceraldehído-3-fosfato. La presencia de la TIM asegura el catabolismo eficiente de los seis carbonos de la glucosa ya que sólo el GAP puede continuar el siguiente paso de la glucólisis. La TIM ha alcanzado la perfección

catalítica, que consiste en una velocidad de reacción que sólo está limitada por la difusión del sustrato dentro y fuera de la enzima. La actividad catalítica de la TIM exhibe una cinética Michaeliana, aunque sus propiedades funcionales dependen de contactos originados por la dimerización, no es regulada alostéricamente y los residuos involucrados en la unión de sustrato y catálisis se encuentran en el monómero (1).

La estructura tridimensional de la TIM de varias especies ha sido resuelta por cristalografía de rayos X. Para la TIM de *Leishmania* se ha logrado una resolución de 0.83 Å (11). En este cristal la TIM está en un complejo con el 2-fosfoglicolato, un análogo del estado de transición del sustrato (figura 2). Hasta ahora todas las TIMs silvestres son oligoméricas, cada subunidad en la TbTIM pesa 26.9 kD y es conformada por 250 aa que se pliegan para formar el prototipo de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, (hélice alfa, asa, hebra beta, asa), uno de los plegamientos más comunes en la naturaleza. Las unidades alfa/beta se pliegan de manera regular, de modo que las hebras beta (numeradas de beta1-beta8) forman un barril beta. Las hélices alfa (alfa1-alfa8) rodean el exterior del barril beta. Los residuos catalíticos se ubican en hebras beta y en las asas que conectan la hebra beta a la hélice alfa subsecuente.

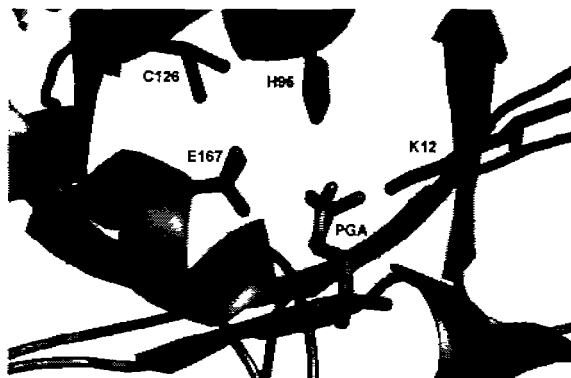


Figura 2. Residuos del sitio activo y Cys 126 del cristal de la LmTIM/PGA a una resolución de 0.83 Å. Las coordenadas fueron tomadas del Protein Data Bank 1N55, referencia (11).

El sitio donde las dos subunidades contactan es llamado interfase dimérica y está formada principalmente por las asas 1, 2, 3 y 4. El asa 3 se extiende dentro de una cavidad formada por las asas 1 y 4 de la subunidad vecina, esta asa es llamado interdigitante y consiste de nueve residuos. Entre los contactos que estabilizan más a la interfase, se encuentran los enlaces de hidrógeno formados por el asa interdigitante. Otra asa importante en la TIM es la asa 6, que está involucrado en el funcionamiento catalítico, más que en la estabilización estructural (residuos 166-176). Se propone que la función de esta asa en el mecanismo catalítico es proteger al sitio activo del solvente y prevenir la eliminación del fosfato del intermediario (12), ya que la conformación cerrada estabiliza al estado de transición. Mediciones realizadas por RMN, han revelado que el movimiento del asa es independiente de la unión de glicerol-3-fosfato (un análogo del sustrato) o 2-fosfoglicolato (un análogo del estado de

transición); sin embargo, la unión de ligando desplaza el equilibrio hacia la conformación cerrada. El movimiento entre las conformaciones cerrada y abierta es suficientemente rápido ( $\sim 100\mu\text{s}$ ) para permitir la reacción catalítica (un número de recambio en el orden de magnitud de  $10^5\text{-}10^7\text{ s}^{-1}$ ) (13).

Estudios con la TIM de levadura han propuesto que el mecanismo de isomerización es una transferencia de un protón catalizada por una base con asistencia electrofílica (14). Los residuos catalíticos de la TIM incluyen al glutamato 167 como base catalítica y a la histidina 95 que transfiere protones intramolecularmente durante la interconversión de los dos azúcares, la carga positiva de la lisina 12 favorece la unión del sustrato, finalmente, la serina 96 participa al asistir el posicionamiento adecuado de la base catalítica (E167). El glutamato 167 cataliza la transferencia intramolecular del protón entre el carbono 1 (C1) y carbono 2 (C2) del sustrato, y la histidina 95 cataliza la transferencia del protón entre el oxígeno del C1 y el oxígeno del C2. El glutamato inicia la reacción al deprotonar el sustrato debido a que tiene una carga negativa a pH fisiológico (figura 3).

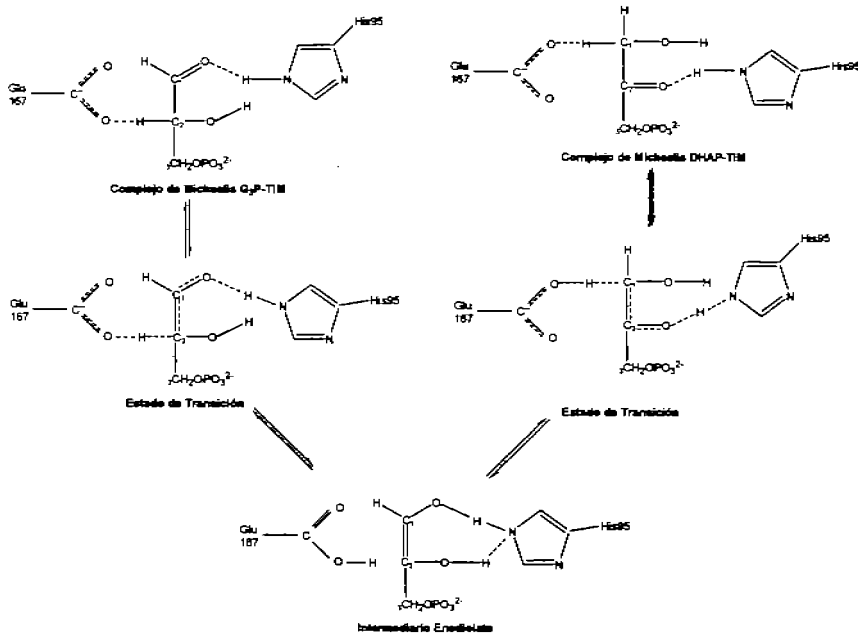


Figura 3. Mecanismo enzimático propuesto para la reacción catalizada por la TIM

### 1.8.- Residuos de cisteína en la TbTIM

La TIM de *Trypanosoma brucei* tiene tres cisteínas en las posiciones 14, 39 y 126 (figura 4). La C14 se localiza en el asa 1 y es uno de los tres residuos que se encuentran expuestos en el monómero y completamente enterrados en la interfase. En la estructura cristalográfica se observa que la cadena lateral de la Cys14 está rodeada por los residuos del asa 3 de la otra subunidad, formando un puente de hidrógeno con la Gly72 y a una distancia aproximada de 0.38nm de la Ser71, Glu77, Val78 y Ser79 (15). Por otra parte, la Cys126 es un residuo altamente conservado, en una búsqueda exhaustiva de todas las secuencias reportadas de TIMs en el GenBank (284 secuencias) encontramos que solamente una de ellas (*Oenococcus oeni*) no conserva este aminoácido. La Cys126 se ubica casi al final de la hebra beta 5, su átomo de S $\gamma$  forma parte del interior del barril beta y se encuentra a la distancia de un contacto de van der Waals de un oxígeno del Glu catalítico (11). La Cys39 es un residuo no conservado que forma parte de una de las hebras beta.

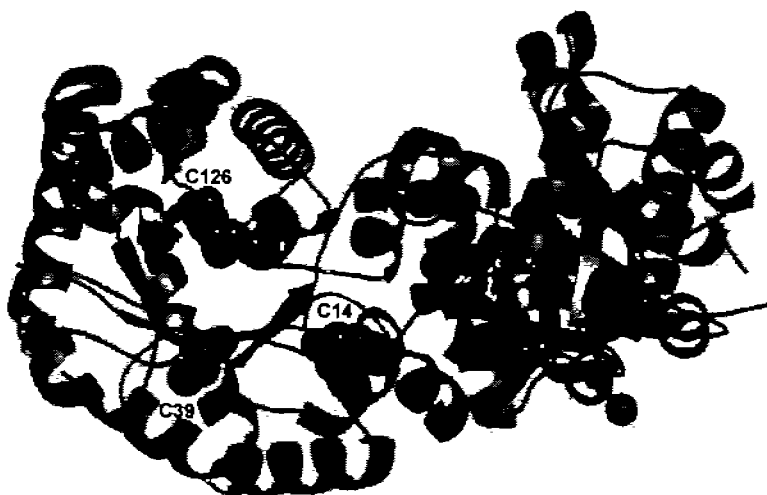


Figura 4. TIM de *Trypanosoma brucei*. Los residuos de cisteínas se resaltan como esferas y se numeran sólo en uno de los monómeros. Las coordenadas fueron tomadas del Protein Data Bank 1KV5 a 1.65 Å de resolución.

### 1.9.- Estudios de estabilidad en la TIM

Hasta ahora, la mayoría de los estudios de estabilidad de la TIM, han sido realizados en la dirección N→D (16, 17 y 18), sin embargo, recientemente se efectuó la caracterización energética en el sentido D→N para la TIM de *Saccharomyces cerevisiae*, en donde el mecanismo comprende un proceso de tres estados que incluye a un monómero inactivo expandido (19).

Aunque las estructuras tridimensionales de las TIMs de distintas especies forman un barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, sus vías de plegamiento al equilibrio son distintas. Las



TIMs de conejo (20 y 21), *Bacillus stearothermophilus* y *Leishmania mexicana* (22 y 23) se ajustan a un modelo de dos estados, mientras que en las vías de plegamiento de *Saccharomyces cerevisiae* (19 y 24) y *Thermotoga maritima* (25) se detecta un intermediario monomérico y agregados en esta última. El modelo de plegamiento que incluye más intermediarios en la TIM es el reportado para *Trypanosoma cruzi* (26), que incluye cuatro estados (nativo, dímero no nativo, monómero expandido y monómero desnaturalizado) y cuya desnaturalización por HCl-Gdn es reversible. Las TIMs de *Plasmodium falciparum* (27) y *Trypanosoma brucei* (18) también se ajustan a este modelo, sin embargo su desnaturalización es irreversible y presentan agregados. La tabla 1 resume las características del plegamiento en las distintas TIMs desnaturalizadas en HCl-Gdn hasta el momento (26).

Enzima	Cond. Eq. <sup>a</sup>	Rev. <sup>b</sup>	$\Delta\lambda$ <sup>c</sup>	Vía de desnaturalización	$\Delta G^{\circ d}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Ref.
BsTIM	24/25/8	Si	27	N <sub>2</sub> → 2D	101.3	17
TmTIM	48/variable/8	No	16	N <sub>2</sub> → A → 2D	—	25
rTIM	72/25/7.4 24/0/6.8	Si	19	N <sub>2</sub> ↔ 2D	70 [60/5] 140.6	20 21
PTTIM	1/nr/8	No	25	N <sub>2</sub> → N <sub>2</sub> * → A → 2D	—	27
γTIM	24/25/7.4 24/25/7.2	Si	30 20	N <sub>2</sub> ↔ 2M ↔ 2D	103.5 [70.3/16.6]	19 24
LmTIM	12/20/7.5	Si	25	N <sub>2</sub> ↔ 2D	82.4	23
TbTIM	48/25/7.4	No	20	N <sub>2</sub> → N <sub>2</sub> * ↔ 2M ↔ 2D ↓ ↓ A A	—	18
TcTIM	48/25/7.4	Si	21.4 21.2 35 31.5	N <sub>2</sub> → N <sub>2</sub> * ↔ 2M ↔ 2D	105.7	26

Tabla 1. <sup>a</sup>Condiciones de Equilibrio: tiempo(h)/temperatura (°C)/pH. <sup>b</sup>Reversibilidad de la desnaturalización. <sup>c</sup> $\Delta\lambda$  es el cambio total en el CEM por la desnaturalización de los monómeros. <sup>d</sup>En corchetes se presentan los valores  $\Delta G^{\circ}$  disociación/ $\Delta G^{\circ}$  desplegamiento del monómero.

