



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE DESPLEGAMIENTO

DE LA TIM DE *Schizosaccharomyces pombe*

CON CLORURO DE GUANIDINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P r e s e n t a :

Q.F.B. ALMA JESSICA DÍAZ SALAZAR

ASESOR: DRA. GEORGINA GARZA RAMOS MARTÍNEZ

LABORATORIO DE FISCOQUÍMICA E INGENIERIA DE PROTEÍNAS.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

Marzo 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Físicoquímica de Proteínas del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez.

JURADO

PRESIDENTE	Dr. Armando Gómez Puyou
VOCAL	Dr. Juan Luis Rendón Gómez
SECRETARIO	Dr. Hugo Nájera Peña
SUPLENTE	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
SUPLETE	Dr. Enrique García Hernández

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN.....	iv
I. MARCO TEÓRICO	1
A. Proteínas y su estructura	1
1. Estabilidad de la estructura proteica.....	3
B. Plegamiento de proteínas	6
1. Modelos de plegamiento.....	8
2. Métodos para analizar el plegamiento de las proteínas	11
a. Fluorescencia en proteínas.....	12
1) Apagamiento de la fluorescencia.....	15
b. Desnaturalizantes	16
C. Triosafosfato isomerasa.....	18
1. Plegamiento de la TIM.....	20
D. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
II. OBJETIVOS.....	25
A. General.....	25
B. Particulares	25
III. METODOLOGÍA	25
A. Purificación de SpTIM	25
B. Determinación de la actividad de la TIM	26
C. Espectroscopia de fluorescencia	27
D. Experimentos de desnaturalización y renaturalización	27
1. Desnaturalización	27
2. Renaturalización	28
E. Experimentos para encontrar las condiciones de equilibrio	28
1. Desnaturalización	28
2. Renaturalización	29
F. Transiciones de desplegamiento térmico	29
G. Cinéticas de plegamiento y desplegamiento	30
IV. RESULTADOS	31

A. Purificación de <i>SpTIMwt</i>	31
B. Propiedades catalíticas de <i>SpTIMwt</i>	31
C. Experimentos de desnaturalización y renaturalización	32
1. Desnaturalización	32
2. Renaturalización	34
D. Experimentos para encontrar las condiciones de equilibrio	35
1. Desnaturalización	35
a. Datos normalizados	38
2. Renaturalización	40
E. Histéresis.....	44
F. Cinéticas de plegamiento y desplegamiento	46
G. Ajuste de datos al equilibrio	48
H. Transiciones de desplegamiento térmico.....	50
I. <i>SpTIM</i> vs <i>ScTIM</i>	51
V. DISCUSIÓN	53
VI. CONCLUSIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

Las proteínas adquieren su estructura tridimensional nativa en un proceso llamado plegamiento, en el cual, cada secuencia particular adopta la conformación nativa o de mínima energía. El plegamiento ha sido estudiado con mayor detalle en proteínas monoméricas. No obstante, la mayoría de las proteínas requieren asociarse a otras proteínas para alcanzar el estado nativo. Este proceso de oligomerización es regla, más que excepción. Todas las enzimas de la vía glucolítica son multiméricas, de éstas, la enzima Triosafosfato isomerasa (TIM) es un dímero formado por subunidades idénticas que catalizan la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato. Las proteínas homodiméricas son el modelo oligomérico más sencillo para estudios de plegamiento y asociación. Sin embargo, las vías de desnaturalización al equilibrio que han sido reportadas para la TIM de distintas especies, son diferentes en complejidad, van desde un proceso de dos estados a reacciones multiestado que involucran la presencia de uno o más intermediarios hasta la agregación de la proteína. Esto es interesante debido a que todas las TIMs poseen la misma estructura básica, barril $(\beta/\alpha)_8$, y el nivel de conservación de aminoácidos es relativamente alto.

En este trabajo caracterizamos la desnaturalización/renaturalización de la TIM de *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp*TIM), inducida por cloruro de guanidina; se monitorearon los cambios en la fluorescencia intrínseca así como la actividad catalítica. Tanto las transiciones de desnaturalización como las de renaturalización se ajustaron a un modelo concertado de dos estados; $N_2 \rightleftharpoons 2D$, en el cual sólo son detectables los estados nativo dimérico y desplegado monomérico. No obstante, las transiciones de desnaturalización y renaturalización se presentan a diferentes concentraciones de cloruro de guanidina esto es, existe una marcada histéresis. Para la *Sp*TIM la histéresis puede ser resultado de una barrera cinética muy grande entre el dímero nativo y los monómeros desplegados en cualquiera de los dos sentidos, desnaturalización y renaturalización. El valor de la constante de velocidad de primer orden de la disociación de la *Sp*TIM en H_2O es de $6.333 \times 10^{-11} s^{-1}$ correspondiendo a una vida media de aproximadamente 500 años, lo que sugiere que la enzima tiene una gran estabilidad cinética.

I. MARCO TEÓRICO

A. Proteínas y su estructura

Las proteínas se encuentran en todos los sistemas biológicos y cada organismo posee una gran variedad de ellas. Son secuencias lineales de L-aminoácidos (Fig. 1) unidos a través de enlaces peptídicos (Fig. 2); con algunas excepciones, todas están formadas a partir de los mismos 20 aminoácidos. Esta secuencia lineal de aminoácidos está determinada exclusivamente por la información contenida en el ADN, es única para cada proteína y se le conoce como estructura primaria (Voet 2004).

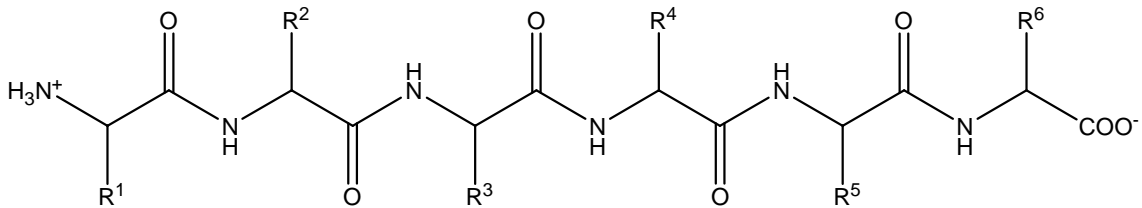


Figura 1. Estructura primaria de una proteína

En cuanto al enlace peptídico, éste es covalente, se da mediante la unión entre el grupo carboxilo del aminoácido n y el amino del aminoácido $n+1$, con la eliminación de una molécula de agua. El enlace peptídico (C-N) tiene un carácter parcial de doble enlace, es rígido y plano por lo que no existe rotación a su alrededor (Horton et al. 2002) (Fig. 2).

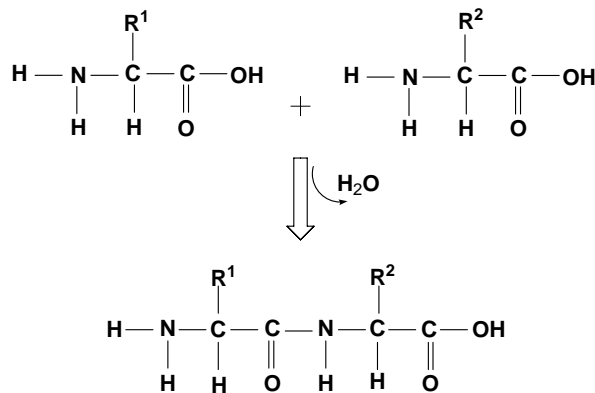


Figura 2. Formación del enlace peptídico.

La cadena polipeptídica puede plegarse en estructuras regulares repetitivas, hojas β o hélices α , ambos patrones de plegamiento son conocidos como la estructura secundaria (Fig. 3). Las hélices α , están formadas por regiones de entre seis a 30 residuos de longitud y 3.6 aminoácidos por vuelta. Para los polipéptidos constituidos por L-aminoácidos se tiene que la hélice α es dextrógira. Cada oxígeno carbonílico del residuo n está unido por puente de hidrógeno al nitrógeno α -amino del residuo $n+4$ (en la dirección convencional de amino \rightarrow carboxilo terminal). Los átomos de N, O e H de los puentes de hidrógeno son colineales, formando uniones que son casi paralelas al eje longitudinal de la hélice. Todas las cadenas laterales de los residuos aminoácidos apuntan hacia fuera del cilindro de la hélice minimizando en esta forma la interferencia estérica (Voet 2004).

La hoja β se encuentra formada por cadenas polipeptídicas extendidas, denominadas hebras β las cuales están estabilizadas por puentes de hidrógeno entre los oxígenos carbonílicos e hidrógenos amídicos. Estos enlaces pueden unir a dos o más cadenas polipeptídicas adyacentes o a segmentos diferentes de la misma cadena. Los puentes de hidrógeno de la hoja β son casi perpendiculares al eje longitudinal de las hebras β , las cuales pueden ser paralelas (que corren en la misma dirección N- a C- terminal), o antiparalelas (que corren en la dirección opuesta). La hoja β no es absolutamente plana, sino un poco plegada debido a los ángulos de los enlaces peptídicos (Fig. 3). Las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos apuntan de modo alternativo hacia arriba y hacia abajo de la hoja (Voet 2004).

El siguiente nivel estructural, estructura terciaria, se refiere al ordenamiento espacial de todos los residuos de aminoácidos de la secuencia lineal, así como el patrón de los enlaces disulfuro. Está determinado principalmente por el empaquetamiento de las estructuras secundarias, las cuales se encuentran en diferentes proporciones y se combinan de manera diferente para formar una o más unidades llamadas dominios (Voet 2004) (Fig. 3).

Las estructuras terciarias de las proteínas solubles en agua tienen un interior formado predominantemente por aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y una superficie formada principalmente por aminoácidos hidrofílicos que interactúan con el entorno acuoso.

Por último, muchas proteínas están formadas de dos o más cadenas polipeptídicas llamadas subunidades o monómeros, las cuales pueden tener una secuencia de aminoácidos idéntica o diferente. La estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento espacial de tales subunidades y a la naturaleza de sus contactos mutuos (Berg et al. 2003).

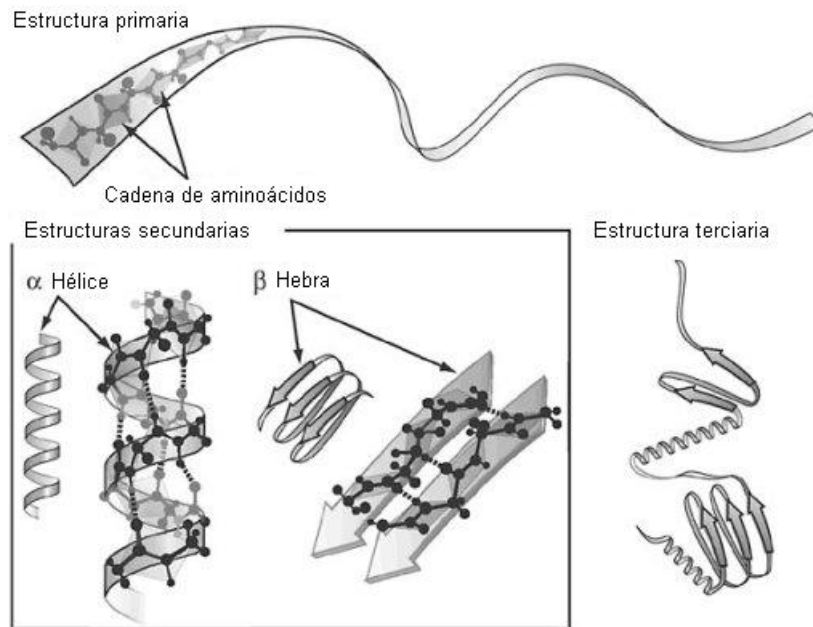


Figura 3. Niveles de estructura de las proteínas. La secuencia lineal de los residuos aminoácidos define la estructura primaria. La estructura secundaria consiste en conformaciones que se repiten regularmente en la cadena peptídica, como las hélices α y hebras β . La estructura terciaria se refiere al empaquetamiento de las estructuras secundarias (Tomado de http://bifi.unizar.es/research/complexm_fundphysics/ssue/ssue.php).

1. Estabilidad de la estructura proteica

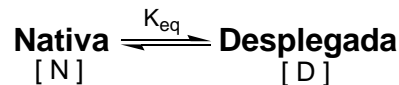
La estabilidad de una proteína es la tendencia a mantener su conformación nativa, este estado corresponde a la conformación en la cual la energía libre de Gibbs es la menor. Por otro lado, el estado desplegado representa la energía libre mínima bajo condiciones desnaturalizantes.

Hay dos aspectos diferentes en la estabilidad de las proteínas. Uno es la estabilidad química de la estructura, la cual involucra cambios covalentes y es usualmente irreversible. El otro es la estabilidad conformacional del estado plegado en ausencia de cambios covalentes.

Las mediciones de estabilidad conformacional requieren determinar la constante de equilibrio (K_{eq}) y con ello el cambio de energía libre para la reacción $N \rightleftharpoons D$. Estos experimentos algunas veces revelan características adicionales, tales como la existencia de dominios o la presencia de intermediarios estables del plegamiento.

El estado plegado nativo tiene una estructura bien definida estabilizada por varias interacciones no covalentes, particularmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, en tanto que en el estado desplegado se presentan conformaciones abiertas y expuestas al solvente, sin o con muy poca estructura residual.

Las transiciones entre el estado plegado y el desplegado de algunas proteínas son altamente cooperativas, siguen un mecanismo de dos estados que involucra únicamente el estado nativo y el desplegado, presentándose sólo una transición.



La constante de equilibrio para esta reacción está dada por la ecuación 1, donde [D] y [N] son las concentraciones de la proteína desplegada y nativa, respectivamente, al equilibrio.

$$K_{eq} = [D] / [N] \quad (1)$$

La estabilidad del estado nativo está determinada por la diferencia de energía libre entre los estados N y D, de acuerdo a la ecuación 2.

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq} \quad (2)$$

En ausencia de desnaturizantes, el desplegamiento es endergónico; con el incremento de la concentración de desnaturizante la estabilidad de la proteína disminuye, haciéndose exergónica la reacción de desplegamiento. Bajo estas condiciones la proteína puede preferir adoptar el estado desplegado.

El estado desplegado tiene una elevada entropía (elevada fluctuación estructural) y alta energía, por lo que las interacciones son poco estables, mientras el estado nativo tiene entropía baja (bien estructurado) y baja energía; esto hace que las interacciones sean estables. Estas interacciones son del tipo no covalente como

las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Aunque también hay algunas de tipo covalente como los enlaces disulfuro.

El estado desplegado tiene una gran entropía conformacional debido a que el número de conformaciones diferentes que puede tomar una cadena polipeptídica es enorme. En contraste, el espacio conformacional accesible al estado nativo es relativamente pequeño. De esta manera, el cambio de entropía conformacional del desplegamiento es positivo, lo cual favorece el equilibrio hacia el estado desplegado.

En el estado nativo mucha de la contribución de entropía desfavorable se compensa por las interacciones entálpicas, tales como puentes de hidrógeno y varias interacciones electrostáticas en la proteína. Las contribuciones entrópicas del agua a los alrededores de la proteína también se deben de tomar en cuenta. En el estado desplegado, numerosas cadenas laterales hidrofóbicas son expuestas al agua. El movimiento de las moléculas de agua alrededor de estas cadenas laterales está muy restringido, lo cual lleva a una contribución entrópica desfavorable del solvente en el estado desplegado. En la estructura nativa dicho efecto es mínimo debido a que muchas de las cadenas hidrofóbicas se encuentran en el interior de la proteína, y porque el área accesible al solvente en el estado nativo es menor.

El balance global de lo anterior resulta en una pequeña diferencia en la energía libre entre los estados N y D: $\Delta G_{\text{desp}} = 5 - 10 \text{ kcal mol}^{-1}$; la magnitud de este valor depende de la proteína particular en la cual se evalúe.

El ΔG° tiene contribuciones tanto entálpicas como entrópicas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (3)$$

Donde ΔH° y ΔS° representan respectivamente el cambio de entalpía y entropía para los estados N y D.

De todo lo anterior, se ha concluido que la estabilidad de una proteína nativa refleja un delicado balance que involucra numerosos factores tanto de naturaleza entrópica como entálpica, dando como resultado que las proteínas nativas sean marginalmente estables. Cambios relativamente pequeños en el ambiente de la proteína pueden afectar significativamente la estabilidad de su estado nativo (*Konerman 2004*).

A partir de esto se ha propuesto que el proceso de plegamiento se puede ver, termodinámicamente, como un embudo de energía libre (Fig. 4). Los estados no plegados tienen una entropía conformacional alta y una energía libre relativamente elevada. A medida que avanza el plegamiento, el estrechamiento del embudo representa una disminución de las especies conformacionales presentes. Las pequeñas depresiones en las caras del embudo de energía libre son intermediarios semiestables que pueden disminuir la velocidad del plegamiento momentáneamente. En el fondo del embudo el conjunto de intermediarios del plegamiento se reducen a una única conformación nativa (Nelson y Cox 2005).

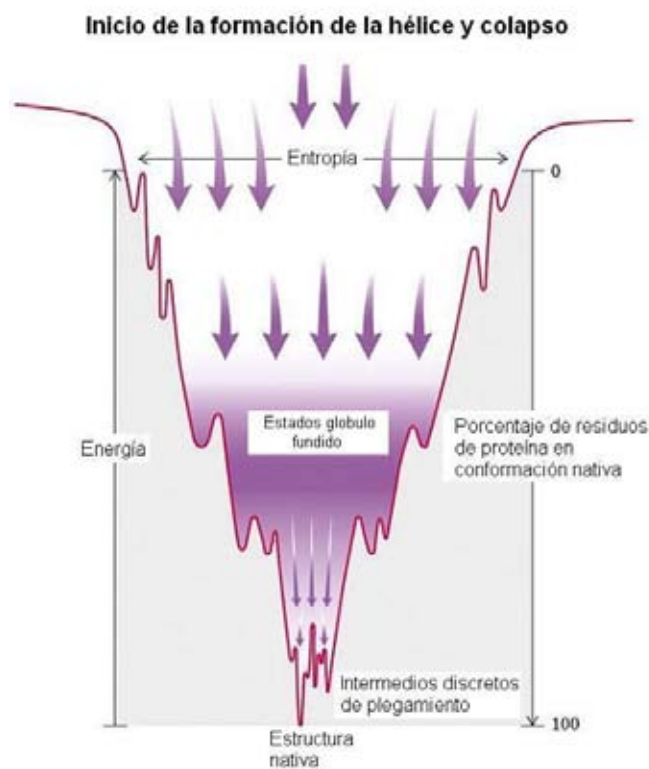


Figura 4. Embudo de energía libre. Cuando una proteína se pliega se mueve como en un embudo, donde el diámetro del embudo da idea de la entropía de la cadena y la profundidad determina la energética del sistema (Tomado de Nelson y Cox 2005).

B. Plegamiento de proteínas

Las proteínas tienen una función química o estructural específica, así como una estructura tridimensional única (Cozzone 2002). Su función está estrechamente vinculada a su estructura y pueden adoptar un número ilimitado de conformaciones.

Las posibles conformaciones de una proteína incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. De las numerosas conformaciones que teóricamente puede tomar, hay una o unas pocas que predominan en condiciones biológicas. La que es termodinámicamente más estable y que se encuentra en su conformación funcional plegada se denomina estructura nativa (*Nelson y Cox 2005*).

