



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“ESTUDIO SOBRE LA REVERSIBILIDAD DEL
PLEGAMIENTO DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE *T. cruzi*”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
BRENDA GUADALUPE SÁNCHEZ REBOLLAR

DIRECTOR DE TESIS
DR. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS

ASESOR DE TESIS
DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Asesoría del Dr. Edgar Vázquez Contreras. Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de proyecto 40524-M.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Jorge y Linda

*Todo lo que pueda lograr en la vida
es gracias a su apoyo y comprensión.*

A mis Hermanas:

Karla, Gloria y Natalia

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras

*Por que no sólo me aceptó como parte
de su equipo de trabajo sino también
como uno más de sus amigos.*

*Al Laboratorio de Fisicoquímica de Proteínas
(Facultad de Medicina, UNAM).*

A la Q.F.B. Beatriz Aguirre

*Y gracias a cada uno de mis amigos por hacer que todo fuera más
sencillo en su compañía.*

INDICE

RESUMEN

Capítulo 1. GENERALIDADES

1.1 Proteínas.....	1
1.2 El Plegamiento.....	4
1.2.1 Rutas para el Plegamiento de las Proteínas.....	6
1.2.2 Intermediario común en el Plegamiento de las Proteínas. El Glóbulo Fundido.....	9
1.2.3 Enfermedades Relacionadas con el Plegamiento de las Proteínas.....	10
1.3 Desnaturalización y Renaturalización de las Proteínas.....	11
1.3.1 Desnaturalización.....	11
1.3.2 Renaturalización.....	13
1.4 ¿Cómo se estudia el Plegamiento?.....	14
1.5 Papel de las Enzimas.....	15
1.6 Triosafosfato Isomerasa (TIM).....	16
1.6.1 Función de la TIM en la Glucólisis.....	16
1.6.2 Propiedades Catalíticas de la TIM.....	17
1.6.3 Estructura Tridimensional de la TIM.....	19
1.6.4 Justificación del estudio de la TIM de <i>T. cruzi</i> (TcTIM).....	20

Capítulo 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis.....	22
2.2 Objetivos.....	22
2.2.1 Objetivos Particulares.....	22

Capítulo 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material.....	23
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Sobreexpresión y Purificación de TcTIM.....	24
3.2.1.1 Sobreexpresión de TcTIM.....	24
3.2.1.2 Purificación de TcTIM.....	24
3.2.2 Elaboración del Sustrato G3P.....	26
3.2.3 Electroforesis en el Gel SDS-PAGE.....	27

3.3 Determinación de la Concentración de TcTIM.....	27
3.4 Desnaturalización y Renaturalización de TcTIM inducidas por Clorhidrato de Guanidinio.....	28
3.4.1 Diseño de Muestras.....	28
3.4.2 Análisis del cambio en la Estructura Terciaria por Intensidad de Fluorescencia.....	29
3.4.3 Unión de ANS (1-anilino-8-naftalen sulfonato).....	30
3.4.4 Análisis del cambio en la Estructura Secundaria por Dicroísmo Circular.....	31
3.4.5 Determinación de la Actividad Catalítica y Reversibilidad de TcTIM.....	32
3.4.6 Análisis Estructural por Técnicas Computacionales.....	34

Capítulo 4. RESULTADOS

4.1 Purificación de TcTIM.....	35
4.2 Determinación de la Concentración de TcTIM.....	36
4.3 Tiempo de Equilibrio.....	37
4.3.1 Determinación por Intensidad de Fluorescencia.....	37
4.3.2 Determinación por Dicroísmo Circular.....	39
4.4 Análisis del Patrón de Desnaturalización/Renaturalización por Intensidad de Fluorescencia.....	39
4.5 Unión de ANS.....	43
4.6 Análisis por Dicroísmo Circular.....	44
4.7 Actividad Catalítica.....	45
4.7.1 Determinación del Patrón de Plegamiento.....	45
4.7.2 Análisis de la Reversibilidad del proceso de Desnaturalización de TcTIM.....	46
4.8 Análisis Computacional.....	48
4.8.1 Estructura Primaria.....	48
4.8.2 Estructura Cuaternaria.....	49

Capítulo 5. DISCUSIÓN.....	50
----------------------------	----

Capítulo 6. CONCLUSIONES	55
--------------------------------	----

Capítulo 7. PERSPECTIVAS.....	57
-------------------------------	----

REFERENCIAS.....	58
------------------	----

RESUMEN

Estudios de desnaturalización inducida por clorhidrato de guanidinio (Gdn-HCl), para enzimas homólogas de Triosafosfato Isomerasa (TIM) de diversas especies (humano, conejo, *Plasmodium falciparum*, *Thermotoga maritima*, *Leishmania mexicana*, *Sacharomices cerevisiae* y *Trypanosoma brucei*), indican que el patrón de plegamiento de la enzima es heterogéneo, a pesar de que el alineamiento de las secuencias primarias y la superposición de las estructuras tridimensionales de estas proteínas muestran únicamente diferencias muy sutiles. Se ha observado que la ruta de plegamiento va desde un proceso de dos estados, en el caso de *L. mexicana*, hasta procesos complicados, *T. brucei*. Observándose a menudo el proceso de agregación irreversible. En este trabajo estudiamos las reacciones de desnaturalización y renaturalización de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM), inducidas por Gdn-HCl en un intervalo de 0.1 M a 6 M, a 25 ° C. El análisis del cambio en la Intensidad de Fluorescencia Intrínseca como función del tiempo indica que un adecuado tiempo de equilibrio es de 48 horas. Cada una de las muestras fue analizada por Intensidad de Fluorescencia (IF), Dicroísmo Circular (DC) y Actividad Catalítica. Los resultados indican que el patrón de plegamiento de TcTIM consta de cuatro estados, es decir, presenta dos estados intermedarios; de los cuales uno de ellos une ANS en un intervalo de concentración de 0.4-0.8 M de Gdn-HCl: el segundo intermedario presenta mayor IF, DC y Actividad Catalítica que la enzima nativa. Además mediante el análisis de la actividad catalítica se determina que el fenómeno de plegamiento de TcTIM es reversible casi al 100%, esto es sumamente interesante debido a que su pariente directa TIM de *T. brucei* (TbTIM) no sigue un proceso reversible al renaturalizarla y presenta agregados, a pesar de tener alrededor de un 70% de identidad entre ellas. La información obtenida indica que la diversidad de formas por las cuales se puede llevar a cabo el plegamiento de una proteína homóloga no es siempre el mismo, y nos lleva a reconocer que el plegamiento es un proceso inescrutable del cual todavía nos queda bastante por conocer.

Capítulo 1

GENERALIDADES

1.1 Proteínas

Las proteínas son las biomoléculas que desempeñan el mayor número de funciones en las células. Por un lado, forman parte de la estructura básica de los tejidos (músculos, tendones, piel, uñas, etc.) y, por otro, desempeñan funciones metabólicas y reguladoras (asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de lípidos en la sangre, inactivación de materiales tóxicos, etc.)¹. Las proteínas también son los elementos que definen la identidad de cada ser vivo, pues son la expresión del código genético contenido en el genoma. Sus funciones más el ambiente favorecen el fenotipo de los seres vivos.

Las proteínas son polímeros de moléculas que reciben el nombre de aminoácidos y serían por tanto las unidades monoméricas de estas biomoléculas. En la naturaleza existen muchos aminoácidos diferentes, pero en las proteínas sólo puede haber 20 ó 21 diferentes. Con estas moléculas los se pueden sintetizar muchísimas proteínas distintas, ya que en cada una, los aminoácidos se encuentran en un orden y una proporción específica determinada por un gen. Los aminoácidos están unidos entre ellos por medio de enlaces peptídicos. Estos enlaces son de carácter covalente y se establecen entre el grupo carboxilo de un aminoácido (COOH) y el grupo amino (NH₂) del siguiente, dando lugar al desprendimiento de una molécula de agua (Figura 1). El enlace peptídico tiene un comportamiento similar al de un enlace doble (C=C), es decir, presenta cierta rigidez que inmoviliza en un plano los átomos que lo forman².

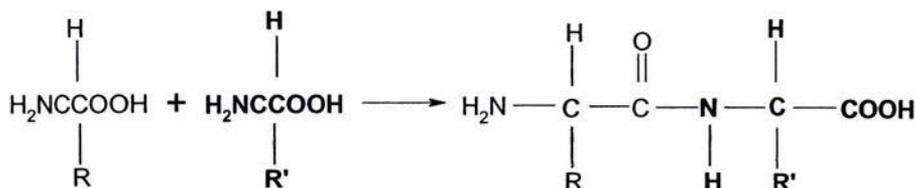


Figura 1. **Reacción de formación del enlace peptídico.** Se resaltan los grupos que participan en la formación del enlace peptídico.

La estructura y, por lo tanto, el papel biológico de una proteína está definido por tres niveles estructurales básicos o esenciales denominados: Estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y en el caso de proteínas oligoméricas también existe la estructura cuaternaria¹.

La estructura primaria (Figura 2) es la simple secuencia de aminoácidos de la proteína¹. Nos indica qué aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que dichos aminoácidos se encuentran; si se conoce la secuencia de nucleótidos del gen es posible obtener la secuencia de residuos de aminoácidos que forman a la proteína, utilizando el código genético, ya que tres letras del ADN (codón), son traducidas por los ribosomas en un aminoácido específico, de ahí la importancia de conocer el genoma, pues en él están las instrucciones para todas las funciones que se necesitan para mantener a los organismos vivientes en condiciones naturales.

Una vez obtenida la cadena principal de residuos de aminoácidos, éstos pueden obtener diversas conformaciones espaciales mediante diversos tipos de interacciones. Por ejemplo, los puentes de Hidrógeno entre los aminoácidos adyacentes originan la formación de estructuras regulares que se extienden a lo largo de una dimensión. Este nivel es al que se le denomina estructura secundaria de las proteínas. Estas estructuras incluyen el ordenamiento de la estructura primaria para la formación de estructuras repetitivas regulares (Figura 2). Es precisamente a partir del empaquetamiento de estas estructuras que las proteínas obtienen su estructura tridimensional y, por lo tanto, su función biológica.

Existen dos tipos de estructura secundaria:

1. La **estructura α -hélice** se forma al enrollarse la estructura primaria helicoidalmente sobre sí misma. Se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo ($-C=O$) de un residuo de un aminoácido y el grupo amino ($-NH-$) del cuarto aminoácido que le sigue en la secuencia. Es decir, que por cada cuatro aminoácidos la secuencia da un giro de 360° . Los aminoácidos que favorecen la formación de la α -hélice son: ALA, GLU, LEU y MET².
2. La **conformación β** de los aminoácidos no forman una hélice sino una cadena plana, en este tipo de estructura secundaria los aminoácidos se acomodan de manera paralela o antiparalela uno respecto al otro y se conectan entre sí por puentes de hidrógeno formando láminas².

La estructura terciaria de las proteínas informa sobre el empaquetamiento de la estructura repetitiva y la estructura irregular (asas) de un polipéptido para formar la conformación nativa (N), que es la biológicamente activa o funcional (Figura 2). Esta conformación se mantiene estable gracias a la existencia de enlaces no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos¹. Estas interacciones son:

1. Los puentes de hidrógeno
2. Las interacciones hidrofóbicas (van der Waals)
3. Las atracciones electrostáticas (puentes salinos)

En algunos casos, para dar mayor estabilidad a la molécula proteica, pueden formarse también enlaces covalentes como los puentes disulfuro. Estos enlaces se forman a través de aminoácidos que contienen azufre (como la Cisteína), y que están distantes en la secuencia primaria.

Para muchas proteínas los niveles de estructura mencionados anteriormente son suficientes para adoptar la conformación nativa. En cambio para otras la estructura nativa sólo se logra cuando se unen dos o más cadenas polipeptídicas iguales o diferentes, dando lugar así a la **estructura cuaternaria** de la proteína (un ejemplo de proteína con estructura cuaternaria es precisamente la Triosafosato Isomerasa (TIM) con la cual se desarrolló este trabajo). Este nivel estructural informa sobre la unión de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria particular, para formar un complejo proteico conocido como oligómero (Figura 2). Cada una de las cadenas polipeptídicas que forman al oligómero recibe el nombre de monómero³.

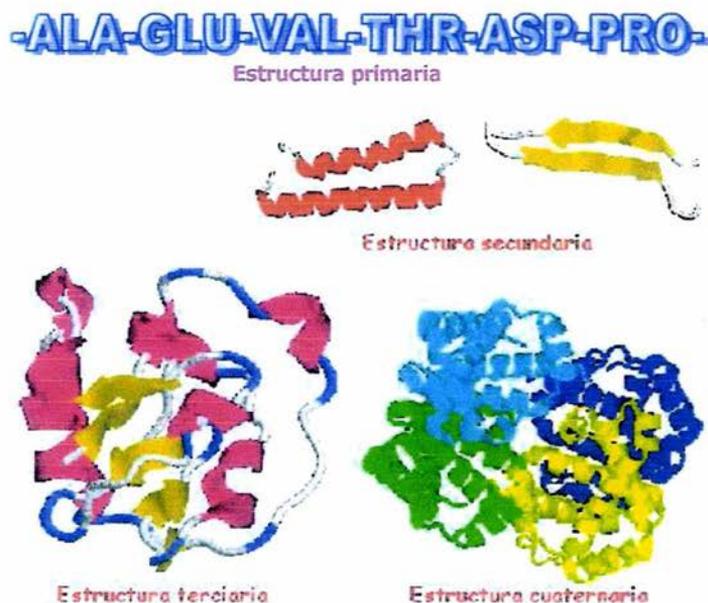


Figura 2. Niveles estructurales de las proteínas. Se representa la estructura primaria, secundaria (α -hélices y hojas β), terciaria y cuaternaria de las proteínas.

1.2 El Plegamiento

Las proteínas adquieren su estructura tridimensional en un proceso llamado plegamiento, en el cual, cada secuencia de aminoácidos particular adopta una conformación nativa o de mínima energía; es precisamente en este estado en el que una proteína permanecerá la mayor parte de su existencia. Este fenómeno comenzó a ser estudiado alrededor de 1960, por Anfinsen⁴, pero debido a la complejidad del fenómeno a la fecha se considera todavía como enigmático.

Actualmente se conocen algunos detalles de cómo es que las proteínas adquieren su función biológica. Se ha logrado descifrar que el plegamiento de algunas proteínas pequeñas y monoméricas ocurre de manera espontánea⁴. Debido a la constante demanda de proteínas en las células, el proceso es muy rápido, ocurre en el orden de los milisegundos a segundos².

También se conoce a detalle los grados de libertad de la cadena polipeptídica, así como todas las fuerzas que participan en el proceso (puentes de Hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, atracciones electrostáticas y puentes disulfuro). El arreglo estructural que adoptan las proteínas al plegarse generalmente consiste en dirigir a los aminoácidos hidrofóbicos al interior de la molécula (ALA, VAL, PHE, PRO, MET, ILE Y LEU), mientras que los aminoácidos polares se localizan en la superficie (SER, THR, TYR, HYS, CYS, ASN, GLN, TRP); y es por eso que las proteínas son muy solubles en agua.

El plegamiento hacia la conformación nativa es un proceso central para que las proteínas puedan llevar a cabo su función correctamente. En el plegamiento *in vivo*, existen factores auxiliares como chaperonas que son proteínas catalizadoras que asisten al proceso¹. Sin embargo, estos factores sólo facilitan el plegamiento productivo en el ambiente celular pero no lo dirigen³.

Se sabe por estudios *in vitro* que para algunas proteínas el proceso NO necesita de información adicional o entrada de energía, por lo tanto se deduce que la información necesaria para la adquisición de la estructura tridimensional con actividad biológica se encuentra codificada, también, en la secuencia primaria¹. De ahí que al plegamiento se conozca como segunda parte del código genético.

La reducción más sencilla que se puede hacer para estudiar el complejo proceso del plegamiento proteico, es considerarlo como una única reacción química de transformación, en donde la cadena de aminoácidos sin estructura denominada U (de "unfolded") se

transforma en la estructura tridimensional con actividad biológica como se muestra en la Figura 3.