A pesar del alto porcentaje de identidad en estructura primaria (75%) entre las TIMs de *T. brucei* (TbTIM) y *T. cruzi* (TcTIM) y que sólo el 13% de sus estructuras presentan cambios no conservados (28), hasta el presente trabajo no había sido posible estudiar la desnaturalización reversible para la TbTIM, mientras que han sido reportados los parámetros termodinámicos asociados al replegamiento de la TcTIM

## 2.- HIPÓTESIS

1. Por ser un análogo del estado de transición, el PGA incrementará el replegamiento total en cada una de las enzimas al favorecer la formación de un núcleo estructurado en el sitio activo.
2. Es posible bajo condiciones apropiadas (temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de proteína) determinar la energética asociada al replegamiento de la Tb TIM silvestre y sus mutantes de cisteínas C126A/C39A y C14A/C39A.
3. Las TIMs de *B. stearothermophilus*, *L. mexicana* y conejo, cuyo proceso de desnaturalización por HCl-Gdn al equilibrio se ajusta a un modelo de dos estados, presentarán mayor carga promedio y menor hidrofobicidad promedio que las TIMs que presentan intermediarios al equilibrio.

## 3.- OBJETIVOS

1. Estudiar la contribución del análogo del estado de transición 2fosfoglicolato en la renaturalización de la TbTIM silvestre y dos dobles mutantes de cisteínas C126A/C39A (C14+) y C14A/C39A (C126+).
2. Cuantificar la energética del plegamiento de la TbTIM tipo silvestre, así como para dos dobles mutantes de cisteínas C14+ y C126+ a fin de estudiar la participación al plegamiento de estos residuos. La TbTIM tiene tres cisteínas en las posiciones 14, 39 y 126, de las cuales se estudió la contribución individual de las Cys 14 y Cys126.
3. Determinar si la correlación negativa entre hidrofobicidad y carga reportada por Uversky (6) existe entre las secuencias de TIMs reportadas en el Genbank. De ser así identificar alguna relación con la presencia de intermediarios estables de plegamiento para las distintas TIMs desnaturalizadas con HCl-Gdn.

## 4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.1.- Expresión y purificación

La expresión y purificación de la TtTIM silvestre y sus mutantes de cisteína se realizó mediante un procedimiento estandarizado en el laboratorio, de acuerdo al protocolo descrito por Borchet et al (31).

Células de *Escherichia coli* de la cepa BL21DE3pLysS, transformadas con los genes mutantes y el silvestre y clonados en el vector de expresión pET3a (pET System, Novagen); se crecieron a partir de placas de medio Luria-Bertani (LB)-agar-ampicilina. 50 mL de medio líquido LB complementado con  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina se inocularon con una colonia fresca del cultivo en medio sólido. Este cultivo se incubó durante toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante (250 rpm). Los 50 mL del cultivo, se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm. Con el botón resuspendido se inoculó 1 L de medio líquido LB con  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina y se dejó crecer a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante hasta que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento del cultivo,  $\text{D.O.}_{600} \approx 0.7$ . La sobreproducción de la proteína se promovió con la adición del inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. El cultivo se mantuvo con agitación constante por 12 h a  $37^\circ\text{C}$ , en los casos de la mutante C126+ y la enzima silvestre y a  $30^\circ\text{C}$  para la mutante C14+. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El botón resultante se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis y las células se rompieron por sonicación. Los pasos siguientes se realizaron a  $4^\circ\text{C}$ ; en cada uno, el grado de pureza de la proteína se determinó por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida al 16 % en condiciones desnaturalizantes empleando el método de von Jagow (22) teñidos con azul de Coomassie. Además se determinó la concentración de proteína mediante el método del ácido biconínico (BCA) para valorar el rendimiento de la purificación (35).

Las células fragmentadas se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis con 200 mM de NaCl en agitación constante de 30 a 60 min y se centrifugó a 15000 rpm por 15 min. El sobrenadante se incubó por 24 hrs con sulfato de amonio al 45 % de saturación. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min, al sobrenadante se le adicionó el sulfato de amonio necesario para alcanzar una saturación de 65 % y se dejó equilibrar durante 24 hrs. Se centrifugó nuevamente a 15000 rpm por 15 min. El precipitado se resuspendió en 5 mL de amortiguador A (TEA 100 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM y NaCl 25 mM) y se dializó contra el mismo amortiguador con dos cambios de 0.5 L. La muestra se inyectó a una columna de carboximetil (CM)-sefarosa, previamente equilibrado con amortiguador A y controlada por un equipo de FPLC (Fast Pressure Liquid Chromatography). La TIM se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 25-150 mM en amortiguador A. En cada una de las fracciones, la proteína se cuantificó por absorbancia a 280 nm y por actividad catalítica. Las fracciones con mayor actividad y pureza se juntaron y concentraron para su caracterización posterior. La concentración de las muestras de proteína se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm ( $\epsilon_{1\text{cm}}^{(0.1\%)} = 1.298$ ).

## 4.2.- Actividad Catalítica

La actividad catalítica fue medida en la dirección GAP → DHAP por medio de un ensayo acoplado a la enzima  $\alpha$ -glicerol fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GPDH), la cual cataliza la oxidación del NADH por la dihidroxiacetona fosfato. Figura 3.

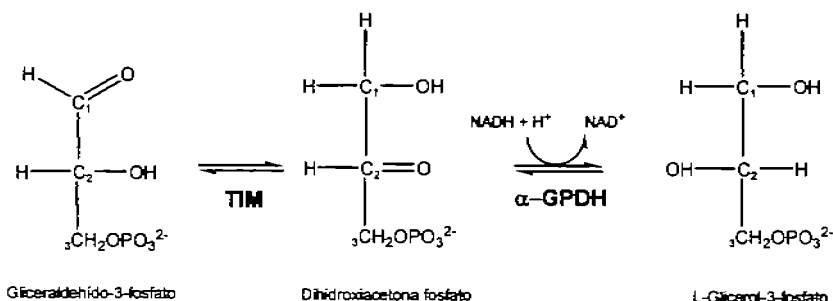


Figura 3. La actividad catalítica de la TbTIM fue medida mediante una reacción acoplada a la oxidación de NADH.

La actividad fue determinada por el decremento en absorbancia a 340 nm (oxidación de NADH) en función del tiempo en un espectrofotómetro Beckman DU7500. Los ensayos de actividad se realizaron a 25 °C, en 1 mL de solución que contenía: TEA 100 mM (pH 7.4), EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\alpha$ -GPDH y GAP 1 mM como sustrato. La reacción se inició por la adición de 6 ng de TIM. Los trazos mostrados fueron lineales con respecto al tiempo, lo que indica que no ocurrió disociación del dímero durante la medición de actividad.

## 4.3.- Experimentos de desnaturalización química y replegamiento

En todos los experimentos utilizamos un amortiguador compuesto por TEA 100 mM (pH 7.4), EDTA 10 mM y DTT 1 mM como agente reductor (amortiguador B) e incubamos a una temperatura de 23°C. Todas las mediciones de actividad catalítica se efectuaron por duplicado. Tanto los experimentos para determinar el efecto del PGA en la reactivación, como los experimentos de replegamiento fueron efectuados por triplicado, mientras que los experimentos de desnaturalización se hicieron una sola vez. Todos los experimentos fueron realizados en concentraciones de proteína en las que las enzimas son díméricas.

## 4.4.- Efecto del PGA en la renaturalización

Muestras de 1 mg/mL de las tres enzimas fueron desnaturalizadas en una solución 6M de HCl-Gdn, al cabo de 70 minutos fueron diluidas 100 veces en amortiguador B hasta una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína y 60 mM de HCl-Gdn. La velocidad de reactivación se cuantificó determinando la actividad catalítica de las muestras a diferentes tiempos. Para evaluar el efecto del inhibidor competitivo, las enzimas previamente desnaturalizadas, se

diluyeron en amortiguador B que contenía PGA a una concentración final de 0.1mM. La reactivación se cuantificó determinando la actividad de las muestras a diferentes tiempos.

En ambas condiciones, el porcentaje de actividad catalítica recuperada se obtuvo al comparar cada condición con su enzima correspondiente incubada en amortiguador B, durante el mismo tiempo y a una concentración de proteína de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **4.5.- Determinando el equilibrio termodinámico**

Cuando las transiciones de plegamiento/desplegamiento han alcanzado el equilibrio y la desnaturalización es reversible, es posible estimar los parámetros termodinámicos asociados al proceso, por ello es importante determinar las condiciones de equilibrio. El parámetro elegido para monitorear el progreso de las transiciones de desnaturalización y renaturalización hasta alcanzar el estado de equilibrio fue la actividad catalítica debido a su alta sensibilidad para caracterizar al estado nativo.

**4.5.1.- Renaturalización (D $\rightarrow$ N).** En los experimentos de renaturalización es necesario asegurarse de que se ha alcanzado el equilibrio termodinámico hacia el estado totalmente desnaturalizado y posteriormente el equilibrio de renaturalización.

Para alcanzar el estado totalmente desnaturalizado incubamos 1mg/mL de las enzimas en HCl-Gdn 6M en amortiguador B por periodos de 70 min a 48 h. Durante este lapso, tomamos alícuotas que fueron diluidas 50 veces en amortiguador B hasta concentraciones finales de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 120mM de proteína y HCl-Gdn respectivamente, para después renaturalizar por 24 horas. Cuando las diferencias entre los distintos tiempos de incubación en HCl-Gdn 6M/amortiguador B y actividad fueron mínimas, alcanzamos el estado totalmente desnaturalizado. Una vez identificado el equilibrio hacia el estado completamente desnaturalizado, incubamos las enzimas a una concentración de 1mg/mL en HCl-Gdn 6M/amortiguador B, tomamos una alícuota en el tiempo de equilibrio correspondiente de cada enzima y la diluimos en amortiguador B hasta 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína y 120mM de HCl-Gdn. Inmediatamente después, medimos la actividad catalítica en distintos momentos de la renaturalización hasta que no observamos cambios, en otras palabras esperamos hasta que el sistema llegara al equilibrio de replegamiento. El porcentaje de actividad catalítica es resultado de la comparación con el control correspondiente, incubado en amortiguador B, durante el mismo tiempo y a una concentración de proteína de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**4.5.2.-Desnaturalización (N $\rightarrow$ D).** Incubamos las tres enzimas en amortiguador B a una concentración final de proteína de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en concentraciones de HCl-Gdn desde 120mM hasta 1.5 M. A estas muestras les fue medida actividad catalítica periódicamente desde 8 h hasta 8 días, la cual comparamos con la actividad de un control, incubado en amortiguador B en los mismos tiempos. Las mediciones se realizaron hasta que la variación de actividad en función del tiempo fue mínima.

#### 4.6.- Experimentos al equilibrio termodinámico

La transición hacia el sentido de desnaturalización por HCl-Gdn ha sido caracterizada en la TbTIM (18), por esta razón un objetivo en particular de esta tesis es cuantificar la energética de la renaturalización al equilibrio. La renaturalización fue seguida por actividad catalítica y fluorescencia intrínseca, con la finalidad de confirmar que se alcanzó el equilibrio en el replegamiento. La desnaturalización al equilibrio fue monitoreada solamente por el cambio en actividad catalítica.

**4.6.1.- Renaturalización (D→N).** Incubamos 1mg/mL de las enzimas en HCl-Gdn 6M /amortiguador B por 24 horas, periodo en el que se determinó que las tres proteínas se encontraban completamente desnaturalizadas. Posteriormente, la renaturalización se inició por dilución de la proteína desplegada en el amortiguador B que contenía concentraciones decrecientes de HCl-Gdn. La concentración final de las proteínas fue de 20µg/mL.

La renaturalización al equilibrio fue monitoreada por el cambio en fluorescencia intrínseca y por actividad catalítica una vez transcurrido el tiempo de equilibrio de replegamiento.

Para la medición de actividad se requieren 6 ng de enzima, para ello se realizan dos diluciones de la TbTIM. En la primera, una alícuota es diluida 67 veces (de 20µg/mL a 300 ng/mL) en amortiguador TED 100/10/1 mM (pH 7.4) ajustado a una concentración final de Gdn-HCl igual a la de la incubación de la muestra correspondiente, para prevenir la renaturalización de la enzima debido a la dilución del desnaturalizante. En la segunda dilución la enzima se diluye 50 veces ( de 300ng/mL a 6 ng/mL) en un volumen final de 1mL de una mezcla de amortiguador TEA 100 mM (pH 7.4), EDTA 10 mM, 1mM de GAP, 0.2 mM NADH y 50 µg/mL de α-GPDH. En esta solución existe una concentración residual de HCl-Gdn que en el mayor de los casos es de 450µM y que no interfiere con el desempeño de la enzima acoplante ya que los trazos en el cambio de absorbancia fueron lineales en todas las condiciones. En la medición de fluorescencia se emplearon las muestras incubadas en distintas concentraciones de HCl-Gdn (desde 120mM hasta 6M), amortiguador B y 20 µg/mL de proteína, para la aplicación de esta técnica se utilizaron las muestras de replegamiento al equilibrio sin modificación por dilución.

Los porcentajes del cambio en intensidad de fluorescencia y actividad catalítica se calcularon con respecto al control de cada enzima incubada en amortiguador B, durante el tiempo de equilibrio correspondiente y a una concentración de proteína de 20 µg/mL.