Para comprender cómo funciona una proteína es necesario conocer los tipos de movimientos internos que puede y debe experimentar a fin de llevar a cabo su función biológica y cómo consigue alcanzar su estructura nativa. En cuanto a este último punto se sabe que las proteínas se pliegan espontáneamente a través de un conjunto ordenado de pasos, adoptando sus conformaciones nativas en condiciones fisiológicas y que la estructura primaria de una proteína dicta la estructura tridimensional de la misma (*Levinthal 1968, Anfinsen 1973*).

Los trabajos de Christian Anfinsen con la ribonucleasa y la paradoja de Cyrus Levinthal, sentaron las bases para llegar a este conocimiento. A partir de ellos se dio inicio a una serie de investigaciones que pretendieron conocer la naturaleza exacta de los mecanismos involucrados en el plegamiento de proteínas.

A partir de experimentos sobre plegamiento realizados *in vitro*, se ha encontrado que algunas proteínas pueden desplegarse reversiblemente y otras no. Esto se puede deber a que: 1) la proteína desplegada o parcialmente plegada se agrega antes o durante el proceso de plegamiento. Esta irreversibilidad generalmente se presenta porque la cadena peptídica desplegada es poco soluble en las soluciones acuosas; además, la irreversibilidad aumenta si la proteína está formada por diferentes dominios o subunidades y 2) la proteína sufre modificaciones post-transcripcionales, alterando elementos esenciales para el plegamiento (*Berg et al. 2003*).

El plegamiento *in vivo* de muchas proteínas se produce con la colaboración de un grupo de moléculas que se denominan chaperonas moleculares, las cuales evitan la agregación que se podría presentar en el ambiente intracelular debido a que las concentraciones de proteína son relativamente elevadas, por lo que la exposición de superficie hidrofóbica en los estados desnaturalizados e intermediarios provocarían

la agregación. Incluso las proteínas pequeñas que se pueden plegar rápidamente, se podrían agregar a altas concentraciones sin la presencia de las chaperonas (*McKee 2003*).

Las chaperonas moleculares ayudan a la proteína en varios pasos del plegamiento y pueden unirse a diferentes estados, incluyendo cadenas polipeptídicas desplegadas o parcialmente plegadas previniendo la agregación. Las chaperonas también pueden desplegar proteínas mal plegadas para replegarlas correctamente.

Aún no se comprende en su totalidad el mecanismo exacto del plegamiento asistido por chaperonas, pero algunos de los detalles ya han sido elucidados.

Se estima que únicamente el 10% de las proteínas presentes en la célula requieren chaperonas moleculares para plegarse, y de hecho su plegamiento *in vitro* puede ser retardado por la presencia de chaperonas debido a que la chaperona puede unirse preferentemente al estado desnaturalizado (*Berg et al. 2003*).

Dilucidar las reglas que gobiernan todo este proceso tiene relevancia desde el punto de vista físico, bioquímico y médico, ya que se ha encontrado que diversas enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Huntington y Creutzfeldt-Jakob entre otras están relacionadas con el plegamiento “no convencional” de alguna proteína, por lo que una mayor comprensión acerca del plegamiento de las proteínas puede conducir a nuevas terapias para este tipo de enfermedades (*Daggett y Fersht 2003*).

1. Modelos de plegamiento

Muchas proteínas realizan sus funciones únicamente si se encuentran en una conformación plegada específica y estable. Durante varios años se ha tratado de determinar cómo ocurre el plegamiento, además de caracterizar los cambios estructurales típicos que lo acompañan y las interacciones que gobiernan estos cambios. El primer paso para resolver esta interrogante lo dio Christian Anfinsen, realizando experimentos de desnaturalización con la enzima ribonucleasa; la trató con mercaptoetanol y urea concentrada, encontrando que la preparación perdía toda su actividad enzimática. Cuando removió la urea y el mercaptoetanol la proteína

recuperaba su actividad enzimática normal. Las moléculas de ribonucleasa activa que se habían replegado a partir de la proteína desnaturalizada fueron indistinguibles, estructural y funcionalmente, de las moléculas presentes al inicio del experimento. De sus observaciones concluyó que la secuencia lineal de aminoácidos contenía toda la información requerida para alcanzar la conformación polipeptídica tridimensional (*Anfinsen 1973*).

Posteriormente, Cyrus Levinthal planteó que una proteína no podría explorar al azar todas las conformaciones posibles hasta caer eventualmente en la correcta. Partiendo de la suposición de que los $2n$ ángulos de torsión ϕ y ψ de una proteína con n residuos tienen cada uno tres conformaciones estables, calculó un total de $3^{2n} \approx 10^n$ conformaciones posibles para la proteína. En el caso de que una proteína pudiera explorar conformaciones nuevas a la velocidad a la que los enlaces simples pueden reorientarse, se encontrarían 10^{13} conformaciones por segundo. Se puede entonces calcular el tiempo, t , en segundos, que se necesita para que una proteína explore todas las conformaciones que puede adoptar:

$$t = 10^n / 10^{13}$$

Para una proteína bastante pequeña, de $n = 100$ residuos, $t = 10^{87}$ s, que es inmensamente mayor que la edad aparente del universo. Es obvio que aún a una proteína muy pequeña le llevaría mucho tiempo llegar a su conformación nativa si tuviera que explorar todas las conformaciones posibles, y en realidad lo hacen en muy poco tiempo, por lo que debe plegarse por alguna clase de ruta ordenada en la que la aproximación al estado nativo va acompañada de un incremento de la estabilidad de la conformación (*Berg et al. 2003*).

A partir de estas bases se han propuesto varios modelos que podrían explicar la ruta de plegamiento. Uno de ellos es el modelo de nucleación (Fig. 5), el cual propone que la estructura terciaria se propaga rápidamente a partir de un núcleo inicial. En este modelo no se consideran intermediarios (*Wetlaufer 1990*).

Otro de los modelos propone que una proteína puede plegarse a través de varios intermediarios. En cada intermediario van aumentando los elementos de estructura secundaria que conformarán la proteína nativa. A esta propuesta se le conoce como el modelo de armazón (Fig. 5) (*Ptitsyn 1994*). Los conceptos para este

modelo han sido refinados y las hipótesis han sido cada vez más precisas. En este modelo se establece que la proteína tiene tres estados de desarrollo en el proceso para formar su estructura tridimensional final. Inicialmente se forman los elementos locales de estructura secundaria, seguidos por un patrón de plegamiento global o estructura terciaria. Finalmente se establecen las interacciones que hacen que la estructura sea rígida y fija. Estas interacciones locales entre átomos y la existencia intermediarios es necesaria, de lo contrario puede presentarse anticipadamente un intermediario llamado glóbulo fundido, el cual es un polipéptido en un estado globular parcialmente organizado que se pliega y asemeja al estado nativo de la molécula. Este modelo implica que el código de plegamiento está contenido en cada residuo de aminoácido y las interacciones locales que hace con sus vecinos inmediatos. Otro refinamiento es el modelo de difusión-colisión; éste sugiere que los elementos de estructura secundaria pueden difundir hasta que colisionan con éxito, se adhieren y dan origen a la estructura terciaria (*Wedemeyer y Scheraga 2001*).

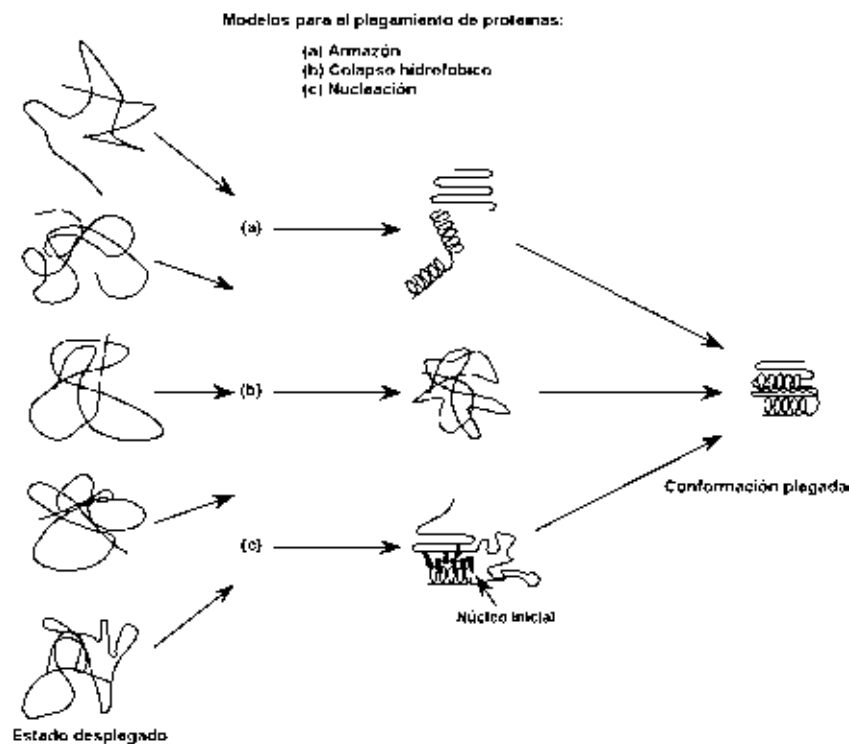


Figura 5. Modelos para el plegamiento de proteínas. (Tomado de <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Fold-Scheme.gif>).

Por otro lado Dill, (*Dill 1985*) propone el modelo de colapso hidrofóbico (Fig 5). En este se ha propuesto que interacciones no locales entre átomos hidrofóbicos distantes en la secuencia se colapsan, lo cual da origen al estado plegado final. El código de plegamiento reside en los patrones globales de interacciones no locales específicas, las cuales se originan del rearrreglo de residuos polares y no polares en la secuencia. Las interacciones hidrofóbicas se compactan y forman un centro no polar. El colapso ayuda a la formación de estructura secundaria debido a que la compactación induce la estabilización de las interacciones de puentes de hidrógeno (*Wedemeyer y Scheraga 2001*).

2. Métodos para analizar el plegamiento de las proteínas

Para empezar a entender el plegamiento de una proteína es importante caracterizar a fondo su vía de plegamiento. Ésta involucra una caracterización detallada (estructural y energética) de todas las especies que se encuentran en la vía.

La estructura tridimensional de las proteínas nativas se puede determinar usando cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Las técnicas de RMN heteronuclear multidimensional se han usado para caracterizar los estados desnaturalizados de muchas proteínas pequeñas (*Voet 2004*).

Los métodos espectroscópicos son los elegidos para investigar cambios en el comportamiento de una proteína bajo diferentes condiciones. Se usan para determinar la estabilidad de la proteína y seguir las transiciones estructurales, también para comparar las propiedades de moléculas relacionadas con la proteína de interés (homólogas o con mutaciones) (*Creighton 1997*).

Los intermediarios y los estados de transición se pueden caracterizar por diversos métodos biofísicos. La estructura en el estado de transición no se puede determinar directamente, sólo puede ser inferida de manera indirecta por el estudio de cinéticas de desplegamiento/replegamiento. Para caracterizar la vía de plegamiento en su totalidad es necesario realizar experimentos de desnaturalización/renaturalización bajo condiciones de equilibrio; este tipo de

experimentos se pueden seguir por diferentes métodos, uno de ellos es aprovechando la fluorescencia intrínseca que presentan las proteínas debido a la presencia de (triptofano) Trp y (tirosina) Tyr en su estructura. En estos experimentos se monitorea el cambio en la fluorescencia en función de la concentración algún desnaturizante. También se puede observar la unión no covalente de algunas moléculas fluorescentes –como el ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico (ANS)- con la proteína (fluorescencia extrínseca) (*Creighton 1997*).

Los procesos de plegamiento y desnaturización también pueden ser monitoreados usando espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Esta técnica es muy útil porque al medir la asimetría del ambiente de los enlaces peptídicos o de los aminoácidos aromáticos, se pueden detectar cambios en la estructura secundaria y estructura terciaria de la proteína. En el UV cercano (250-320 nm) el DC detecta la estructura terciaria y en el lejano (200-250 nm) detecta la estructura secundaria (*Creighton 1997*).

a. Fluorescencia en proteínas

La luminiscencia es la emisión de luz por alguna sustancia y ocurre por estados electrónicamente excitados. Se divide en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado, lo que determina la velocidad de emisión, que para la fluorescencia es típicamente de 10^{-8} s (vida media 10 ns) y para la fosforescencia es de milisegundos a segundos. Estos procesos se ilustran con el diagrama de Jablonski (Fig. 6), el cual muestra que el estado fluorescente de una entidad molecular es el estado excitado más bajo desde el cual tiene lugar la transición al estado fundamental, mientras que el estado fosforescente es un estado metaestable por debajo del estado fluorescente, que tiene transiciones no radiantes. En los casos más habituales, el estado fluorescente es el estado excitado singulete de menor energía, el estado fosforescente es el estado triplete de menor energía, y el estado fundamental es un singulete (*Lakowicz 1999*).

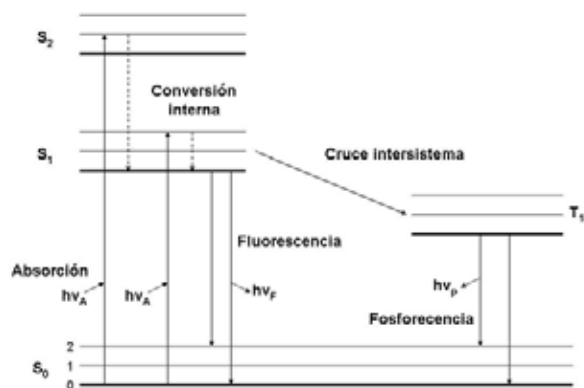


Figura 6. Diagrama de Jablonski. El nivel fundamental singulete y estados electrónicos secundarios se representan como S₀, S₁ y S₂ respectivamente, mientras que el nivel electrónico triplete se representa por T. Los fluoróforos pueden existir en cada uno de estos niveles electrónicos en un determinado nivel de energía vibracional, etiquetado por 0, 1, 2, etc. Las líneas verticales son las transiciones entre los estados que ilustran la naturaleza instantánea de la absorción de luz (transiciones radiativas), las líneas discontinuas indican las transiciones no radiativas.

Entonces, el fenómeno de fluorescencia involucra la excitación de una molécula a altos niveles de energía (por absorción de luz); cuando la molécula se relaja (es decir, regresa a su estado basal) el exceso de energía es liberado con la emisión de un fotón. La intensidad de fluorescencia depende del cociente entre el número de fotones absorbidos por número de fotones emitidos.

Otro de los fenómenos que ilustra el diagrama de Jablonski es el de la conversión interna. Éste se presenta en moléculas que se encuentran en fases condensadas, las cuales, después de ser excitadas, rápidamente se relajan a niveles vibracionales más bajos (en 10^{-12} s o menos); este tipo de transiciones son no radiativas, todo el proceso se lleva a cabo antes de la emisión.

Generalmente los datos de fluorescencia, se presentan como un espectro de emisión en el cual se grafica la intensidad de fluorescencia contra la longitud de onda. Estos varían ampliamente y son dependientes de la estructura química del fluoróforo y del solvente en el cual está disuelto (*Creighton 1997*).

La emisión de fluorescencia es más sensible a cambios en el ambiente del fluoróforo que a la luz que absorbe. Como el tiempo de vida del estado excitado es largo, una gran cantidad de interacciones o perturbaciones pueden influir su estado y, con esto, el espectro de emisión. Por esto, la fluorescencia es una excelente

manera de monitorear los cambios conformacionales de las proteínas (Lakowicz 1999).

La fluorescencia que presentan las proteínas se debe a los aminoácidos que tienen anillos aromáticos: Phe (fenilalanina), Tyr y Trp (Fig.7). En proteínas que contienen los tres aminoácidos la mayor contribución de la fluorescencia se debe a los residuos de Trp.

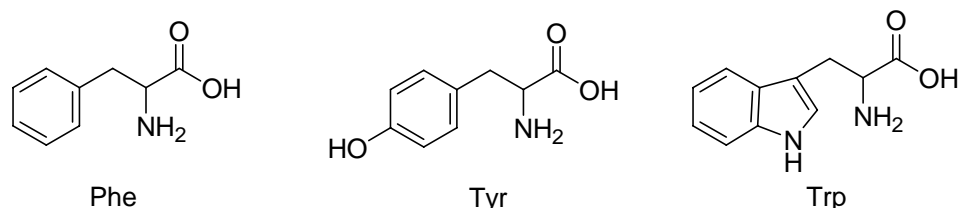


Figura 7. La fluorescencia de las proteínas se da por la presencia de los residuos Phe, Tyr y Trp.

La Phe absorbe y emite a longitudes de onda menores que la Tyr y el Trp. Emite con un máximo cercano a 282 nm. La emisión de Tyr en agua ocurre a 303 nm y es relativamente insensible a la polaridad del solvente; la del Trp está alrededor de 350 nm y es muy dependiente de la polaridad y/o el ambiente local.

En las mediciones de fluorescencia de proteínas, generalmente se excita a longitudes de onda de 280 nm o mayores. A esta longitud de onda no se excita la Phe, por lo que la absorción de las proteínas a 280 nm se debe a la Tyr y el Trp. A longitudes de onda de 295 nm, la absorción se debe principalmente al Trp. La fluorescencia del Trp puede ser selectivamente excitada entre 295-305 nm, evitando así la excitación de las tirosinas. Se observan cambios en el espectro de emisión del Trp en respuesta a transiciones conformacionales de la proteína, asociación de subunidades, unión de sustratos o desnaturalización, ya que todas estas situaciones pueden afectar el ambiente alrededor del Trp. En proteínas que lo contienen, al presentarse el desplegamiento se observan cambios, tanto en la longitud de onda máxima como en la intensidad de fluorescencia. La emisión del Trp en una proteína nativa puede ser mayor o menor que la emisión del Trp libre en solución acuosa, por lo que en la intensidad de fluorescencia pueden ocurrir tanto incrementos como decrementos cuando la proteína se despliega; además, el máximo de emisión

generalmente se corre a longitudes de onda mayores (cerca de 350 nm), esta longitud de onda corresponde a la fluorescencia máxima del Trp en solución (*Lakowicz 1999*).

El máximo de emisión y la eficiencia cuántica del Trp pueden variar ampliamente, dependiendo de la estructura tridimensional de la proteína en la que se encuentra. Como ya se había mencionado, el espectro de emisión del Trp refleja el ambiente en el que se encuentra. Cuando el Trp se encuentra en un ambiente hidrofóbico, como el interior de una proteína plegada, la emisión de los Trp se lleva a cabo a longitudes de onda menores (λ_{max} de 320 nm, emisión característica del indol en ciclohexano) que la que ocurre cuando estos residuos se exponen al solvente (350 nm corresponde a la λ_{max} del Trp cuando está en una solución acuosa) (*Lakowicz 1999*).

Otra característica importante del Trp es que es sensible al apagamiento de la fluorescencia debido a la tendencia del indol a donar electrones mientras se encuentra en el estado excitado.

Resulta complicado interpretar la fluorescencia de una proteína que posee varios aminoácidos fluorescentes. Considerando que el ambiente de cada aminoácido es distinto, las propiedades que presentará cada residuo serán en general diferentes. En caso de que la proteína presente varios Trp, los espectros de emisión de los residuos se superponen, haciendo difícil separar la contribución de cada uno de ellos (*Lakowicz 1999*).