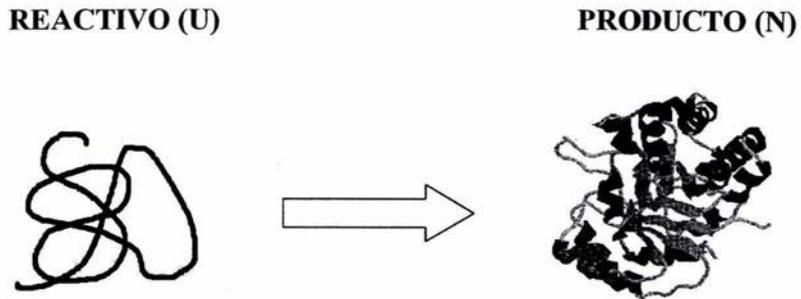


Figura 3. Representación del Plegamiento como una reacción química. A la izquierda se representa a la proteína sin estructura (U), y del lado derecho la estructura tridimensional que se obtiene después del plegamiento (N).

Dado que el proceso *in vivo* puede llegar a ser muy complicado se han diseñado experimentos para poder estudiarlo *in vitro*. Estos experimentos se conocen como de desnaturalización y consisten en ocasionar la pérdida de la estructura tridimensional de la proteína en cuestión⁴. Esto se debe a que generalmente aislamos a las proteínas de las células que las producen por medio de técnicas que relacionan su estructura y función (como la actividad catalítica), por lo tanto se encuentran en su estructura Nativa (N). De ahí que en esta reacción se cuantifica, de manera controlada, la desaparición de las propiedades de la proteína en estudio, hasta obtener una condición en donde la proteína carece de estructura (U).

La desnaturalización se puede inducir por cambios de temperatura, presión, variaciones del pH o al agregar ciertas sustancias como la urea o el clorhidrato de guanidina⁴, es decir, la estructura Nativa está relacionada con las condiciones ambientales. Para algunas moléculas proteicas, si las condiciones originales de temperatura, presión, pH o fuerza iónica se restablecen, la proteína sin estructura o desnaturalizada (U), puede volver a su conformación tridimensional original, reestableciendo también su función. A este proceso se le denomina renaturalización y sería equivalente a colocar la flecha de regreso en la reacción mostrada en la Figura 3.

1.2.1 Rutas para el Plegamiento de las Proteínas

Conocer las rutas mediante las cuales las proteínas adquieren su estructura tridimensional para tener el arreglo espacial que les permite obtener su estructura N y funcional es un problema aún no resuelto. A lo largo de la historia se han propuesto diversos modelos que describen la transición de la proteína de su estado U hacia la formación del estado N. Los modelos más reconocidos son los siguientes:

1. El modelo clásico de **nucleación-propagación** implica la formación de un núcleo de la cadena de aminoácidos hidrofóbicos, seguida de un rápido avance de la cadena polipeptídica hacia el estado plegado. En este modelo la formación del núcleo es la limitante de este paso⁵.
2. Modelo dinámico de **difusión-colisión**, en este modelo la nucleación ocurre en pequeñas partes de la molécula formando microestructuras. Todas las posibles conformaciones pueden ser buscadas rápidamente pero no todas son estabilizadas. Varios de estos microdominios tienden a colisionar y a producir en coalescencia una subestructura con la conformación nativa. El plegamiento es realizado por una serie de pasos de difusión-colisión⁶.
3. El modelo de **plegamiento en etapas** implica varios niveles de estructuración en los cuales varios elementos estructurales son formados y ensamblados; este modelo requiere una secuencia de eventos bien definidos asignando elementos estructurados con una relativa estabilidad a cada etapa del proceso⁷.
4. El **modelo jerárquico del plegamiento de las proteínas**, corresponde al orden de formación de la estructura de las proteínas⁸. Este modelo plantea que durante los primeros milisegundos del plegamiento la molécula se compacta y aparecen elementos de estructura secundaria (α hélices y hojas β). La siguiente etapa involucra la formación de puentes de Hidrógeno estables y la nucleación de los aminoácidos hidrofóbicos al solvente, en esta etapa inicia la formación de la estructura terciaria y por lo tanto pueden presentarse intermediarios con estructura muy semejante a la nativa, siendo la etapa más lenta del plegamiento⁹. Debido a que este modelo engloba de forma total la ruta de plegamiento de una proteína, se representa en la Figura 4.

Las proteínas en su estructura son sistemas dinámicos que fluctúan entre un número determinado de conformaciones y no son una estructura única. Por más pequeña que sea la secuencia de aminoácidos de la proteína en cuestión es imposible pensar que una

proteína pueda visitar al azar¹⁰ todas las conformaciones posibles para plegarse correctamente, debido a la gran cantidad de tiempo que esto le llevaría y tomando en cuenta la velocidad con la cual se pliegan. Por ejemplo, supongamos que una cadena polipeptídica tiene 100 residuos y en promedio cada residuo puede adoptar 10 conformaciones que difieren unas de otras solamente en el ángulo de rotación de los enlaces de los residuos de aminoácidos que componen el esqueleto polipeptídico, la cadena podrá adoptar 10^{100} conformaciones. Si la velocidad de transformación de una conformación en otra es muy rápida por ejemplo de 10^{-13} s, el tiempo promedio requerido para visitar todas las posibles conformaciones sería del orden 10^{81} años. El resultado de esta estimación, es muchas veces mayor que la edad del universo (10^{59} años)¹¹. A pesar de lo anterior, las proteínas generalmente adoptan su estructura tridimensional funcional en intervalos de milisegundos-segundos. Para resolver esta paradoja, Levinthal a finales de la década de los 60s, postuló la existencia de rutas preferenciales en el plegamiento de los polipéptidos¹¹. En estas rutas, la cadena polipeptídica viaja a través de una secuencia específica de intermediarios hasta plegarse en la estructura *N*. Debido a lo anterior, la detección y caracterización de los intermediarios estables que aparecen en las rutas desde el estado *N* (desnaturalización) o hacia él (renaturalización), son preguntas centrales en los estudios de plegamiento.

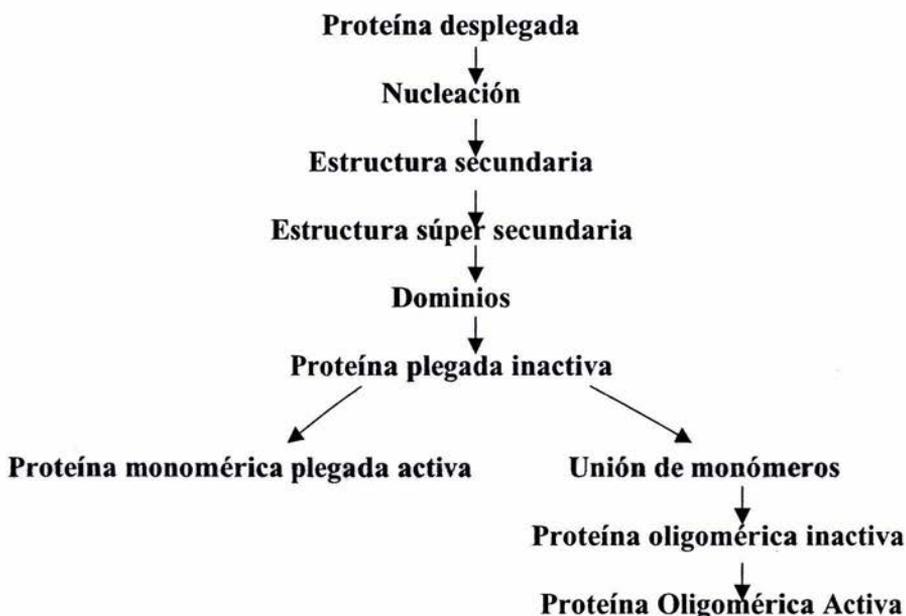


Figura 4. **Representación del Modelo Jerárquico del Plegamiento de las proteínas.** Se representan cada uno de los niveles estructurales propuestos en el modelo jerárquico del plegamiento de las proteínas.

Diversos estudios al equilibrio sobre el plegamiento indican que el proceso se logra a partir de la generación local de estructura secundaria (α -hélices y hojas β)⁹. Este temprano estado del plegamiento de las proteínas, en el que se encuentra mucha estructura secundaria, se dice que es extremadamente rápido ya que aparece 5ms después de iniciado el plegamiento en proteínas pequeñas. Es decir, de acuerdo a los modelos de plegamiento ya mencionados, al iniciarse dicho proceso se adquiere estructura secundaria y se efectúa una compactación de los aminoácidos hidrofóbicos, lo que hace que el plegamiento se conduzca hasta obtener un colapso hidrofóbico. Este colapso es conocido como glóbulo fundido, que es una estructura intermedia de la que se hablará detenidamente más adelante debido a que existe evidencia de que la enzima que se estudia en este trabajo presenta en su ruta de plegamiento un intermediario con esas características¹².

A partir de los 5 a los 1000ms la estructura secundaria vuelve a estabilizarse y forma la estructura terciaria, y es durante este tiempo cuando los elementos de estructura nativa comienzan a formar sub-dominios que se acoplan hasta formar los dominios¹². El estado final del plegamiento involucra la formación de puentes de hidrógeno estables y la exclusión de algunos aminoácidos hidrofóbicos del solvente; en esta etapa inicia la formación de la estructura terciaria y pueden presentarse intermediarios con estructura muy semejante a la nativa¹¹. Los últimos eventos en el plegamiento involucran la formación del resto de las interacciones no covalentes que mantienen la conformación nativa. Esta es la etapa más lenta del proceso del plegamiento⁹.

1.2.2 Intermediario común en el Plegamiento de las Proteínas. El Glóbulo Fundido.

El glóbulo fundido es un intermediario que se presenta en los primeros estadios del plegamiento de muchas proteínas¹², lo que sugiere la existencia de una ruta cinética general en este proceso. La presencia del glóbulo fundido como estado intermediario común en el proceso de plegamiento o desplegamiento de las proteínas ha sido ampliamente estudiado^{4,9,12} y se ha encontrado que existe como intermediario del plegamiento para una gran variedad de proteínas¹². Existe evidencia de que la TIM puede anexarse a la amplia lista de proteínas que presentan características de glóbulo fundido. Las características estructurales que presenta el glóbulo fundido son:

- * La presencia de una elevada cantidad de estructura secundaria similar a la presente en el estado nativo¹².
- * Ausencia de la mayoría de la estructura terciaria por el empaquetamiento de las cadenas laterales⁴.
- * La molécula pierde parte del núcleo hidrofóbico lo que incrementa el acceso del solvente a la superficie hidrofóbica de la molécula¹².
- * La interconversión al estado totalmente desplegado es rápida y no cooperativa, pero lenta y cooperativa para el estado nativo⁹.

Actualmente se ha utilizado el análisis de fluorescencia para el estudio del plegamiento de las proteínas, ya que aporta información de las transiciones de las macromoléculas, siguiendo el cambio en esta propiedad espectroscópica mediante el uso de fluoróforos intrínsecos (como el triptofano) o bien extrínsecos como el 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) que se muestra en la Figura 5.

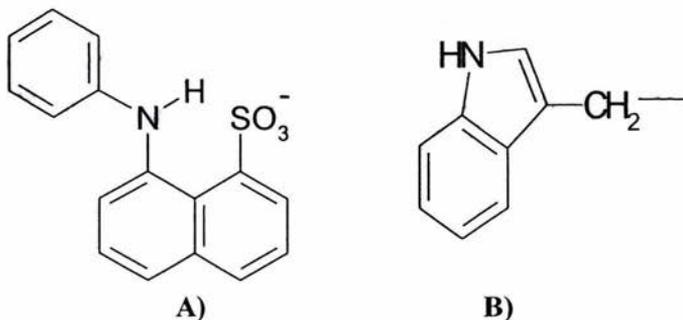


Figura 5. **Estructura de moléculas fluorescentes.** A) 1-anilino-8-naftaleno sulfonato, fluoróforo extrínseco. B) Triptofano, fluoróforo intrínseco.

El uso de este fluoróforo extrínseco se debe a su capacidad para ayudar a detectar cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas por medio del cambio en propiedades principalmente hidrofóbicas de ciertas regiones de la proteína, que afectan el acceso de regiones no polares¹³. Es decir, se ha comprobado que esta molécula es capaz de unirse a las regiones principalmente hidrofóbicas de las proteínas, lo cual es de gran ayuda para describir las transiciones por las cuales pasa la proteína en el proceso de desnaturalización o renaturalización. La unión de la molécula del ANS a estas regiones hidrofóbicas de la proteína modifica su intensidad de fluorescencia. Cabe mencionar que en general el ANS no se une a la proteína en estado N ni tampoco en el D.

1.2.3 Enfermedades Relacionadas con el Plegamiento de las Proteínas

Diversas enfermedades neurológicas se caracterizan por presentar en células específicas de tejidos específicos, agregados proteicos insolubles llamados depósitos amiloides. Estas enfermedades están relacionadas con conformaciones anómalas o erróneas de algunas proteínas². En estos casos, proteínas cuya conformación nativa es globular adoptan una estructura fibrosa². Estas patologías pueden tener un origen genético, esporádico o infeccioso. A la fecha no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que le han permitido a una proteína, a lo largo de la evolución, permanecer soluble en las condiciones particulares del organismo, o formar agregados insolubles que se depositen en órganos y tejidos causando una patología¹⁴.

Estas enfermedades incluyendo a la enfermedad del Alzheimer en humanos, son el resultado de la precipitación de alguna proteína. El plegamiento anormal de las proteínas es al menos un factor en un grupo de desordenes infecciosos que incluyen la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o enfermedad de las vacas locas y otras fatales enfermedades humanas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y la diabetes tipo II ². Al conjunto de estas patologías se le conoce como Enfermedades del Plegamiento Anómalo de las Proteínas (EPAPs)¹⁴.

Debido a que las células cuentan con mecanismos para evitar y revertir el plegamiento anómalo de las proteínas, se ha propuesto que las EPAPs se deben, al menos parcialmente, a: 1) Alteración de los mecanismos que regulan las condiciones fisiológicas; 2) Fallas en el "control de calidad" postraduccional¹⁴.

Una hipótesis avanzada de Stanley Prusiner², indica que estas enfermedades son causadas por una proteína conocida como prión. Un prion es una proteína codificada por el cromosoma normal que presenta una conformación alterada. Los priones han perdido su función original, pero han adquirido la habilidad de convertir a las moléculas de proteína normales en priones; de ahí el nombre de proteína infecciosa.

Las enfermedades del cerebro muestran aparentemente una mezcla de hojas β y α hélices que forman agregados insolubles fibrosos que dañan las células del cerebro. Actualmente, se cree que los priones presentes en los órganos y tejidos infectan a las proteínas para que sigan el camino de la falta de plegamiento haciendo que las proteínas se agreguen y se almacenen.

1.3 Desnaturalización y Renaturalización de las Proteínas.

1.3.1 Desnaturalización

Dado que las proteínas son aisladas de la célula que las produce en su estado nativo, el plegamiento de las mismas *in vitro* es un proceso que debe estudiarse por medio de experimentos de Desnaturalización y Renaturalización.

Se dice que una proteína se desnaturaliza cuando pierde sus diversos niveles de organización estructural. La desnaturalización es causada por un colapso de la estructura original con la ruptura de los enlaces iónicos, de las interacciones hidrofóbicas y de los puentes de hidrógeno, sin cambio en la estructura primaria, es decir, la pérdida total de la estructura nativa. La desnaturalización va acompañada de la disminución de la solubilidad, cambios en la rotación óptica y en las propiedades espectroscópicas, así como pérdida de la función biológica⁹. El fenómeno de la desnaturalización comenzó a ser estudiado en la primera década del siglo XX².

Las proteínas pueden ser desnaturalizadas por gran variedad de condiciones: variación de la temperatura y presión, variaciones de pH, adición de detergentes o agentes caotrópicos que se describen a continuación.

1.3.2 Renaturalización

En algunos casos al eliminar los agentes que causan la desnaturalización, la proteína recupera su conformación original (Nativa), y a este fenómeno se le conoce como renaturalización y fue descubierto en el año 1957, por Christian Anfinsen². Este investigador desarrollo experimentos con la Ribonucleasa A (RNasa A)⁴ en los cuales demostró que la proteína puede ser desnaturalizada y renaturalizada encontrando que las características de la proteína antes y después de la desnaturalización son indistinguibles. La RNasa A fue desplegada con una solución de Urea 8M que posteriormente fue dializada. La proteína así obtenida es 100% enzimáticamente activa y físicamente indistinguible de la enzima que no se sometió al experimento.

De manera natural las proteínas han sido diseñadas para ser moléculas con alto grado de flexibilidad lo que les permite llevar a cabo su función y lograr así su estructura nativa de manera espontánea, por lo tanto se esperaría que una vez desnaturalizadas puedan volver a su conformación nativa de la misma manera, después de regresar a sus condiciones nativas; pero se ha demostrado que no en todos los casos es posible. Es decir, es posible desnaturalizar a la proteína, pero no se garantiza que el proceso sea reversible.