**4.6.2.- Desnaturalización (N→D).** Muestras de las tres enzimas a 20 µg/mL de proteína en amortiguador B fueron incubadas en distintas concentraciones de HCl-Gdn, desde 120mM hasta 1.5M, durante el tiempo de equilibrio de desnaturalización previamente determinado para cada enzima. Para ajustar la concentración del desnaturalizante se utilizó HCl-Gdn 8M/amortiguador B.

La transición de la desnaturalización al equilibrio fue seguida únicamente por el cambio en actividad catalítica. La actividad catalítica fue determinada en la misma forma que en los experimentos de renaturalización al equilibrio.

#### 4.7.- Mediciones Espectroscópicas

**4.7.1.- Espectroscopía de fluorescencia (EF).** La absorción de luz por una molécula causa la excitación de un electrón, el cual se mueve de un estado basal a un estado excitado. Cada estado electrónico contiene un número de niveles vibracionales. Después que el electrón ha sido excitado, rápidamente se relaja desde el mayor nivel hasta el menor estado vibracional. La velocidad de esta relajación ocurre en el orden de picosegundos y usualmente sucede antes de que puedan hacerse mediciones en el sistema. Luego de alcanzar el menor estado vibracional, el estado excitado decae al nivel basal por distintos mecanismos. Los compuestos fluorescentes decaen al estado basal por emisión de luz. El mecanismo de fluorescencia es explicado por un diagrama de estados electrónicos (diagrama de Jablonski) mostrado en la figura 4 (29).

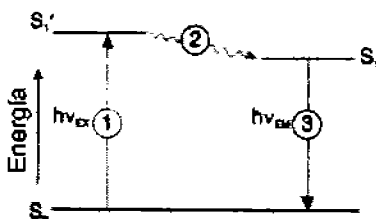


Figura 4. Diagrama de Jablonski. En (1) un fotón de energía  $h\nu_{ex}$  es generado por una fuente externa como una lámpara incandescente o un láser y absorbido por el fluoróforo, originando un estado electrónico excitado ( $S_1'$ ). En (2) el estado excitado existe por un tiempo finito (1-10ns). Durante este tiempo el fluoróforo sufre cambios conformacionales e interacción de varias formas con su ambiente molecular. Este proceso tiene dos consecuencias importantes. Primero, la energía de  $S_1'$  es parcialmente disipada dando lugar a un estado excitado relajado ( $S_1$ ) desde donde se origina la fluorescencia. Segundo, no todas las moléculas inicialmente excitadas por absorción (1) regresan al estado basal ( $S_0$ ) por emisión de fluorescencia. En (3) un fotón de energía  $h\nu_{em}$  es emitido, regresando el fluoróforo a su estado basal ( $S_0$ ). Debido a la disipación de energía en el tiempo de vida del estado excitado (2), la energía de este fotón es menor y por lo tanto de mayor longitud de onda que el fotón de excitación  $h\nu_{ex}$ .

De los grupos químicos más comunes encontrados en macromoléculas biológicas, sólo los triptofanos, tirosinas, NADH y FAD fluorescen significativamente para ser usados por EF. Todas estas moléculas consisten de anillos aromáticos planos. La EF provee información del ambiente de grupos individuales en las estructuras macromoleculares.

La fluorescencia intrínseca de la proteína es usada para seguir la exposición de los residuos aromáticos que ocurre por la desnaturalización o disociación generada por agentes químicos, temperatura, presión, etc.

La TbTIM tiene cinco triptofanos en las posiciones 11, 90, 159, 170 y 193 que se localizan en el asa 1, hebra- $\beta$  4, en una pequeña hélice  $3_{10}$  anterior a la hebra- $\beta$  6, asa catalítico y hélice- $\alpha$  6, respectivamente. El W193 se encuentra expuesto al solvente y apaga la fluorescencia del W159 (18).

Estos residuos fueron usados como sensores de cambios en la estructura terciaria promedio de la proteína ya que la presencia de más de un triptofano nos impide asignar cambios en intensidad de fluorescencia a una región particular de la TbTIM.

Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorómetro ISS PCI excitando a una longitud de onda de 280 nm y midiendo emisión en un rango de 295 a 380 nm, en ambos casos empleamos un ancho de banda de 8 nm, a cada espectro de fluorescencia le fue restado su blanco correspondiente. Para la determinación del efecto de las dobles mutaciones en la estructura terciaria, obtuvimos los espectros de fluorescencia intrínseca de las mutantes y la enzima silvestre, utilizamos una concentración de proteína de 50  $\mu\text{g/mL}$  y amortiguador B. El cambio en fluorescencia intrínseca fue seguido en la transición de repliegamiento, para ello se emplearon las muestras al equilibrio de renaturalización incubadas en distintas concentraciones de HCl-Gdn (desde 120mM hasta 6M), amortiguador B y 20  $\mu\text{g/mL}$  de proteína.

El CEM fue calculado a partir de los datos de intensidad de fluorescencia ( $I_\lambda$ ) obtenidos a diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ), por la ecuación [5].

$$\text{CEM} = \frac{\sum \lambda \cdot I_\lambda}{\sum I_\lambda} \quad [5]$$

**4.7.2.- Espectroscopía de dicroísmo circular.** La espectroscopía de dicroísmo circular (EDC) es una técnica óptica que permite la detección y cuantificación de estructuras moleculares quirales. También proporciona información relacionada con la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. El dicroísmo circular es la diferencia en absorción entre la luz circularmente polarizada hacia la derecha e izquierda. En una muestra ópticamente activa, ocurre una absorción preferencial en uno de los periodos de polarización y la intensidad de la luz transmitida varía, figura 5. La variación está directamente relacionada al dicroísmo circular de la muestra a una longitud de onda determinada. La detección sucesiva a varias longitudes de onda conduce a la generación del espectro de dicroísmo circular. Los cromóforos proteicos pueden dividirse en tres clases: el enlace peptídico, aminoácidos con cadenas laterales aromáticas y grupos prostéticos. La señal de dicroísmo debajo de 240 nm reporta la conformación del esqueleto peptídico. La intensidad de la señal en la región de 190 – 240 nm permite mediciones de DC precisas, en esta región del espectro, las hélices- $\alpha$  exhiben dos mínimos característicos a 208 y 222 nm, un máximo menos intenso centrado en 215 nm es típico de las hebras- $\beta$ . Debido a que las señales de los cromóforos individuales es aditiva, los espectros de DC en la región de 190 – 240 nm representan una combinación de los espectros de los distintos elementos de



estructura secundaria y por tanto arrojan información importante respecto al contenido total de estructura secundaria de una proteína (3).

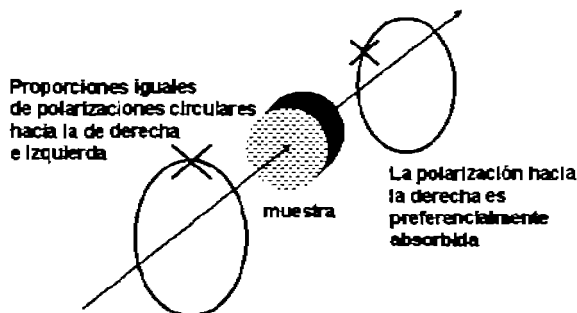


Figura 5. El dicroísmo Circular es la diferencia en absorción de la luz circularmente polarizada hacia la derecha e izquierda por una molécula asimétrica o quiral.

La EDC es una técnica particularmente útil en monitorear cambios conformacionales en las proteínas, por ejemplo en el desplegamiento térmico o inducido por un desnaturalizante.

La EDC fue usada para determinar el contenido de estructura secundaria en cada enzima en la conformación nativa. Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-715 equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura. La concentración de las soluciones de TIM fue de  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ , previamente equilibradas en amortiguador de fosfato de sodio  $25 \text{ mM}$  pH 7.4, en una celda de  $0.1 \text{ cm}$  de recorrido óptico para el UV lejano ( $190\text{-}260 \text{ nm}$ ) y un ancho de banda de  $1 \text{ nm}$ . Cada espectro fue el promedio de tres barridos consecutivos y fueron corregidos restándoles la señal del amortiguador. La elipticidad molar  $[\theta]$  por residuo se calculó utilizando una masa promedio de  $107.7 \text{ gramos por mol de aminoácido}$  ( $26.9 \text{ kDa}/250 \text{ residuos por monómero}$ ). Los espectros obtenidos se analizaron con el programa de estimación de estructura secundaria K2d (32 y 33). El programa K2d utiliza una red neuronal alimentada por miles de espectros de dicroísmo circular de distintas proteínas, la información que resulta es almacenada en una matriz. K2d se basa en esta matriz pre-calculada para dar una estimación del porcentaje de  $\alpha$ -hélices, hebras- $\beta$  y estructuras aleatorias de un espectro particular.

Las transiciones de desplegamiento térmico se obtuvieron siguiendo los cambios de elipticidad a  $222 \text{ nm}$ , mientras que la temperatura de la muestra se incrementó a una velocidad de  $1 \text{ }^\circ\text{C}/2.5 \text{ min}$ . Los experimentos se realizaron a una concentración de proteína de  $0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ , en una celda de  $0.1 \text{ cm}$  de recorrido óptico, en amortiguador MOPS  $20 \text{ mM}$  (pH 7.0),  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  DTT y  $1 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  y en su caso  $1 \text{ mM}$  de PGA.

#### 4.8.- Análisis de secuencias.

Realizamos una búsqueda de todas las secuencias de aminoácidos de las distintas TIMs reportadas en el banco de datos del GenBank, en total 284. Analizamos las secuencias en función de carga neta e hidrofobicidad promedio. La hidrofobicidad promedio fue calculada basándonos en la escala normalizada de hidropatía (desde 1 para el más hidrofóbico hasta 0 para el más polar) de Kyte y Doolittle (30). Esta escala indica la tendencia hidrofóbica o hidrofílica de las cadenas laterales de los aminoácidos y constituye una herramienta de predicción de las porciones del péptido que se encuentran dentro de la proteína y lejos del contacto del solvente acuoso, o de los segmentos expuestos al solvente.

La hidrofobicidad promedio fue el resultado de la suma del índice hidropático de cada aminoácido dividido entre el total de aminoácidos que conforman a una TIM particular, de esta manera normalizamos entre las TIMs de distintos tamaños. Por otro lado la carga promedio fue determinada considerando la carga de los aminoácidos Glu, Asp, Lys, Arg e His a pH fisiológico, a cada uno de ellos se les asignó el valor de 1, a excepción de la His, que tiene una menor contribución (asignamos 0.5) debido a que el pKa de su grupo imidazol se encuentra muy cercano al pH fisiológico. La suma de las contribuciones de cada residuo cargado también se dividió entre el total de aminoácidos de la TIM. Finalmente graficamos la carga contra la hidrofobicidad de cada TIM y en esta gráfica ubicamos aquellas enzimas con las que se han realizado experimentos de desnaturalización con HCl-Gdn al equilibrio.

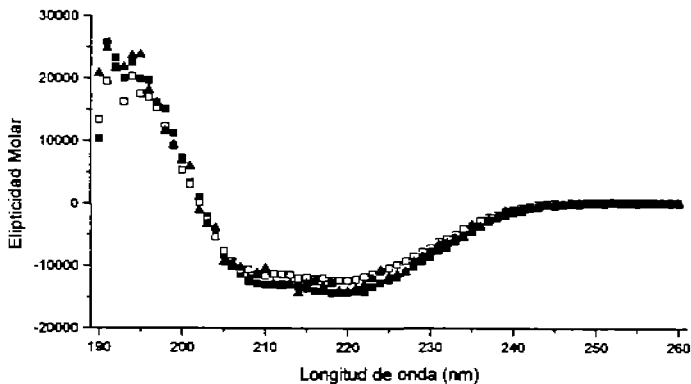
## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.- Purificación de las proteínas recombinantes

La TbTIM silvestre y las mutantes C14A/C39A (C126+) y C39A/C126A (C14+) se purificaron de acuerdo al protocolo descrito para la enzima silvestre (31) con un rendimiento de 30 a 50 mg de enzima pura/L de cultivo. La pureza de las proteínas se determinó por medio de geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS mostrando una sola banda con una masa molecular aproximado de 27kDa al teñir con azul de Coomassie.

### 5.2.- Propiedades estructurales de las enzimas mutantes

Comparamos los espectros de dicroísmo circular y de fluorescencia de las tres enzimas, a fin de evaluar el efecto de las mutaciones en la estructura secundaria y terciaria. Los espectros obtenidos por dicroísmo circular son similares y característicos de una proteína estructurada como un barril  $\alpha/\beta$ . (gráfica 1). Los espectros fueron analizados usando el programa K2d, este análisis indicó que las tres enzimas tienen la misma estructura secundaria (tabla 2).