1) Apagamiento de la fluorescencia

El apagamiento de la fluorescencia se refiere a la disminución de la intensidad de fluorescencia de una muestra debido a que se presentan interacciones moleculares como: reacciones de estado excitado, rearrreglos moleculares, transferencia de energía o formación de complejos en el estado basal. En general, se encuentran dos tipos de apagamiento, el colisional o dinámico y el estático; en ambos el apagamiento resulta del contacto entre el apagador y el fluoróforo. En el

apagamiento colisional, el apagador sólo está en contacto con el fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado, mientras que en el estático se forma un complejo entre el fluoróforo y el apagador (no fluorescente). Por otra parte, el apagamiento también se puede presentar por las propiedades ópticas de la muestra, ya sea por densidades altas o turbidez.

Este fenómeno da información muy valiosa acerca de los sistemas bioquímicos debido a las interacciones moleculares que se presentan durante el apagamiento; pueden revelar la accesibilidad de los fluoróforos a los apagadores, la localización de fluoróforos en proteínas; la velocidad del apagamiento colisional puede usarse además para determinar el coeficiente de difusión del apagador.

Una gran variedad de sustancias actúan como apagadores de la fluorescencia, uno de los apagadores colisionales más conocidos y que funciona en la mayoría de fluoróforos es el oxígeno molecular. En la tabla 1 se indican los apagadores de los fluoróforos de las proteínas (*Lakowicz 1999*).

Tabla 1. Apagadores de fluorescencia

Fluoróforo	Apagador
Triptófano	Acrilamida, halógenos (anestésicos), peróxido de hidrógeno, imidazol, histidina, ioduro, succinamida, trifluoroacetamida, grupos carboxilo, dimetilformamida
Tirosina	Disulfuros

b. Desnaturalizantes

En el estudio del proceso de plegamiento de una proteína, es común el uso de desnaturalizantes para llevar a la proteína de su estado nativo al desplegado.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas nativas son entidades marginalmente estables en las condiciones fisiológicas, por lo que son muy

susceptibles a la desnaturalización al alterarse el equilibrio de las fuerzas débiles que mantienen la conformación nativa. Son dos los principales mecanismos por los cuales los desnaturalizantes inducen el desplegamiento: 1) por interacciones directas con la proteína y 2) por cambios en las propiedades del solvente (agua) (*Konerman 2004*).

Factores como aumento o disminución de la temperatura, presión elevada, las variaciones de pH a extremos ácidos o alcalinos, los detergentes, las concentraciones elevadas de sustancias orgánicas solubles en el agua y la influencia de sales, tales como el cloruro de guanidina (GdnHCl) y la urea (agentes caotrópicos) (Fig.8), desestabilizan la estructura nativa de la proteína e inducen su desnaturalización.

La urea y el GdnHCl son los desnaturalizantes químicos de mayor uso. Generalmente se requieren concentraciones elevadas del desnaturalizante -8 M de urea y 6 M de GdnHCl- para que una proteína se desnaturalice. Estas concentraciones producen una solvatación preferencial del estado desnaturalizado; sin embargo, los efectos que producen en las proteínas son variados. La urea y el GdnHCl tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el esqueleto polipeptídico así como con las cadenas laterales de los residuos, provocando disturbios en la red interna de puentes de hidrógeno de la proteína. La característica más importante de estos desnaturalizantes parece ser su habilidad para incrementar la solubilidad, tanto de las cadenas laterales polares como de las no polares. Al parecer tienen potencial para reducir la magnitud del efecto hidrofóbico. La urea y el GdnHCl disminuyen cerca de un tercio las interacciones desfavorables de las cadenas laterales hidrofóbicas con el agua (*Konerman 2004*). Esto es, las soluciones acuosas de estos desnaturalizantes son mejores solventes para la cadena polipeptídica que sólo el agua. Bajo tales condiciones la tendencia a adoptar una estructura plegada en la cual muchos de los residuos permanecen sin contacto con el solvente está menos favorecida, con lo que las proteínas incrementan su área de superficie accesible (*Konerman 2004*).

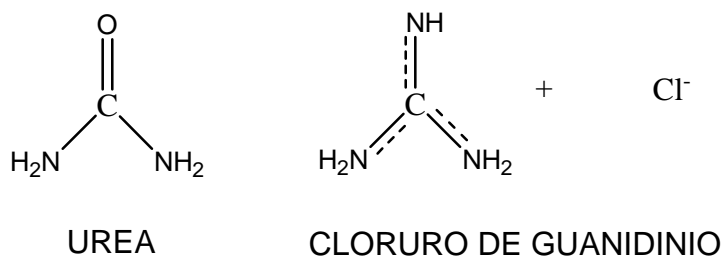


Figura 8. Estructura de la urea y GdnHCl.

C. Triosafosfato Isomerasa

Nuestro principal objeto de estudio para el análisis detallado de las rutas de plegamiento, es la enzima Triosafosfato isomerasa (TIM).

La TIM participa en la vía glucolítica, cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P), siendo este último el único que continúa en la vía, por lo que la reacción que cataliza esta enzima determina en gran parte la eficiencia de la glucólisis (*Nelson y Cox 2005*). Se estableció que *in vivo* los pasos limitantes de la velocidad de reacción en la que participa son la unión de sustrato y la liberación de producto controlados por la difusión (*Blacklow et al. 1988, Knowles 1991*).

La TIM estudiada en diferentes especies, es un homodímero de subunidades idénticas; a excepción de la de organismos termófilos, en los que es un tetrámero (*Maes et al. 1999, Walden et al. 2001*). Cada monómero está formado por alrededor de 250 residuos. El peso molecular de cada monómero es de 20 a 27 kDa, mientras que el peso molecular del dímero es cerca de 53 kDa (*Noltman 1972, Straus et al. 1985*). Sólo el dímero es catalíticamente activo, los monómeros por sí solos son inactivos (*Waley 1973, Zabori et al. 1980*) y se asocian a través de interacciones no covalentes para formar un homodímero con una alta constante de asociación. Se ha propuesto que los monómeros son termodinámicamente inestables, pero al ensamblarse inducen una estabilidad conformacional máxima (*Mainfroid et al. 1996*). Aunado a esta explicación, también se ha argumentado que la dimerización es necesaria para optimizar la geometría del sitio activo (*Schliebs et al. 1997*). Cada

monómero tiene su sitio activo (Fig. 9a), que está conformado por los residuos Lys12, His95 y Glu165 (Fig. 9b).

La TIM pertenece a la clase de proteínas barril (β/α)₈, que es una de las arquitecturas moleculares más recurrentes y de mayor diversidad funcional en la naturaleza (Farber y Petsko 1990). Cada monómero está estructurado en ocho hebras β paralelas alternando con ocho hélices α unidas por asas. Este tipo de dominio se encuentra en alrededor del 10% de enzimas cuya estructura es conocida (Reardon y Farber 1995). A la fecha se han depositado las coordenadas cristalográficas de 19 TIMs provenientes de diferentes organismos, y todas presentan estructuras tridimensionales similares.

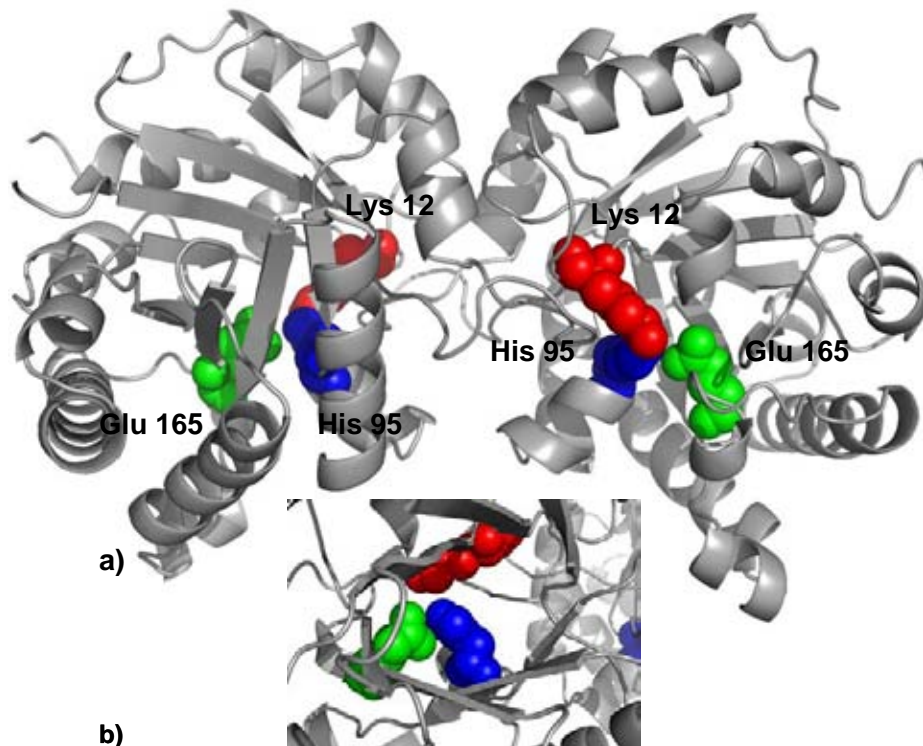


Figura 9. Modelo estructural de la SpTIM, obtenido con el programa Modeller a partir de las coordenadas cristalográficas de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 1NEY). a) Dímero de SpTIM que muestra el sitio activo con el clásico motivo barril- β/α ; b) triada catalítica formada por los residuos: Lys12, His95 y Glu165. Imágenes generadas con el programa Pymol (<http://www.pymol.org>).

1. Plegamiento de la TIM

Los estudios de plegamiento de proteínas están relacionados con la termodinámica, la cinética y la caracterización estructural de la proteína nativa, desplegada y los estados intermediarios. Las transiciones en el desplegamiento inducido por urea, GdnHCl, temperatura o presión se han utilizado para estimar la estabilidad conformacional de las proteínas. Cabe mencionar que un requerimiento necesario para el análisis termodinámico del proceso de plegamiento es que la reacción sea reversible.

Muchos de los estudios de desnaturalización se han realizado con proteínas monoméricas, ya que las oligoméricas tienen procesos de desnaturalización más complejos y en ocasiones se presenta agregación de la proteína, lo que lleva a la irreversibilidad parcial o total del proceso. Homodímeros como lo es la TIM son los modelos más simples de proteínas oligoméricas. La vía de desnaturalización de esta proteína ha sido descrita para varios organismos (Tabla 2).

Las vías de desnaturalización que han sido reportadas son diferentes en complejidad, abarcando desde un proceso de dos estados hasta reacciones multiestado que involucran agregación de proteína. Esto es interesante debido a que todas las TIMs poseen la misma estructura tridimensional básica y el nivel de conservación de aminoácidos es alto. Algunos estudios indican que las vías de plegamiento de proteínas homólogas son similares (*Hollecker y Creighton 1983*). Sin embargo, existen ejemplos de proteínas homólogas cuya vía de desplegamiento no sigue el mismo patrón (*Plaxco et al. 1997*).

Generalmente los estudios de estabilidad de la TIM se han realizado en la dirección $N \rightarrow D$, pero en el caso de ScTIM se efectuó la caracterización energética en el sentido $D \rightarrow N$ (*Nájera y Fernández-Velasco 2003*). En dicho trabajo se encontró que los experimentos de desplegamiento no alcanzan el equilibrio, debido a que el proceso de disociación y/o desplegamiento es muy lento. En el caso del plegamiento, sí se alcanza el equilibrio, encontrándose que el proceso se ajusta a un modelo de tres estados en el que participa un intermediario monomérico expandido e inactivo.

Se reportó un ΔG° plegamiento de -3.96 kcal/mol y un ΔG° asociación de -16.8 ± 1.1 kcal/mol (Nájera y Fernández-Velasco 2003).

Tabla 2. Estudios de desnaturalización de la TIM de diferentes especies inducida por GdnHCl (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005)

Especie ^a	Condiciones de equilibrio ^b	Rev ^c	Vía de desnaturalización ^d	C _{1/2} ^e	ΔG° (kcal/mol)	Referencia
BsTIM	24 / 25 / 8	✓	$N_2 \rightarrow 2D$	nr ^f	24.2	Mainfroid 1996
rTIM	72 / 25 / 7.4 24 / 0 / 6.8	✓	$N_2 \rightleftharpoons 2D$	0.55	17.0	Rietveld 1998 Moreau 2003
LmTIM	12 / 20 / 7.5	✓	$N_2 \rightleftharpoons 2D$	nr	19.7	Lambeir 2000
hTIM ^g	24/25/8	✓	$N_2 \rightleftharpoons 2D$	nr	19.3	Mainfroid 1996
ScTIM	24 / 25 / 7.4 24 / 25 / 7.2	✓	$N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$	1.2	24.7	Nájera 2003 Morgan 2000
TmTIM	48/variable/8	-	$N_2 \rightarrow A \rightarrow 2D$	3.5	-	Beaucamp 1997
PfTIM	1 / nr / 8	-	$N_2 \rightarrow N_2^* \rightarrow A \rightarrow 2D$	nr	-	Gokhale 1999
TbTIM	48 / 25 / 7.4	-	$N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$ A ↑ A ↑	1.1 2.2	-	Chávez-Cárdenas 2002
	72 / 23 / 7.4	✓	$2D \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons N$	1	20.2	h
TcTIM	48 / 25 / 7.4	✓	$N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$	1.2 2.4	25.3	Chávez-Cárdenas 2005

^a BsTIM *Bacillus stearothermophilus*, TmTIM *Thermotoga maritima*, rTIM conejo, PfTIM *Plasmodium falciparum*, ScTIM *Saccharomyces cerevisiae*, LmTIM *Leishmania mexicana*, TbTIM *Trypanosoma brucei*, TcTIM *Trypanosoma cruzi*, hTIM *Homo sapiens*.

^b Tiempo (horas) / temperatura (°C) / pH

^c Reversibilidad.

^d N₂ es el dímero nativo, N₂* dímero no nativo, M monómero plegado, D monómero desplegado.

^e C_{1/2} es la concentración de desnaturalizante en el punto medio de la transición.

^f No reportada.

^g La desnaturalización se realizó con urea.

^h Proyecto de doctorado de IBB Valeria Guzmán Luna.

D. *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) es una especie de levadura que fue aislada por primera vez de una cerveza africana en 1893. Su nombre “pombe”

significa cerveza en el idioma Swahili. En regiones subtropicales también ha sido aislada de fermentaciones que contienen azúcar.

En el 2002 se publicó la secuencia completa de su genoma, el cual está formado por tres cromosomas donde se distribuyen 4,800 genes (*Wood et al. 2002*). Es un hongo unicelular con forma de bastón, mide normalmente de 3 a 4 μm de diámetro y de 7 a 14 μm de longitud. Se divide por fisión binaria y produce dos células de igual tamaño.

Es un organismo ampliamente utilizado como modelo de estudio en procesos eucarióticos, tales como el control del ciclo celular, mitosis y meiosis, reparación del DNA y recombinación, “splicing” y los controles importantes para la estabilidad del genoma. *S. pombe* tiene el genoma más pequeño de todos los eucariotas analizados hasta la fecha, pero comparte muchos procesos con las células eucariotas superiores; por lo tanto su proteoma tiene valor para los estudios funcionales y comparativos de dichos procesos. La clasificación científica es la siguiente:

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Schizosaccharomycetes
Orden	Schizosaccharomycetales
Familia	Schizosaccharomycetaceae
Género	Schizosaccharomyces
Especie	<i>S. pombe</i>
Nombre binomial	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

En este trabajo el modelo de estudio fue la TIM de *S. pombe*. Esta levadura produce etanol, por lo que es un organismo con un alto nivel de actividad glucolítica; cerca del 2% de la proteína total soluble es TIM (*Forsburg 2005*). En nuestro laboratorio se clonó el gen de la TIM de *S. pombe*, se secuenció completamente y se sobreexpresó con éxito. Se ha montado el protocolo de purificación de la proteína y se ha realizado su caracterización cinética (Fig. 10: TIM Sp 2005). La secuencia de

aminoácidos de la *Sp*TIM comparte un 56% de similitud con la de *Sc*TIM (Fig.10: TIM Sc).

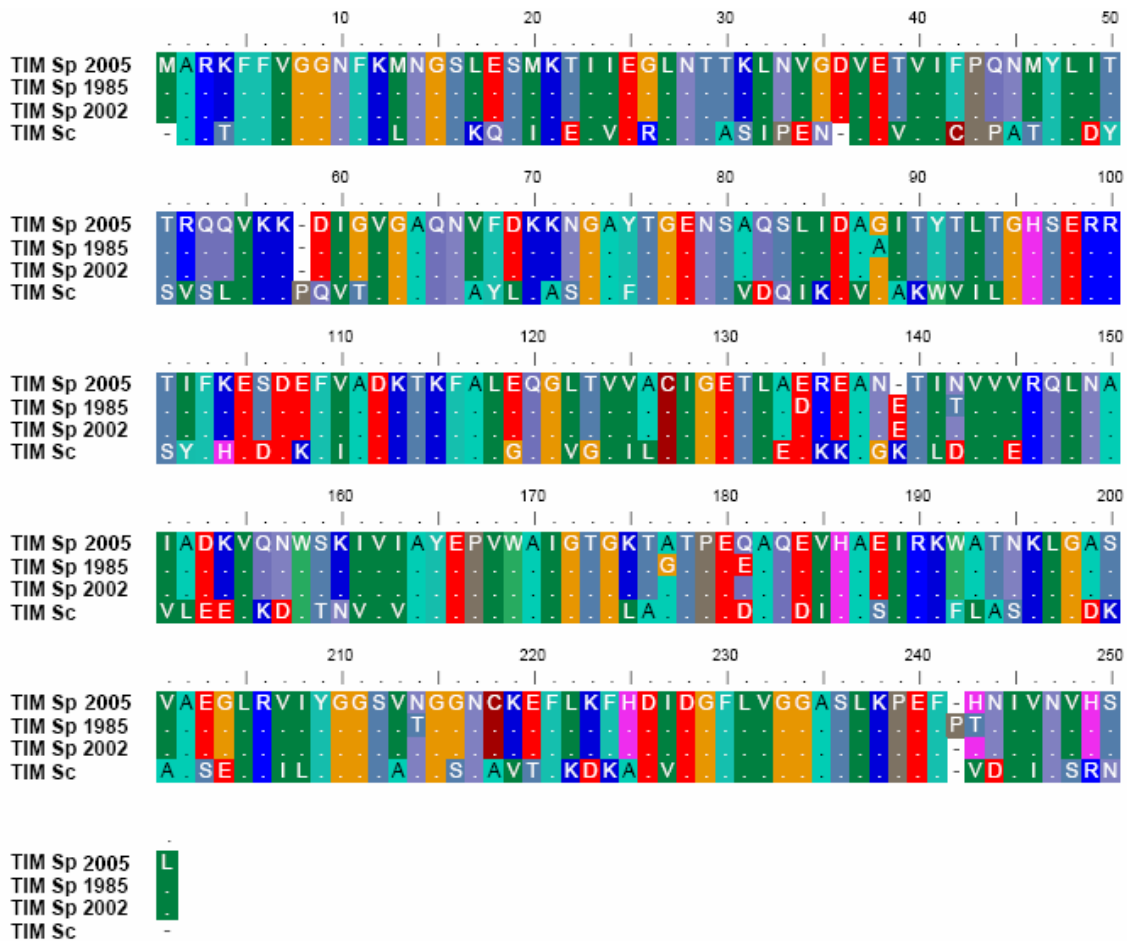


Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *S. pombe*. La primera secuencia se obtuvo en el laboratorio como proyecto de tesis de licenciatura de Ma. Elisa Ramírez Escalona (TIM Sp 2005) y es la secuencia con la que se trabajó. La segunda fue obtenida por Russell en 1985 (Russell 1985) y la tercera es la obtenida a partir de la secuencia completa del genoma (Wood et al. 2002). Por último se tiene la de *S. cerevisiae* (Lolis et al. 1990).