La reacción de renaturalización de las proteínas oligoméricas tiende a ser aún más difícil, ya que a menudo se presenta la precipitación o agregación de estas moléculas, lo que conduce a una parcial o total proceso irreversibilidad. Para determinar la estabilidad conformacional y por lo tanto biológica de las proteínas mediante el análisis termodinámico, es necesario que el proceso sea reversible⁹.

Debido a que al aumentar o disminuir gradualmente la condición desnaturalizante a una proteína se modifica la proporción entre el número de moléculas que se encuentran en el estado N y U, en el caso de un modelo de dos estados. Se puede obtener así un perfil de desnaturalización o renaturalización según sea el caso.

1.4 ¿Cómo se estudia el Plegamiento?

Las principales técnicas experimentales que nos ayudan a seguir las transiciones estructurales que se llevan a cabo durante la desnaturalización y renaturalización de las proteínas son:

- * **Actividad Biológica.** Ayuda a determinar las transiciones estructurales a nivel estructural nativa, pues es ésta la única que posee esta característica.
- * **Espectroscopia UV-VIS.** Es particularmente utilizada para el estudio de moléculas con grupos cromóforos, y la sensibilidad del método depende del coeficiente de extinción de cada proteína. Para un coeficiente de extinción de 10^4 el límite de detección es de 0.5nmol utilizado un espectrofotómetro convencional y esperando una absorbancia de 0.01. Las proteínas absorben luz UV-VIS a 280nm¹.
- * **Espectrofluorimetría.** Algunos compuestos absorben luz y después la emiten alargando su longitud de onda, a este fenómeno se le conoce como fluorescencia. El mayor fluoróforo (residuo aromático), en una proteína es el Triptofano, el cual absorbe luz de 275-295nm y la emite en un intervalo de 330-340nm. La fluorescencia es teóricamente cerca de 100 veces más sensible que la espectrofotometría UV-VIS para la detección de bajas concentraciones de proteína. La fluorescencia del triptofano se utiliza para seguir la movilidad interna de la proteína y la exposición o exclusión de los residuos aromáticos del solvente⁹.
- * **Dicroísmo Circular (DC).** El DC es una propiedad de la actividad óptica de las moléculas. Se puede observar esta propiedad en el esqueleto polipeptídico de una proteína en la región del espectro UV cercano (270-300nm) y UV lejano (170-250nm) en sus diferentes estructuras secundarias. Las α hélices se caracterizan por presentar señal negativa de DC a 222nm y señales positivas alrededor de 192nm. Mientras que las señales para las hojas β son similares pero menos apreciables⁴.
- * **Filtración en Gel.** Esta técnica es ampliamente utilizada para la determinación del tamaño de las moléculas que participan en una reacción de desnaturalización de proteínas. Comúnmente se realiza con geles comerciales como Sephadex, Sephacryl y Biogel. Estos geles tienen un tamaño de poro tal

que la proteína puede ser fácilmente separada de las otras moléculas por diferencia de tamaño de manera efectiva².

- * **Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).** Es una técnica ampliamente utilizada para obtener información de la naturaleza del desplegamiento de las proteínas y de las fuerzas involucradas en estabilizar a las proteínas⁴.

En el caso de tener un modelo de desnaturalización de dos estados se observa que, la estructura de las proteínas cambia conforme se incrementa la condición desnaturalizante, en principio, la proporción entre las moléculas de proteína presentes en el estado nativo (N) y el desnaturalizado (D), se modifique de tal manera que se puede obtener el patrón o perfil de desnaturalización. Este proceso fue estudiado primeramente por Anfinsen en 1973. Del mismo modo es posible obtener el perfil de renaturalización al disminuir la condición desnaturalizante regresando a las condiciones que favorecen la presencia del estado N.

1.5 Papel de las Enzimas

Las enzimas son las proteínas encargadas de llevar a cabo todas las reacciones químicas que forman parte del metabolismo de la célula y, por lo tanto, de ellas depende en gran parte el buen funcionamiento celular. Las principales propiedades que presentan las enzimas son las siguientes:

- ❖ **Mayor Velocidad de Reacción.** Las reacciones catalizadas enzimáticamente alcanzan velocidades de reacción de 10^6 a 10^{12} veces mayores que las reacciones no catalizadas enzimáticamente y de varios ordenes de magnitud mayor que las catalizadas químicamente. Esto es posible, gracias a que las enzimas disminuyen el estado de activación de la reacción y por lo tanto la reacción es mucho más rápida que en ausencia de la enzima. En presencia de las enzimas se requiere de un gasto mínimo de energía, y se pueden recuperar íntegras al final de la reacción ya que no participan directamente en ella. La velocidad de reacción enzimática depende de:

- La cantidad o la actividad específica de la enzima.
- La concentración del sustrato.

- El pH y la composición de la solución en que se lleve a cabo la reacción.
 - La temperatura.
 - La presencia de activadores o inhibidores.
- ❖ **Condiciones de Reacción Suaves**, las enzimas trabajan a temperatura, a presión y en condiciones de pH específicas de acuerdo a las características del organismo en el que se encuentren.
- ❖ **Especificidad de Reacción**, las enzimas presentan una gran selectividad por la identidad de los grupos químicos de sus sustratos y productos, de tal manera que rara vez se obtiene productos colaterales o secundarios de la reacción.
- ❖ **Capacidad de Regulación**, es decir, que algunas actividades enzimáticas varían de acuerdo con la concentración de otras moléculas diferentes de sus sustratos (cofactores). Los mecanismos de regulación incluyen la inhibición, control alostérico, modificación covalente enzimática y variación en la cantidad de enzima sintetizada.

1.6 Triosafosfato Isomerasa (TIM)

1.6.1 Función de la TIM en la Glucólisis

Una de las reacciones químicas más importantes para la mayoría de las formas de vida es el ciclo glucolítico. Esta vía metabólica anaeróbica consta de 10 reacciones enzimáticas en donde una molécula de 6 carbonos (glucosa), es convertida en dos moléculas de tres carbonos (piruvato) con la generación de dos moléculas de ATP (principal molécula de almacenamiento energético en el metabolismo celular), la reacción general se muestra en la Figura 7.

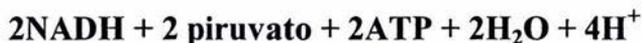


Figura 7. **Ecuación general de la glucólisis**¹. Donde NADH: Nicotin Adenin Dinucleótido reducido; NAD⁺: Nicotin Adenin Dinucleótido oxidado; ADP: Adenosin Difosfato; ATP: Adenosin Trifosfato; P_i: Fosforo inorgánico.

En la reacción 4 de esta vía, la hexosa difosforilada fructosa-1,6-bisfosfato es dividida por la enzima aldolasa en dos triosas: dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que es una cetosa, y el gliceraldehído-3-fosfato (GAP), que es una aldosa, las cuales son isómeros².

Para la obtención final de dos moléculas de piruvato se requiere isomerizar a la DHAP en GAP, pues únicamente este último podrá convertirse en piruvato. La isomerización de estas triosas es catalizada precisamente por la Triosafosfato isomerasa (TIM o TPI) enzima con la que se desarrolló este trabajo (ver Figura 8).

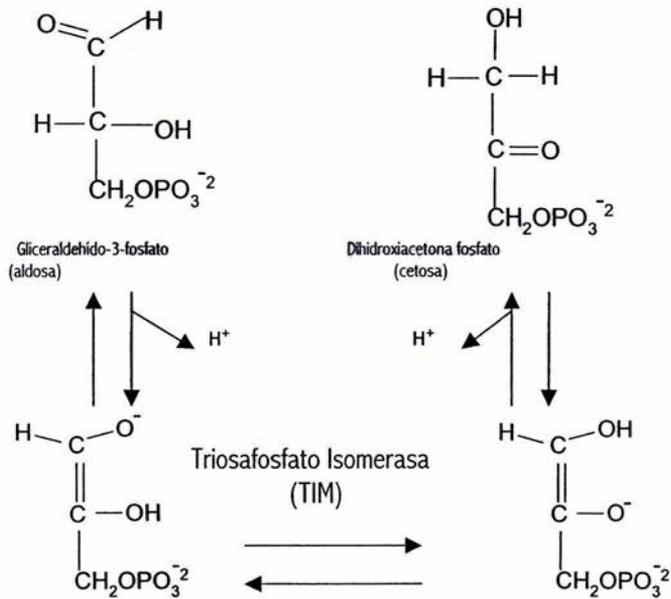
1.6.2 Propiedades Catalíticas de la TIM

Se sabe que el mecanismo catalítico de la enzima es a través de un intermediario endiolatado. La TIM cataliza las reacciones uniéndose más fuertemente al estado de transición que al sustrato; de hecho el 2-fosfoglicolato se une de 100 a 155 veces con más afinidad a la TIM que el Gliceraldehído-3-fosfato o Dihidroxiacetona fosfato¹⁵.

La transformación de DHAP en GAP realizada por la TIM, es muy rápida, entre 10⁸ y 10⁹ veces más que en ausencia de la enzima, diversos estudios han confirmado por una parte, que la unión del GAP a la enzima está limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos especies, y por otra, que no se debe a los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el solvente para la catálisis o a los rearrreglos químicos entre el sustrato y la enzima, por ello se le conoce como “catalizador perfecto”².

Diversos estudios han revelado que cuando el sustrato se une al sitio catalítico, del asa próxima a este (asa 6), la cual está conservada en todas las TIM, se cierra sobre el sitio activo; esta asa es conocida como asa catalítica o flexible, y se ha comprobado que la

mutación de los aminoácidos que la componen reduce 10^5 veces el poder catalítico de la enzima¹⁵.



Intermediario endiolatado

Figura 8. Esquema de la reacción catalizada por la TIM¹. Se representa la interconversión del Intermediario endiolatado por la TIM.

No es claro por qué la TIM sólo es activa como dímero, ya que los aminoácidos involucrados en la catálisis se encuentran en cada monómero, como se puede observar en la Figura 9. Es probable que las interacciones en la interfase sean necesarias para mantener a los aminoácidos catalíticos en una posición adecuada, o para mantener la estabilidad de la estructura de barril, de hecho un determinado número de aminoácidos de la interfase se encuentra conservado. Sin embargo, algunos miembros de la familia de proteínas α/β son barriles activos como monómeros².

1.6.3 Estructura Tridimensional de TIM

La Triosafosfato Isomerasa TIM, presenta un elevado contenido de estructura secundaria en su estructura N, presenta en promedio aproximadamente 31% de α hélices y 28% de hebras β plegadas del total de la estructura.

La estructura secundaria de la TIM esta formada por ocho hebras β que alternan con una o dos α hélices. La cadena se pliega de manera que las ocho hebras forman una hoja β paralela central semejante a un barril (en ángulo formado entre las hebras y el eje del barril es de 35°). Las hélices que unen a las hebras β se empaquetan en forma paralela a la dirección de las hebras (Figura 9). Este patrón se ha encontrado en alrededor de 20 enzimas con actividades catalíticas diversas¹.

La TIM es una enzima clave para el metabolismo celular por lo cual se predice su presencia en todo organismo terrestre. Esta enzima se ha encontrado en diversas especies y actualmente se conoce la estructura tridimensional de 11 de ellas (humano¹⁶, pollo¹⁷, *Sacharomices cerevisiae*¹⁸, *Tripanosoma cruzi*¹⁹, *Tripanosoma brucei*²⁰, *Escherichia coli*²¹, *Bacillus stearothermophilus*²², *Leishmania mexicana*²³, *Pyrococcus woesei*²⁴, *Plasmodium falciparum*²⁵, *Termotoga maritima*²⁶, *Entamoeba histolytica*²⁷ y músculo de conejo²⁸). Al analizar la actividad catalítica de TIM se encontró que sólo es activa como dímero. Su peso molecular es de aproximadamente 27KDa¹.

El sitio activo de esta enzima se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad que se forma por las asas contiguas a las hebras. Los aminoácidos que componen el sitio activo son el GLU165, HIS95 y LYS12, y estos residuos están conservados en proteínas homólogas. En proteínas homólogas, las regiones que se encuentran en el sitio activo están conservadas, así como los residuos directamente involucrados en la química de la reacción. En el caso de la TIM, los aminoácidos conservados son aquellos que participan directamente en la química de la reacción, o se localizan en la vecindad del sitio activo. A pesar de las diferencias en los aminoácidos de la interfase, la topología del barril y la geometría de la asociación de los monómeros en el dímero, es semejante en diferentes especies¹⁵.

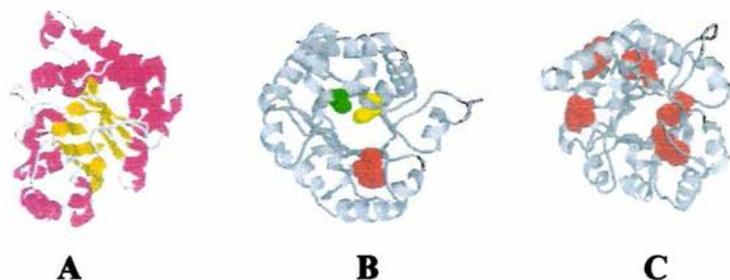


Figura 9. Representación de la estructura tridimensional de una unidad monomérica de la TIM de *T. cruzi*. A) Representación de las estructuras secundarias. B) Representación de los aminoácidos que conforman el sitio catalítico: GLU165 (rojo), HIS95 (amarillo) y LYS12 (rojo). C) Representación de los residuos de Trp (rojo) por monómero.

1.6.4 Justificación del estudio de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM)

Dado el papel central que juega la TIM en el metabolismo anaerobio, se ha propuesto como blanco para construir fármacos específicos contra agentes infecciosos principalmente humanos, que en alguna parte de su ciclo de vida dependan básicamente de la glucólisis como fuente de energía. Este es el caso de los tripanosomátidos, como lo es el *Tripanosoma cruzi*¹⁹.

Toda la información obtenida sobre TcTIM es de gran utilidad por que el protozoo patógeno del cual se aísla provoca la Tripanosomiasis americana o "Enfermedad de Chagas". Dicha enfermedad a infectado a 24 millones de personas en América Latina y según la OMS las muertes por año debido a esta enfermedad tienen un promedio de 45 mil¹⁷. Tomando en cuenta la situación socioeconómica y habitacional de los países afectados, principalmente en América Latina, algunos especialistas aseguran que dicha enfermedad constituye mayor amenaza que el SIDA. Incluso el mal provocado en Latinoamérica por la Enfermedad de Chagas se ubica en el tope de las enfermedades endémicas; entre las afecciones parasitarias se encuentra en tercer lugar, detrás de la malaria y la esquistosomiasis²⁹.

En la actualidad, una de las principales preocupaciones científicas es elaborar drogas o medicamentos efectivos contra las enfermedades producidas por parásitos. Las drogas actuales contra la tripanosomiasis generan desafortunadamente también algunos efectos colaterales en los pacientes. El estudio detallado de toda la información estructural de esta proteína está relacionado además con la generación de información necesaria para tratar de curar la enfermedad de Chagas²⁹. Y debido a que existen pequeñas diferencias entre la enzima de este parásito y la de los humanos, esta información se puede aprovechar para el diseño racional de nuevos medicamentos³⁰.

T. brucei es evolutivamente un pariente muy cercano de *T. cruzi* y produce la enfermedad del sueño en humanos y el nagana en ganado vacuno en África. Si se compara la estructura primaria de las TIMs de ambos parásitos, resulta que 185 de los 250 aminoácidos que las componen son idénticos en ambas proteínas; el 26% restante se compone de 30 cambios conservativos, lo que indica que únicamente hay un 15% de cambios drásticos o no conservativos entre ambas proteínas³¹.

A pesar de estas diferencias la estructura tridimensional de estas proteínas no muestra diferencias significativas¹⁹. Aún así, el patrón de plegamiento para ambas enzimas sigue rutas diferentes³¹. Experimentos preeliminares¹⁹ muestran que el patrón de plegamiento de la enzima de *T. cruzi* es reversible pero complejo, es decir, no es un proceso de dos estados; por lo tanto es necesario determinar cuales y cuantos son los pasos que lo determinan. Esta observación es interesante por que un pariente directo de *T. cruzi*, *T. brucei* posee un plegamiento irreversible y forma agregados. Dado que los agregados están presentes en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, estudiar el origen de los mismos es un campo de vanguardia.