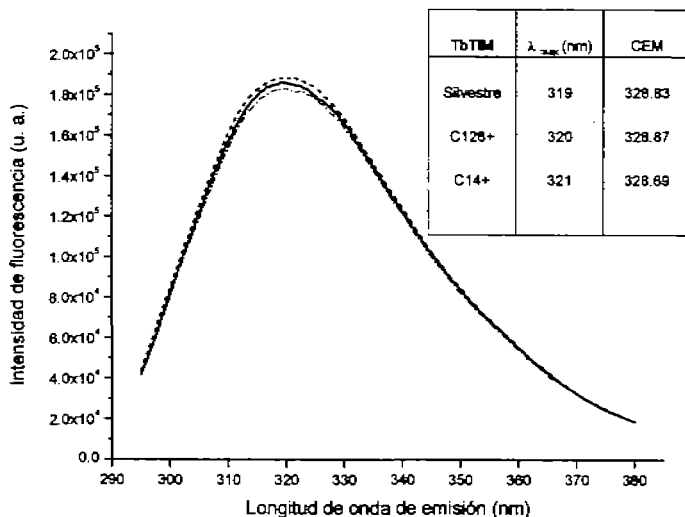
Gráfica 1. Espectros de DC en el UV lejano, los tres espectros son similares y característicos de una proteína estructurada como un barril  $\alpha/\beta$ .

■ TbTIM silvestre, □ TbTIM C126+ y ▲ TbTIM C14+.

TbTIM	% de estructura secundaria		
	$\alpha$ -hélices	hebras $\beta$	aleatorias
Silvestre	37%	26%	37%
C126+	37%	26%	37%
C14+	37%	26%	37%

Tabla 2. Contenido de estructura secundaria determinado para los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la TbTIM silvestre y las mutantes utilizando el programa K2d.

Los espectros de intensidad de fluorescencia de las mutantes mostraron un ligero corrimiento hacia el rojo en la longitud de onda de máxima emisión, de 1nm en la C126+ y 2nm en la C14+ con relación a los 319 nm correspondientes al máximo de emisión de la enzima silvestre (gráfica 2). El CEM es prácticamente idéntico entre las tres enzimas.



Gráfica 2. Espectros de intensidad de fluorescencia de las tres enzimas, se utilizó una  $\lambda_{EX}$  de 280 nm, se observa un ligero corrimiento del máximo de emisión hacia el rojo de 1 y 2 nm para las mutantes C126+ y C14+ respectivamente.

— TbTIM silvestre, -- TbTIM C126+ y - - TbTIM C14+.

### 5.3.- Propiedades catalíticas

El efecto de las dobles mutaciones en los parámetros catalíticos fue determinado en los dos sentidos de la reacción de la TIM. Los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $k_{cat}$ ) de la mutante C126+ y TbTIM silvestre obtenidos con GAP como sustrato son similares. En la mutante C14+ la  $K_m$  y  $k_{cat}$  disminuyen aproximadamente 50% cuando el GAP es usado como sustrato (tabla 3), sin embargo estos cambios son compensatorios y no tienen un efecto significativo en la relación  $k_{cat}/K_m$  que representa la constante de velocidad de segundo orden, en todos los casos esta constante permanece sin variaciones en el orden de magnitud. Los parámetros cinéticos con DHAP son similares en las tres enzimas, en las enzimas mutantes la constante de especificidad permanece sin variaciones con respecto a la enzima silvestre.

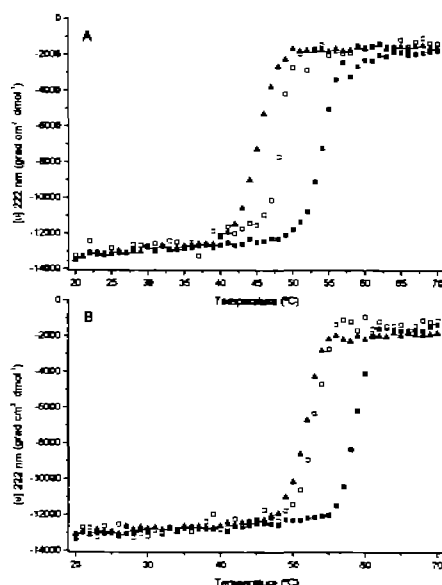
El efecto de las mutaciones en las propiedades espectroscópicas y los parámetros cinéticos no es significativo.

TbTIM	DHAP			GAP		
	$K_m$ (M) $10^{-3}$	$k_{cat}$ (s $^{-1}$ )	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ $10^5$ (s $^{-1}$ M $^{-1}$ )	$K_m$ (M) $10^{-4}$	$k_{cat}$ (s $^{-1}$ )	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ $10^6$ (s $^{-1}$ M $^{-1}$ )
Silvestre	1.9	450	2.3	3.8	4330	11.0
C126+	1.4	502	3.5	3.14	4830	15.38
C14+	2.09	466	2.3	2.47	1940	7.85

Tabla 3. Los parámetros cinéticos fueron determinados en amortiguador TE (ver materiales y métodos) a 25°C y diferentes concentraciones de GAP (0.01-3.0 mM) o DHAP (0.1-10 mM). Se calcularon los parámetros cinéticos correspondientes a cada enzima utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. Los datos se calcularon por un ajuste de regresión no lineal.

#### 5.4.- Efecto del PGA en la termoestabilidad y renaturalización

Obtuvimos las  $T_{ms}$  aparentes en ausencia y presencia de PGA. Las sustituciones de cisteínas en las mutantes C126+ y C14+ provocaron una desestabilización con respecto a la proteína silvestre, que se refleja en una disminución en las  $T_{ms}$  aparentes hasta de 8°C. En presencia del PGA observamos un corrimiento de la  $T_{map}$  hacia mayores temperaturas (gráfica 3), por lo tanto el PGA termoestabiliza a las tres enzimas.



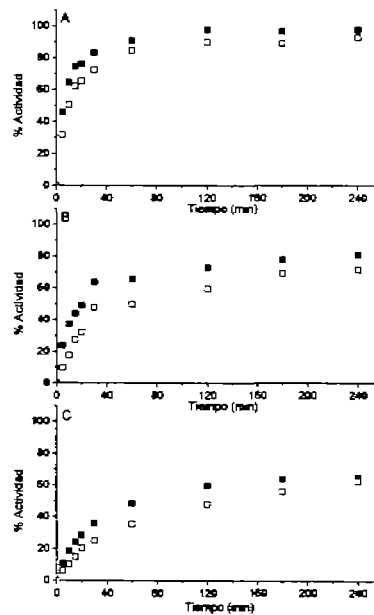
Gráfica 3. Las transiciones térmicas se obtuvieron siguiendo la señal de elipticidad a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20 a 70 °C. La concentración de proteína fue de 0.4 mg mL $^{-1}$ , en amortiguador MOPS 20 mM pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 1mM Na $_3$ . Panel A, ■ TbTIM silvestre, □ TbTIM C126+ y ▲ TbTIM C14+. Panel B, en presencia de 1 mM de PGA.

El efecto del PGA fue mayor en la mutante C14+, donde el corrimiento de la  $T_{m_{ap}}$  es de 6.5 °C (tabla 4). En todas las transiciones se presentó agregación de las enzimas, por lo que en estas condiciones el proceso de desnaturalización por temperatura es irreversible.

TbTIM	$T_{m_{ap}}$ (°C) - PGA	$T_{m_{ap}}$ (°C) +PGA	$\Delta T_{m_{ap}}$
Silvestre	53.6	58.5	4.9
C126+	48.1	52.8	4.7
C14+	45.0	51.5	6.5

Tabla 4. Efecto del PGA en la  $T_{m_{ap}}$  (°C) de la TbTIM silvestre y mutantes. El PGA termoestabiliza a las tres enzimas, el mayor efecto ocurre en la mutante C14+, pues su  $T_{m_{ap}}$  se corre 6.5 °C. Los valores de la  $T_{m_{ap}}$  se obtuvieron a partir de las curvas de desnaturalización térmica mostradas en la figura 3.

Con el propósito de evaluar el efecto del PGA en el rendimiento final de la reactivación a partir del estado totalmente desnaturalizado, realizamos cinéticas de renaturalización en presencia y ausencia de PGA para cada una de las enzimas. En la gráfica 4 se muestran las curvas de reactivación seguidas por la recuperación de actividad catalítica.



Gráfica 4. Efecto del PGA en la renaturalización de la TbTIM. Las enzimas se desnaturalizaron a una concentración de 1 mg/mL en HCl-Gdn 6M durante 70 min. Posteriormente se renaturalizaron por dilución en amortiguador B hasta una concentración de proteína de 10 µg/mL, la reactivación fue seguida por el cambio en actividad catalítica a distintos tiempos como se indica en Materiales y Métodos. Panel A) TbTIM silvestre, B) TbTIM C126+, C) TbTIM C14+. ■ + PGA, □ - PGA.

A partir de los datos de reactivación, es posible determinar la cantidad de enzima renaturalizada por unidad de tiempo usando la ecuación integrada de velocidad de primer orden (ecuación [6]):

$$v = -\frac{d[D]}{dt} = k[D] \quad \text{ó} \quad -\frac{d[D]}{[D]} = k dt \quad \text{Ec. [6]}$$

Donde  $k$  es la constante de velocidad de primer orden, integrando entre dos distintas concentraciones de enzima desnaturalizada,  $[D]_0$  y  $[D]$  en sus tiempos correspondientes  $t_0$  y  $t$ :

$$-\int_{[D]_0}^{[D]} \frac{d[D]}{[D]} = k \int_{t_0}^t dt \quad \text{Ec. [7]}$$

$$\ln \frac{[D]}{[D]_0} = k(t - t_0) \quad \text{ó} \quad 2.3 \log \frac{[D]_0}{[D]} = k(t - t_0) \quad \text{Ec. [8]}$$

Si  $[D]_0$  es la concentración inicial de proteína desnaturalizada y  $t_0 =$  tiempo cero, entonces la ecuación [8] puede expresarse como:

$$2.3 \log \frac{[D]_0}{[D]} = k t \quad \text{ó} \quad \log [D] = -\frac{k}{2.3} t + \log [D]_0 \quad \text{Ec. [9]}$$

Por tanto, una gráfica del  $\log [D]$  contra tiempos iniciales de reactivación ( $t$ ) es lineal con una pendiente negativa de  $k / 2.3$  y el  $\log [D]_0$  en el intercepto del eje  $\log [D]$ . El significado físico de la constante de velocidad de primer orden es una aproximación de la fracción de especie reactante que se convierte en producto por unidad de tiempo (34). Las constantes de velocidad de primer orden fueron calculadas para cada transición (tabla 5). La TbTIM silvestre presentó una mayor velocidad de repliegamiento con relación a las mutantes. En las tres enzimas observamos un aumento en la  $k$  de velocidad en presencia de PGA. En particular en la TbTIM silvestre, la constante en presencia de PGA aumentó 60%, el efecto fue menor en las mutantes con un incremento del 36% y 33% en la C14+ y C126+ respectivamente.

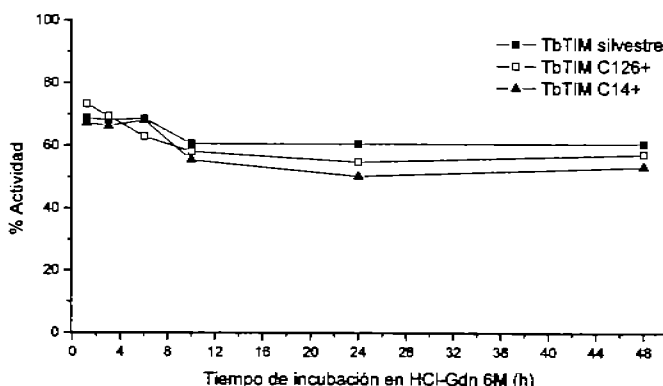
TbTIM	$k$ ( $s^{-1}$ )	
	- PGA	+PGA
Silvestre	2.9E-04	4.6E-04
C126+	1.2E-04	1.6E-04
C14+	8.7E-05	1.2E-04

Tabla 5. Constantes de velocidad de primer orden del repliegamiento de las tres enzimas en presencia y ausencia de PGA. El PGA aumenta la velocidad de renaturalización en las tres enzimas, en mayor grado en la TbTIM silvestre. Las constantes se calcularon de a partir de las curvas de reactivación de la gráfica 4 usando la ecuación [9].

El PGA incrementa notoriamente la velocidad de reactivación sin cambiar el rendimiento final en la reactivación (gráfica 4). La TbTIM silvestre alcanza una reactivación prácticamente total, del 97 y 92% en presencia y sin PGA, respectivamente. En la mutante C126+ el máximo de reactivación fue de 80.8% con PGA y 71.45% sin PGA, por otro lado la menor reactivación fue alcanzada por la mutante C14+ con 64.74 y 62.36%, con PGA y en ausencia de éste, respectivamente. A pesar de que determinamos que el PGA tiene efecto cinético en la reactivación, con estos datos no es posible proponer un esquema de plegamiento que incluya el (los) intermediario(s) al cual se une el PGA ni la magnitud de dicha interacción. Sin embargo, la finalidad de estos experimentos fue exclusivamente determinar la contribución de este análogo del estado de transición al replegamiento total. Consideramos que la diferencia en el rendimiento final de la transición hacia el estado nativo en presencia y ausencia de PGA en cada mutante no es significativa.