Al comparar el genoma de *S. pombe* con el de *S. cerevisiae*, se identificaron cientos de genes que aparecen en el genoma de *S. pombe* y no en el de *S. cerevisiae*. Esto se puede deber a que a pesar de que ambos organismos son levaduras, estas dos especies son evolutivamente muy distintas una de la otra, se han estimado más de 1000 millones de años de divergencia de su ancestro común. Entre las diferencias se puede encontrar que:

- ✓ *S. cerevisiae* tiene alrededor de 5600 marcos de lectura, mientras que *S. pombe* tiene alrededor de 4800.

- ✓ *S. cerevisiae* tiene 16 cromosomas, *S. pombe* tiene 3.
- ✓ *S. cerevisiae* usualmente es diploide mientras que *S. pombe* usualmente es haploide.
- ✓ Durante el ciclo celular, *S. cerevisiae* dura la mayor parte del tiempo en la fase G1 mientras que *S. pombe* usualmente está en la fase G2.

Las diferencias, así como las similitudes entre ambos organismos, hacen que estos sean modelos experimentales complementarios (*Forsburg 2005*), por lo que se pretende comparar los resultados que se obtengan de la caracterización del plegamiento de la TIM de *S. pombe* con lo reportado para la TIM de *S. cerevisiae*.

II. OBJETIVOS

A. General

Caracterizar el patrón de plegamiento de la *SpTIM*.

B. Particulares

- a) Obtener condiciones de reversibilidad del proceso de desplegamiento inducido por GdnHCl.
- b) Obtener el patrón de desplegamiento y replegamiento de la *SpTIM* por cambios en la fluorescencia y actividad catalítica inducidos por GdnHCl.
- c) Obtener los parámetros termodinámicos del plegamiento de la *SpTIM*.
- d) Comparar el proceso de disociación y desnaturalización de *SpTIM* con el de la TIM de *S. cerevisiae*.

III. METODOLOGÍA

A. Purificación de SpTIM

Las células de *Escherichia coli* de la cepa BL21, transformadas con los genes silvestres, se crecieron en placas de medio Luria Bertani (LB)-agar-kanamicina. A partir de una de estas colonias se realizó un precultivo en medio líquido LB complementado con kanamicina, el cual se incubó a 37°C durante toda la noche.

El precultivo se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm. El botón que se obtuvo de la centrifugación se resuspendió en 1 mL de medio LB kanamicina; con éste, se inoculó 1 L del mismo medio, agregando poco a poco hasta que la D.O.₆₀₀ fue de 0.1. Se dejó crecer a 37°C con agitación constante hasta que se alcanzó la fase de crecimiento exponencial del cultivo, D.O.₆₀₀ ≈ 0.5-0.6.

La sobreproducción de la proteína se promovió con la adición del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). El cultivo se mantuvo por 12 horas a 30°C con agitación constante. Las células de este cultivo se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis.

Las células resuspendidas en amortiguador de lisis se rompieron por sonicación. Las células fragmentadas (extracto total) se centrifugaron a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido de esta manera, se volvió a centrifugar para posteriormente realizar la precipitación con sulfato de amonio al 35%, lo cual se centrifugó, el sobrenadante resultante se llevo a 65% de sulfato de amonio y se volvió a centrifugar, éste último sobrenadante finalmente se llevo a 90% de sulfato de amonio y se centrifugó. El precipitado que se obtuvo se resuspendió en 3 ml de amortiguador (TEA 10mM, EDTA 1mM, DTT 1mM pH 7.6) y se dializó en 500 mL del mismo amortiguador.

La muestra dializada se inyectó a una columna de exclusión molecular (Sephacryl S-300) controlada por un equipo de FPLC. Posteriormente se pasó por una columna de intercambio iónico (Mono Q) a pH 7.6 y después nuevamente con la misma columna pero a pH 8. En cada una de las fracciones que se obtuvo, se cuantificó la proteína en un espectrofotómetro a 280 nm y se midió la actividad

catalítica. Las fracciones con mayor actividad y pureza se juntaron y concentraron para su caracterización posterior.

Para cada paso, el grado de pureza de la proteína se determinó por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida al 16 % en condiciones desnaturizantes, teñidos con azul de Coomassie. Además se determinó la concentración de proteína en cada paso mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) para valorar el rendimiento de la purificación.

B. Determinación de la actividad de la TIM

La actividad de la enzima, en dirección de G3P a DHAP, se determinó con un ensayo acoplado a α -Glicerol fosfato deshidrogenasa (α -GDH), siguiendo la oxidación de NADH. El ensayo se realizó a 25° C siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm de 1 mL de mezcla de reacción, que contiene: amortiguador TEA 100 mM, EDTA 10 mM pH 7.6 (TE), 0.20 mM de NADH, 2 mM de G3P y 10 μ g de α -GDH. La reacción se inicia por la adición de 5 ng de SpTIM silvestre.

C. Espectroscopía de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro ISS PC1. La temperatura de la celda se mantuvo a 20° C. Se excitó a una longitud de onda de 280 nm y se midió la emisión en un rango de 290 a 400 nm; a cada espectro de fluorescencia se le restó el blanco correspondiente. El cambio en la fluorescencia intrínseca se siguió en las transiciones de desplegamiento y replegamiento; para ello se emplearon las muestras al equilibrio incubadas a distintas concentraciones de GdnHCl. El centro espectral de masas (CEM) se calculó de los datos de intensidad (I_λ) obtenidos a diferentes longitudes de onda (λ), usando la siguiente ecuación:

$$\text{CEM} = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$$

D. Experimentos de desnaturalización y renaturalización

Para obtener los parámetros termodinámicos asociados al proceso de plegamiento/desplegamiento, fue necesario determinar que para la SpTIM el proceso

es reversible, para lo cual, se realizaron experimentos de desnaturalización y renaturalización con GdnHCl.

En todos los experimentos se utilizó el amortiguador TED para realizar las diluciones de proteína correspondientes, éste contiene TEA 100 mM, EDTA 10 mM y DTT 1 mM a pH 7.6.

1. Desnaturalización

La SpTIM se incubó en amortiguador TED a concentraciones de 1 y 2.5 mg/mL en presencia de GdnHCl 6 y 4 M respectivamente, a una temperatura de 23°C. La desnaturalización de la proteína se siguió midiendo la actividad catalítica y la intensidad de fluorescencia (IF) a diferentes tiempos hasta alcanzar el estado desnaturalizado.

2. Renaturalización

Se incubó 1 mg/mL de SpTIM en GdnHCL 6M durante 70 minutos a 23°C, la proteína desnaturalizada se diluyó en amortiguador TED para obtener concentraciones de proteína de 5, 10 y 20 µg/mL, las cuales se incubaron a 23°C. Se midió tanto la actividad catalítica como la fluorescencia de estas muestras a diferentes tiempos.

E. Experimentos para encontrar las condiciones de equilibrio

Para estimar los parámetros termodinámicos asociados al proceso de plegamiento/desplegamiento, también es necesario determinar las condiciones de equilibrio, para ello, se siguió el progreso de las transiciones de desnaturalización y renaturalización, midiendo la actividad catalítica y fluorescencia intrínseca hasta no observar cambios en dichos parámetros con respecto al tiempo.

En todos los experimentos de desnaturalización y renaturalización se midieron, a la par de las muestras, dos controles, ambos a la concentración de proteína que se

manejó en todo el experimento, uno sin GdnHCl y el otro a la concentración de GdnHCl residual después de diluir la proteína a la concentración correspondiente.

1. Desnaturalización

Se incubaron 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.018 μM), 2 $\mu\text{g/mL}$ (0.074 μM) y 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM) de proteína en diferentes concentraciones de GdnHCl (0.12 a 6 M) a 23°C y se monitorearon los cambios en actividad catalítica e IF a diferentes tiempos.

La actividad catalítica se midió iniciando la reacción en la celda con 5 ng de proteína, para lo cual se realizaron una o dos diluciones de cada muestra para obtener dicha concentración. En cada dilución la concentración de GdnHCl se ajustó a la misma concentración de incubación para evitar el replegamiento. Las concentraciones residuales de GdnHCl (0.005-0.024 M) en la mezcla de reacción no afectan el funcionamiento de la enzima acoplante.

2. Renaturalización

Se incubó 1mg/ml de SpTIM en 6 M de GdnHCl a 23°C por 60 min, posteriormente se midió la actividad catalítica y la IF a fin de comprobar que la proteína estaba completamente desnaturalizada. A los 70 minutos se diluyó la proteína desnaturalizada a 5 $\mu\text{g/mL}$ (0.184 μM), 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM) y 40 $\mu\text{g/mL}$ (1.47 μM), se inició la renaturalización en concentraciones de GdnHCl que van de 0.03 a 6 M y una temperatura de 23°C. La actividad catalítica y la IF se determinaron en la misma forma que en los experimentos anteriores de desnaturalización.

F. Transiciones de desplegamiento térmico

Las transiciones de desplegamiento térmico se obtuvieron siguiendo los cambios de elipticidad a 222 nm. Los experimentos se realizaron a concentraciones de proteína de 0.02, 0.05 y 0.1 mg/mL en una celda de 0.1 cm de recorrido óptico en amortiguador TRIS 10 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM a pH 7.6. Para la proteína a una concentración de 0.02 mg/mL se siguió la transición de desplegamiento térmico incrementando la temperatura de la muestra a una velocidad de 1°C/min y a

0.5°C/min. Las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-715 equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de temperatura.

G. Cinéticas de plegamiento y desplegamiento

La velocidad de desnaturalización del dímero de la SpTIM hacia los monómeros desplegados se determinó siguiendo la pérdida de actividad de la proteína incubada en diferentes concentraciones de GdnHCl.

La proteína a 20 µg/mL (0.74 µM) se incubó en amortiguador TED con diferentes concentraciones de GdnHCl (3 a 4 M) a una temperatura de 23°C. La actividad se midió a diferentes tiempos.

Para determinar la constante de velocidad de primer orden, se graficaron los datos obtenidos para la pérdida de actividad de la proteína en función del tiempo y se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial ($y = y_0 + Ae^{-x/t}$), a partir de lo cual se obtuvo k para cada concentración de GdnHCl. Después se graficó el logaritmo natural, de cada una de las constantes de velocidad, en función de la concentración de GdnHCl y se realizó un ajuste lineal. Los datos se extrapolaron a 0M de GdnHCl para obtener la constante de velocidad de primer orden para la desnaturalización del dímero en condiciones nativas.

Para la reacción de desnaturalización se calculó la energía libre de activación utilizando la fórmula: $\Delta G^{++} = -RT \ln kh/k_B T$, donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, k es la constante de velocidad de primer orden, obtenida como se mencionó anteriormente, h es la constante de Planck y k_B es la constante de Boltzman.

La velocidad de renaturalización de la SpTIM, se determinó monitoreando la recuperación de la actividad a diferentes concentraciones de proteína.

Se desnaturalizó 1.5 mg/mL de SpTIM en 5.5 M de GdnHCl. La proteína así desnaturalizada, se diluyó en amortiguador TED para iniciar la renaturalización, obteniéndose concentraciones finales de proteína de 1, 5 y 20 µg/mL; todas, con una concentración residual de GdnHCl de 73 mM. Estas muestras se incubaron a 23°C y se monitoreo la actividad a diferentes tiempos hasta que la proteína recupero su actividad.

Se determinó la constante de velocidad de segundo orden para la renaturalización, graficando los datos obtenidos para la recuperación de la actividad en función del tiempo y se ajustaron a la ecuación: $y = y_0 + Ae^{-x/t}$, a partir de este ajuste, se obtuvo k para cada concentración de proteína. Después para obtener la constante de velocidad para la renaturalización se graficó la k en función de la concentración de proteína y se realizó el ajuste a la ecuación lineal.

IV. RESULTADOS

A. Purificación de SpTIMwt

En la purificación de la SpTIM se obtuvo un rendimiento de 10 mg de enzima pura/L de cultivo. En cada paso de la purificación se determinó el grado de pureza de la proteína por medio de geles de poliacrilamida en presencia de SDS, mostrando al final una sola banda con un peso molecular aproximado de 27 kDa (PM de la SpTIM 27.098 kDa).

B. Propiedades catalíticas de SpTIMwt

Se midieron las velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato para la reacción de isomerización catalizada por la TIM. La SpTIM mostró un comportamiento hiperbólico, sigue una cinética de Michaelis-Menten, a partir del ajuste a dicha ecuación se calcularon la K_M y la k_{cat} (Fig. 11).

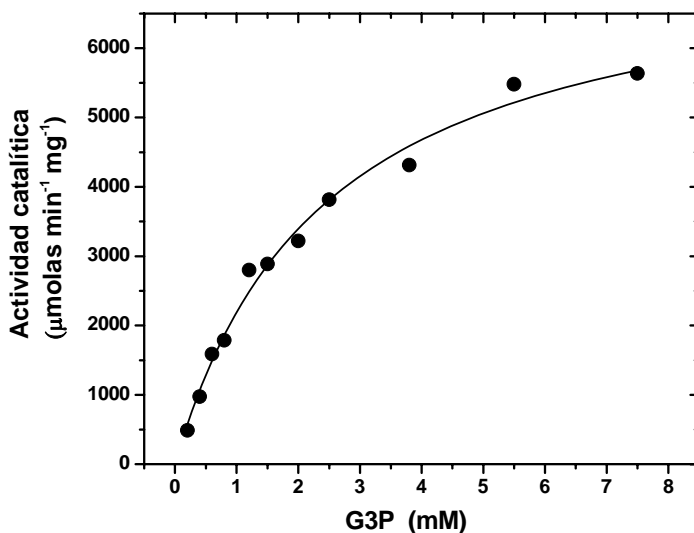


Figura 11. Parámetros cinéticos de la SpTIM. Fueron determinados a 25° C, pH 7.6 y diferentes concentraciones de G3P (0,09 – 8 mM). La K_M es de 2.4 ± 0.24 mM, la V_{max} de 7519.7 ± 336.3 $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y la k_{cat} es de $4.075 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$.

C. Experimentos de desnaturalización y renaturalización

Para obtener los parámetros termodinámicos asociados al proceso de plegamiento/desplegamiento, es necesario determinar si para la SpTIM el proceso es reversible, así como establecer las condiciones de equilibrio; para esto, se realizaron experimentos de desnaturalización y de renaturalización con GdnHCl.

1. Desnaturalización

La desnaturalización se realizó a dos concentraciones diferentes de enzima y de GdnHCl. En las gráficas de la figura 12 se observa la desnaturalización de la SpTIM a una concentración de 1 mg/mL en GdnHCl 6 M, monitoreada por la pérdida de actividad catalítica y el cambio en la fluorescencia intrínseca. La actividad se pierde completamente a partir de los 15 minutos y simultáneamente se presentan cambios en el espectro de fluorescencia. La SpTIM nativa presenta una λ_{\max} de 320 nm y un CEM de 331 nm. Para la enzima incubada en GdnHCl 6 M se observa un corrimiento de la λ_{\max} hasta 350 nm y un corrimiento en el CEM a 354.6 nm, valores que se mantienen igual a partir de los 5 minutos.

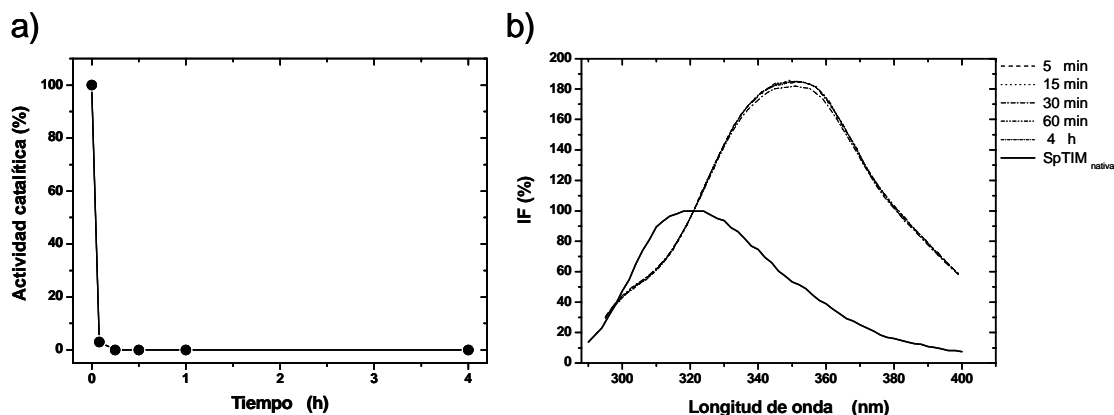


Figura 12. Desnaturalización de 1 mg/mL de SpTIM en GdnHCl 6 M seguida por mediciones de actividad catalítica (a) y fluorescencia intrínseca (b) a diferentes tiempos.

En la figura 13 se presenta la desnaturalización de la SpTIM a una concentración de 2.5 mg/mL en GdnHCl 4M. La desnaturalización es más lenta a diferencia de las condiciones anteriormente descritas. En este caso a las cuatro

horas la enzima conserva un 55% de actividad. A las 24 horas la enzima es inactiva, observándose también el corrimiento en la λ_{\max} hasta 350 nm y un CEM de 354.6 nm.

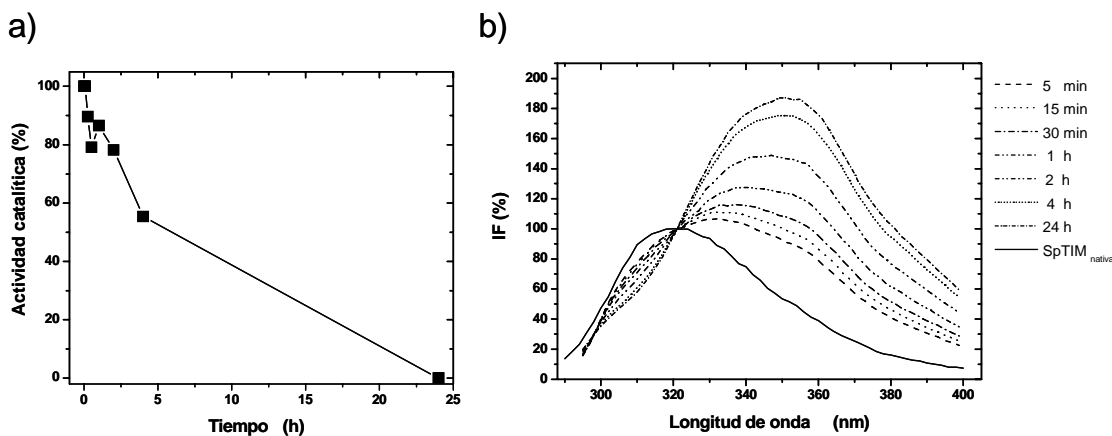


Figura 13. Desnaturalización de 2.5 mg/mL de *SpTIM* en GdnHCl 4 M seguida por mediciones de actividad catalítica (a) y fluorescencia intrínseca (b) a diferentes tiempos.