Capítulo 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

El patrón de renaturalización de TcTIM debe ser muy similar al obtenido para la desnaturalización.

2.2 OBJETIVOS

- Estudiar la renaturalización de TcTIM y comparar con los resultados reportados para la desnaturalización.

2.2.1 Objetivos Particulares

- ❖ Definir el tiempo de equilibrio de TcTIM tanto en el proceso de desnaturalización como en el de renaturalización.
- ❖ Analizar el patrón de plegamiento-desplegamiento de TcTIM mediante cambios en la Intensidad de Fluorescencia Intrínseca y Extrínseca, Dicroísmo Circular y Actividad Catalítica.
- ❖ Estudiar la reversibilidad del proceso desnaturalización/renaturalización en diferentes condiciones.
- ❖ Realizar una comparación del patrón de plegamiento de enzimas homologas TIM de diversas especies.

Capítulo 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de expresión de *E. coli*/BL21DE3pLysS
- Enzima α -GDH (α -Glicerol Deshidrogenasa)

REACTIVOS

- Medios de cultivo LB (Luria Bertani), para *T. cruzi*
 Bacto Triptona10g
 Extracto de Levadura5g
 NaCl.....5g
 Agua1L

- Amortiguador de Lisis pH 6.5

REACTIVO	M
MES	0.025
EDTA	9.99×10^{-4}
DTT	9.98×10^{-4}
PMSF (en 200 μ L de DMSO)	1.99×10^{-4}

- Amortiguador A pH 8

REACTIVO	M
TEA	0.249
Azida de Na	0.01
DTT	5.0×10^{-4}
EDTA	0.0199

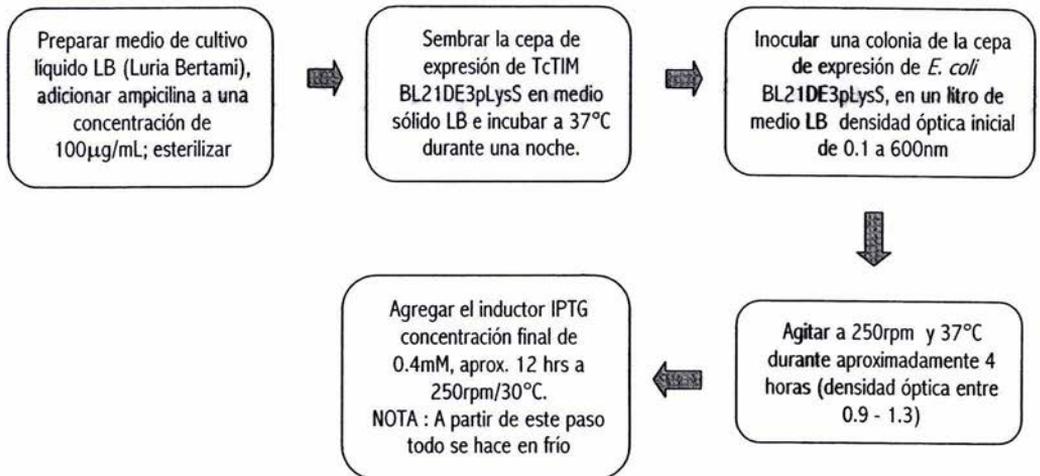
- Ampicilina
- IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido)
- NADH (Nicotin Adenin Dinucleotido reducido)
- G3P (Glicerol-3-fosfato)
- ANS (1-anilino-8-naftalen sulfonato)
- Gdn-HCl (Clorhidrato de Guanidinio)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Sobreexpresión y Purificación de Tc TIM

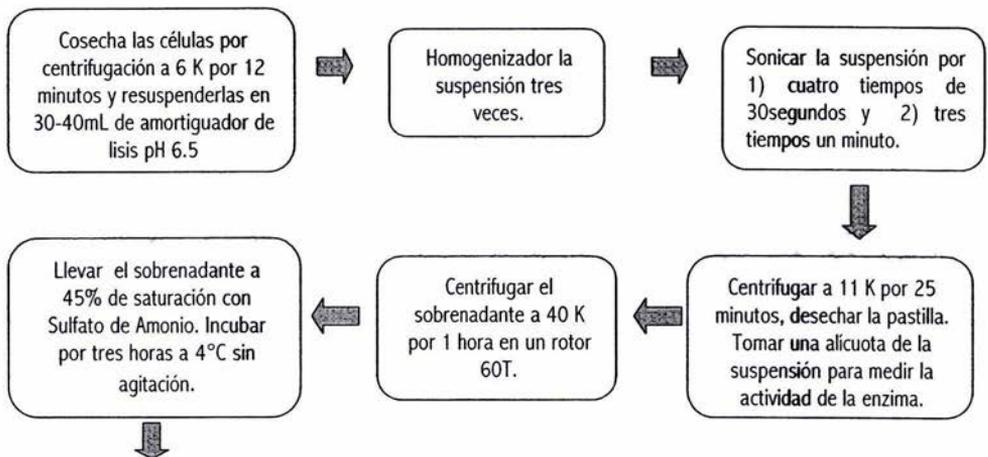
3.2.1.1 Sobreexpresión de TcTIM*

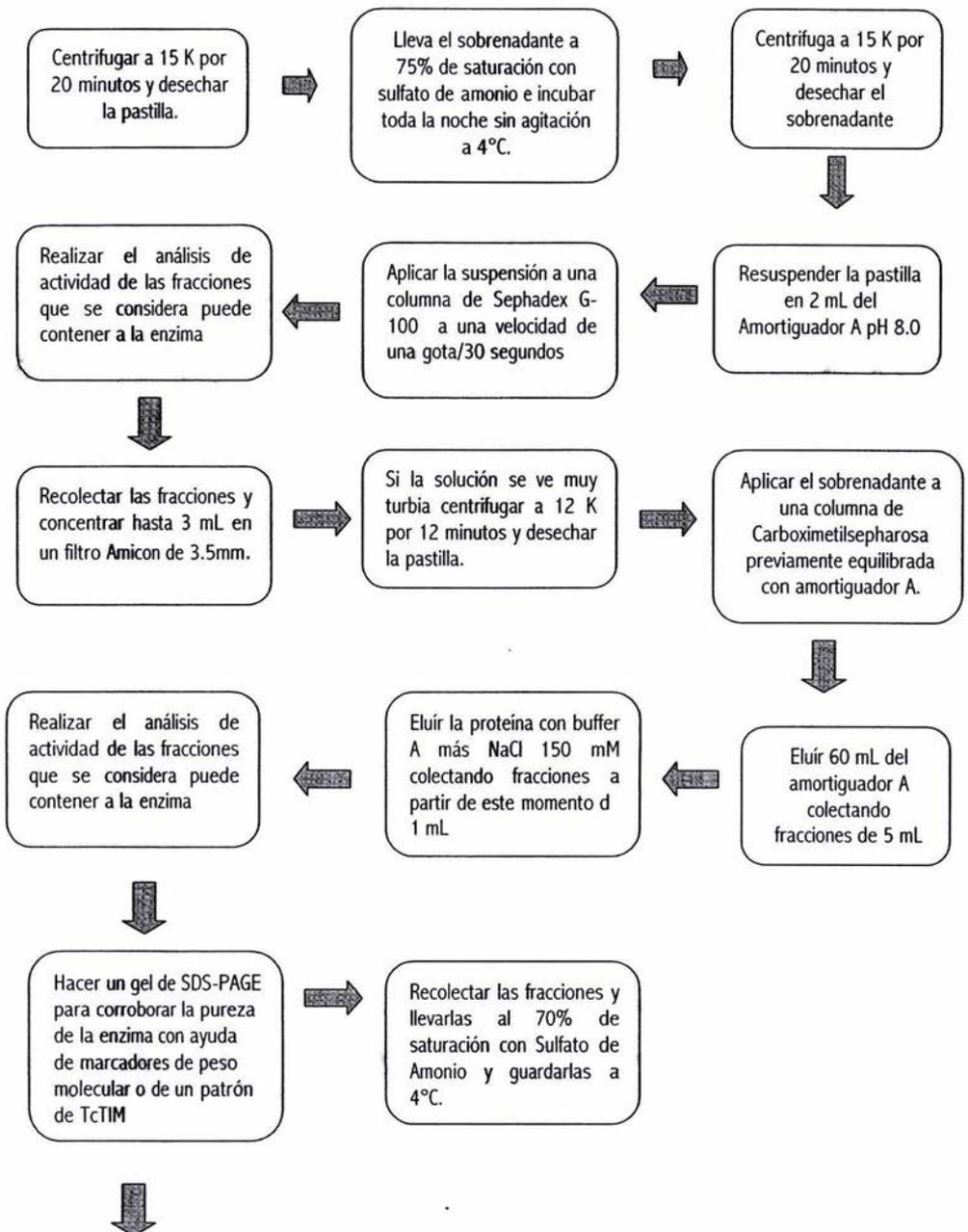
* Realizado de acuerdo a Ostoa-Saloma, Pedro., *et. al.*1997

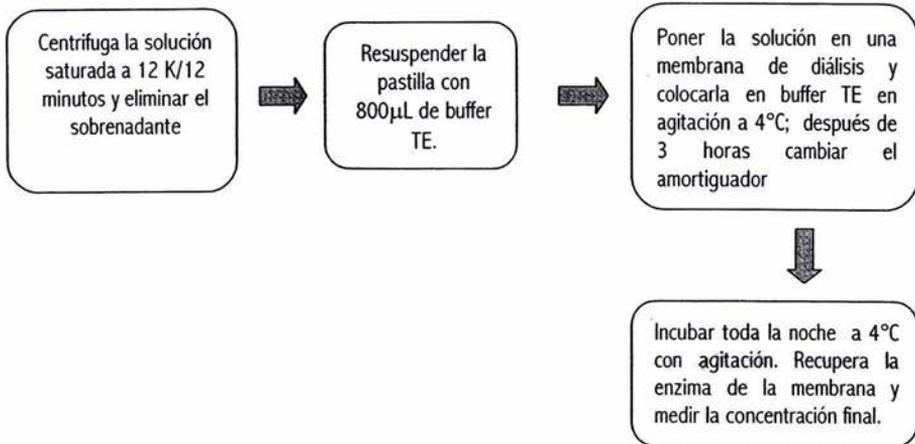


3.2.1.2 Purificación de TcTIM*

* Realizado de acuerdo a Ostoa-Saloma, Pedro., *et. al.*1997







3.2.2 Elaboración del sustrato G3P

1. Pesa 1.5gramos de resina Dowex 50WX2-100, Hform (Supelco), en un tubo de ensayo de boca ancha y resuspender la resina en 4mL de agua destilada a 25° C. Agita por un minuto con ayuda de un Vortex.
2. Permitir que la suspensión sedimente y eliminar el sobrenadante. Repite la operación hasta que desaparezca por completo el color rosa de la fase acuosa (aproximadamente por 6 veces)
3. En un tubo de ensayo, de aproximadamente 20mL, pesa 100mg de sustrato G3P. A la resina, lo más seca posible, agregar 5mL de agua hirviendo. Agita la suspensión y añadir de inmediato al tubo con el sustrato.
4. Hierve el sustrato con la resina exactamente por 3 minutos y 15 segundos, bajo agitación constante y enfría la suspensión en hielo. Filtra por una membrana de 0.22µm.
5. Ajusta el pH a 5 con Bicarbonato de Sodio

3.2.3 Electroforesis en Gel SDS-PAGE

SDS-PAGE con PhastGel el PhastGel se utilizó a una concentración de 12.5% de poliacrilamida. Inicialmente, se prepara la solución teñidora y la solución desteñidora como se muestra a continuación:

- * Solución Teñidora. Solución 0.1% de FastGel Blue R en metanol al 30% y Ácido Acético al 10% en agua destilada.
 - ✓ Solución Stock. Disolver una tableta de FastGel Blue R en 80mL de agua destilada y colocar en agitación de 5-10 minutos. Agregar 120 mL de metanol y agitar de 2-3 minutos. Esto hace una solución 0.2%.
 - ✓ Solución Final. Mezclar una parte de solución stock filtrado con 1 parte de ácido acético al 20% en agua destilada.
- Solución Desteñidora. Metanol al 30% y ácido acético al 10% en agua destilada (3:1:6), de esta solución se debe preparar al menos 300mL de esta solución; por que debe cambiarse al menos tres veces.

Una vez elaboradas estas soluciones, se colocan las muestras en cada uno de los carriles de la siguiente manera: Se corrió el gel a 70Vh por una hora, posteriormente se colocó en la solución teñidora caliente a 70°C por 15 minutos. Una vez teñido el gel se colocó en la solución desteñidora por tres tiempos de 7 minutos cada uno cambiando la solución.

3.3 Determinación de la concentración de TcTIM

La concentración se mide con ayuda de un espectrofotómetro, con una celda de cuarzo de 1cm de paso de luz, tomando como blanco la solución de buffer TE utilizado para dializar. Se toman lecturas a 280nm y se determina la absorbancia de la muestra. En este caso se realiza una dilución 1:500 de la proteína en buffer TE. Tomando en cuenta que con una absorbancia de 1.36 se tienen 1000µg/mL, determinar la concentración final de la proteína, este es un factor ya establecido³¹.

Por otro lado también se puede conocer la concentración de proteína si se tiene el coeficiente de absortividad molar ϵ , el cual para TcTIM es de 1.33, y conociendo la Ley de Beer se puede obtener fácilmente su concentración.

3.4 Desnaturalización y Renaturalización inducidas por Clorhidrato de Guanidinio

3.4.1 Diseño de Muestras

El diseño de las muestras se divide en dos partes: la primera que comprende el estudio de la desnaturalización de TcTIm y la segunda que involucra el estudio de la renaturalización de la enzima.

En el caso de la desnaturalización se elabora en tubos de vidrio con tapón de rosca de aproximadamente 5mL, en los cuales se coloca una solución que contiene a TcTIm, Clorhidrato de Guanidinio (desnaturalizante) y Buffer TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH 7.4, a las concentraciones más adelante señaladas. La concentración de proteína puede ser de 50 µg/mL ó 500 µg/mL, y es fija para cada tubo; mientras que la concentración de guanidina aumenta gradualmente desde 0.1M a 6M y siempre incluimos dos tubos de referencia con la enzima nativa sin desnaturalizante como control.

Las muestras para el análisis de la renaturalización de la enzima deben contener el mismo intervalo de concentraciones de guanidina utilizadas para la desnaturalización para poder realizar una comparación de los valores obtenidos. Para poder evaluar el desarrollo de este estudio es necesario elaborar una solución madre que contenga al desnaturalizante y a la enzima. Se busca obtener una solución que contenga una concentración de proteína determinada tal que al ser diluida nos permita obtener la misma concentración que se utiliza para la desnaturalización (50 µg/mL y 500 µg/mL) y nos proporcione la concentración más baja de desnaturalizante que se puede obtener. La concentración original de guanidina que debe contener la solución madre debe ser lo más cercana a 6M para garantizar la completa desnaturalización de la enzima, por lo cual antes de comenzar a diluir a la proteína en estas condiciones se debe dejar equilibrar por un lapso nunca menor a 30 minutos.

Estas muestras son incubadas en baño de agua a 25°C para posteriormente ser analizadas mediante el uso de técnicas de Fluorescencia Intrínseca y Extrínseca, Dicroísmo Circular y Actividad Catalítica.

3.4.2 Análisis del cambio en la Estructura Terciaria por Intensidad de Fluorescencia

Para este análisis se utilizó un Espectrofotómetro marca ISS modelo PCS (Photon Counting Spectrofluorometer) con termorregulador para mantener la temperatura a 25 °C y celdas de cuarzo de 500 μ L, a las cuales se adicionaron 250 μ l de cada una de las muestras para tomar los espectros.

El análisis por fluorescencia de TcTIM se dividió en dos partes, la primera que fue el análisis de la fluorescencia de los residuos aromáticos presentes en la molécula, y la segunda en la cual se adiciona el fluoróforo extrínseco ANS (ver 3.4.3).