### 5.5.- Alcanzando el equilibrio termodinámico en la renaturalización

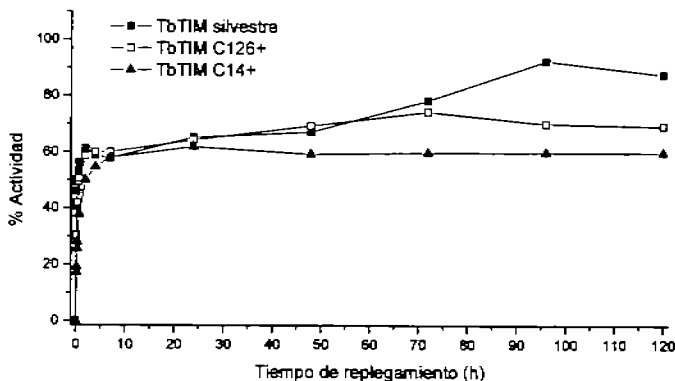
Para seguir la transición hacia la renaturalización debemos iniciar de un estado totalmente desnaturalizado que ha alcanzado el equilibrio. A continuación se muestra la gráfica de actividad recuperada por enzima (gráfica 5) al incubar en HCl-Gdn 6M por distintos tiempos y renaturalizar durante 24h. A partir de 10 horas el cambio en la actividad recuperada es imperceptible, por lo que para fines prácticos en todos los experimentos de replegamiento partimos de una solución de enzimas incubadas en HCl-Gdn 6M por 24 horas.



Gráfica 5. TbTIM silvestre, C14+ y C126+. Las enzimas se incubaron en HCl-Gdn 6M a una concentración de proteína de 1mg/mL y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para iniciar la renaturalización por dilución en amortiguador B. Después de 24 h en el medio de renaturalización se midió la actividad de las muestras.

El equilibrio de renaturalización es alcanzado en distintos tiempos entre las enzimas. Las mutantes C14+ y C126+ llegan al equilibrio en 24h y 3 días respectivamente, por otro lado la enzima silvestre presenta una cinética de replegamiento más lenta y logra el equilibrio termodinámico en 4 días (gráfica6).

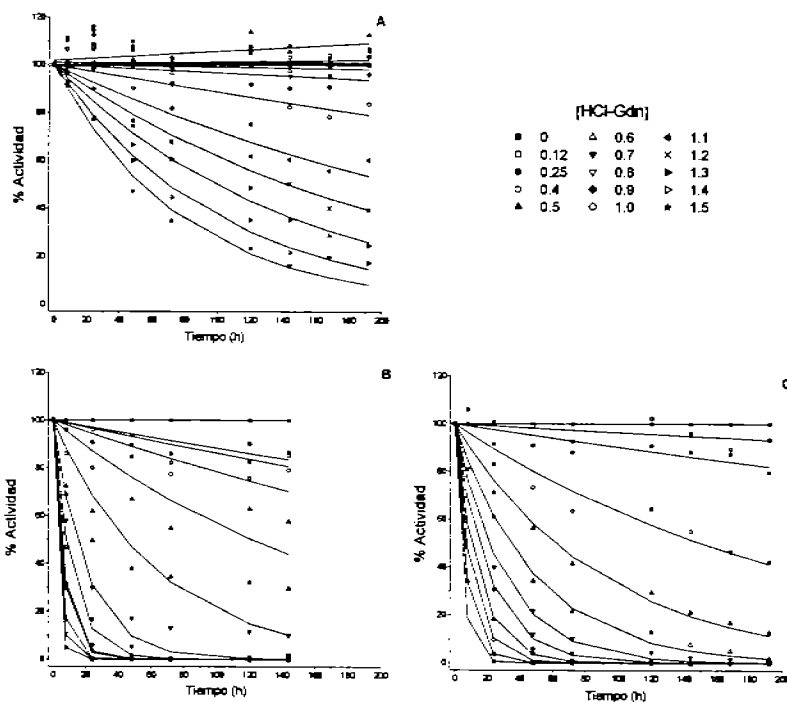




Gráfica 6. TbTIM silvestre, C14+ y C126+ buscando equilibrio de replegamiento. Las enzimas desnaturizadas en HCl-Gdn 6M por 24 h, se renaturalizaron por dilución en amortiguador B a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para medir actividad catalítica de las muestras.

### 5.6.- Alcanzando el equilibrio termodinámico en la desnaturalización

La TbTIM C126+ mostró una velocidad de desnaturalización mayor con respecto a las otras enzimas, al cabo de 3 días determinamos que las diferencias en actividad catalítica no eran significativas, es decir alcanzamos el equilibrio de desnaturalización. Las enzimas silvestre y mutante C14+ requirieron de 7 días cada una. Después de estos tiempos las variaciones en la actividad catalítica fueron mínimas (gráfica 7).



Gráfica 7. TbTIM buscando el equilibrio de desnaturalización. Las enzimas se incubaron a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y concentraciones crecientes de HCl-Gdn entre 120 mM y 1.5M. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir actividad catalítica como se describe en Materiales y Métodos. Datos ajustados a la ecuación exponencial de primer orden. Panel A) TbTIM silvestre, B) TbTIM C126+, C) TbTIM C14+.

A partir de las curvas de la gráfica 7, es posible obtener la constante de velocidad de disociación. El cálculo de éste parámetro cinético y de la constante de asociación, son discutidos en la sección 5.12.

En la tabla 6 se presentan los periodos necesarios para lograr el equilibrio termodinámico de las tres enzimas en cada transición.

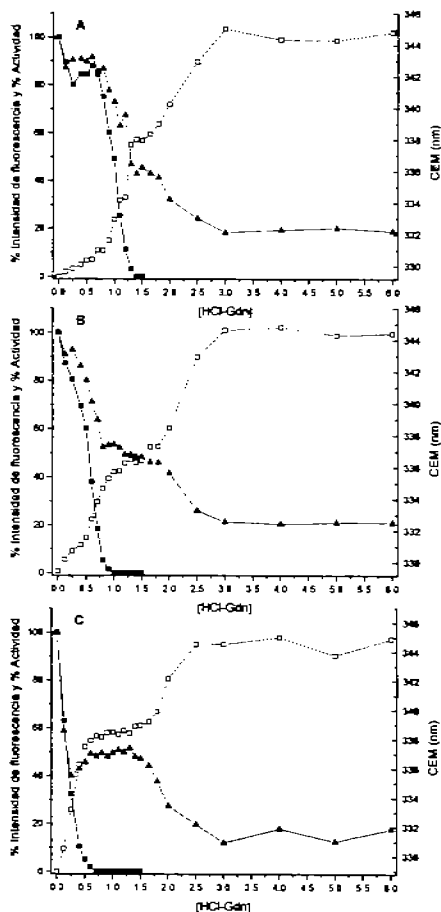
TbTIM	N $\rightarrow$ D (días)	D $\rightarrow$ N (días)
Silvestre	7	4
C126+	3	3
C14+	7	1

Tabla 6. Tiempo para lograr el equilibrio de desnaturalización y renaturalización en la TbTIM. El tiempo equilibrio para cada transición fue establecido a partir de las gráficas 6 y 7, al determinar el tiempo a partir del cual las variaciones en actividad catalítica fueron mínimas.

## 5.7.- Experimentos al equilibrio termodinámico

### 5.7.1.- Renaturalización

La actividad catalítica, intensidad de fluorescencia y CEM fueron determinados al alcanzarse el equilibrio de renaturalización para cada enzima (gráfica 8). En las tres enzimas los cambios en fluorescencia intrínseca y CEM mostraron dos transiciones, por lo tanto el plegamiento de estas enzimas no se ajusta a un modelo de dos estados. Por otra parte las curvas de renaturalización obtenidas por actividad catalítica son monofásicas.



Gráfica 8. Porcentaje de reactivación determinado a los tiempos de equilibrio de repliegamiento de las TbTIMs. La renaturalización fue seguida por el cambio en ■ actividad catalítica, ▲ intensidad de fluorescencia y □ CEM como se menciona en Materiales y Métodos. Las enzimas desnaturalizadas en HCl-Gdn 6M por 24 h se renaturalizaron por dilución en amortiguador B y concentraciones decrecientes de HCl-Gdn entre 6 M y 120 mM a una concentración final de proteína de 20 µg/mL. Las lecturas fueron en el equilibrio de repliegamiento. Panel A) TbTIM silvestre, B) TbTIM C126+, C) TbTIM C14+.

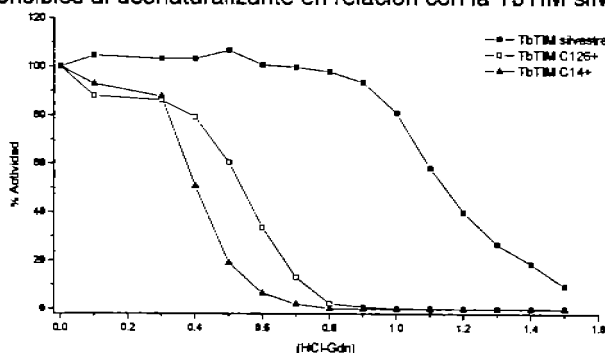
Por el cambio en intensidad de fluorescencia, se observa que a partir de 3M hasta 6M de HCl-Gdn, hay una señal de fluorescencia residual en las tres enzimas (gráfica 8), lo cual coincide con lo reportado por Chánez et al (18) en la TbTIM silvestre en el sentido de desnaturalización. La desnaturalización de las tres enzimas produjo un cambio similar en CEM, resultado de la exposición de los residuos de triptofano al solvente (tabla 7)

TbTIM	CEM (nm) 0 M HCl-Gdn	CEM (nm) 6 M HCl-Gdn	$\Delta$ CEM (nm)
Silvestre	328.83	343.43	14.6
C126+	328.87	343.8	14.93
C14+	328.69	344.62	15.93

Tabla 7. Cambio en el CEM en la TbTIM en ausencia de desnaturalizante y en 6 M de HCl-Gdn. Los valores del CEM se obtuvieron de los datos de la gráfica 8.

### 5.7.2.- Desnaturalización

La desnaturalización al equilibrio fue seguida por el cambio en actividad catalítica (gráfica 9). En la enzima silvestre, la transición se aprecia en concentraciones mayores a 1.0 M de HCl-Gdn, mientras que en las mutantes la transición inicia en 250 mM y termina en 0.9 M de HCl-Gdn, lo que indica que son más sensibles al desnaturalizante en relación con la TbTIM silvestre.



Gráfica 9. Transiciones al equilibrio de desnaturalización de las TbTIMs seguidas por el cambio en actividad catalítica. Las enzimas se incubaron a una concentración de 20  $\mu$ g/mL en concentraciones crecientes de HCl-Gdn entre 120 mM y 1.5M. Al tiempo de equilibrio correspondiente se tomaron alícuotas de las muestras para medir actividad catalítica como se explica en Materiales y Métodos

## 5.8.- Datos normalizados

Los resultados de los experimentos de desnaturalización y renaturalización al equilibrio fueron normalizados a fin de compararlos entre mutantes y técnicas, para ello ajustamos los datos al valor  $\alpha$  (fracción nativa), ecuación [10]

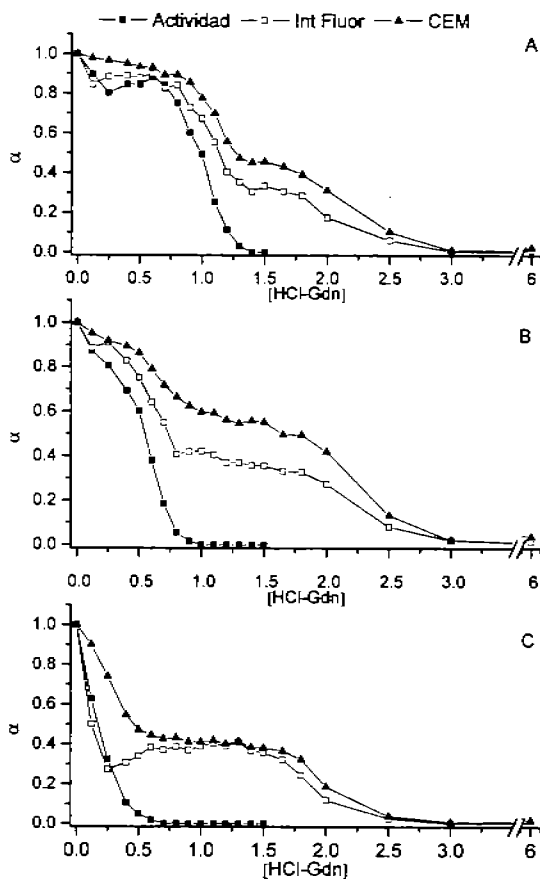
$$\alpha = \frac{[Y(x) - Y_D]}{[Y_N - Y_D]} \quad \text{Ec. [10]}$$

Donde  $Y(x)$  es el valor de intensidad de fluorescencia, CEM o actividad catalítica a la concentración  $x$  de HCl-Gdn y  $Y_N$  y  $Y_D$  son los valores para los estados nativo y desnaturalizado, respectivamente. Los resultados del cambio en actividad catalítica no se modificaron al ser normalizados, ya que ésta no presentó actividad residual, sin embargo en la intensidad de fluorescencia la señal residual fue ajustada a 0.