En la figura 13b, se observa que todos los espectros de fluorescencia registrados a los diferentes tiempos, para la proteína desnaturalizada, se cruzan a una misma longitud de onda con el espectro de fluorescencia de la proteína nativa, este es un punto isobéptico y generalmente su presencia es una prueba de que sólo existen dos especies principales, en este caso, esto puede ser un primer indicio de que en la desnaturalización de esta proteína no existen intermediarios.

En ambos casos la proteína desnaturalizada presenta un incremento del 80% en la IF. Esto se debe a que en la conformación nativa probablemente existe alguna interacción molecular que provoca el apagamiento de la fluorescencia.

A fin de tratar de entender que es lo que está provocando el apagamiento, se hizo un modelo estructural para la *SpTIM* a partir de las coordenadas cristalográficas de la TIM de levadura para poder realizar una revisión del ambiente de cada uno de los triptofanos, los cuales se encuentran en las posiciones 157, 168 y 191; a partir de esto se encontró que el Trp 191 podría verse afectado por la Lys 195 que se encuentra a una distancia de 5.67 Å, ya que se sabe que si un triptofano está en contacto con grupos polares o cadenas laterales cargadas puede presentar apagamiento. Estas reacciones de apagamiento intramolecular pueden ser poco

eficientes por sí mismas, pero si están lo suficientemente cerca (hasta 5Å) pueden provocar un apagamiento significativo (Lakowicz 1999).

2. Renaturalización

Se incubó 1mg/mL de SpTIM en GdnHCl 6M a 23°C durante 70 minutos. En este tiempo la enzima quedó completamente desnaturalizada, lo cuál se observa en la total inactivación de la enzima y el cambio en el CEM hasta 350 nm. Posteriormente se inició la renaturalización por dilución de la enzima a distintas concentraciones finales: 5, 10 y 20 µg/mL, manteniendo una concentración residual de GdnHCl de 120 mM en todas las muestras. Se incubaron a 23° C y se midió su actividad a diferentes tiempos. Como se puede ver en la figura 14, en las tres concentraciones se alcanzó un porcentaje de reactivación de alrededor del 80 % lo cuál nos indica que, independientemente de la concentración de proteína, cuando ésta es desnaturalizada por GdnHCl puede replegarse espontáneamente en ausencia de especies moleculares adicionales. La desnaturalización bajo las condiciones anteriormente mencionadas es reversible.

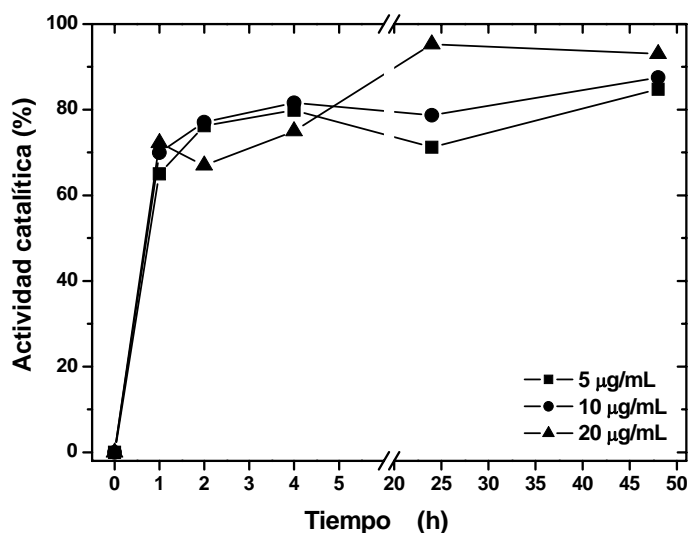


Figura 14. Renaturalización de la SpTIM. A partir de 1 mg/mL de proteína desnaturalizada en GdnHCl 6M se realizó la renaturalización a tres diferentes concentraciones de proteína; 5 µg/mL (0.184 µM) (■), 10 µg/mL (0.37 µM) (●) y 20 µg/mL (0.74 µM) (▲). La actividad de la proteína renaturalizada se midió a diferentes tiempos (1, 2, 4, 24 y 48 horas).

En la figura 15 se observa la renaturalización de *SpTIM* a 20 $\mu\text{g/mL}$ seguida por mediciones de actividad y fluorescencia. A los 30 minutos se recupera alrededor de un 70 % de actividad, que se mantiene sin cambio hasta las 4 horas. Por otro lado, los espectros de fluorescencia, en el medio de renaturalización, se mueven hacia una λ_{max} de 322 nm desde los 30 min, sin cambios hasta las 4 horas. La desnaturalización bajo las condiciones anteriormente mencionadas es reversible.

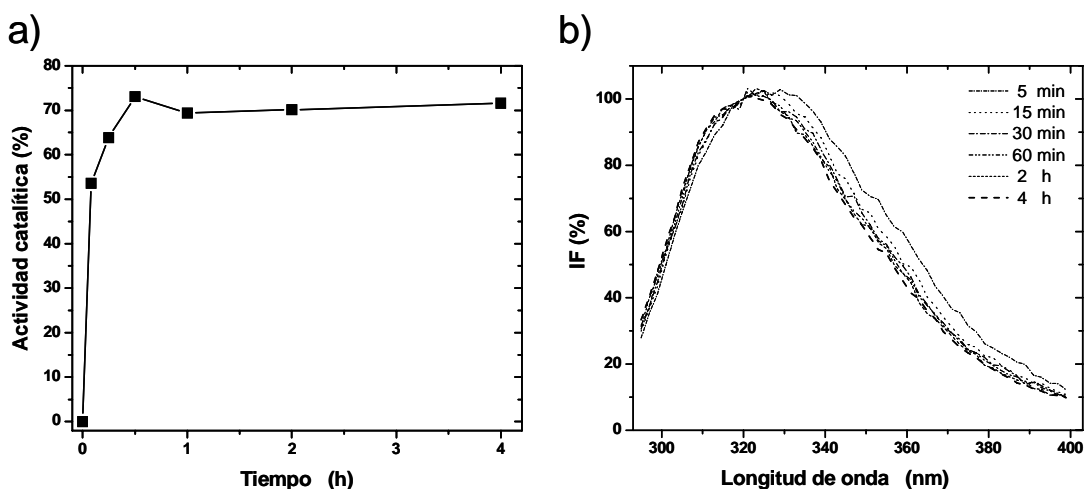


Figura 15. Renaturalización de *SpTIM* a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM). Se realizaron simultáneamente las mediciones de actividad (a) e intensidad de fluorescencia (b) a diferentes tiempos.

D. Experimentos para encontrar las condiciones de equilibrio

1. Desnaturalización

La desnaturalización fue seguida por el cambio en la actividad catalítica, $IF_{\lambda_{\text{max}}}$ y determinación del CEM. La actividad catalítica de la *SpTIM*, incubada a diferentes concentraciones de GdnHCl se observa en la figura 16a, donde se puede ver una sola transición. La actividad decae entre GdnHCl 2.25 M y 3.75 M. Las actividades en la región de transición van disminuyendo a medida que se incrementa el tiempo de incubación.

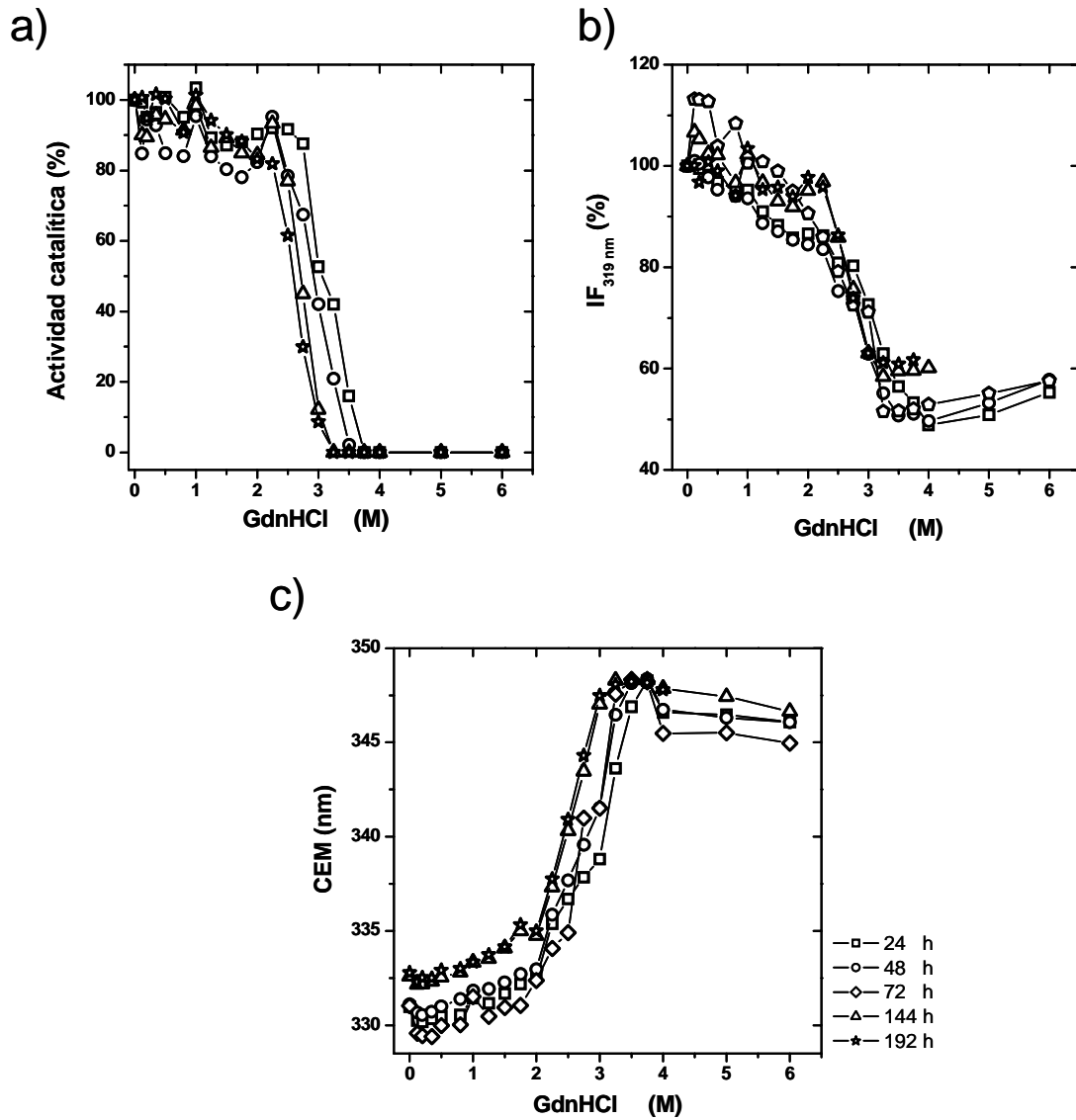


Figura 16. Desnaturalización a diferentes tiempos. Se incubó la SpTIM a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM) en diferentes concentraciones de GdnHCl (0 a 6 M). Se monitoreo el cambio en la actividad catalítica (a), IF (b) y CEM (c).

De manera simultánea se siguieron los cambios en la fluorescencia intrínseca de la SpTIM a diferentes concentraciones de GdnHCl por distintos tiempos de incubación (Fig. 16b), observándose que entre 144 y 192 horas no hay diferencias significativas en los valores de IF.

En ausencia de desnaturante el espectro de emisión de fluorescencia de la SpTIM tiene un valor de CEM de 331 nm. A concentraciones de desnaturante entre 3.75 M y 6 M el valor de CEM es de alrededor de 348 nm; es decir hay un cambio de 17 nm entre el CEM inicial y el de la TIM desnaturada (Fig. 16c), lo cual indica la exposición de los Trp al solvente.

En la figura 17 se grafican en paralelo los porcentajes de los cambios en actividad, IF y CEM después de 192 horas de incubación. Independientemente del parámetro medido, se observa en todas las gráficas una sola transición entre 2.25 M y 3.75 M de GdnHCl. En los experimentos de desnaturación reportados para otras TIMs, como las de levadura, *T. brucei* y *T. cruzi*, la actividad se pierde a concentraciones menores con respecto a las que se presenta la transición seguida por fluorescencia o cambio en los valores del CEM. Los datos obtenidos con la SpTIM indican que los cambios en actividad, IF y CEM se dan en el mismo intervalo de concentraciones. Esto sugiere que posiblemente el paso de disociación se de al mismo tiempo que el desplegamiento de los monómeros. Los valores en la transición van disminuyendo lentamente en función del tiempo de desnaturación y las diferencias se hacen mínimas entre 144 y 192 horas (tabla 3).

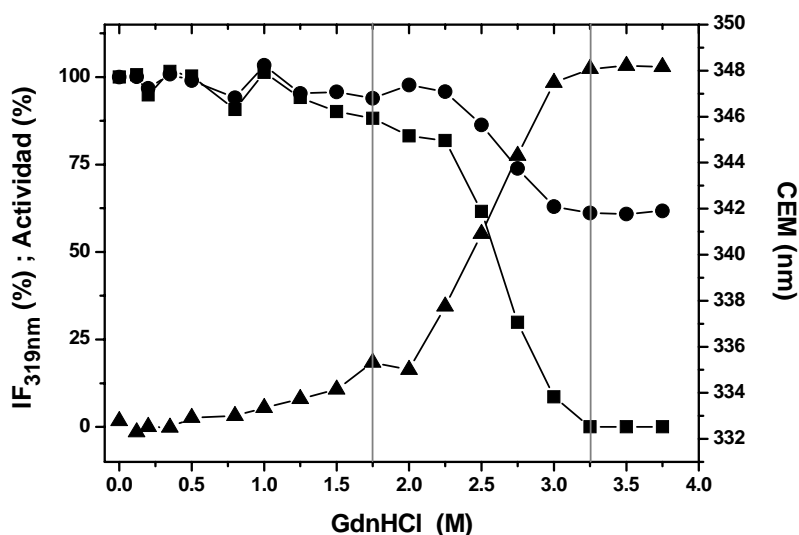


Figura 17. Experimento de desnaturación de la SpTIM. La actividad catalítica (■), la IF (●) y el CEM (▲) se monitorearon hasta las 192 horas.

Tabla 3. Valores del CEM y de los porcentajes de actividad e IF en las concentraciones de GdnHCl donde inicia y termina la transición medidos a diferentes tiempos.

	ACTIVIDAD (%)			IF _{319nm} (%)			CEM (nm)		
	GdnHCl (M)			GdnHCl (M)			GdnHCl (M)		
	2.0	3.0	3.75	2.0	3.0	3.75	2.0	3.0	3.75
24 H	90.3	52.6	0	86.6	72.7	53.3	332.5	339.0	348.3
48 H	82.3	42.0	0	84.4	63.0	51.1	333.0	341.5	348.4
144 H	84.4	12.1	0	95.1	63.0	59.6	334.8	347.0	348.3
192 H	83.2	8.6	0	97.7	63.0	61.7	335.0	347.5	348.1

a. Datos normalizados

Los resultados de los experimentos de desnaturalización (medidos a las 192 horas), seguidos por mediciones de actividad, $IF_{\lambda_{max}}$ y determinación del CEM, se normalizaron a fin de comparar entre las diferentes técnicas (Fig. 18). Los datos se ajustaron al valor de fracción nativa (f_N) cuya ecuación para un modelo de dos estados es la siguiente:

$$f_N = (y - y_D) / (y_N - y_D), \text{ donde:}$$

f_N es la fracción nativa, y_N es la contribución de la variable dependiente “y” del estado nativo y y_D es la contribución de la variable dependiente “y” del estado desnaturalizado.

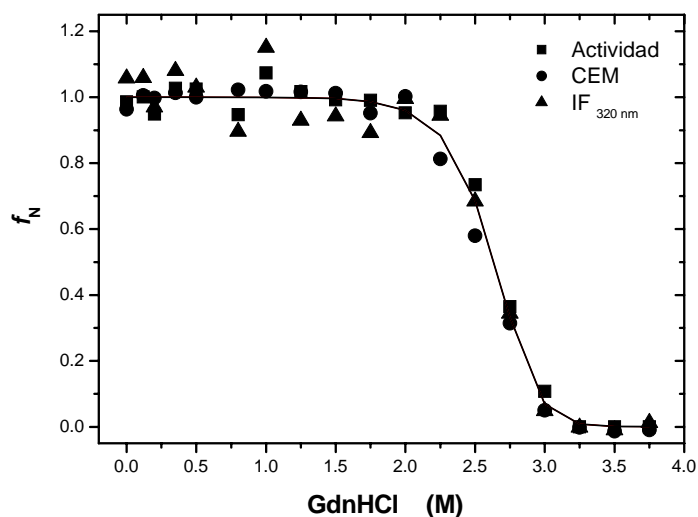


Figura 18. Datos normalizados para los experimentos de desnaturalización a 20 μ g/mL (0.74 μ M) seguidos por cambios de la actividad catalítica (■), IF a 320 nm (▲) y CEM (●) después de incubar durante 192 horas.

En la figura 18 se puede ver que el desplegamiento de la *Sp*TIM medido por diferentes métodos genera el mismo tipo de curvas, mostrando una sola transición; los datos de actividad catalítica, $IF_{\lambda_{max}}$ y CEM, se sobrepone a todas las concentraciones de GdnHCl. Se cree que el dímero nativo de la TIM es el único estado catalíticamente activo, los monómeros por si solos no tienen actividad. Por otro lado, las mediciones de fluorescencia permiten saber si hay algún cambio estructural en la proteína. Relacionando esto con el hecho de que los cambios en actividad e IF se dan de manera simultánea, se puede suponer que la disociación del dímero y el desplegamiento de los monómeros se dan en paralelo.

Los experimentos de desnaturalización también se realizaron a concentraciones menores de proteína: 0.5 y 2 μ g/mL, estos se siguieron únicamente por actividad catalítica. En la figura 19 se observan los datos normalizados para los experimentos seguidos por actividad catalítica a las tres diferentes concentraciones de proteína. La transición para 2 y 20 μ g/mL es igual ($C_{1/2} = 2.6$ M), en tanto que para 0.5 μ g/mL la transición se mueve ligeramente hacia concentraciones menores de GdnHCl ($C_{1/2} = 2.5$ M).

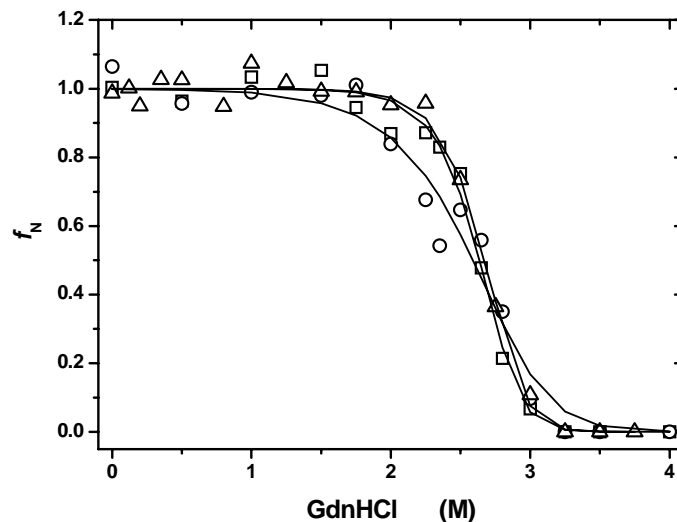


Figura 19. Desnaturalización. Datos normalizados para los experimentos N→D seguidos por actividad catalítica. La proteína se incubó a concentraciones de (○) 0.5 µg/mL (0.018 µM), (□) 2 µg/mL (0.074 µM) y (△) 20 µg/mL (0.74 µM).