La determinación de la fluorescencia de los fluoróforos intrínsecos, es decir Triptofano (W), Fenilalanina (F) e Tirosina (Y), se estudió de dos formas. La primera consistió en excitar cada muestra a 280nm tomando barridos de 300-400nm, esto con el fin de excitar a todos los residuos aromáticos. En la segunda lectura la muestra se excita a 295nm, haciendo barridos de 310-410nm, buscando excitar solamente a los Triptofanos presentes en la proteína. Los parámetros analizados de los espectros de fluorescencia intrínseca se definen en la siguiente Figura:

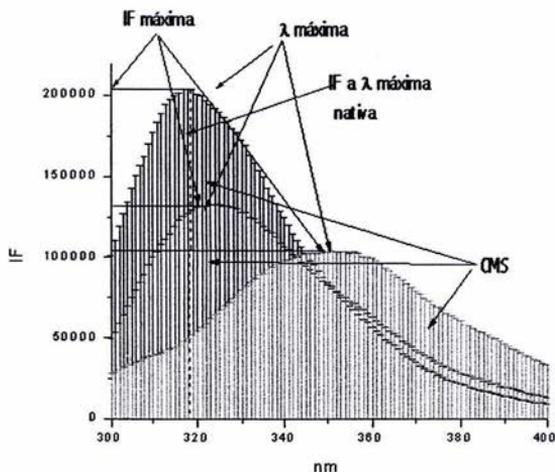


Figura 10. **Parámetros a evaluar para cada espectro de fluorescencia a 280nm y 295nm de excitación.** Se observa como se determina la λ máxima la IF máxima, la IF a la λ máxima de la enzima nativa y el CMS.

De cada una de las muestras se obtiene por lo tanto cuatro parámetros diferentes que son: IF máxima, λ máxima, IF a λ máxima nativa y CMS; esto con el fin de obtener la mayor información posible sobre el comportamiento de la proteína en cada una de las concentraciones de desnaturizante a las cuales fue expuesta.

Una vez con estos datos se puede determinar el Centro de Masa Espectral (CMS), basándose en la siguiente fórmula:

$$C M S = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$$

donde,

λ = longitud de onda

$I(\lambda)$ = Intensidad de Fluorescencia a la longitud de onda

3.4.3 Unión de ANS

La lectura de fluorescencia del ANS se realiza excitando la muestra a 360nm efectuando barridos de 400-560nm, después de adicionar a la celda una alícuota de una solución madre de ANS, buscando que la concentración final sea de alrededor de $100\mu\text{M}$ ¹³. El espectro representado de las muestras nativas con ANS se muestra en la Figura 11.

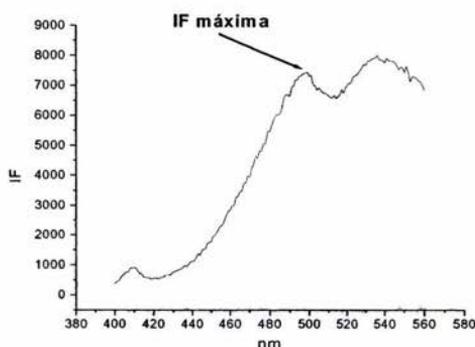


Figura 11. **Espectro de Fluorescencia de ANS.** El parámetro analizado es la IF del primer pico del espectro a 496nm.

En el espectro de ANS se determina la IF máxima a la longitud de onda a la cual absorbe la molécula, la cual se encuentra entre 494-496nm.

3.3.4 Análisis del cambio Estructura Secundaria por Dicroísmo Circular

Para el análisis de la estructura secundaria se utilizó un Espectropolarímetro Marca JASCO modelo J-715 termorregulado a 25 °C. Los parámetros necesarios para analizar cada una de las muestras son los siguientes: Rango de lectura de 210-260nm, Resolución de 1nm, Velocidad de 100nm/min, Número de repeticiones por espectro 3, Acumulaciones 1, Respuesta 4seg, Anchura de Banda 2 y Sensibilidad de 2mdg.

Una vez determinadas estas condiciones se coloca cada una de las muestras para que el equipo realice la lectura de cada barrido al intervalo de longitud de onda antes mencionado, y se toma el valor de DC a 222 nm, longitud de onda a la cual se presenta mayoritariamente el contenido de las α hélices. Los espectros representados para algunas condiciones en la Figura 12.

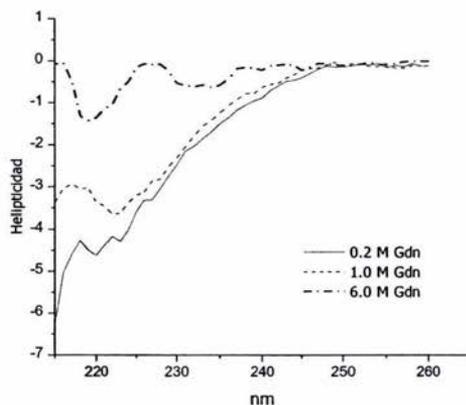


Figura 12. Espectros de DC de TcTIM. Comportamiento de la helipticidad de TcTIM a diferentes concentraciones de Guanidina.

3.4.5 Determinación de la Actividad Catalítica y Reversibilidad de TcTIM

- * Elaborar Buffer TE (TEA 100mM y EDTA 10mM) pH 7.4
- * Preparar los reactivos para actividad:
 - G3P sustrato (cuya elaboración se mencionó anteriormente)
 - α GDH: 5 μ L en 995 μ L de TE
 - NADH: 7mg en 100 μ L de TE
- * Elaborar la mezcla de reactivos para actividad:

REACTIVO	Volumen por cada celda
Buffer TE	928 μ L
G3P	50 μ L
α -GDH	20 μ L
NADH	2 μ L

Debido a que la determinación de la actividad no puede llevarse a cabo de manera directa por la presencia del desnaturalizante, el cual puede alterar la actividad de la enzima α GDH que también forma parte de la mezcla de actividad, es necesario realizar un protocolo que permita realizar el análisis³². La reacción que comprende la determinación de la actividad de TcTIM se muestra en la Figura 13.

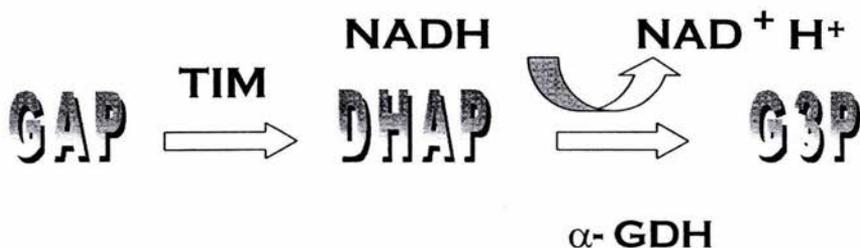


Figura 13. **Reacción para la determinación de la actividad de TcTIM.** Donde GAP: Gliceraldehído-3-fosfato; DHAP: Dihidroxiacetona Fosfato; NADH: Nicotin Adenin Dinucleótido reducido; NAD^+ : Nicotin Adenin Dinucleótido oxidado; G3P: Glicerol-3-fosfato y α -GDH: α -Glicerol Deshidrogenasa.

Esta reacción permite evaluar la actividad de TcTIM de manera indirecta evaluando espectroscópicamente el consumo de NADH mediante la pérdida de color, por lo cual se determina la actividad a 340nm, longitud de onda a la cual absorbe el NADH.

Para este estudio debe considerarse que la concentración a la cual se incubaron cada muestra de proteína es de 50µg/mL y que contiene determinada cantidad de desnaturizante, misma que puede alterar los resultados de actividad ya que puede inactivar a la otra enzima necesaria para el análisis³², α-GDH, por lo cual es necesario realizar diluciones de las muestras originales para alcanzar tanto la concentración necesaria de proteína para este estudio, 5 ng/mL; así como la concentración de Guanidina más baja que se pueda tener.

Por lo tanto, se realiza una primera dilución de la proteína a 1µg/mL y se adiciona la cantidad de desnaturizante necesaria para mantener la misma concentración en cada una de las muestras, la cual será aquella que se obtenga de la dilución de la solución más concentrada de guanidina (6M); posteriormente, se realiza una segunda dilución muy rápidamente, colocando una alícuota de la proteína tal que permita obtener una concentración de 5 ng/mL en la celda que contenga la mezcla catalítica.

Para iniciar la determinación de la actividad se programa el espectrofotómetro Beckman Coulter DU 7500 en el programa de Cinética Multiceldas, a una longitud de onda de 340nm, con tabulaciones de 1.0, tiempo de 30segundos entre cada lectura y con un total de tiempo de 420segundos.

Una vez concluida la lectura de la muestra se analizan los resultados obteniendo el valor de la pendiente de cada una de las muestras y las unidades en la que las reporta el programa son unidades de absorbancia (UA), las cuales se sustituyen en la fórmula siguiente para obtener la actividad específica de cada muestra.

$$Actividad\ \epsilon_{especifica}\ (\mu mol / min \cdot mg) = \frac{\frac{\Delta u.a.}{mL}}{\frac{6.22 u.a}{\mu Mol} * [Prot(mg / mL)]} \cdot mL$$

donde, $\epsilon_{NADH} = 6.22$

Este primer estudio permite determinar la actividad catalítica de cada una de las muestras desnaturizadas con diferentes concentraciones de guanidina, lo cual es necesario para caracterizar cada uno de los estados intermediarios presentes en el proceso de desnaturización-renaturalización.

Pero también es necesario determinar si la proteína es capaz de regresar a su estado nativo completamente después de ser desnaturizada, con el fin de determinar si el proceso es o no reversible. Para lograrlo seguimos el método propuesto por Zomosa-Signoret 2003, en el cual se incubaba a la proteína a una concentración de 500 µg/mL y 6 M de guanidina y se determina su actividad tras una hora de incubación a 25 °C.

3.4.6 Análisis Estructural por Técnicas Computacionales

Existen técnicas computacionales disponibles en la red para el análisis de la estructura primaria y cuaternaria³⁵ de las proteínas, que son de gran ayuda para la comparación de los diferentes niveles estructurales de proteínas homólogas.

Por lo tanto, el análisis computacional a nivel estructural de la TIM de diversas especies que han sido cristalizadas y reportadas en el Protein Data Bank (PDB)³⁶, se divide en dos partes: 1) Comparación de las estructuras primarias y 2) Comparación de las estructuras tridimensionales.

La comparación de estructura primaria fue realizada con el programa CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment³⁵. El cual se basa en la alineación de las estructuras primarias de las proteínas, señalando a los aminoácidos conservados en todas las estructuras, los conservados medianamente y los que no son conservados. Para llevar a cabo la alineación es necesario conocer los códigos PDB de cada una de las secuencias a analizar e introducirlas en el programa para que inicie el análisis.

La alineación que realizamos comprende a las secuencias de aminoácidos de las TIM de cada una de las especies cristalizadas: Humano (1HTI), levadura (1YPI), *L. mexicana* (1AMK), *T. cruzi* (1TCD), *T. brucei* (1TPF), *E. histolytica* (1M6J), *T. maritima* (1B9B) y *Plasmodium* (1YDV).

El mismo programa permite realizar la comparación del porcentaje de identidad en estructura primaria de las secuencias introducidas para el análisis, para lo cual se tiene que seleccionar la secuencia contra la cual se desea realizar la comparación. Para este estudio seleccionamos como base la secuencia de TIM de *T. cruzi* con respecto a las demás secuencias.

La comparación de estructura cuaternaria de las especies de TIM reportadas en el PDB, se llevó a cabo con el programa Deep View/Swiss-PDBViewer 3.7, el cual realiza la superposición de las estructuras cuaternarias con respecto a una estructura tridimensional base. Para nuestro estudio se determinó como patrón a TcTIM la cual se superpuso con: 1TPF, 1YPI, 1HTI, 1YDV, 1B9B, 1M6J, 1TIM (pollo), 1R2T (músculo de conejo) y 1BTM (*B. stheriothermophilus*).

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1 Purificación de TcTIM

Una vez seguido el protocolo de purificación mencionado en material y métodos, el cual consiste en la sobreexpresión de TcTIM en la cepa de expresión, el rompimiento de células por sonicación y purificación de TcTIM mediante el uso de centrifugación, precipitación, así como de columnas cromatográficas de Exclusión Molecular e Intercambio Iónico.

En cada uno de los pasos antes mencionados se determinó la concentración de proteína mediante la actividad específica de TcTIM y se obtuvo el rendimiento para cada proceso.

Proceso	Rendimiento
Centrifugación - Precipitación	44.2mg
Columna de Exclusión Molecular	41.45mg
Columna de Intercambio Iónico	25.63mg

Por lo tanto, el rendimiento obtenido de la Purificación de TcTIM con el protocolo antes mencionado y mediante las técnicas anteriores es cercano al 60%.

Para verificar la pureza de la enzima se elaboró un gel de electroforesis, SDS-PAGE en el PhastGel a una concentración de 12.5% de poliacrilamida. En este gel se colocaron en cada carril 7 diferentes concentraciones de proteína y en cada uno de los extremos marcadores de peso molecular (LMW).

El resultado obtenido es, una sola banda a la concentración más alta de proteína la cual indica que se encuentra totalmente pura, a concentraciones menores no se observa la presencia de la enzima debido a la sensibilidad de la técnica. La Figura 14 representa dicho resultado a continuación, indicando el orden en el que se colocó cada muestra en los carriles del gel.

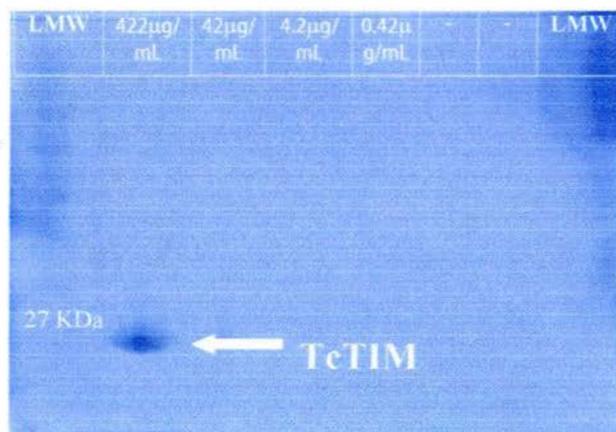


Figura 14. **Gel de electroforesis de TcTIM.** Se puede observar una sola banda en el gel a un a concentración de 422µg/mL. *LMW. Marcador de Peso Molecular

Es importante este resultado debido a que este trabajo se basa principalmente en el análisis de una enzima, la Triosafosfato Isomerasa, y si esta enzima no se encontrase totalmente pura el estudio no podría realizarse.

4.2 Concentración de TcTIM

Una vez realizada la determinación de la concentración de la enzima con ayuda de un Espectrofotómetro a una longitud de onda de 280nm, longitud de onda a la cual absorbe el enlace peptídico, y habiéndose realizado una dilución de la proteína en la celda del espectro de 1:1000 (proteína-amortiguador TE). Se obtiene una absorbancia de 0.11844, la cual se transforma en unidades de concentración mediante el factor mencionado en la sección de material y métodos.

El resultado de esa transformación indica que la concentración de la enzima purificada es de 4.22mg/mL, y el volumen total obtenido de enzima es de 5.1mL. Por lo tanto el valor de la cantidad total de enzima obtenida en la purificación es bastante cercano a la aproximación que se tiene mediante el análisis de la actividad específica mencionado anteriormente.

4.3 Tiempo de Equilibrio

4.3.1 Determinación por Intensidad de Fluorescencia

Se determinó el tiempo de equilibrio de la Desnaturalización y Renaturalización, por medio de cambios en las propiedades fluorescentes como función de la concentración de Gdn-HCl excitando la molécula a 280 y 295nm, para lo cual se realizaron lecturas de cada una de las muestras al tiempo 0, 48 y 96, una y dos semanas. Los resultados obtenidos para el proceso de desnaturalización se muestran en la Figura 15.

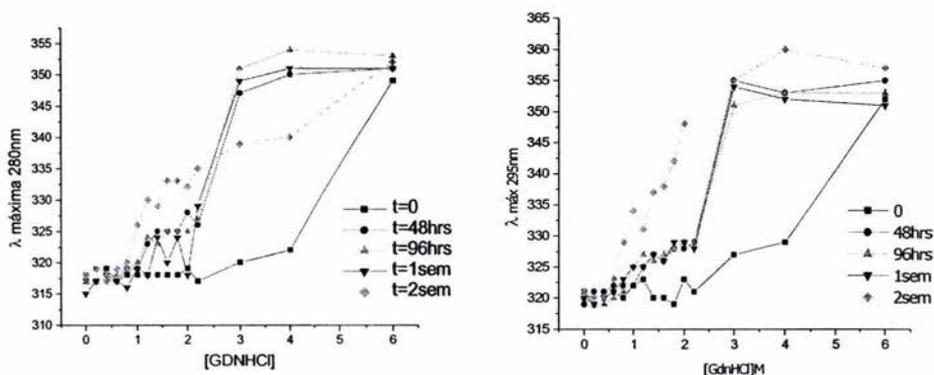


Figura 15. **Determinación del tiempo de equilibrio del proceso de Desnaturalización TcTIM seguido por Fluorescencia a 280 y 295nm.** Evaluación de λ máxima como función de la concentración de GdnHCl

Se puede observar que el proceso de desnaturalización de TcTIM es bastante lento ya que al tiempo 0 muchas de las concentraciones de Gdn-HCl exploradas poseen propiedades fluorescentes parecidas a las del estado N. Transcurridas 24 horas de incubación a 25°C, el perfil de desnaturalización se modifica considerablemente, manteniéndose así hasta un tiempo no mayor a una semana.