### Renaturalización

De las transiciones de renaturalización de las tres enzimas, la primera transición se presenta en el mismo rango de concentraciones de HCl-Gdn de 3 a 1.65 M en todas las enzimas (gráfica 10, cambio en intensidad de fluorescencia y CEM). En las tres enzimas se detecta una meseta entre ambas transiciones, lo cual indica la presencia de un intermediario estable. Esta meseta se presenta en un rango de 1.65M a 1.3M en la TbTIM silvestre, en la mutante C126+ abarca un intervalo de 1.65M a 0.9M y en la mutante C14+ se aprecia un intermediario más estable ya que la meseta va desde 1.65M hasta 0.6M de HCl-Gdn.

La segunda transición involucra la recuperación de la actividad catalítica y ocurre en distintos intervalos de HCl-Gdn para cada enzima, en la TbTIM silvestre comienza a partir de 1.3M y por debajo de 0.9 M y 0.6 M en las mutantes C126+ y C14+ respectivamente. Estas concentraciones corresponden con el final de la meseta observada por fluorescencia y CEM, lo que indica que el intermediario no tiene actividad catalítica.



Gráfica 10. Fracciones nativas de TbTIM al equilibrio de renaturalización usando los datos de la gráfica 8 normalizados aplicando la ecuación [10]. Panel A) TbTIM silvestre, B) TbTIM C126+, C) TbTIM C14+.

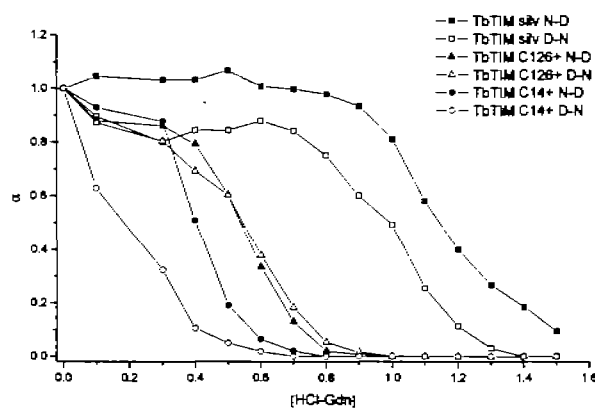
### 5.9.- Reversibilidad

Las enzimas silvestre y mutante C126+ son desnaturizadas reversiblemente, alcanzan  $\alpha_s$  de recuperación de actividad catalítica de 0.89 y 0.87 respectivamente. Por otro lado la mutante C14+ es poco reversible, sus  $\alpha_s$  máximas de reactivación en actividad catalítica e intensidad de fluorescencia tienen valores de 0.62 y 0.5 respectivamente (tabla 5). Es probable que la irreversibilidad exhibida por la mutante C14+ se deba a la formación de interacciones no productivas entre los estados intermedios parcialmente plegados, lo cual es frecuente en proteínas oligoméricas.

TbTIM	N→D	D→N		
	$\alpha$ Act. Cat.	$\alpha$ Act. Cat.	$\alpha$ Int. Fluor.	$\alpha$ CEM
Silvestre	1.04	0.89	0.84	0.98
C126+	0.88	0.87	0.86	0.95
C14+	0.92	0.62	0.5	0.9

Tabla 8. Fracciones nativas en ambas transiciones en la menor concentración de desnaturizante (120mM).

En la mutante C126+ se sobreponen las curvas que describen el cambio en la actividad catalítica en ambas direcciones. Lo anterior indica que en estas condiciones la desnaturización por HCl-Gdn es reversible y que el estado de equilibrio fue verdaderamente alcanzado (gráfica 11).

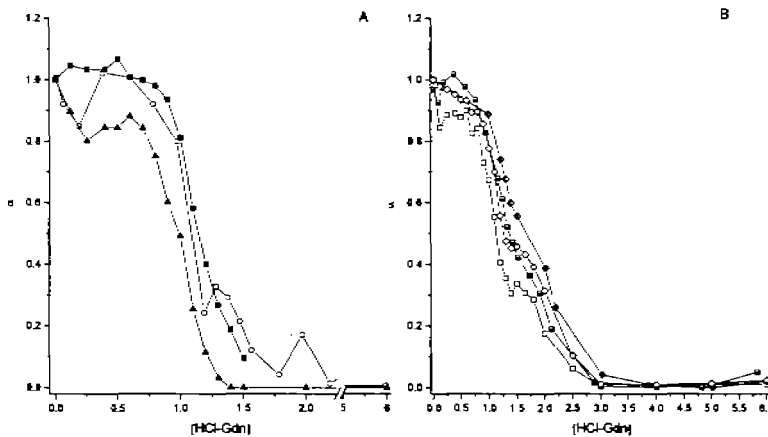


Gráfica 11. Fracciones de TbTIM nativa siguiendo el cambio en actividad catalítica en las transiciones de desnaturización y replegamiento. Los valores fueron normalizados usando la ecuación [10].

En la enzima silvestre, la transición de desnaturización se encuentra ligeramente desplazada hacia mayores concentraciones de desnaturizante con respecto a la curva de replegamiento, sin embargo ambas curvas siguen trayectorias parecidas. En la mutante C14+ observamos una clara histéresis, las curvas no se sobreponen ni siguen trayectorias similares como en la enzima silvestre (gráfica 11).

Las curvas de desnaturalización al equilibrio por HCl-Gdn para la TbTIM silvestre han sido reportadas (18), por ello las comparamos con nuestros datos de la enzima silvestre para determinar cual de las dos transiciones está al equilibrio (gráfica 12).

En la gráfica 12 panel B se aprecia que las transiciones de desnaturalización previamente reportadas coinciden con las curvas de repliegamiento del presente trabajo, todas ellas siguen trayectorias muy parecidas a pesar de que la presencia del intermediario estable es ligeramente más clara en el sentido de la renaturalización. Es notoria la alta correspondencia entre las curvas del cambio en CEM



Gráfica 12. TbTIM silvestre. Fracción nativa de las transiciones de desnaturalización y de repliegamiento. Comparación entre los datos en el sentido de desnaturalización previamente reportados y los obtenidos en este trabajo. Panel A: actividad, ○TbTIM N-D (18), ■ TbTIM N-D, ▲ TbTIM D-N. Panel B: ■ Int. Fluor. N-D (18) ◆ CEM N-D (18), □ Int. Fluor. D-N y ◇ CEM D-N.

Considerando que los experimentos reportados (18) fueron efectuados en condiciones ligeramente distintas (concentración de proteína y 3°C de diferencia en las incubaciones), proponemos que las curvas de renaturalización presentadas en gráfica 12 describen experimentos al equilibrio termodinámico. Aparentemente en la enzima silvestre no se alcanzó el equilibrio de desnaturalización, esta es una dificultad frecuente en los experimentos de estabilidad en oligómeros donde las cinéticas de desnaturalización y/o repliegamiento son lentas y dificultan la identificación de los estados al equilibrio.

### 5.10.- Ajuste de datos

El modelo de plegamiento más sencillo, que describe estos resultados coincide con el reportado para la TIM de levadura (19), que involucra a un intermediario monomérico. Los monómeros desnaturalizados se pliegan en monómeros inactivos que se asocian para conformar un dímero nativo, ecuación [11]





donde D = monómero desnaturalizado, M = monómero plegado y N = dímero nativo, los cambios en energía libre de cada proceso dependen linealmente de la concentración de desnaturalizante ( ecuación 3), por tanto:

$$\Delta G_{\text{pleg}} = \Delta G^{\circ}_{\text{pleg}} - m[D] \quad \text{Ec. [12]}$$

$$\Delta G_{\text{asoc}} = \Delta G^{\circ}_{\text{asoc}} - m[D] \quad \text{Ec. [13]}$$

La suma de las fracciones molares de los estados desnaturalizado, monómero y dímero nativo es igual a uno y resultan de los siguientes cocientes:

$$f_D = \frac{D}{P_t}, \quad f_M = \frac{M}{P_t}, \quad f_N = \frac{2N}{P_t}$$

Donde la concentración total de proteína  $P_t$  es expresada en función de monómeros ( $P_t=D+M+2N$ ) y las constantes de equilibrio son descritas por:

$$K_{\text{pleg}} = \frac{[M]}{[D]} \quad \text{y} \quad K_{\text{asoc}} = \frac{[N]}{[M]^2}$$

Mediante sustituciones algebraicas de las fracciones molares  $f_M$  y  $f_N$  por las constantes de equilibrio y concentración molar de proteína, se obtienen las ecuaciones [14], [15] y [16]:

$$f_M = \frac{-\left(\frac{1}{K_{\text{pleg}}} + 1\right) + \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{pleg}}} + 1\right)^2 + 8K_{\text{asoc}}P_t}}{4K_{\text{asoc}}P_t} \quad \text{Ec. [14]}$$

$$f_N = 2(f_M)^2 \cdot K_{\text{asoc}} \cdot P_t \quad \text{Ec. [15]}$$

$$f_D = 1 - f_M - f_N \quad \text{Ec. [16]}$$

En la deducción de las ecuaciones [14], [15] y [16], la variable experimental (Y) se asume aditiva esto es,  $Y = Y_D f_D + Y_M f_M + Y_N f_N$ .

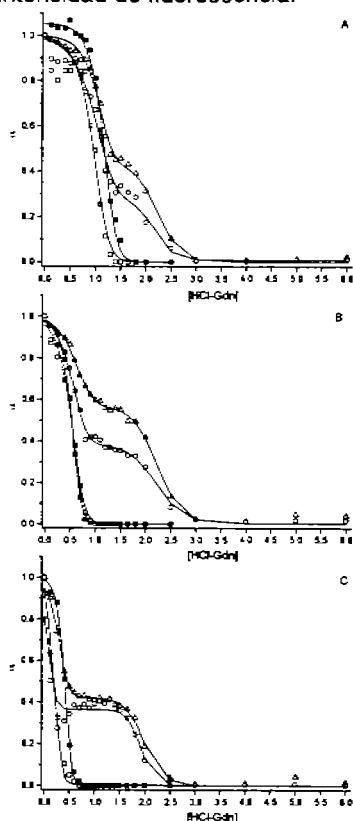
### 5.11.- Cálculos de estabilidad

Para ajustar los datos utilizamos el programa Origin 7.0 y se emplearon los distintos grupos de resultados obtenidos (en ambas transiciones y por cada parámetro), en caso de haber alcanzado realmente el equilibrio termodinámico, cada experimento arrojaría los mismos valores de  $\Delta G^{\circ}$ .

En el ajuste de datos, el valor máximo ( $Y_N$ ) de actividad catalítica, CEM e IF fue ajustado a 1, en la transición seguida por actividad el mínimo corresponde a la monomerización, por lo tanto  $Y_N=0$ . En la señal seguida por IF y CEM, el

mínimo se relaciona con la desnaturalización total del monómero, por ello se ajustó a  $Y_D=0$ .

A continuación se muestran las curvas de fracción nativa contra concentración de desnaturalizante ajustadas al modelo descrito por la ecuación 11 (gráfica 13). Con los datos de la mutante C126+ se realizó el mejor ajuste, en todas las transiciones el valor de  $R^2$  fue al menos de 0.9911, los ajustes de las transiciones de la enzima silvestre presentaron una  $R^2 \geq 0.984$ , excepto en el cambio en actividad catalítica en el replegamiento donde  $R^2=0.966$ . En las transiciones de la mutante C14+ la  $R^2 \geq 0.9818$  en el ajuste del cambio en actividad catalítica en ambas transiciones y CEM, sin embargo el ajuste en el cambio en intensidad de fluorescencia tuvo mayor error al presentar una  $R^2=0.93$ , este error puede deberse a que no fue posible obtener una curva con más puntos a concentraciones de desnaturalizante menores a 0.120 M, concentración a la cual se obtiene un 40% y 50% de los cambios en las señales de actividad e intensidad de fluorescencia.



Gráfica 13. Cambios en fracción nativa seguidos por actividad catalítica, intensidad de fluorescencia y CEM en la TbTIM. Ajuste a un modelo de tres estados en las transiciones de desnaturalización y replegamiento. ■ actividad catalítica N-D, □ actividad catalítica D-N, ○ intensidad de fluorescencia D-N y △ CEM D-N.

Panel A) TbTIM silvestre, B) TbTIM C126+, C) TbTIM C14+.