2. Renaturalización

El proceso de renaturalización de la *SpTIM* se siguió con el cambio en la actividad catalítica, la $IF_{\lambda_{max}}$ y la determinación del CEM.

En la figura 20a se observan los cambios seguidos por actividad catalítica a diferentes tiempos. La actividad aparece a partir de 0.6 M de GdnHCl; nuevamente se observa una sola transición aunque ésta se presenta a concentraciones mucho menores que para el proceso de desnaturalización. En este caso va de 0.6 a 0.2 M de GdnHCl.

En la figura 20b se presentan los cambios seguidos por IF a 320 nm observándose sólo una transición. En cuanto al CEM (Fig. 20c) podemos ver que a partir de las 24 horas, prácticamente ya no se presentan cambios, se observa una sola transición que va de 1 M a 0.35 M de GdnHCl y el cambio entre el CEM inicial y el final es de 13 nm. Como se puede observar en cada una de las gráficas de la figura 20, entre las 24 y 118 horas ya no hay cambios en ninguno de los parámetros medidos.

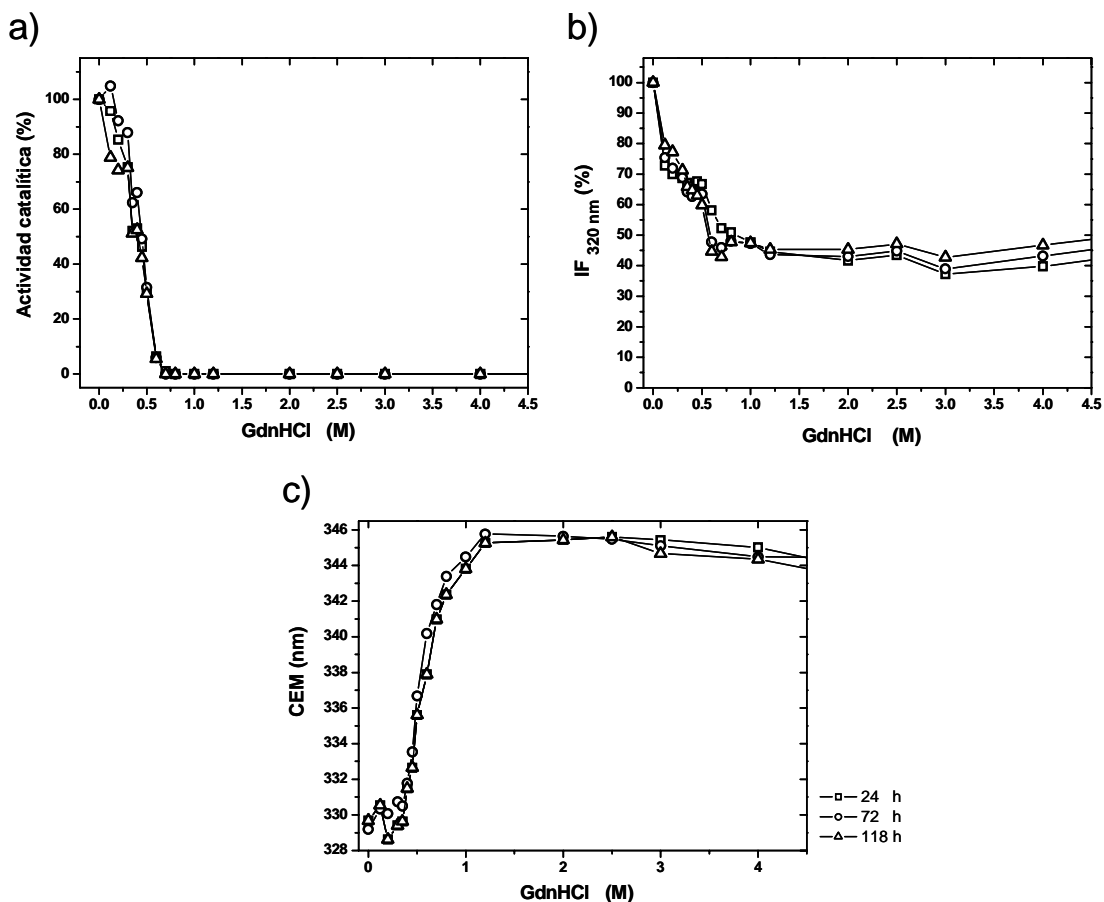


Figura 20. Renaturalización de 20 μ g/mL (0.74 μ M) de *SpTIM* en diferentes concentraciones de GdnHCl (4 a 0 M). Se siguió el cambio en la actividad catalítica, IF y CEM. Las mediciones se realizaron a las 24 (□), 72 (○) y 118 (△) horas.

Se realizó nuevamente un experimento a 20 μ g/mL, pero en este caso se manejaron más concentraciones de GdnHCl después de la transición, a fin de obtener mejores ajustes.

En la figura 21, se muestran los datos normalizados de las mediciones de actividad catalítica, $IF_{\lambda_{max}}$ y CEM con respecto a la concentración de GdnHCl. Se presenta sólo una transición que va de GdnHCl 0.55 M a 0.3 M.

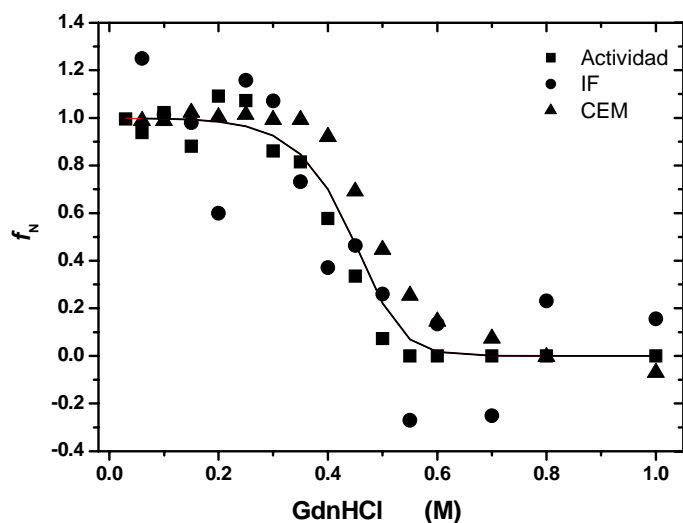


Figura 21. Datos normalizados para los experimentos de renaturalización a 20 µg/mL (0.74 µM) seguidos por actividad catalítica (■), CEM (▲) e IF (●) después de incubar por 72 horas.

Se realizaron experimentos de renaturalización a diferentes concentraciones de proteína. En la figura 22 se presentan los datos normalizados para los diferentes parámetros que se midieron a 40 µg/mL de proteína. Nuevamente se observa una sola transición desde 0.55 a 0.3 M de GdnHCl.

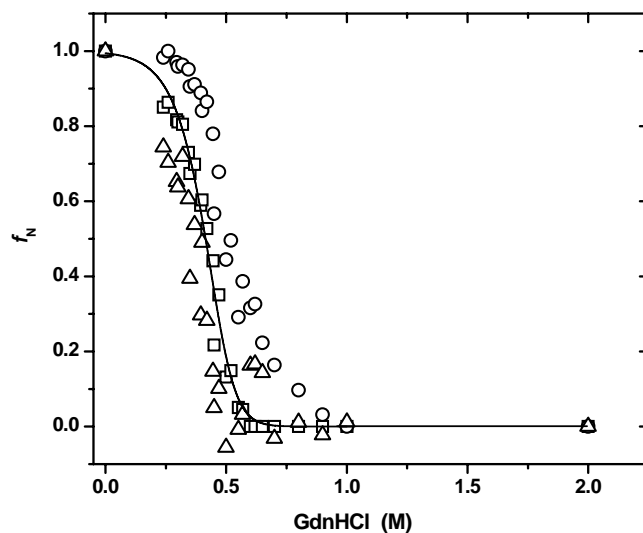


Figura 22. Datos normalizados para los experimentos de renaturalización a 40 µg/mL (1.47 µM) seguidos por actividad catalítica (□), IF (△) y CEM (○) después de incubar por 72 horas.

La renaturalización de la proteína a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se siguió únicamente por actividad catalítica. Se observa una transición que va de 0.5 a 0.2 M de GdnHCl (Fig. 23).

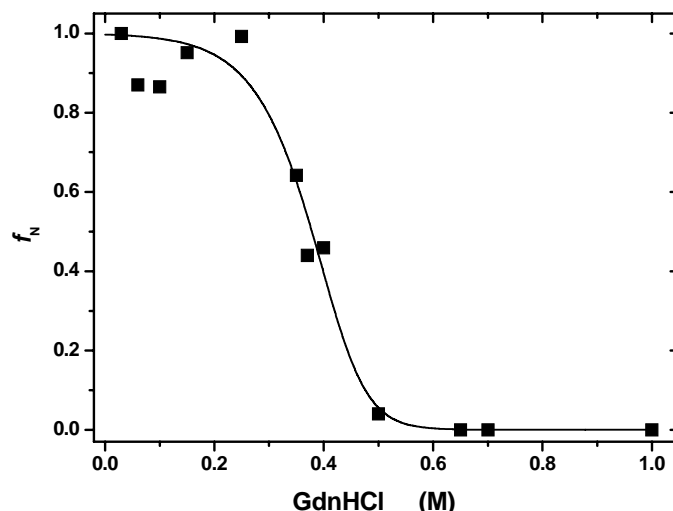


Figura 23. Datos normalizados para la renaturalización de la SpTIM a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.184 μM). Se monitoreo el proceso midiendo la actividad catalítica después de incubar por 72 horas. Los datos presentados son el promedio de tres experimentos.

En la figura 24 se presentan los datos normalizados obtenidos de los experimentos de renaturalización, monitoreados por actividad catalítica a diferentes concentraciones de proteína. Al igual que en la desnaturalización, no se observa una dependencia clara respecto de la concentración de proteína. A 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína las transiciones son iguales, a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay un ligero corrimiento de la transición hacia concentraciones menores de GdnHCl. Debido a que la transición se da en un intervalo de concentraciones muy bajas, no fue posible obtener datos confiables a concentraciones menores de proteína. Se intentó buscar condiciones para modificar al menos en 10 veces la concentración de proteína; para hacer estos experimentos era necesario modificar el protocolo de desnaturalización: aumentar la concentración de proteína y/o disminuir la de GdnHCl. Como se mencionó anteriormente (Fig. 13) la desnaturalización a 4 M de GdnHCl y 2.5 mg/ml de proteína requiere de hasta 24 horas de incubación, esto a su vez disminuye el grado de reactivación.

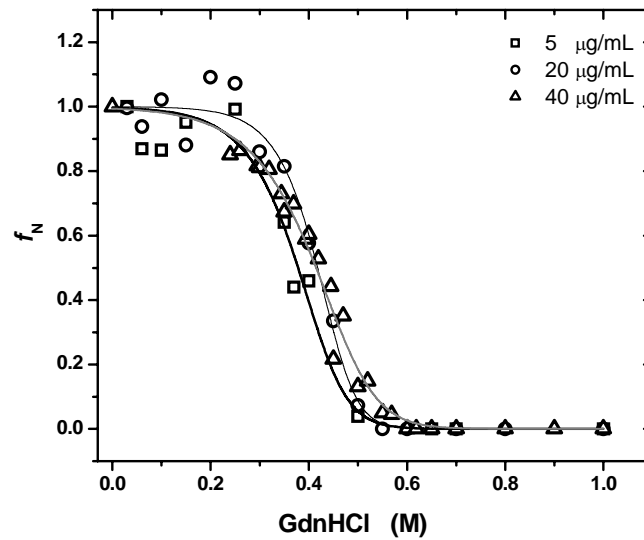


Figura 24. Datos normalizados para los experimentos de renaturalización a 5 $\mu\text{g/mL}$ (0.184 μM) (\square), 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM) (\circ) y 40 $\mu\text{g/mL}$ (1.47 μM) (\triangle) seguidos por actividad catalítica después de incubar durante 72 horas.

E. Histéresis

Comparando los resultados de los experimentos para la desnaturalización y la renaturalización a las diferentes concentraciones de proteína, se tiene que a concentraciones \leq de 0.2 M de GdnHCl, la actividad en ambas direcciones ($\text{N} \rightarrow \text{D}$ y $\text{D} \rightarrow \text{N}$) es similar a la nativa, ya que el proceso es reversible. Por otra parte, a concentraciones mayores de 3 M de GdnHCl la enzima es inactiva en ambos sentidos, pero a concentraciones intermedias de desnaturalizante (0.4 – 2.8 M) se observa una marcada histéresis en las transiciones de desplegamiento y repliegamiento (Fig. 25).

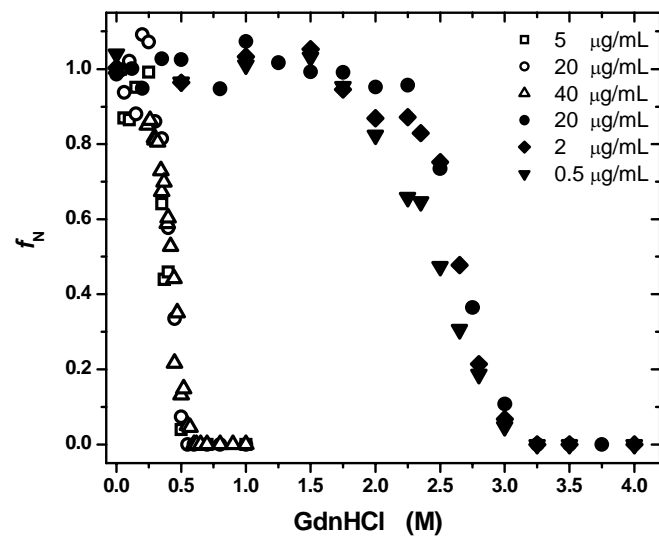


Figura 25. Histéresis entre el desplegamiento y el repliegamiento de *SpTIM*. Cambios normalizados para los experimentos N→D (símbolos cerrados) medidos después de incubar por 192 horas y D→N (símbolos abiertos) medidos después de incubar por 72 horas. Todos los experimentos se siguieron por actividad catalítica y se manejaron diferentes concentraciones de proteína.

En todas las condiciones estudiadas se observa una sola transición, por lo que se puede sugerir que el mecanismo es de dos estados y no hay evidencia de la presencia de algún intermediario. La transición para la desnaturalización ocurre entre 2.3 y 3 M de GdnHCl, a partir de esa concentración la señal permanece constante (Fig. 25). Esta señal podría corresponder a los monómeros desplegados. En la renaturalización, de 4 a 0.55 M de GdnHCl, los monómeros podrían estar desplegados y desde 0.55 M se empieza a observar al dímero nativo. Las transiciones de desnaturalización y renaturalización están separadas por una diferencia de concentración de 2 M de GdnHCl.

Ya que la enzima presenta actividad sólo como dímero, los datos obtenidos siguiendo la actividad catalítica, muestran que los cambios en la estructura cuaternaria que acompañan el desplegamiento de la TIM en GdnHCl, no son reversibles en un rango fijo de concentraciones de GdnHCl, que abarcan las transiciones de desnaturalización y renaturalización. Los cambios en la estructura terciaria tampoco lo son: *SpTIM* es estable en 1.5 M de GdnHCl -igual actividad y

mismo patrón de fluorescencia que la enzima nativa- pero después de que se desnaturaliza en 6 M de GdnHCl y se diluye a 1.5 M de GdnHCl, la enzima pareciera que permanece monomérica -sin actividad- y desnaturalizada -mismo patrón de fluorescencia que la enzima en 6 M de GdnHCl-, esto se refleja como una histéresis muy fuerte entre la desnaturalización y la renaturalización con respecto a los cambios en la estructura de la proteína.

F. Cinéticas de plegamiento y desplegamiento.

Siendo estrictos el fenómeno de histéresis no permite medir directamente la constante de equilibrio y por lo tanto la estabilidad conformacional de la enzima, por lo que se trató de estimar la estabilidad cinética del dímero de la SpTIM mediante experimentos de cinética de desnaturalización y renaturalización.

La velocidad de desnaturalización del dímero de la SpTIM hacia los monómeros desplegados se determinó siguiendo la pérdida de actividad vs tiempo, a diferentes concentraciones de GdnHCl (Fig. 26a). Entre 3 y 4 M, las constantes de velocidad determinadas son las constantes de velocidad del desplegamiento, ya que en estas condiciones no hay contribución de la reacción de replegamiento.

Las constantes de velocidad de desplegamiento (k_{obs}) se determinaron en diferentes concentraciones de desnaturalizante a partir del ajuste a una exponencial sencilla de los datos de la figura 26a. Mediante la extrapolación lineal del $\ln k_{obs}$ vs su correspondiente concentración de GdnHCl (Fig. 26b) se obtuvo la constante de primer orden en ausencia de desnaturalizante, $k = 6.333 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, que corresponde a una vida media de 500 años. El valor de esta constante nos permite conocer el grado de estabilidad de la proteína en condiciones nativas, una vez formado el dímero es muy difícil que se disocie y que los monómeros se desplieguen.

También se calculó el valor de la constante de velocidad de desplegamiento en 1M de GdnHCl, obteniéndose una vida media de alrededor de 11 años. El valor resultante de la constante de velocidad de desnaturalización en H₂O, así como el

hecho de que a 1M de GdnHCl la proteína tarde tanto tiempo para desnaturalizarse, sugiere que los datos obtenidos en las mediciones de actividad e $IF_{\lambda_{max}}$ en la dirección N→D no han alcanzado el equilibrio.

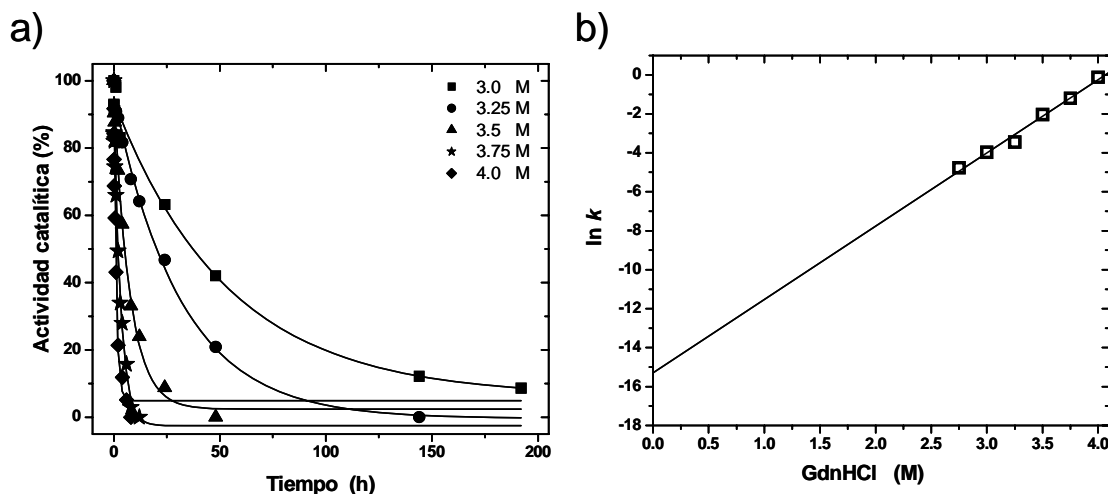


Figura 26. Determinación de la constante de velocidad de primer orden para la desnaturalización de la *SpTIM* a 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM). a) Los datos obtenidos para la pérdida de actividad de la proteína a diferentes concentraciones de GdnHCl en función del tiempo se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial, a partir de lo cual se obtuvo k . b) Las constantes de velocidad de primer orden se graficaron como una función de la concentración de GdnHCl. De la extrapolación lineal de los datos a GdnHCl 0M se obtiene $k=6.333 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ para la desnaturalización del dímero en condiciones nativas.