Se puede determinar que el tiempo de equilibrio para el proceso de desnaturalización es de 48hrs, ya que después de este tiempo, a 96hrs y una semana, el perfil no presenta mayor cambio según la Figura 15.

El tiempo de equilibrio para el proceso de renaturalización se determinó de la misma forma que para la desnaturalización, tomando lecturas a diferentes tiempos: 0, 24 y 48hrs, una y dos semanas; incubando las muestras a 25°C. Los resultados para el proceso de renaturalización se presentan en la Figura 16.

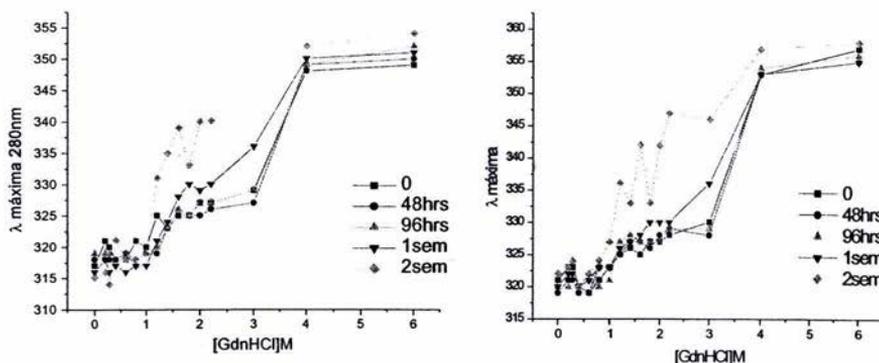


Figura 16. Determinación del tiempo de equilibrio para el proceso de Renaturalización de TcTIM seguido por Fluorescencia a 280 y 295nm. Evaluación de λ máxima como función de la concentración de GdnHCl.

A diferencia de la desnaturalización, la renaturalización es bastante rápida, es decir, la forma de su patrón se mantiene desde el tiempo 0 hasta un tiempo no mayor a una semana. Pero ambos procesos coinciden en el tiempo de equilibrio.

Los resultados obtenidos para ambos procesos indican que el tiempo al cual alcanzan el equilibrio las muestras en ambos procesos es de 48hrs ya que no se observa diferencia significativa entre los patrones obtenidos a tiempos mayores. El patrón obtenido a las dos semanas es diferente a los observados para los tiempos 0, 48 y 96hrs y una semana. Por lo tanto la determinación del patrón de plegamiento de cada uno de los procesos se determina después de incubar las muestras entre 48hrs y una semana.

4.3.2 Determinación por Dicroísmo Circular (DC)

Se determinó el tiempo de equilibrio de cada uno de los procesos por DC, incubando las muestras a 25°C, a una semana y 2 semanas tomando en cuenta el tiempo de equilibrio encontrado mediante el análisis de la Intensidad de Fluorescencia. La lectura de cada una de las muestras fue determinada a 222nm, longitud de onda a la cual se presenta en su mayoría estructura en forma de α -hélices. Los resultados obtenidos son los siguientes:

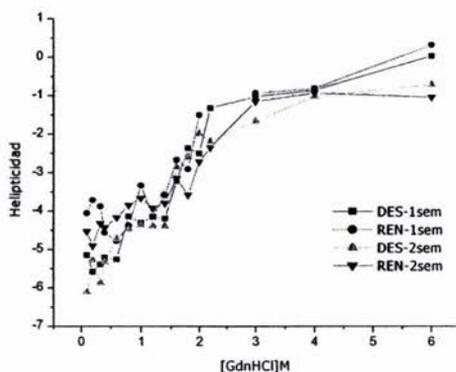


Figura 17. **Determinación del tiempo de equilibrio para la desnaturalización y la renaturalización.** Se determina el tiempo de equilibrio a la primera y la segunda semana de incubación tomando lecturas a 222nm.

Para el caso de DC el tiempo de equilibrio puede ser determinado a una semana, aunque no se ve cambio considerable a las dos semanas de incubación. Para economizar tiempo se determina el tiempo de equilibrio a una semana.

4.4 Análisis del Patrón de desnaturalización/renaturalización por Intensidad de Fluorescencia (IF)

El análisis del cambio en la estructura terciaria de la proteína al exponerla a diversas concentraciones de Gdn-HCl se determinó mediante el análisis en la intensidad de fluorescencia, obteniendo con esta técnica resultados del comportamiento de los residuos de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe); así como del fluoróforo extrínseco ANS.

El análisis de los residuos aromáticos se dividió en dos partes: 1) Determinación del cambio en la estructura terciaria de los residuos aromáticos Tyr y Phe excitando a la molécula a 280nm, con

barridos de 300-400nm; 2) Cambio en la estructura terciaria del Trp excitando a 295nm, con barridos de 310-410nm. Las muestras fueron incubadas a 25°C por tiempos determinados y las lecturas se llevaron a cabo con ayuda de un Espectrofluorómetro con termorregulador.

Una vez determinado este tiempo se incuban las muestras por 48hrs a 25°C y se determinan las lecturas en el Espectrofotómetro de la forma antes mencionada para cada proceso, realizando gráficos que representen el cambio en las propiedades fluorescentes en función de la concentración de Gdn-HCl. Los parámetros a analizar a cada patrón se definieron anteriormente en la sección de Material y Métodos.

El análisis del cambio la estructura terciaria de TcTIM es seguido mediante un patrón que indica el comportamiento de la molécula en las diferentes concentraciones de Gdn-HCl tanto para la desnaturalización como para la renaturalización. Es importante recavar toda la información que se pueda obtener de cada muestra mediante este análisis para poder realizar una comparación lo más completa posible entre ambos procesos. Es por eso que se obtiene el patrón para cada proceso analizando diferentes parámetros que se obtienen de las propiedades fluorescentes: longitud de onda de máxima emisión, Intensidad de Fluorescencia (IF) máxima, IF a la longitud de onda de máxima emisión de la enzima en estado N y Centro de Masa Espectral (CMS).

La determinación de la longitud de onda en función de la concentración de desnaturalizante para ambos procesos a 280 y 295nm es presentado en la Figura 18.

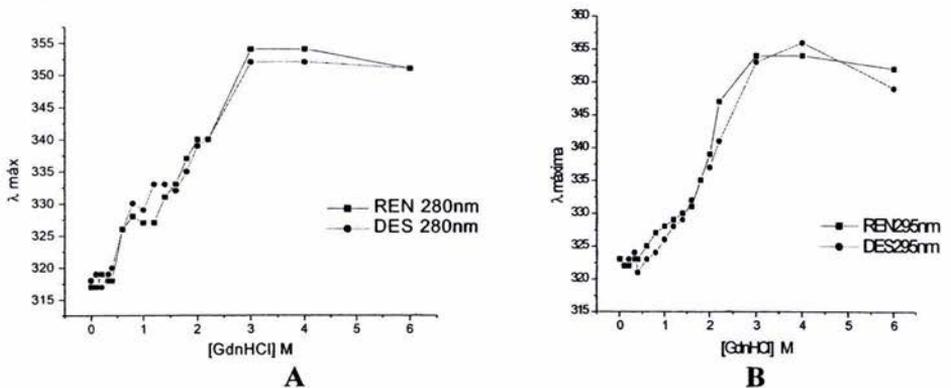


Figura 18. Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización y renaturalización determinando la λ máxima en función de la concentración de GdnHCl. A) Excitando a 280nm, B) Excitando a 295nm

Ambos procesos siguen caminos muy similares al excitar a los residuos aromáticos (Figura 18), de la proteína, realizando el análisis de la λ máxima en función de la concentración de Gdn-HCl.

La determinación de la IF máxima en función de la concentración de desnaturalizante para ambos procesos a 280 y 295nm es presentado en la Figura 19.

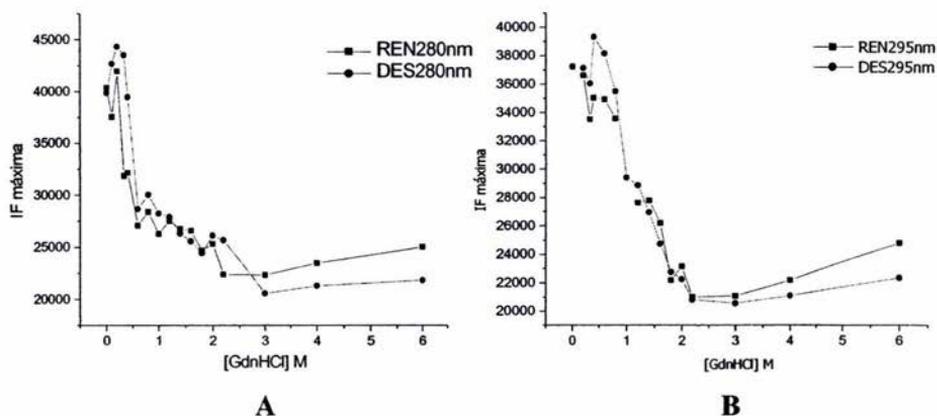


Figura 19. **Cambio en la estructura terciaria de TcTIM.** Comparación del proceso de desnaturalización y renaturalización determinando la IF máxima en función de la concentración de GdnHCl. A) Excitando a 280nm, B) Excitando a 295nm.

Al igual que para el análisis de la λ máxima, el patrón obtenido para la desnaturalización y renaturalización de TcTIM determinando la IF máxima a 280 y 295nm es bastante similar, lo cual nos indica que ambos procesos siguen rutas similares para desnaturalizar o renaturalizar a la proteína.

La determinación del patrón de desnaturalización y renaturalización analizando la IF a la longitud de onda de máxima emisión de la enzima N a 280 y 295nm se presenta en la Figura 20.

El patrón presentado para ambos procesos sigue siendo muy similar ante el análisis de la IF a la longitud de onda de máxima emisión de la enzima nativa.

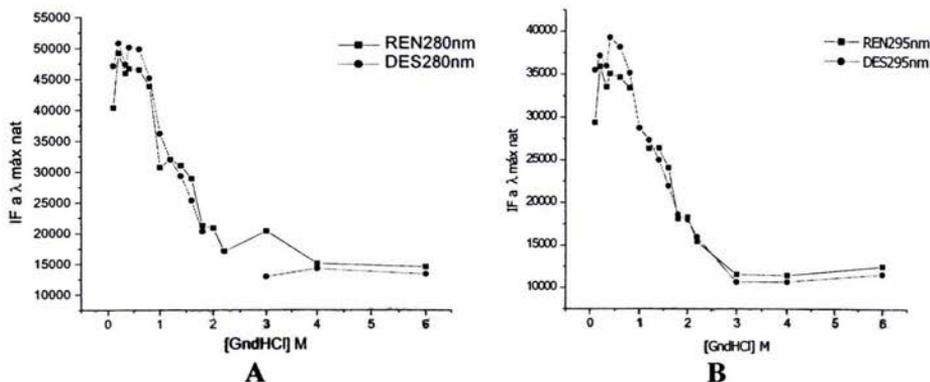


Figura 20. **Cambio en la estructura terciaria de TcTIM.** Comparación del proceso de desnaturalización y renaturalización determinando la IF a λ máxima de la enzima nativa en función de la concentración de GdnHCl. A) Excitando a 280nm, B) Excitando a 295nm.

El análisis del cambio en el Centro de Masas Espectral (CMS) para la desnaturalización y la renaturalización, obtenido mediante la formula mencionada en Material y Métodos, a 280 y 295nm es el siguiente:

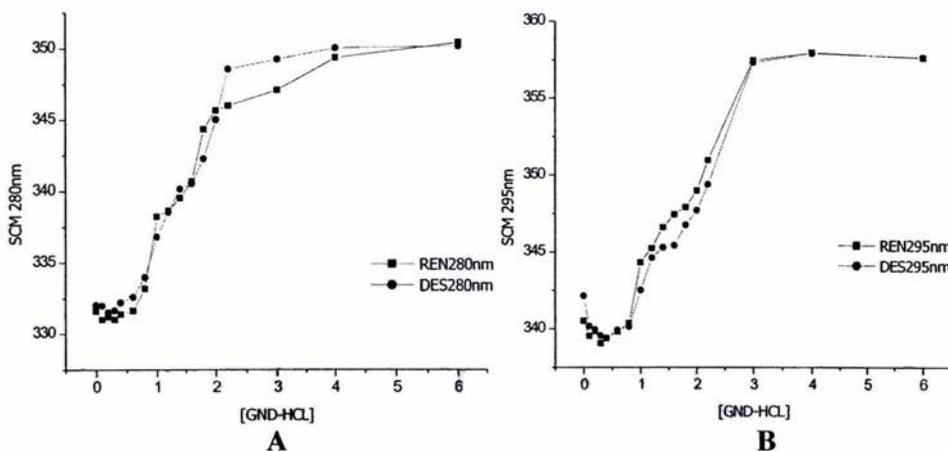


Figura 21. **Cambio en la estructura terciaria de TcTIM.** Comparación del proceso de desnaturalización y renaturalización de CMS. A) Excitando a 280nm, B) Excitando a 295nm.

El estudio de la fluorescencia intrínseca de la proteína excitando a 280 y 295nm indica que el proceso de desnaturalización y renaturalización siguen caminos similares.

El análisis de las Figuras 18, 19, 20 y 21 indican la presencia de una población que se mantiene estable en un intervalo de 0.8-1.4M de guanidina y se advierte la presencia de una población en el intervalo de 0.1-0.6M de Gdn-HCl que presenta mayor intensidad de fluorescencia que la enzima nativa.

4.5 UNIÓN DE ANS

El cambio en la Intensidad de Fluorescencia del fluoróforo extrínseco ANS es una herramienta ampliamente utilizada para la caracterización de los estados intermedios presentes en la ruta de plegamiento de las proteínas.

Mediante la intensidad de fluorescencia de las muestras se puede determinar en que concentraciones de desnaturante se encuentra el pico que indique la presencia de un intermediario que expone zonas hidrofóbicas al solvente que unen ANS.

Para lograr obtener estos datos se adicionó a cada muestra antes de su lectura determinada concentración de ANS, y se excitó a la molécula a 360nm realizando barridos de 400-560nm. La IF se tomó del primer pico presente en el espectro alrededor de 496nm, tal como se indicó en la sección de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos para los procesos de desnaturalización y renaturalización de TcTIM a diferentes concentraciones de desnaturante se presentan en la Figura 22.

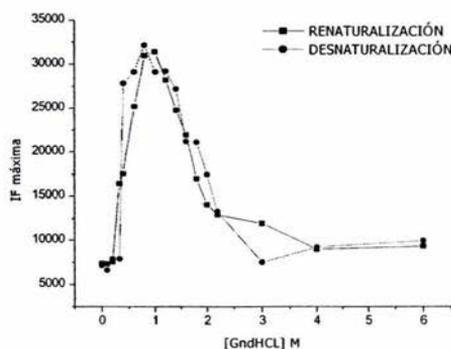


Figura 22. Unión de ANS a TcTIM para la desnaturalización y renaturalización. Determinación de la IF del ANS a 496nm en función de la concentración de Gdn-HCL.

La Figura presenta un pico en la IF del ANS a 496nm en el intervalo de concentración de desnaturante de alrededor de 0.8-1.4M. Lo cual indica la presencia de un intermediario en el patrón de plegamiento de TcTIM que une ANS.

En ese mismo intervalo de concentración de Guanidina se puede observar una meseta en los patrones presentados anteriormente de Intensidad de Fluorescencia a 280 y 295nm, el cual indica que aun no esta completamente desnaturada la enzima; con lo cual se puede definir como monómeros compactados que exponen zonas hidrofóbicas al solvente a dichas concentraciones de desnaturante.

4.6 Análisis por Dicroísmo Circular (DC)

El análisis del contenido de estructura secundaria como función del incremento en la concentración de Gdn-HCl, se llevó a cabo mediante la técnica de DC. Para este estudio se utilizó un Espectropolarímetro termostabilizado con el cual se obtuvieron espectros con barridos de 210-260nm. El patrón de desnaturación y renaturalización se determinó tomando como referencia el valor de DC encontrado a 222nm, debido a que esa longitud de onda se encuentra mayoritariamente el contenido de α -hélices.