Los valores de  $\Delta G$  y  $m$  obtenidos según el modelo de la ecuación 8, se reportan en la tabla 9. Para el cálculo de los promedios de  $\Delta G$  y  $m$  se utilizaron todas las transiciones en la mutante C126+ ya que se alcanzó el equilibrio y los ajustes tuvieron un error mínimo, en la TbTIM silvestre se promediaron los valores de las transiciones de replegamiento en actividad catalítica, intensidad de fluorescencia y CEM en las cuales proponemos que se alcanzó el equilibrio como se discutió en la sección de Reversibilidad. Para la obtención de los parámetros de estabilidad correspondientes a la mutante C14+, utilizamos los datos de renaturalización en el cambio en actividad catalítica y CEM debido a que estas transiciones siguen trayectorias similares y presentan valores de  $R^2 \geq 0.9818$ . A reserva de que la desnaturalización de la C14+ es poco reversible, el intermediario es el más estable entre las enzimas, por esto consideramos importante obtener un estimado de la estabilidad de esta mutante.

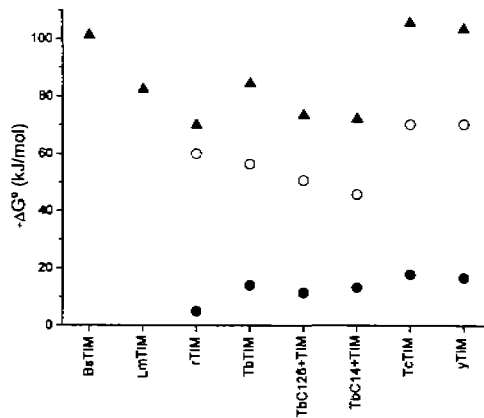
TbTIM	Parámetro/ Transición	$-\Delta G^{\circ}_{\text{asoc. 2M} \rightarrow \text{N}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m_{\text{asoc. 2M} \rightarrow \text{N}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$-\Delta G^{\circ}_{\text{pleg. 2D} \rightarrow \text{2M}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m_{\text{pleg. 2D} \rightarrow \text{2M}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$-\Delta G^{\circ}_{\text{Total}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Silvestre	Act/ N→D	68.58 ± 2.45	26.24 ± 2.00			
	Act/ D→N	59.63 ± 2.52	22.44 ± 2.56			
	CEM/ D→N	58.29 ± 1.80	22.46 ± 1.91	25.89 ± 5.88	11.56 ± 2.45	
	IF/ D→N	51.41 ± 1.96	16.89 ± 2.40	30.10 ± 25.12	13.84 ± 11.24	
	Promedio D→N IF, CEM y Act	56.44 ± 4.41	20.60 ± 4.70	28.00 ± 2.98	12.78 ± 1.61	84.44
C126+	Act/ N→D	55.35 ± 1.51	34.75 ± 2.70			
	Act/ D→N	52.15 ± 1.12	26.55 ± 1.96			
	CEM/ D→N	47.44 ± 1.07	20.78 ± 1.81	23.35 ± 2.43	10.48 ± 1.07	
	IF/ D→N	48.10 ± 1.09	24.38 ± 1.98	22.24 ± 4.21	10.09 ± 1.88	
	Promedio (todas)	50.76 ± 3.70	28.62 ± 7.25	22.79 ± 6.78	10.28 ± 6.27	73.55
C14+	Act/ N→D	57.54 ± 0.92	48.07 ± 2.01			
	Act/ D→N	46.76 ± 0.95	44.50 ± 4.41			
	CEM/ D→N	44.65 ± 0.37	34.69 ± 0.32	26.43 ± 4.60	13.33 ± 2.41	
	IF/ D→N	38.24 ± 1.24	45.71 ± 0.84	37.64 ± 30.87	19.78 ± 16.78	
	Promedio D→N <sub>Act y CEM</sub>	46.70 ± 1.50	39.60 ± 6.04	26.43	13.33	72.13

Tabla 9. Cambio en energía libre en el plegamiento, asociación y estabilidad total en la TbTIM silvestre y mutantes de cisteína, valores obtenidos al realizar un ajuste a un modelo de tres estados representado en la ecuación [11].

En los tres casos de TbTIM mencionados en este trabajo, se observa que la energía libre de disociación es mayor que la del desplegamiento del monómero, lo cual corresponde con lo encontrado en las TIMs de distintas especies hasta ahora reportadas (19). Por lo tanto, la asociación de los monómeros en las TbTIMs contribuye en mayor medida a la estabilidad del dímero nativo.

Los valores de  $m$  indican la dependencia del  $\Delta G$  en la concentración de desnaturante, así como la exposición al solvente de los residuos hidrofóbicos. Como se observa en la tabla 9, la pendiente en la transición de asociación es mayor en la mutante C14+, 92% y 49% más que en las enzimas silvestre y C126+ respectivamente, por lo tanto la dimerización es más sensible a la concentración de HCl-Gdn en la mutante C14+. La pendiente calculada en la transición de plegamiento, es también mayor en la mutante C14+, 5% y 29% superior con relación a las enzimas silvestre y C126+.

En la gráfica 14 se observan los cambios en energía libre total, de asociación y plegamiento en las TIMs desnaturadas en HCl-Gdn. De la proporción  $\Delta G^{\circ}_{\text{pleg } 2D \rightarrow 2M} / \Delta G^{\circ}_{\text{total}}$ , se calcula la contribución del plegamiento de los monómeros a la estabilidad total, para las TbTIM silvestre, C126+ y C14+ las proporciones son 0.33, 0.31 y 0.37. Estos valores son cercanos con el de la TcTIM (0.34) con la que existe un alto porcentaje de identidad. El cambio en energía libre total, es parecido entre la LmTIM (82.4 kJ mol<sup>-1</sup>) y la TbTIM silvestre (84.44 kJ mol<sup>-1</sup>), por otro lado las mutantes presentan un  $\Delta G^{\circ}_{\text{total}}$  menor (73.55 kJ mol<sup>-1</sup> y 72.13 kJ mol<sup>-1</sup> para la C126+ y C14+ respectivamente), cercano al de la TIM de conejo (70 kJ mol<sup>-1</sup>). De los estudios de estabilidad por desnaturación con HCl-Gdn, se concluye que el  $\Delta G^{\circ}$  de plegamiento de los monómeros de las TIMs de distintas especies es mayor a -17.5 kJ/mol.



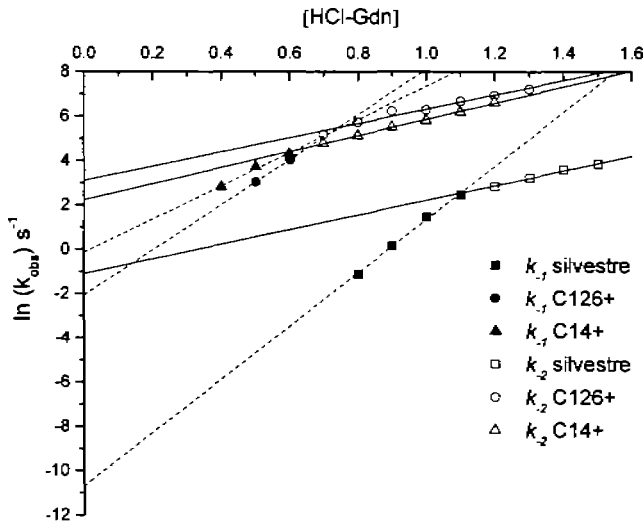
Gráfica 14. Estabilidad de las TIMs de diferentes especies en presencia de HCl-Gdn.  $\Delta G^{\circ}_{\text{total}}$  (▲),  $\Delta G^{\circ}_{\text{asoc } 2M \rightarrow M}$  (○),  $\Delta G^{\circ}_{\text{pleg } D \rightarrow M}$  (●). En todos los casos la energía de asociación es mayor a la del plegamiento monomérico. BsTIM (22), LmTIM(23), rTIM(20), TbTIM y mutantes C126+ y C14+ (presente trabajo), TcTIM (26), yTIM (19).

### 5.12.- Determinación de las constantes de velocidad

Las constantes de velocidad de desnaturalización fueron determinadas a distintas concentraciones de desnaturalizante, midiendo la actividad catalítica en las tres enzimas (ver materiales y métodos, gráfica 7). Los datos de la gráfica 7 fueron ajustados a la ecuación de velocidad de primer orden, que consiste en un rearrreglo de la ecuación [9]:

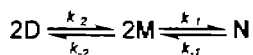
$$A = A_0 e^{-k_{obs} t} \quad \text{Ec. [17]}$$

Donde  $A$  es la actividad catalítica, que depende del tiempo  $t$ ,  $A_0$  es la actividad en el tiempo cero (100%) y  $k_{obs}$  es la constante de velocidad obtenida del ajuste. Se asume que el logaritmo natural de estas constantes es función lineal de la concentración de desnaturalizante. En el trazo de las constantes observadas, es clara la presencia de dos pendientes, las cuales proponemos que se relacionan con los pasos de disociación y desplegamiento de los monómeros. De la regresión lineal de las pendientes observadas, es posible obtener las constantes de velocidad  $k_1^{H_2O}$  y  $k_2^{H_2O}$  asociadas a la disociación del dímero y desplegamiento del monómero en ausencia de desnaturalizante. En la gráfica 15 se muestra la extrapolación lineal del logaritmo natural de las constantes hasta la concentración cero de [HCl-Gdn].



Gráfica 15. Dependencia de la cinética de disociación en la concentración de desnaturalizante en las tres TbTIMs. Las constantes de velocidad fueron obtenidas del ajuste de los datos de la gráfica 7 a una función exponencial. La ordenada al origen indica el valor de  $k_1$  en agua.  
 ■ TbTIM silvestre, □ TbTIM C126+ y ▲ TbTIM C14+.

Considerando el  $\Delta G^\circ$  correspondiente de las transiciones de plegamiento y asociación y las  $K_{-1}^{H_2O}$  y  $K_{-2}^{H_2O}$ , es posible obtener las  $k_1^{H_2O}$  y  $k_2^{H_2O}$  mediante la relación de las  $K_{eq}$  con las constantes de velocidad:



$$\Delta G^\circ_{asoc} = -RT \ln K_{asoc}$$

$$\Delta G^\circ_{pleg} = -RT \ln K_{pleg}$$

$$K_{asoc} = \frac{k_1}{k_{-1}} \Rightarrow k_1 = K_{asoc} k_{-1}$$

$$K_{pleg} = \frac{k_2}{k_{-2}} \Rightarrow k_2 = K_{pleg} k_{-2}$$

En ambas enzimas mutantes, la velocidad de disociación ( $k_{-1}$ ) aumenta considerablemente con relación a la enzima silvestre. En la mutante C14+, el dímero se disocia casi 40,000 veces más rápido que el dímero silvestre. Entre las constantes de velocidad de asociación ( $k_1$ ) las diferencias son menos drásticas, en la mutante C14+ los monómeros se asocian con mayor rapidez, ~400 veces más rápido que la enzima silvestre (tabla 10). En las tres enzimas el orden de la  $k_1$  es cercano a los valores calculados para una reacción bimolecular limitada por difusión ( $10^8$ - $10^{10}$   $M^{-1}s^{-1}$ ). El dímero de la enzima silvestre es el más estable, se asocia a una velocidad cercana a la limitada por difusión y se disocia muy lentamente. La velocidad de plegamiento del monómero es similar en las tres enzimas, en la mutante C14+, éste se pliega 15 veces más rápido que el monómero silvestre. En la velocidad de desnaturalización, el monómero de la mutante C126+, se despliega 66 veces más rápido que el monómero silvestre. En términos generales, la mutante C14+ exhibe una velocidad de disociación considerablemente mayor que la enzima silvestre, mientras que la mutante C126+ se despliega con una velocidad 66 veces mayor que la enzima silvestre.

TbTIM	$K_1^{H_2O}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_{-1}^{H_2O}$ ( $s^{-1}$ )	$-\Delta G^\circ_{asoc\ 2M \rightarrow M}$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	$K_2^{H_2O}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{-2}^{H_2O}$ ( $s^{-1}$ )	$-\Delta G^\circ_{pleg\ 2M \rightarrow M}$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )
Silvestre	2.88E+07	2.25E-05	68.58	2.94E+04	0.33	28
C126+	7.52E+08	1.27E-01	55.35	2.36E+05	22.32	22.79
C14+	1.26E+10	8.74E-01	57.54	4.32E+05	9.31	26.43

Tabla 10. Constantes de velocidad de disociación y desnaturalización determinadas a partir de la regresión lineal y extrapolación hasta la ausencia de desnaturalizante mostradas en la gráfica 15 y constantes de velocidad de asociación y plegamiento calculadas a partir del  $\Delta G^\circ$  termodinámico.