La constante de velocidad de segundo orden, para la renaturalización de la *SpTIM*, se determinó monitoreando la recuperación de actividad vs tiempo, a diferentes concentraciones de proteína (Fig. 27a). Las constantes de velocidad en función de la concentración de proteína se ajustaron a una ecuación lineal (Fig. 27b) y a partir de la pendiente se obtuvo una $k = 2.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A partir de las constantes de desnaturalización y renaturalización obtenidas, se calculó la $K_{eq} = 2.10 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ y con esto un ΔG° de 19.4 kcal/mol para la desnaturalización/renaturalización de la *SpTIM*.

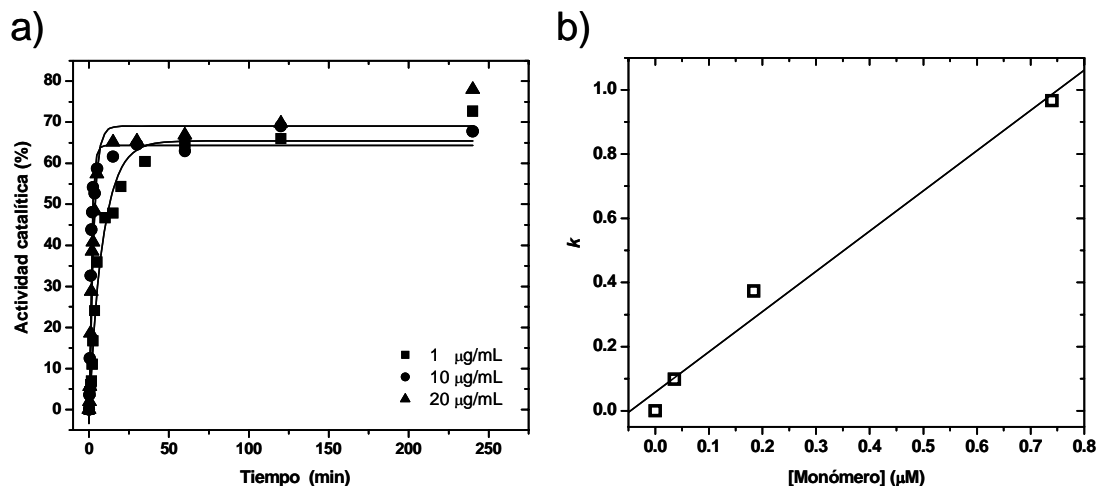
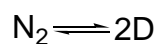


Figura 27. Determinación de la constante de velocidad de segundo orden para la renaturalización de la *SpTIM*. a) Datos obtenidos para la recuperación de actividad a diferentes concentraciones de la proteína en función del tiempo. Los datos se ajustaron a una exponencial sencilla. b) Las constantes de velocidad se graficaron como una función de la concentración de proteína, a partir de la pendiente obtenida por el ajuste de los datos a una ecuación lineal se obtuvo $k = 2.09 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

G. Ajuste de datos al equilibrio

Al parecer los datos obtenidos para la desnaturalización no se encuentran al equilibrio, por otra parte los datos de renaturalización (Fig. 20) alcanzan un valor constante desde las 24 horas, lo que sugiere que han alcanzado el equilibrio. En éstos, solo se observa una transición, así como el mismo tipo de curvas, independientemente de haber medido actividad o $IF_{\lambda, \text{max}}$, sugiriendo que los datos de renaturalización se pueden ajustar a un modelo concertado de dos estados, en el cual sólo se consideran dos monómeros desplegados en equilibrio con un dímero plegado:



Donde N_2 representa el dímero plegado y $2D$ a los monómeros desplegados. La constante de equilibrio para el proceso y la energía libre de desnaturalización están dadas por:

$$K_{\text{eq}} = [D]^2 / [N_2] \quad (1) \quad ; \quad \Delta G^\circ = -RT \ln K_{\text{eq}} \quad (2)$$

La proteína total, expresada en concentración de monómeros, está dada por:

$$Pt = 2N_2 + D \quad (3)$$

Las fracciones mol de los dímeros nativos (X_N) y de los monómeros desnaturalizados (X_D) están dadas por:

$$X_N = 2N_2 / Pt \quad \text{y} \quad X_D = D / Pt \quad (4)$$

La fracción de los dímeros nativos $f_N = 1 - f_D$ donde $f_D = D / Pt$. Combinando estas ecuaciones y resolviendo para f_N en términos de la constante de equilibrio K_{eq} y Pt se obtiene la siguiente ecuación (Hobart et al. 2002):

$$f_N = \frac{\sqrt{K_{eq}^2 + 8K_{eq}Pt + K_{eq}}}{4Pt} \quad (5)$$

Los datos normalizados de los experimentos de renaturalización al equilibrio seguidos por mediciones de actividad, $IF_{\lambda_{max}}$ y determinación del CEM se ajustaron simultáneamente a la ecuación 5 (Fig. 21, 22 y 23).

Los ΔG en la región de la transición, dependen linealmente de la concentración del desnaturalizante (Fig. 28); a partir de estos se obtuvieron los valores de la concentración de GdnHCl en el punto medio de la transición ($C_{1/2}$) (tabla 4).

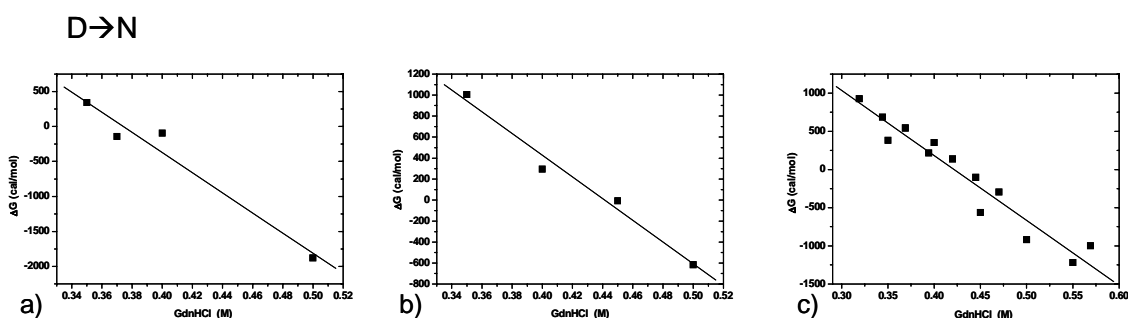


Figura 28. Determinación de la $C_{1/2}$. En a, b y c se grafican los ΔG (de los datos observados en la transición) en función de la concentración de GdnHCl para los experimentos de renaturalización a 5 $\mu\text{g/mL}$ (0.184 μM), 20 $\mu\text{g/mL}$ (0.74 μM) y 40 $\mu\text{g/mL}$ (1.47 μM) respectivamente.

Tabla 4. Valores de ΔG° obtenidos con la ecuación para un mecanismo de dos estados.

D → N			
[proteína]	ΔG° (kcal/mol)	$C_{1/2}$ (M)	m (kcal/mol M)
5.0 $\mu\text{g/mL}$	-15.5 ± 1.02	0.37	16.77 ± 2.73
20.0 $\mu\text{g/mL}$	-16.3 ± 1.42	0.44	18.01 ± 3.16
40.0 $\mu\text{g/mL}$	-12.4 ± 0.53	0.42	10.45 ± 1.23

ΔG° D→N 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$. El ajuste se realizó considerando todos los parámetros medidos.

ΔG° D→N 5 $\mu\text{g/mL}$. El ajuste se realizó solo para los datos de actividad.

En la tabla 4, se puede ver que los valores obtenidos de ΔG° son muy similares a los reportados para las TIMs de otras especies (Tabla 2). En promedio se obtiene un $\Delta G^\circ = 15.9$ kcal/mol, este valor, varía en casi 3.5 kcal/mol del obtenido cinéticamente; esta diferencia se puede deber a que la constante de velocidad de segundo orden para la renaturalización se calculó con solo tres concentraciones de proteína (Fig. 27).

H. Transiciones de desplegamiento térmico

Las transiciones de desplegamiento térmico se obtuvieron siguiendo los cambios de elipticidad a 222 nm y diferentes concentraciones de proteína (Fig 29a). Los experimentos se realizaron a concentraciones de proteína de 0.02, 0.05 y 0.1 mg/mL en una celda de 0.1 cm de recorrido óptico (Fig.29a). Para la solución de proteína con una concentración de 0.02 mg/mL se siguió la transición de desplegamiento térmico incrementando la temperatura de la muestra a una velocidad de 1 °C/min y a 0.5 °C/min (Fig. 29b). En todas las condiciones el proceso fue irreversible. A partir de estos experimentos se obtuvo la $T_{m_{ap}}$ (Tabla 5), y se observa que el incremento de la concentración de la proteína provoca un aumento de la $T_{m_{ap}}$ de alrededor de 1°C.

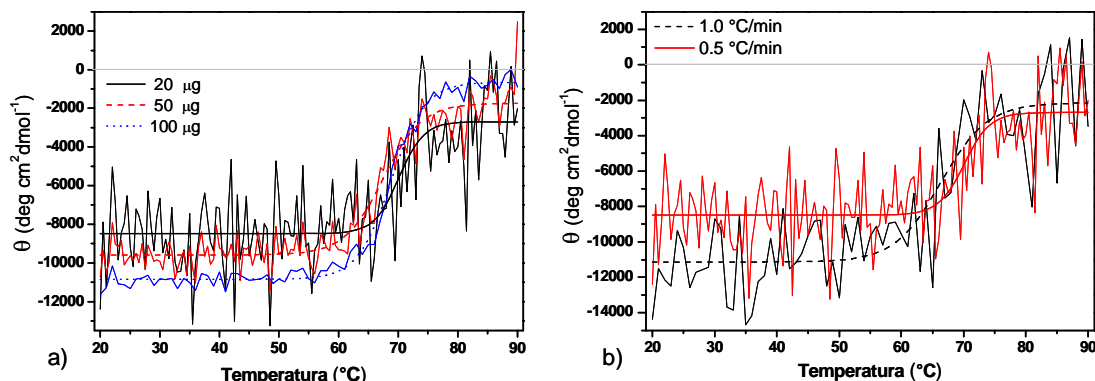


Figura 29. Las transiciones térmicas se obtuvieron siguiendo la señal de elipticidad a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20 a 90°C. a) Las concentraciones de proteína utilizadas fueron de 0.02, 0.05 y 0.1 mg/mL. b) Para la concentración de 0.02 mg/mL se siguió la transición de desplegamiento térmico incrementando la temperatura de la muestra a una velocidad de 1 °C/min y a 0.5 °C/min

Tabla 5. Valores de Tm obtenidos a partir de las curvas de desnaturalización térmica mostradas en la figura 27.

SpTIM	Tm aparente (°C)
0.02 mg/ml	66.36 _(1°C/min)
	70.14 _(0.5 °C/min)
0.05 mg/ml	67.45 _(1°C/min)
0.1 mg/ml	68.84 _(1°C/min)

I. SpTIM vs ScTIM

Al parecer la SpTIM resulta ser muy resistente a la desnaturalización por GdnHCl y a la desnaturalización térmica, en comparación con la ScTIM. Se realizó un experimento incubando ambas enzimas a una concentración de 20 μg/mL en 3 M de GdnHCl a 23° C y se midió la actividad a diferentes tiempos. En la figura 30 se observa que la ScTIM, desde los cinco minutos ya había perdido toda su actividad, mientras que la SpTIM mantenía una actividad del 95%; a las 24 horas de incubación, aún conservaba una actividad del 73%. Como podemos ver, la SpTIM tiene mayor resistencia al GdnHCl que la ScTIM (Fig 30).

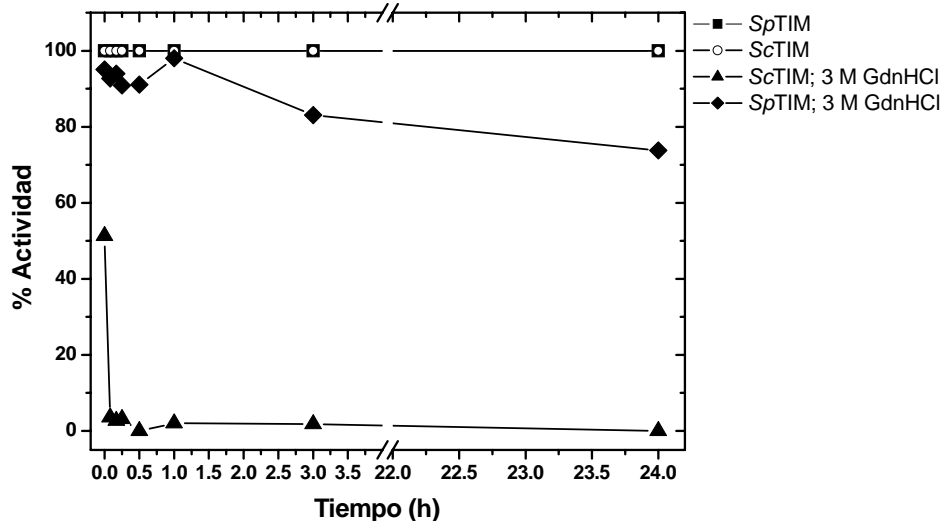


Figura 30. SpTIM vs ScTIM. 20 µg/mL de ambas enzimas se incubaron en 3M de GdnHCl y se siguieron los cambios de actividad a diferentes tiempos.

Por otra parte, el valor de la $T_{m_{ap}}$ obtenido para la SpTIM, 68.8 °C es considerablemente mayor (alrededor de 10 °C) que lo reportado para la ScTIM (Benítez-Cardoza et al. 2001) y para las TIMs de otras especies mesófilas (Tabla 6), aunque está en el rango de los valores reportados para la TIM de organismos termófilos (BsTIM).

Tabla 6. Valores de T_m reportados para TIM de otras especies

Especie	$T_{m_{ap}}$ (°C)
<i>Thermotoga maritima</i>	102
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	76
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59.1
<i>Gallus gallus</i>	58.4
<i>Homo sapiens</i> ^a	58
<i>Plasmodium falciparum</i>	58
<i>Giardia lamblia</i>	58
<i>Entamoeba histolytica</i>	56.8
<i>Trypanosoma cruzi</i>	55
<i>Escherichia coli</i>	54
<i>Trypanosoma brucei</i>	52.2
<i>Vibrio cholerae</i>	41
<i>Leishmania mexicana</i>	50 (pH 7.6)
	57 (pH 7.0)
	60 (pH 6.0)

^a Para la TIM de humano se encontraron condiciones de reversibilidad (Mainfroid et al. 1996)

La constante de velocidad de primer orden para la desnaturalización de la SpTIM es de $6.333 \times 10^{-11} \text{s}^{-1}$ (vida media de 500 años), tres órdenes de magnitud mayor comparada con el valor reportado para la $k_{\text{disociación}}$ de ScTIM: $3.54 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ (vida media de 53.7 años) (Nájera et al. 2007).

V. DISCUSIÓN

El proceso de plegamiento y desplegado de la TIM se ha estudiado para varias especies utilizando desnaturizantes químicos (Gokhale et al. 1999, Nájera et al. 2003, Pan et al. 2004, Cháñez-Cárdenas et al. 2005), temperatura (Beauchamp et al. 1997) o presión (Rietveld y Ferreira 1998, Vázquez-Pérez y Fernández-Velasco 2007). A partir de estos estudios se ha encontrado que las transiciones de desplegado son muy diversas, desde procesos de dos estados en las TIMs de humano (Mainfroid et al. 1996), conejo (Rietveld y Ferreira 1998), *L. mexicana* (Lambeir et al. 2000) y *B. stearrowthermophilus* (Mainfroid et al. 1996), procesos de tres estados con un intermediario monomérico, para el caso de *S. cerevisiae* (Nájera et al. 2003) y *T. marítima* (Beauchamp et al. 1997) y procesos de cuatro estados en los que se presentan dos intermediarios, monomérico y dimérico, en las TIMs de *T. cruzi* (Cháñez-Cárdenas et al. 2005), *T. brucei* (Cháñez-Cárdenas et al. 2002) y *P. falciparum* (Gokhale et al. 1999). En algunos casos estos procesos son irreversibles, presentando agregación, lo que dificulta el estudio y la caracterización termodinámica del plegamiento. En general, la asociación entre los monómeros de la TIM está relacionada a la adquisición de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína nativa. Los valores del $\Delta G_{\text{asociación}}$ son siempre mayores que los del $\Delta G_{\text{plegamiento}}$, siendo la asociación entre subunidades, el factor que contribuye en mayor medida a la estabilidad total de las TIMs (Peimbert et al. 2008).

En este trabajo se describe el proceso de plegamiento de la TIM de *S. pombe*, la cual fue clonada y caracterizada en nuestro laboratorio. Sus parámetros cinéticos son similares a los reportados para otras TIMs y sus espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y de fluorescencia, no presentan diferencias significativas con los de otras. Una propiedad específica que se encontró en la SpTIM, es su resistencia a la desnaturización por dodecil sulfato de sodio (SDS) y urea (datos no mostrados), indicando que esta TIM en particular, es una proteína con una estructura rígida.

En los experimentos de desnaturización, a tiempos largos de incubación, se obtienen curvas con una sola transición, que se superponen siguiendo los cambios en actividad y fluorescencia, lo que sugiere un proceso de desplegado de dos

estados en el cual sólo son medibles los estados nativo dimerico y desplegado monomérico. El valor obtenido de la $C_{1/2}$ en el sentido de la desnaturalización es de 2.6 M. Estos datos confirman la resistencia de la SpTIM a la desnaturalización, siendo este valor mayor al reportado para las TIMs de otras especies (Tabla 2). La TIM es activa en su estado nativo dimerico, por lo que la pérdida de actividad es principalmente reflejo de la disociación de la TIM a las distintas concentraciones de GdnHCl. Al graficar la fracción nativa vs la concentración de GdnHCl, siguiendo los cambios en actividad y fluorescencia (Fig. 18), es evidente que el mecanismo de desnaturalización es consistente con el proceso de dos estados, en el cual la estructura cuaternaria, la terciaria y seguramente la secundaria (no medida) se pierden de manera paralela. El patrón de disociación/despliegamiento procede a través de un proceso concertado $N_2 \rightleftharpoons 2D$; sin embargo, a las concentraciones de proteína que se probaron no se pudo observar dependencia respecto de la concentración de proteína: el punto medio de la transición, $C_{1/2}$, no cambia con la concentración de proteína (Fig 19).

El hecho de encontrar una sola transición en la desnaturalización, sin dependencia de la concentración de proteína para un proceso concertado disociación/despliegamiento, no descarta que el proceso en sí involucre la presencia de un intermediario:

- Una proteína dimerica, con intermediarios monomericos inestables, puede desnaturalizarse vía un mecanismo de dos estados. Las concentraciones estudiadas pueden ser mayores a sus Kds, por lo que el dímero sería muy estable (alta $C_{1/2}$) en relación al intermediario monomérico. A concentraciones de proteína cercanas a su Kd, posiblemente se pueda observar un intermediario monomérico.