Al realizar el análisis de las muestras por DC al equilibrio se obtienen los resultados presentados en la Figura 23.

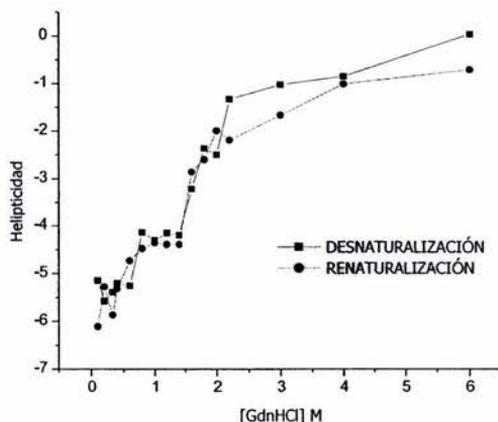


Figura 23. Cambio en la estructura secundaria para la renaturalización y desnaturación de TcTIM. Se cuantificó el cambio en la helipticidad de las muestras a 222nm.

Se puede observar que el patrón de plegamiento-desplegamiento es bastante similar analizando la composición de estructura secundaria presente a 222nm, donde se presenta mayoritariamente estructura en α -hélices, para cada una de las concentraciones de desnaturizante estudiadas.

Analizando la estructura secundaria de la enzima en el proceso de desnaturalización y renaturalización es evidente que el primer intermediario que se encuentra a bajas concentraciones de desnaturizante (0.1-0.5M), presenta mayor estructura secundaria que la enzima nativa, lo cual se advierte al presentarse menor helipticidad como se puede observar en el gráfico 16. También se puede apreciar una meseta en la forma del patrón que se atribuye a la presencia de un segundo intermediario en un intervalo de concentración de guanidina de 0.8-1.4M, lo cual indica que este intermediario aún cuenta con estructura secundaria.

4.7 Actividad Catalítica

El estudio de la actividad catalítica de TcTIM refleja el cambio en su estructura nativa así como su oligomerización, ya que esta enzima sólo presenta actividad como dímero. Por eso es que es un análisis fundamental para este trabajo.

La determinación del patrón de plegamiento por medio del análisis de la actividad catalítica para esta enzima no es sencillo debido a que la actividad se cuantifica mediante un sistema acoplado, como se menciona en la sección de Material y Métodos, en el cual la presencia de Gdn-HCl es nociva para la acción de la enzima α -GDH, la cual puede desactivarse arrojando resultados erróneos en este análisis. Es por esto que se utiliza el protocolo descrito³⁶, el cual permite obtener la fracción de dímeros nativos en presencia del desnaturizante.

El estudio de la actividad catalítica se divide en dos partes: 1) Determinación del patrón de plegamiento, 2) Análisis de la reversibilidad del proceso.

4.7.1 Determinación del Patrón de Plegamiento

El patrón de plegamiento mediante el análisis en la actividad catalítica de las muestras de renaturalización y desnaturalización, se realizó de la siguiente manera: Tras una semana de incubación de las muestras, se llevó a la proteína a una concentración de 5.0mg/mL en la celda de actividad con la cantidad necesaria de Gdn-HCl para que todas las muestras se encontraran a 30mM y con la adición de la mezcla de actividad, cuyo contenido ya fue mencionado en Material y

Métodos. Al realizar el análisis en el espectrofotómetro a 340nm, de la actividad específica de acuerdo a la fórmula mencionada en Material y Métodos se encontró el siguiente patrón para ambos procesos:

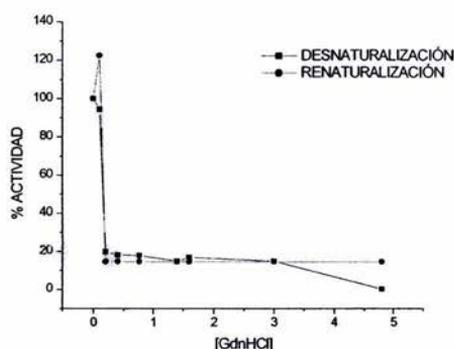


Figura 24. Cambio en la actividad catalítica de TcTIM como función de GdnHCl. Determinación del % de actividad específica en función de GdnHCl.

Se puede observar claramente que se presenta un intermediario, a bajas concentraciones de guanidina, que presenta mayor actividad que la enzima nativa, alrededor de 20% mayor, el cual se presenta en la concentración de desnaturalizante de 0.1M. Este mismo intermediario es el que se encuentra con mayor IF y Helipticidad que la enzima nativa.

4.7.2 Análisis de la Reversibilidad del Proceso de Desnaturalización de TcTIM.

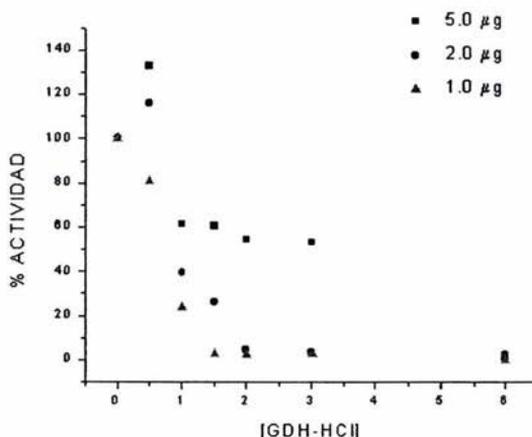
Para el análisis de la reactivación⁴⁰, de TcTIM después de la desnaturalización con Cloruro de Guanidinio 6 M. El experimento se llevo a cabo tras una hora de incubación de la enzima desnaturalizada a 25 °C, a la cual se renaturalizó en amortiguador TED 20:1:1.

Una vez renaturalizada TcTIM se llevó a cabo la determinación de la actividad catalítica, realizando una comparación con la enzima nativa a la misma concentración de la muestra, y se obtuvieron los valores de actividad específica reportados a continuación:

Enzima	Actividad Específica ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$)
Nativa	1690.9967
Desnaturalizada-Renaturalizada	1623.7942

Con lo anterior, se demuestra que el proceso de desnaturalización de TcTIM es un proceso totalmente reversible cuando se parte de la enzima totalmente desnaturalizada a 6M de Gdn-HCl, ya que TcTIM después de la renaturalización cumple con su función biológica de manera normal.

Los resultados obtenidos al realizar el protocolo⁴⁰ en donde se incubaron las muestras a 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TcTIM y a concentraciones crecientes de desnaturalizante llevándolas al equilibrio a 25 °C. Una vez obtenidas dichas condiciones se renaturalizó por una hora eliminando el Gdn-HCl. Posteriormente, se determinó la actividad catalítica de cada muestra obteniendo el patrón presentado en la Figura 25.



Con la Figura anterior se determina que TcTIM logra recuperar su actividad después de su desnaturalización-renaturalización con Gdn-HCl, se vuelve que a una concentración de alrededor de 0.5 M de desnaturalizante presenta mayor actividad catalítica que la enzima nativa, y que en el caso de la incubación a 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la enzima mantiene cerca del 60% de su actividad hasta concentraciones alrededor de 3 M de Gdn-HCl.

También es claro que, el porcentaje de reactivación de la enzima depende de la concentración de proteína, ya que a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la enzima tiende a perder más fácilmente su actividad.

1HTI_A	LVGGASL KPEFVDIINAKQ---- 248
1YPI_A	LVGGASL KPEFVDIINSRN---- 247
1TCD_A	LVGGASL KPEFVEIIEATK---- 249
1TPF_A	LVGGASL KPEFVDIIKATQ---- 250
1AMK_	LVGGASL KPEFRDIIDATR---- 251
1M6J_A	LVGGASL DAAKFKTIINSVSEKL 261
1YDV_A	LVGNASL KESFVDIIKSAM---- 248
1B9B_A	LVGGASL KESFIELARIMRGIS 255
	..

Figura 26. Alineación de la secuencia primaria de diversas especies de TIM's. Donde los aminoácidos en negritas, debajo de la alineación presentan un asterisco están conservados en todas las secuencias, los aminoácidos que tienen dos puntos debajo de su secuencia son los medianamente conservados y los que sólo tienen un punto son los que están presentes solo en algunas especies.

4.8.2 Estructura Cuaternaria

Las especies de TIM que se superpusieron son: 1TCD (amarillo), 1TPF (verde), 1YPI (morado), 1HTI (rosa fuerte), 1YDV (vino), 1B9B (verde agua), 1M6J (rojo), 1TIM (pollo, azul), 1R2T (músculo de conejo, gris) y 1BTM (*B. sthereoothermophilus*, naranja). La superposición se llevo a cabo con el programa Deep View/Swiss-PDBViewer 3.7.

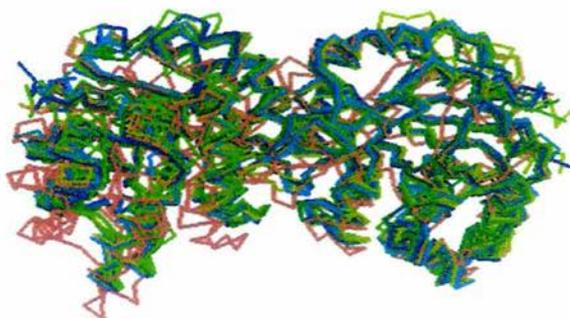


Figura 27. Superposición de las estructuras cristalográficas de TIM. Las estructuras superpuestas son: 1TCD, 1TPF, 1YPI, 1HTI, 1YDV, 1B9B, 1M6J, 1TIM, 1R2T y 1BTM.

Se puede observar que no hay diferencia significativa entre las estructuras superpuestas con un RMS de 1.2

Capítulo 5

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron las reacciones de desnaturalización y renaturalización de la Triosafosfato Isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM), al agregar o diluir Clorhidrato de Guanidina (GdnHCl).

Para determinar el tiempo de equilibrio de cada uno de los procesos se incubaron las muestras a diferentes tiempos 0, 24 y 48 horas, una y dos semanas para el estudio de Intensidad de Fluorescencia; mientras que para el estudio por Dicroísmo Circular se incubaron las muestras por una y dos semanas.

El análisis de la cinética del cambio en la Intensidad de Fluorescencia Intrínseca (IF) para ambas reacciones, indica que un adecuado tiempo de equilibrio es 48hrs como se puede observar en las Figuras 15 y 16; al igual que el análisis por dicroísmo circular, Figura 17. Una vez transcurrido este tiempo se analizó el cambio en la IF, Dicroísmo Circular (DC) y Actividad Catalítica de la enzima en un intervalo de 0.1 a 6 M de Cloruro de Guanidinio, incubadas a 25 ° C.

Los análisis realizados de Intensidad de Fluorescencia y Dicroísmo Circular (DC) una vez transcurrido el tiempo de equilibrio y al realizar una comparación de la desnaturalización y renaturalización de la enzima indican que siguen caminos similares, en los cuales se puede observar claramente la presencia de cuatro estados. El primer estado que se observa en cualquier modelo de desnaturalización es la forma nativa (N); al adicionar el Gdn-HCl se presenta un primer estado intermediario en el intervalo de 0.1M-0.4M, que en el análisis presenta mayor IF, Helipticidad y Actividad Catalítica que la forma nativa. El segundo intermediario según el análisis de IF une el fluoróforo extrínseco ANS a una concentración de desnaturalizante de 0.8M de Gdn-HCl y de acuerdo con el análisis de la actividad catalítica es inactivo. El último estado en el proceso de desnaturalización es el U.

Por lo tanto, después del análisis de los cambios en los diferentes niveles estructurales de la proteína se tiene que el análisis en la estructura terciaria o empaquetamiento por IF Intrínseca el cual determina el curso de los residuos aromáticos al aumentar gradualmente la concentración de desnaturalizante. La IF Extrínseca fue de gran utilidad para determinar al intermediario que une el ANS a la proteína.

El estudio de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular, proporciona resultados muy importantes para este trabajo debido a que la TcTIM presenta estructura de barril α/β que consta de 8 hebras β y 8 α hélices, la información obtenida de este análisis comprende el curso de la estructura secundaria en cada uno de los pasos que sigue para lograr su plegamiento.

Por último, la recopilación de estos resultados indica que la ruta de plegamiento que sigue TcTIM para el proceso de desnaturalización-renaturalización, se representa en el modelo siguiente:



Donde N_2 : dímero nativo; N_2^* : dímero NO nativo; $2N$: monómeros compactos; $2U$: monómeros desnaturalizados.

El estudio de la reactivación de la enzima luego de la desnaturalización con Cloruro de Guanidina 6M, incubada una hora a 25°C indica que la enzima sigue un camino reversible tal como se ha reportado anteriormente^{37,38}. Por lo tanto la enzima vuelve a su estado nativo después de la desnaturalización, por lo cual se puede decir que la enzima busca su renaturalización de manera inmediata.

Como anteriormente se ha mencionado el patrón de plegamiento de TIM inducido por Cloruro de Guanidina de diversas especies (humano²⁴, conejo²⁵, *P. Falciparum*²⁶, *T. maritima*²⁸, *L. Mexicana*²³, *S. Cerevisiae*^{29,30}, *T. brucei*²² y *T. cruzi*¹⁹) es bastante heterogéneo³⁷, actualmente no se puede definir por qué siendo enzimas homólogas puedan presentar tanta diversidad en su plegamiento, a pesar de que la superposición de las estructuras tridimensionales de estas proteínas muestra únicamente diferencias muy sutiles. Se ha observado que la ruta de plegamiento puede ir desde un proceso de dos estados hasta procesos multipasos, en los cuales a menudo se observa la agregación irreversible.

La comparación en cuanto a porcentaje de identidad en secuencia primaria de las diferentes especies en comparación con TcTIM, presentó resultados muy interesantes que indican que el porcentaje de identidad de la secuencia primaria de las TIMs es en promedio mayor al 50% de identidad. Estos resultados indican que a pesar de la gran similitud en secuencia que existe entre ellas no se puede predecir mediante esta la ruta de plegamiento que puede seguir cada especie. Es decir, aunque la estructura primaria sea ampliamente conservada con la evolución, el patrón de plegamiento no sigue las mismas características.

A continuación se muestra un análisis comparativo del porcentaje de identidad en secuencia primaria de las diferentes TIMs con respecto a TcTIM.

Especie	% de Identidad con respecto a TcTIM
<i>T. brucei</i>	73.90
<i>P. falciparum</i>	42.63
<i>S. cerevisiae</i>	45.78
<i>L. mexicana</i>	68.27
<i>T. marítima</i>	41.83
<i>E. histolytica</i>	43.97
Humano	51.20

Tabla 1. Porcentaje de identidad de diversas especies de TIM. Comparación de la secuencia primaria de las diversas especies de TIM con respecto a TcTIM.

Los resultados obtenidos indican que la especie de TIM más parecida en cuanto a secuencia primaria a TcTIM es TbTIM, es decir la TIM de *T. brucei*, se cree que esto se debe a que son del mismo género; y la especie con menor identidad en secuencia primaria con respecto a TcTIM es la de *T. marítima* que presenta alrededor de 42%, esto tal vez se deba a las diferencias que presenta cada una de ellas a nivel biológico. Lo anterior se puede observar como en la Tabla 1.

Con la comparación de estructura cuaternaria de las especies de TIM reportadas en el PDB, se puede observar que la superposición de las estructuras cuaternarias indica que, a pesar de la heterogeneidad de los modelos de plegamiento de dichas especies, las enzimas llegan a una estructura tridimensional común.

En la Tabla 2 se puede apreciar el número de aminoácidos por monómero de cada especie de TIM, así como su código PDB, la ruta de plegamiento, su reversibilidad y la referencia que describe dicho proceso.

Dentro del problema del plegamiento de las proteínas se ha propuesto ampliamente que la ruta de plegamiento ha sido conservada a lo largo de la evolución. También se ha propuesto que proteínas homólogas siguen la misma ruta de plegamiento para asegurar que las proteínas se plieguen de manera correcta.

Contrario a esta creencia, el plegamiento por el cual las TIMs de diferentes especies llegan a la estructura nativa *in vitro*, es muy heterogéneo y va desde el modelo de dos estados en la enzima de *L. mexicana*³⁷ hasta un patrón de plegamiento muy complejo en la enzima de *T. brucei*²² en donde la proteína no sigue un proceso reversible al renaturalizarla como se puede observar en la Tabla siguiente.