### 5.13.- $\Delta\Delta G^\circ$

La obtención del  $\Delta\Delta G^\circ$  de las mutantes con respecto a la enzima silvestre, se realizó mediante la ecuación [18] a partir de los datos de  $\Delta G^\circ$  promedio de la tabla 9, los resultados se muestran en la tabla 11.

$$\Delta\Delta G^\circ = \Delta G^\circ_{mut} - \Delta G^\circ_{sil} \quad \text{Ec. [18]}$$

Mutante	$\Delta\Delta G^\circ_{asoc\ 2M \rightarrow N}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G^\circ_{pleg\ 2D \rightarrow 2M}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G^\circ_{total}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
C126+	5.68	5.20	13.86
C14+	10.74	-0.54 <sup>1</sup> /1.57 <sup>2</sup>	16.37

Tabla 11.  $\Delta\Delta G^\circ$  por mutante en cada paso de la vía de plegamiento. <sup>1</sup>Diferencia entre  $\Delta G^\circ_{pleg}$  calculado por el cambio en CEM. <sup>2</sup>Resta entre  $\Delta G^\circ_{pleg}$  promedio.

A excepción del  $\Delta\Delta G^\circ_{pleg}$  de la mutante C14+, los signos de los  $\Delta\Delta G^\circ$  son positivos (tabla 10), lo que indica que el efecto de las mutaciones es desestabilizante con respecto a la enzima silvestre. Las dos mutantes resultaron ser más afectadas en términos de la asociación, la C14+ presenta el cambio más significativo por 10.74 kJ/mol, casi el doble que el  $\Delta\Delta G^\circ$  de la mutante C126+. La estabilidad del monómero de la mutante C126+ es disminuída por 5.2 kJ/mol, por otra parte el monómero de la mutante C14+ es tan estable como el monómero silvestre ya que presenta un  $\Delta\Delta G^\circ_{pleg} = -0.54$  kJ/mol resultado de la diferencia entre los  $\Delta G^\circ_{pleg}$  obtenidos por el cambio en CEM o bien menos estable por sólo 1.56 kJ/mol si se considera la resta de los  $\Delta G^\circ_{pleg}$  promedio.

El estudio de estabilidad en mutantes permite la caracterización de intermediarios del plegamiento al estabilizar una estructura (s) particular. Tal es el caso en estas mutantes, en particular en la mutante C14+ es más clara la presencia del intermediario monomérico en comparación con la silvestre. En la mutante C14+ (gráfica 10, Panel C cambio en intensidad de fluorescencia) se observa claramente una gran meseta que indica la presencia del intermediario, que abarca desde 0.3 hasta 2M de desnaturalizante, por otro lado la enzima silvestre (gráfica 10, Panel A) presenta el intermediario en un rango menor de desnaturalizante (1.3 hasta 2M).

Concluimos que la consecuencia de la doble mutación en las cisteínas 126 y 39 (C14+) afecta al estado de asociación del dímero nativo y favorece la presencia del intermediario monomérico. Sin embargo ya que el  $\Delta\Delta G^\circ_{asoc}$  de la mutante C126+ es casi de la mitad en comparación con el de la C14+, sugerimos que la mayor estabilidad en la asociación del dímero de la C126+ con respecto a la C14+ se debe a la presencia de la cisteína 126, la cual proponemos que estructura al barril  $\alpha/\beta$ , generando un cambio conformacional que afecta a la interfase y disminuye la  $k_{-1}$ .

Contrariamente a lo esperado, la asociación del dímero depende energéticamente en mayor medida de la Cys 126, un residuo altamente conservado localizado en el interior del barril  $\alpha/\beta$ , que de la Cys 14, un aminoácido que está muy empaquetado en la interfase dimérica.

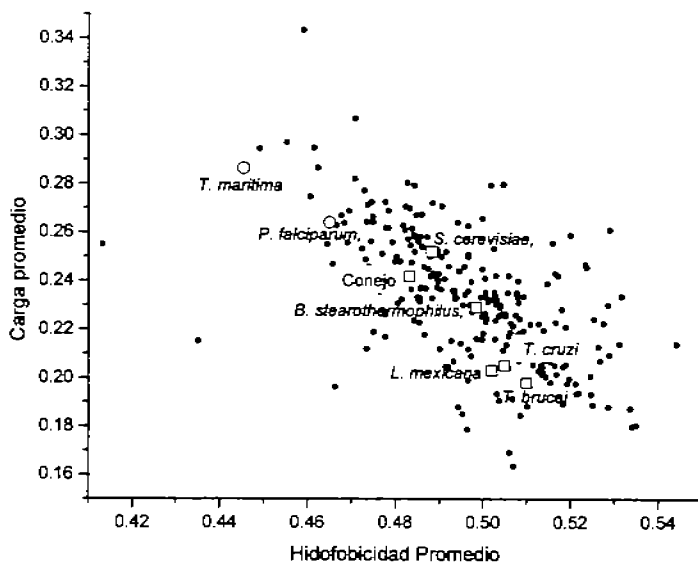
#### 5.14.- Análisis de secuencias

Encontramos que bajo los criterios empleados para asignar carga e hidrofobicidad promedio a cada secuencia de aminoácidos de TIM, existe una correlación negativa entre estos dos parámetros (gráfica 16).

En la gráfica 16 se destacan las TIMs que han sido objeto de estudios de desnaturalización por HCl-Gdn, sin embargo no identificamos ninguna relación entre la presencia de intermediarios estables de plegamiento y la correlación negativa mencionada. Por un lado las TIMs de *B. stearothermophilus*, Conejo y *L. mexicana* exhiben una vía de plegamiento que se ajusta a un modelo de dos estados, mientras que las TIMs de *S. cerevisiae*, *T. cruzi* y *T. brucei* presentan intermediarios. Las TIMs de *T. maritima* y *P. falciparum* presentan transiciones irreversibles debido a agregación en la desnaturalización por HCl-Gdn, éstas se localizan en una zona de mayor carga promedio y menor hidrofobicidad en relación con las TIMs cuyo proceso de desnaturalización es reversible. A reserva de un análisis que incluya a otros agentes desnaturalizantes, al parecer existe una relación entre la reversibilidad de la desnaturalización y la correlación encontrada.

La contribución de la carga a la irreversibilidad puede explicarse en términos de repulsiones electrostáticas. La presencia de muchas cargas aumentaría la probabilidad de repulsiones entre ellas, esto podría dificultar la formación de intermediarios cinéticos o termodinámicos *in vitro*, el cual es un medio de características muy distintas al ambiente celular (rico en ligandos, con maquinaria que asiste el plegamiento, biomoléculas, etc), en donde estas proteínas son plegadas. La importancia de la hidrofobicidad en la reversibilidad resulta menos clara, incluso puede ser que sólo se correlacione negativamente con la carga promedio y no con procesos de desnaturalización irreversibles, lo cual resulta lógico ya que los aminoácidos con carga a pH fisiológico, son los menos hidrofóbicos.





Gráfica 16. Correlación negativa entre carga e hidrofobicidad promedio de 284 TIMs. Se distinguen las TIMs que han sido desnaturizadas por HCl-Gdn y cuyas transiciones son ○ irreversibles (TmTIM y PfTIM) ó □ reversibles (BsTIM, LmTIM, rTIM, ScTIM, TbTIM y TcTIM).

## 6.- CONCLUSIONES

### Hipótesis 1. Nula

El PGA tiene un efecto exclusivamente cinético en el replegamiento de las enzimas TbTIM silvestre y sus mutantes C126+ y C14+, la reversibilidad total permanece igual en presencia de este análogo del estado de transición.

### Hipótesis 2. Verdadera

La energética del replegamiento fue calculada para la TbTIM silvestre y las mutantes. Ninguna de las dos mutaciones dobles produjo enzimas más estables en asociación o plegamiento en relación con la silvestre.

En ambas mutantes el paso de asociación se desestabiliza más que el paso de plegamiento.

El reemplazo de la cisteína 126 (en la mutante C14+) afecta en mayor medida la asociación de los monómeros que la sustitución de la cisteína 14 en la interfase.

La sustitución de la cisteína 14 en la interfase (en la mutante C126+), disminuye la estabilidad del monómero.

### Hipótesis 3. Nula

En las secuencias de aminoácidos de TIMs reportadas en el banco de datos del GenBank, existe una correlación negativa entre carga e hidrofobicidad promedio.

Las TIMs cuyas vías de plegamiento se ajustan a un proceso de dos estados (*B. stearothermophilus*, *L. mexicana* y conejo) no presentan mayor carga y menor hidrofobicidad promedio, que aquellas que presentan intermediarios estables.

Las TIMs cuya estructura primaria tengan promedios de carga alta e hidrofobicidad baja, presentarán transiciones de desnaturalización por HCl-Gdn irreversibles debido a la formación de agregados.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Voet, D. y Voet J.G., Biochemistry, 3ª Edición, Ed. Wiley, 2004.
2. Konermann, L. *Protein Unfolding and Denaturants*. ELS
3. Creighton, T.E., Proteins, 2ª Edición, Ed. Freeman, 2002
4. Jaenicke R, Lilie H. (2000). Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv Protein Chem.* 53:329-401
5. Bowie JU, Sauer RT. (1989). Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer. *Biochemistry.* 5;28(18):7139-43
6. Uversky, V. (2002). Cracking the folding code. Why do some proteins adopt partially folded conformations, whereas other don't?. *FEBS letters.* 514(2-3):181-3
7. Creighton, T.E (Editor)., Protein Folding, Ed. Freeman, 1992
8. Alber, T., Sun, D.P., Nye, J.A., Muchmore, D. C., y Matthews, B. W. (1987). Temperature-sensitive mutations of bacteriophage T4 lysozyme occur at sites with low mobility and low solvent accessibility in the folded protein. *Biochemistry* 26, 3745-3758
9. Shortle, D., y Lin, B. (1985). Genetic analysis of staphylococcal nuclease: identification of three intragenic "global" suppressors of nuclease-minus mutations. *Genetics.* 110,539-555
10. Hampsey, D. M., Dast, G., y Sherman, F. (1988). Yeast iso-I-cytochrome c: Genetic analysis of structural requirements. *FEBS Lett.* 231, 275-283
11. Kursula I, Wierenga RK. (2003). Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J Biol Chem.* 278(11):9544-51.
12. Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. y Ringe. (1991). Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry.* 30,5821-5826.
13. Williams, J. C, y McDermott, A. E. (1995). Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry.* 34, 8309-8319

14. Harris, T. K., Cole, R. N., Comer, F. I., y Mildvan, A. S. (1998). Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*. 37, 16828-16838.
15. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gomez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Perez-Montfort R, Gomez-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*. 1;253(3):684-91.
16. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. y Goraj, K. (1996). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441-456
17. Mainfroid, V., Mande, S., Hol, W., Martial, J. y Goraj, K. (1996). Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry*. 35, 4110-4117
18. Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Conia, R., Saab-Rincón, G. y Pérez-Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 117-129
19. Nájera, H., Costas, M., y Fernandez-Velasco D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* 370, 785-792
20. Moreau VH, Rietveld AW, Ferreira ST. (2003). Persistent conformational heterogeneity of triosephosphate isomerase: separation and characterization of conformational isomers in solution. *Biochemistry*. 42(50):14831-7
21. Pan H, Raza AS, Smith DL. (2004). Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol.* 336(5):1251-63

22. Schagger H, von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166(2):368-79.
23. Lambeir AM, Backmann J, Ruiz-Sanz J, Filimonov V, Nielsen JE, Kursula I, Norledge BV, Wierenga RK. (2000). The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur J Biochem.* 267(9):2516-24.
24. Morgan CJ, Wilkins DK, Smith LJ, Kawata Y, Dobson CM. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J Mol Biol.* 30;300(1):11-6
25. Beaucamp N, Hofmann A, Kellerer B, Jaenicke R. (1997). Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Sci.* 6(10):2159-65.
26. Chanez-Cardenas ME, Perez-Hernandez G, Sanchez-Rebollar BG, Costas M, Vazquez-Contreras E. (2005). Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry.* 16;44(32):10883-92.
27. Gokhale RS, Ray SS, Balaram H, 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.* 5;38(1):423-31.
28. Chanez-Cardenas ME y Vazquez-Contreras E., *Rev. Soc. Quim. Mex.* 46, 219-222
29. Jelesarov I., Bosshard, H. R., *Thermodynamics and Kinetics of Protein Folding*, Lecture Course in Protein Biophysics
30. Kyte J. y Doolittle RF. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157(1):105-32.
31. Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. P., Callens, M., Noble, M. E., Opperdoes, F. R., Michels, P. A., y Wierenga, R. K. (1993). Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in

- Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur.J. Biochem.* 211, 703–710.
32. Andrade, M.A., P. Chacón, J.J. Merelo and F. Morán. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Prot. Eng.* 6, 383-390
  33. Merelo, J.J., M.A. Andrade, A. Prieto and F. Morán. (1994). Proteinotopic feature maps. *Neurocomputing.* 6, 443-454
  34. Segel, I. H., Biochemical Calculations, 2ª Edición, Ed. Wiley
  35. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC.(1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85