- Al equilibrio podría existir una población muy pequeña de monómeros plegados cuyas propiedades no son detectables en las condiciones empleadas. A las concentraciones de GdnHCl en las que se puede disociar al dímero se favorecería la forma desplegada del monómero.

- La disociación del dímero puede darse en el tiempo en el que se alcanza el equilibrio nativo/desplegado. Sin embargo, los monómeros plegados pueden reasociarse dando dímeros nativos o desplegarse completamente.

En los experimentos de renaturalización al equilibrio se obtienen curvas con una sola transición que se superponen, independientemente del parámetro medido. Ésta transición se presenta a concentraciones de GdnHCl mucho menores (0.2 a 0.5 M) que para el proceso de desnaturalización y es mucho más cooperativa que la de desnaturalización, el valor de la $C_{1/2}$ es de 0.42 M (tabla 4). En las condiciones empleadas en este trabajo, tampoco se observó una clara dependencia con respecto a la concentración de proteína. Como se mencionó anteriormente, no fue posible trabajar a concentraciones de proteína mayores, ya que la *SpTIM* incrementa su resistencia a la desnaturalización a medida que aumenta la concentración de proteína y/o disminuye la concentración de desnaturalizante (Fig. 13). El tiempo en el que las señales no se modifican, es considerablemente menor que para la desnaturalización -72 vs 192 horas-, y no se modificó a las distintas concentraciones de proteína usadas.

Esta resistencia a la desnaturalización se refleja en una histéresis muy marcada cuando se compararon las transiciones de desnaturalización y renaturalización de la *SpTIM*. Este fenómeno había sido descrito en la TIM de levadura (*Nájera et al. 2003*); sin embargo, las diferencias de concentración de GdnHCl, en las que se presentan ambas transiciones son mucho mayores en la *SpTIM*. Esta histéresis se ha estudiado también en la desnaturalización térmica de la *ScTIM* (*Benítez-Cardoza et al. 2001, González-Mondragón et al. 2007*) y en la desnaturalización por presión de la TIM de conejo (*Rietveld y Ferreira 1998*). En la *TmTIM*, organismo hipertermófilo, se observa una histéresis similar a la de la *SpTIM*.

La presencia de este fenómeno de histéresis implicaría que en las escalas temporales empleadas, el desplegamiento de la *SpTIM* no es un proceso en verdadero equilibrio termodinámico.

Esta histéresis puede ser el resultado de una barrera cinética muy grande entre el dímero nativo y los monómeros desplegados en cualquiera de los dos sentidos, desnaturalización y renaturalización. Las constantes de velocidad de los experimentos cinéticos demuestran que la *SpTIM* tiene una estabilidad cinética muy grande comparada con las TIMs de otras especies. Se presenta una gran barrera de activación entre el dímero plegado y los monómeros desplegados, lo que implicaría

que se requiere una gran cantidad de energía para interconvertir el dímero de la SpTIM y los monómeros desplegados.

La estabilidad cinética es una propiedad que se ha tratado de explicar considerando al proceso de desnaturalización como una reacción simple al equilibrio entre el estado nativo (N) y el estado desnaturalizado (D), separados por un estado de transición (ET) de gran energía. La altura de la barrera energética del estado de transición determina la velocidad de plegamiento y desnaturalización de una proteína; entonces, la energía del estado de transición de las proteínas cinéticamente estables sería considerablemente mayor, lo cual se refleja en una velocidad de desnaturalización extremadamente lenta, “atrapando” a la proteína en su estado nativo (*Manning y Colón 2004*). Aunque el ΔG sea favorable para la desnaturalización de la proteína a altas concentraciones de GdnHCl, la energía de activación del estado de transición es tan grande que hace que la velocidad de desnaturalización sea considerablemente más lenta ($\Delta G^{++} = 31.15 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Se ha sugerido que la presencia de una barrera cinética grande, que separa a los estados plegado y desnaturalizado, es una característica evolutiva que permite a las proteínas mantener su actividad en condiciones extremas en las que puede encontrarse *in vivo* (*Plaza del Pino et al. 2000*).

En el caso particular de la TIM se ha propuesto que su estabilidad cinética esta estrechamente relacionada a la estructura oligomérica de la enzima (*Rietveld y Ferreira 1998*). Ferreira y col., utilizando presión hidrostática para perturbar el equilibrio de asociación entre subunidades de la TIM de conejo, encontraron que no hay dependencia con respecto a la concentración de proteína en el proceso de disociación/desnaturalización. Lo esperado para un oligómero es que la asociación dependa de la concentración de proteína.

Recientemente se estudió el efecto de la solvatación/desolvatación en el proceso de desnaturalización térmica en las TIMs de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* (*Costas et al. 2008*). Se ha propuesto que estos efectos, junto con los efectos electrostáticos en la superficie de la proteína, son mecanismos eficientes que modulan las barreras de energía de los procesos de plegamiento/desnaturalización de una proteína. Los datos de la desnaturalización térmica de estas TIMs se

ajustaron a un modelo irreversible de dos estados con una cinética de primer orden, encontrando que no hay efecto de la concentración de proteína en las transiciones calorimétricas, lo que indica que la disociación de los monómeros ocurre después del paso limitante de la reacción. Es decir, el dímero es el estado de transición cinéticamente importante (*Costas et al. 2008*).

Se ha propuesto que la estabilidad cinética es una propiedad común de proteínas con estructuras rígidas. En condiciones nativas las proteínas cinéticamente estables tienen acceso limitado a las conformaciones, parcial o totalmente, desplegadas. Esta propiedad les confiere una gran resistencia a la digestión proteolítica y para algunas de ellas se ha encontrado resistencia a la desnaturalización por SDS (*Manning y Colón 2004*).

El hecho de que la SpTIM presente una resistencia a la desnaturalización y una marcada histéresis en las transiciones de desnaturalización/renaturalización que aparentemente no dependen de la concentración de proteína, sugieren que la SpTIM pertenece al grupo de proteínas cinéticamente estables.

Uno de los objetivos particulares de este trabajo fue comparar el proceso de disociación y desnaturalización de la SpTIM con el de la ScTIM. Los resultados obtenidos muestran diferencias importantes entre ambas especies, a pesar de compartir una identidad en su secuencia de aminoácidos del 56 %. Las transiciones de desplegamiento son diferentes, en el caso particular de la SpTIM se presenta un proceso de dos estados, mientras que para la ScTIM es de tres estados siendo evidente la presencia de un intermediario monomérico. Las diferencias en la $C_{1/2}$ para actividad y fluorescencia y la $T_{m_{ap}}$ demuestran que la SpTIM es mucho más estable que la ScTIM. Como se mencionó anteriormente, el factor que contribuye en mayor medida a la estabilidad total en un homodímero obligado como la TIM, es la asociación entre los monómeros; por lo que el acoplamiento entre el plegamiento y la asociación debería estar determinado por las propiedades de sus interfases.

La estructura de la interfase se analizó en el modelo estructural que se obtuvo para SpTIM, y utilizando el programa NACCESS se calcularon las áreas accesibles al solvente que se ocultan cuando se forma el dímero (ΔASA), así como el porcentaje de hidrofobicidad en la interfase. El cálculo del ΔASA también se realizó para la

estructura cristalográfica de ScTIM (PDB: 1NEY) del cual se obtuvo el modelo estructural de la SpTIM (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación entre Δ ASA y el porcentaje de hidrofobicidad de SpTIM y ScTIM.

	Δ ASA (\AA^2)	Hidrofobicidad %
SpTIM	4817.0	74.6
ScTIM	3220.8	62.5

En la tabla 7, se puede observar que el Δ ASA y el porcentaje de hidrofobicidad son mayores en la SpTIM en comparación con los de la ScTIM, esto sugiere que el área de la superficie de la interfase en cada monómero de la SpTIM y los contactos hidrofóbicos entre ellos es mayor. La interfase de la ScTIM se forma por 34 residuos que se distribuyen principalmente en 4 asas (asa 1-4 de cada monómero) (*Peimbert et al. 2008*). Estos mismos residuos se analizaron en el modelo estructural de la SpTIM, encontrando una identidad del 61.7 % con los de la ScTIM. Una diferencia importante es la presencia de un par de puentes salinos entre la Lys17 y el Asp48 en cada uno de los monómeros de la ScTIM, que no se encuentran en la SpTIM, ya que el residuo en la posición 17 es una Leu y el de la posición 48 una Ile (aminoácidos apolares).

El hecho de que la SpTIM tenga una interfase más hidrofóbica podría explicar su gran estabilidad, razón por la cual esta TIM es más resistente a la desnaturalización por GdnHCl. En el caso de la ScTIM, se han realizado mutaciones en residuos de la interfase a fin de incrementar su carácter hidrofóbico, y por ende a una mayor estabilidad. Las mutantes más estables con respecto a la silvestre, se generaron cambiando 5 residuos polares de la interfase a residuos no polares, la Lys17 y el Asp48 se reemplazaron por leucina y tirosina, respectivamente (*Peimbert et al. 2008*) Estos resultados sugieren que la estabilidad de la interfase depende más de las interacciones hidrofóbicas, ya que estas mutantes estables pierden una interacción de puente salino. Por otro lado, se sabe que el GdnHCl disminuye el efecto hidrofóbico en la estructura de las proteínas, entonces al ser más hidrofóbica la interfase de la SpTIM, la cantidad de GdnHCl que se necesita para producir su

efecto, tendría que ser mayor. Este desnaturalizante también provoca alteraciones en la red interna de puentes de hidrogeno de la proteína, entonces puede ser que la SpTIM presente un número mayor de estas interacciones, en comparación con las otras TIMs, lo que se refleja en una concentración mayor de GdnHCl para desnaturalizarla.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ El proceso de desnaturalización/renaturalización de la SpTIM inducido por GdnHCl es reversible.
- ✓ Las transiciones de desnaturalización así como las de renaturalización se ajustan a un modelo concertado de dos estados: $N_2 \rightleftharpoons 2D$. Estas se presentan a diferentes concentraciones de GdnHCl, lo cual resulta en una marcada histéresis.
- ✓ La constante de velocidad de primer orden para la desnaturalización de la SpTIM en H₂O es de $6.333 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$, que corresponde a una vida media de 500 años y sugiere que la enzima tiene una gran estabilidad cinética.
- ✓ La SpTIM pertenece al grupo de proteínas cinéticamente estables.

ABREVIATURAS

BCA	Ácido bicinconínico
CEM	Centro espectral de masas
C _{1/2}	Concentración de desnaturalizante en el punto medio de la transición.
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatography
α-GDH	α-Glicerol fosfato deshidrogenasa
GdnHCl	Cloruro de guanidinio
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
NADH	Dinucleótido de nicotinamina adenina reducido
SpTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ScTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
TRIS	(Tris [hidroximetil] aminometano)

BIBLIOGRAFÍA

1. Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*.1973;181(96):223-230.
2. Beaucamp N, Hofmann A, Kellerer B, Jaenicke R. Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime* design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science*.1997;6:2159-2165.
3. Benítez-Cardoza C.G, Rojo-Domínguez A, Hernández Arana A. Temperatura-induced denaturation and renaturation of Triosephosphate Isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry*. 2001; 40 : 9049-9058.
4. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L. *Bioquímica*. 5a ed. Barcelona: Editorial Reverté, S.A., 2003.
5. Blacklow S.C, Raines R.T, Lim W.A, Zamore P.D, Knowles J.R. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry*. 1988; 27(4): 1158-1167.
6. Chánez-Cárdenas M.E, Fernandez-Velasco D.A, Vazquez Contreras E, Coria R, Saab-Rincon G, Pérez Montfort R. Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;399:117-129.
7. Chánez-Cárdenas M.E, Pérez-Hernandez G, Sánchez-Rebollar B.G, Costas M, Vázquez-Contreras E. Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*.2005;44(32):10883-92.
8. Costas M, Rodríguez-Larrea D, De María L, Borchert T.V, Gómez-Puyou A, Sánchez-Ruiz J.M. Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *Journal of molecular biology*.2009; 385: 924-937.

9. Cozzone J.A. Proteins: Fundamental chemical properties. Encyclopedia of life sciences. 2002.
10. Creighton T.E. Protein Structure. A practical approach. 2a ed. New York: Oxford University Press, 1997:261-321.
11. Dill K.A. Theory for the folding and stability of globular proteins. Biochemistry. 1985;24:1501-1509.
12. Farber G.K, Petsko, G.A. The evolution of α/β barrel enzymes. Trends in biochemical sciences. 1990;15:228-234.
13. Ferreira S.T, Chapeaurouge A, De Felice F.G. Stabilization of partially folded states in protein folding/misfolding transitions by hydrostatic pressure. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2005; 38: 1215-1222.
14. Forsburg S.L. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. Gravitational and space biology. 2005;18(2).
15. García-Hernández E, Fernández-Velasco D.A. Advances in protein physical chemistry. Transworld research network. 2008.
16. Gokhale R.S, Ray S.S, Balaram H, Balaram P. 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. 1999;38:423-431.
17. González-Mondragón E, Zubillaga R, Hernández-Arana A. Effect of a specific inhibitor on the unfolding and refolding kinetics of dimeric triosephosphate isomerase: Establishing the dimeric and similar structured nature of the main transition states on the forward and backward reactions. Biophysical Chemistry. 2007; 125: 172-178.
18. Hobart S.A, Ilin S, Moriarty D.F, Osuna R, Colón W. Equilibrium denaturation studies of the *Escherichia coli* factor for inversion stimulation: Implications for in vivo function. Protein Science. 2002; 11: 1671-1680.
19. Hollecker M, Creighton TE. Evolutionary conservation and variation of protein folding pathways. Two protease inhibitor homologues from black mamba venom. Journal of molecular biology. 1983;168:409-437.

20. Horton H.R, Moran L.A, Ochs R.S, Raw J.D, Scrimgeur K.G. Principles of Biochemistry.3a ed. U.S.A: Prentice Hall, 2002: 130-195.
21. Knowles J.R. Enzyme catalysis not different, just better. Nature 1991;350:121-124.
22. Konerman L. Protein Unfolding and Denaturants. Encyclopedia of life sciences 2004.
23. Lai Z, McCulloch J, Lashuel H, Kelly J. Guanidine Hydrochloride-Induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: Equilibria with high kinetic barriers. Biochemistry.1997;36:10230-10239.
24. Lakowicz J. Principles of fluorescence spectroscopy. 2a ed. USA:Kluwer Academic/Plenum Publishers,1999.
25. Lambeir A.M, Backmann J, Ruiz-Sanz J, Filimonov V, Nielsen J.E, Kursulan I, Norledge B.V, Wierenga R.K. The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triosephosphate isomerase. European journal of biochemistry.2000;267:2516-2524.
26. Levinthal C. Are there pathways for protein folding? Journal de Chimie Physique.1968;65:44-45.
27. Lolis E, Albert T, Davenport R.C, Rose D, Hartman F.C, Petsko G.A. Structure of yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9-Å resolution. Biochemistry.1990;29: 6609-6618.
28. Maes D , Zeelen J.P , Thanki N , *et al.* The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. Proteins 1999; 37: 441-453.
29. Mainfroid V, Mande S, Hol W, Martial J, Goraj K. 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.1996;35:4110-4117.
30. Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, Frere J.M, Mande S.C, Hol W.G, Martial J.A. and Goraj K. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. Journal of molecular biology.1996;257:441-456.

31. Manning M, Colón W. Structural basis of protein kinetic stability: Resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and bias toward β -Sheet structure. *Biochemistry*. 2004;43:11248-11254.
32. McKee T, McKee J.R. *Bioquímica. La base molecular de la vida*. 3ra ed. España. McGraw Hill-Interamericana, 2003: 692-697.
33. Moreau V.H, Rietveld A.W, Ferreira S.T. Persistent conformational heterogeneity of triosephosphate isomerase; separation and characterization of conformational isomers in solution. *Biochemistry*. 2003;42(50):14831-7.
34. Morgan C.J, Wilkins D.K, Smith L.J, Kawata Y, Dobson C.M. A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *Journal of molecular biology*. 2000;30:300(1):11-16.
35. Nájera H, Costas M, and Fernandez-Velasco D.A. Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *The biochemical journal*. 2003;370:785-792.
36. Nájera H, Dagdug L and Fernández-Velasco A. Thermodynamic and kinetic characterization of the association of triosephosphate isomerase: The role of diffusion. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1774:985-994.
37. Nelson D.L and Cox M.M. *Principles of Biochemistry*. 4a ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2005:147-153.
38. Noltman E.A. *The enzymes*. 1972; 6: 326.
39. Pan H, Raza A.S, Smith D.L. Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *Journal of molecular biology*. 2004;336(5):1251-63.
40. Peimbert M, Domínguez-Ramírez L, Fernández-Velasco D.A. Hydrophobic repacking of the dimer interface of Triosephosphate isomerase by silico design and directed evolution. *Biochemistry*. 2008; 47(20):5556-5564.
41. Peimbert M, Domínguez-Ramírez L, Tellez L.A, Blancas L, Fernández-Velasco D.A. Triosephosphate Isomerase. *Advances in protein physical chemistry*. 2008 ; 193-217.

42. Plaxco K.W, Spitzfaden C, Campbell I.D, Dobson C.M. A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules. *Journal of molecular biology*. 1997;270:763-770.
43. Plaza del Pino I.M, Ibarra-Molero B, Sánchez-Ruiz J.M. Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability *in vivo* and its relation with misfolding diseases. *Proteins*. 2000; 40 : 58-70.
44. Ptitsyn O.B. Kinetic and equilibrium intermediates in protein folding. *Protein Engineering, Design and Selection*.1994; 7 : 593-596.
45. Reardon D, Farber G.K. The structure and evolution of α/β barrel proteins. *The FASEB Journal*.1995; 9: 497-503.
46. Rietveld A.W, Ferreira S.T. Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*. 1998;37(3):933-937.
47. Russell P.R. Transcription of the triose-phosphate-isomerase gene of *Schizosaccharomyces pombe* initiates from a start point different from that in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1985;40:125-130.
48. Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga R.K. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*.1997; 36:9655-9662.
49. Straus D, Raines R.T, Kawashima E, Knowles J.R, Gilbert W. Active site of Triosephosphate isomerase: *In vitro* mutagenesis and characterization of an altered enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1985; 82: 2272-2276.
50. Vázquez-Pérez A.R, Fernández-Velasco D.A. Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: The monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry*. 2007; 46: 8624-8633.
51. Voet D, Voet J.G. *Biochemistry*. 3a ed. USA: John Wiley & Sons INC., 2004.
52. Walden H, Bell G.S, Russell R.J.M, Siebers B, Hensel R, Taylor G.L. *Journal of molecular biology*. 2001; 306: 745-757.

53. Waley S.G. Refolding of Triose phosphate isomerase. *The biochemical journal*. 1973; 135: 165-172.
54. Wedemeyer W.J. Scheraga H.A. Protein Folding: Overview of Pathways. *Encyclopedia of life sciences*. 2001.
55. Wetlaufer D.B. Nucleation in protein folding-confusion of structure and process. *Protein Science*. 1990;15:414-415.
56. Wood V, Gwillim R, Rajandream M, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, *et al*. The genome sequence of the eukaryote fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 2002;415:871-880.
57. Zabori S, Rudolph R, Jaenicke R. Folding and association of Triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z Naturforsch* 1980; 35C: 999-1004.