Especie	Numero de aa	Código PDB	Reversibilidad	Modelo de Plegamiento inducido por Gdn-HCl	Referencia
<i>T. cruzi</i>	251	1TCD	SI	$ \begin{array}{c} \text{N}_2 \begin{array}{l} \nearrow \text{2N} \rightarrow \text{2U} \\ \searrow \text{N}_2^* \rightarrow \text{2U} \end{array} \end{array} $	Desnaturalización 38 Renaturalización En preparación
<i>T. brucei</i>	250	1TPF	NO	$ \begin{array}{c} \text{A} \quad \text{A} \\ \downarrow \quad \downarrow \\ \text{N}_2 \leftrightarrow \text{N}_2^* \rightarrow \text{2N} \leftrightarrow \text{2U} \end{array} $	37
<i>P. falciparum</i>	248	1YDV	NO	$ \text{N}_2 \rightarrow \text{N}_2^* \rightarrow \text{A} \rightarrow \text{2U} $	43
<i>S. cerevisiae</i>	248	1YPI	SI	$ \text{N}_2 \leftrightarrow \text{2N} \leftrightarrow \text{2U} $	32, 45
<i>L. mexicana</i>	250	1AMK	SI	$ \text{N}_2 \leftrightarrow \text{2U} $	39
<i>T. marítima</i>	253	1B9B	NO	$ \text{N}_2 \rightarrow \text{A} \rightarrow \text{2U} $	44
Conejo	261	1R2T	NO	$ \text{N}_2 \leftrightarrow \text{2N} \leftrightarrow \text{2U} $	42
Humano	248	1HTI	No reportado	$ \text{N}_2 \leftrightarrow \text{2N} \leftrightarrow \text{2U} $	41

Tabla 2. Comparación de TIM de diferentes especies. Nomenclatura para el modelo de plegamiento: N₂: dímero nativo; N₂*: dímero NO nativo; 2N: monómeros compactos; 2U: monómeros desnaturalizados; A: primer monómero caracterizado; A: agregado.

La enzima que presenta mayor identidad con respecto a TcTIM, es TbTIM (73.9% de identidad) y muestra un patrón de plegamiento muy diferente al encontrado es este trabajo para TcTIM. TbTIM presenta agregados intermediarios en el proceso de plegamiento lo que hace que el proceso se vuelva irreversible, mientras que en TcTIM el patrón aunque es muy similar es completamente reversible.

La TIM es una enzima que se ha estudiado con detalle desde el punto de vista estructural, se conoce más de un millar de secuencias primarias y se han reportado las coordenadas tridimensionales de 11 de estas especies (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana*, *B. stearotherphilus*, *Sacharomices cerevisiae*, Humano, pollo, *T. marítima*, *E. hystolitica*, *P. falciparum*, *P. woesei*) La superposición de estas estructuras (Figura 25), sólo muestra diferencias muy sutiles. Lo que indica que a pesar de las variaciones en la secuencia primaria a lo largo de la evolución, la estructura tridimensional se ha conservado, lo cual esta directamente relacionado con la función que la proteína desempeña en el metabolismo.

Una vez realizado el estudio comparativo entre las diversas especies de TIM's, se determino que no es posible definir la ruta de plegamiento que sigue una proteína

mediante el análisis estructural, es decir, no hay un código que indique la conversión de estructura primaria a estructura cuaternaria. Por eso, es que a este proceso se le conoce como segunda parte del código genético, y se espera que al igual que la primera parte del código genético, es decir la traducción de nucleótidos a aminoácidos se pueda contar en el futuro con un código que traduzca la conversión secuencia de aminoácidos a estructura tridimensional.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones

❖ Tiempo de Equilibrio

La caracterización de los procesos de desnaturalización y renaturalización de la TIM de *Trypanosoma cruzi* inducidas con Cloruro de Guanidinio, seguido por el cambio en la estructura terciaria por Intensidad de Fluorescencia y en la estructura secundaria por Dicroísmo Circular indica que ambos procesos alcanzan el equilibrio después de 48hrs de incubación a 25 °C.

❖ Patrón de Plegamiento para TcTIM

El patrón que presentan las reacciones de desnaturalización y renaturalización es bastante similar. Presentando un modelo de cuatro estados.

El estudio de la Intensidad de Fluorescencia y Dicroísmo Circular de las muestras de desnaturalización y renaturalización indican la presencia de dos estados intermediarios, que pueden observarse claramente en las Figuras presentadas anteriormente. Dichos estados intermediarios se caracterizaron con ayuda de la Intensidad de Fluorescencia Extrínseca (Unión de ANS) y la Actividad Catalítica. Por lo tanto el patrón propuesto en este trabajo para la desnaturalización y renaturalización de TcTIM es el propuesto en la Discusión de este trabajo.

❖ Características de los Intermediarios

El primer intermediario encontrado en los análisis de Intensidad de Fluorescencia Intrínseca y Extrínseca, Dicroísmo Circular y según el análisis de la actividad catalítica este conformero es activo, lo que indica su naturaleza dimérica. Este intermediario se presenta en un intervalo de 0.1-0.4 M de Guanidina.

El segundo intermediario, es observado en las transiciones analizadas por las mismas técnicas antes mencionadas, presenta claramente una meseta en el intervalo de concentraciones de desnaturalizante comprendido entre 0.8-1.4M. Mientras que el estudio realizado por actividad catalítica indica que es inactivo. El aumento en la Intensidad de Fluorescencia del ANS indica la presencia de regiones hidrofóbicas

parcialmente expuestas al solvente en ese mismo intervalo de concentración. Con lo cual se concluye que aún presenta secundaria pero carece de actividad catalítica.

❖ **Reversibilidad del Proceso de Desnaturalización**

Una vez analizados los resultados del análisis de la Intensidad de Fluorescencia y Dicroísmo Circular se puede concluir que después de la renaturalización TcTIM logra regresar a nivel estructural a la forma nativa.

El ensayo de reversibilidad de la actividad catalítica de TcTIM es el más importante debido a que su función biológica es indispensable para obtener una conclusión completa se realizó después de desnaturalizarla totalmente a 6M de Gdn-HCL, y al cabo de una hora se le renaturalizó, para determinar su actividad catalítica.

Este análisis indico que logra recuperar casi al 100% su actividad catalítica, es decir su función biológica. Por lo cual se concluye que el proceso de desnaturalización es reversible.

❖ **Comparación de la estructura primaria y cuaternaria de las diversas especies de TIM, así como la heterogeneidad de su patrón de plegamiento.**

El alineamiento de las secuencias primarias de diversas especies de TIM's indica que la especie de TIM que presenta mayor identidad con la enzima de *T. cruzi* es *T. brucei*; que es alrededor del 75% idéntica, lo cual no es muy raro siendo enzimas del mismo genero. Pero lo que si es bastante raro es que estudios anteriores de desnaturalización de TbTIM indican que esta posee un plegamiento irreversible³⁷, con lo cual se descarta totalmente la teoría de la conservación de la ruta de plegamiento a lo largo de la evolución³¹.

La superposición de las estructuras cuaternarias de TIM de diferentes especies indica que independientemente del porcentaje de identidad de estructura primaria que presenten entre ellas y la ruta de plegamiento que siga cada una de ellas todas llegan a una estructura tridimensional con bastante similar.

En la Tabla 2 se realiza una comparación de la ruta de plegamiento de diversas especies de TIM's, y se puede observar la gran heterogeneidad que presentan, ya que se puede ir desde un modelo muy sencillo de dos estados, como el reportado para *L. mexicana*, hasta un proceso bastante complejo como el que en este trabajo se ha estudiado. Lo que realmente resulta interesante es la diversidad de estados intermedios que se pueden presentar en las diferentes especies estudiadas, a los cuales se les puede atribuir la estabilidad del proceso, ya que como en el caso de *T. brucei* se presentan agregados que evitan la reversibilidad del proceso.

Una vez analizada la ruta de plegamiento de las diversas especies de TIM desnaturalizadas con GdnHCl se puede observar claramente la heterogeneidad de modelos que se pueden presentar en una enzima homóloga, a pesar de que presentan altos porcentajes de identidad en sus estructuras primarias, que la superposición de las estructuras cuaternarias indica que no hay diferencia significativa entre ellas y que los residuos del sitio activo se encuentran conservados al 100%, es difícil entender como pueden tener mecanismos de plegamiento tan diferentes.

Capítulo 7

PERSPECTIVAS

Este trabajo trajo consigo aún más incógnitas de las que se tenían al comenzar el estudio, las principales son:

- El patrón de plegamiento de TcTIM ¿Será el mismo al desnaturalizarse con Urea?
- Si se realizaran mutaciones en los residuos de aminoácidos de TbTIM que no son conservados con respecto a TcTIM, se podrá obtener un modelo de plegamiento reversible para esta enzima.

Para poder encontrar respuestas a estas preguntas es necesario que se continúe con el estudio de esta enzima, para lograr tener más información que nos ayude a comprender o a descifrar al menos una parte de este enigma conocido como PLEGAMIENTO.

REFERENCIAS

1. Nelson D. L. y M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ra edición, Nueva York, EUA, 2000, 1152pp.
2. Voet, Donald. *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc. United States of America. 1999, pp 94-192.
3. Stryer L., *Bioquímica*, 3ra. edición. Editorial Reverté. Barcelona, España., 1993, pp .
4. Anfinsen C. B., "Principles that Govern the Folding of Proteins Chains" *Science*, 181, 1973, 223-230.
5. Fersht Alan. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company. New York. E.U.A. 1999. 508-536.
6. Ghélis Charis, Yon Jeannine. *Protein Folding*. Academic Press USA, 1982, pp 29-33.
8. Baldwin R. L. y G. D. Rose., "Is Protein Folding Hierarchic? I local Structure and Peptide Folding?" *Trends in Biological Science*. 1999, 24, 26-33.
9. Creighton, T. E., *Protein Folding*, Second edition, W. H. Freeman and Co. New York, 1993, 547 pp.
10. Jaenicke R., "Folding and Association of Proteins", *Prog. Biophysical and Molecular Biology*, 1987, 49, 117-237.
11. C. Levinthal. "Are There Pathways for protein folding", *Journal of Chemical Physics*, 1968, 65(1) 44,45.
12. María Elena Chánez-Cárdenas y Edgar Vázquez-Contreras. "¿Es el glóbulo fundido un intermediario general en la vía de plegamiento de las proteínas globulares?" *Boletín de Educación Bioquímica (BEB)*

13. Mariá Elena Chánez-Cárdenas. "El uso de 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS), para la identificación de intermediarios en la ruta del plegamiento de proteínas globulares", *Boletín de Educación Bioquímica (BEB)*, 2003, 17(1) 11-17.
14. Mariá Elena Chánez-Cárdenas *et al.* "Enfermedades relacionadas al Plegamiento anómalo de las proteínas". *Mensaje Bioquímico*. Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, México DF, 2002. pp 73-98.
15. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403>
16. Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., Hol, W. G.: "Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme", *Protein Sci* 3 pp. 810 (1994).
17. Banner, D. W., Bloomer, A. c., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Wilson, I. A. "Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data". *Nature*, 1976, 146, 609-614 pp.
18. Lolis E, Alber T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsko GA. "Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution", *Biochemistry*. 1990; 29:6609-6618.
19. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., Perez-Montfort, R.: "Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes". *J Mol Biol*, 1998, 283, pp. 193.
20. Wierenga RK, Noble ME, Vriend G, Nauche S, Hol. "Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex". *J Mol Biol*. 1991, 20;220(4):995-1015.
21. Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C., Martial, J. A.: "Structure of Triosephosphate Isomerase from

- Escherichia coli* determined at 2.6 Angstroms resolution". *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1993, 49 pp. 403.
22. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M., Martial, J. A., Hol, W. G.: "Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions". *Protein Sci*, 1995, 4, pp. 2594.
23. John C. Williams, Johan P. Zeelen, Gitte Neubauer, Gert Vriend, Jan Backmann, Paul A.M. Michels, Anne-Marie Lambeir and Rik K. Wierenga. "Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power"
24. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., Taylor, G. L.: Tiny "Tim: A Small, Tetrameric, Hyperthermostable Triosephosphate Isomerase" *J.Mol.Biol.* 2001, 306 pp. 745.
25. Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., S, S, Balam, H., Balam, P., Murthy, M. R.: "Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design". *Structure*, 1997, 5 pp. 751.
26. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., Wierenga, R. K.: "The Crystal Structure of Triosephosphate Isomerase (Tim) from *Thermotoga Maritima*: A Comparative Thermostability Structural Analysis of Ten Tim Structures", *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 1999, 37 pp. 441.
27. Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., Del Pozo-Yauner, L., Kornhauser, A., Fernandez-Velasco, D. A.: "Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba Histolytica*", *J.Mol.Biol.*, 2002, 322 pp. 669.

28. Aparicio R, Ferreira ST, Polikarpov I.: "Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity". *J.Mol.Biol.*, 2002, 334 pp. 1023.
29. <http://www.who.int/en/>
30. Gómez Puyou, Armando y col., "Using Evolutionary Changes to Achieve Species-specific Inhibition of Enzyme Action -studies with triosephosphate isomerase", *Chem. & Biol.*, 1995, vol. 2 No. 12, , pp. 847-849.
31. María Elena Cháñez-Cárdenas and Edgar Vázquez-Contreras. "Two notably similar proteins follow different unfolding pathways". *Revista de la Sociedad Química de México*. 2002 46, Núm. 3, pp. 219-222.
32. Edgar Vázquez-Contreras, Rafael A. Zubillaga, Guillermo Mendoza-Hernández, Miguel Costas and D. Alejandro Fernández-Velasco, Equilibrium Unfolding of Yeast Triosephosphate Isomerase: a Monomeric Intermediate in Guanidine-HCl and Two-State Behavior in Urea. *Protein and Peptide Letters*, 2000, 7, 57-64.
33. Edgar Vázquez-Contreras, Miguel Costas and María Elena Cháñez-Cárdenas. "Unfolding of homologous TIMs, Insights into enzyme stability". *Protein Science*, 2003, 12, Suppl. 2, pp. 164.
34. Ostoa-Saloma, Pedro., *et. al.*, "Cloning, expresión, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*". *Eur. J. Biochem.* 1997, 244, pp. 700-705
35. <http://www.ebi.ac.uk/services/>
36. <http://www.rcsb.org/pdb/>
37. María Elena Cháñez-Cárdenas, D. Alejandro Fernández-Velasco, Edgar Vázquez-Contreras, Roberto Coria, Gloria Saab-Rincón, and Ruy Pérez Montfort. Unfolding of triosephosphate isomerase (TIM) from *Trypanosoma brucei*. Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002, Vol. 399, No. 2, March 15, pp. 117–129.
38. María Elena Cháñez-Cárdenas, Miguel Costas and Edgar Vázquez-Contreras. The equilibrium unfolding of homologous triosephosphate isomerase induced

- by guanidinium hydrochloride is heterogeneous. The case of *Trypanosoma cruzi*. *Protein Science*, 2002, 11, Suppl. 1, 205-206.
39. AM Lambeir, J Backmann, J Ruiz-Sanz³, V Filimonov, JE Nielsen, I Kursula, B. V. Norledge and RK. Wierenga, "The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase". *Eur. J. Biochem.* 2000, 267:2516-2524
40. Zomosa-Signoret, Viviana; Hernández-Alcantara, Gloria; Reyes-Vivas, Horacio; Martínez-Martínez, Eduardo; Garza-Ramos, Georgina; Pérez-Montfort, Ruy; Tuena de Gomez-Puyou, Marietta; Gomez-Puyou, Armando. "Control of the reactivation kinetics of homodimeric Triosephosphate Isomerase from unfolded monomers". Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mex. *Biochemistry*, 2003, 42(11), 3311-3318.
41. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beaugard, M., Fre`re J. M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A., and Goraj, K., "Three hTIM Mutants that Provide New Insights on why TIM is a Dimer". 1996, *J. Mol. Biol.* 257, 441-456.
42. Rietveld, A and Ferreira, S. "Kinetics and Energetics of Subunit Dissociation/Unfolding of TIM: The Importance of Oligomerization for Conformational Persistence and Chemical Stability of Proteins", *Biochemistry*, 1998, 37: 933-937.
43. Gokhale RS., Ray SS., Balam H, and Balam 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.
44. Beaucamp N, Hofmman, A, Kellerer, B, and Jaenick, R , "Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase", *Protein Science*, 1997, 6:2159-2165.
45. Nájera, Hugo., Costas Miguel & Fernández Velasco, Alejandro. "Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme". *J. Bichem.* 2003, 370, 785-792.