



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO SOBRE LA HIPERACTIVIDAD
OBSERVADA DURANTE LA
DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
*TRIPANOSOMA CRUZI***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
FRANCISCO SANDOVAL BECERRIL



Tutor: DR. EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS

MÉXICO, D. F.

2010



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.

ESTUDIO SOBRE LA HIPERACTIVIDAD OBSERVADA DURANTE LA DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *TRIPANOSOMA CRUZI*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar Vázquez Contreras en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Edgar Vázquez Contreras	Instituto de Química, UNAM
Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Dr. Miguel Costas Basín	Facultad de Química, UNAM

Esta tesis fue defendida en el examen presentado en Febrero de 2010.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente al Instituto de Química, en especial al departamento de Bioquímica, por haberme dado las facilidades para la realización de éste trabajo.

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras por haber dirigido esta tesis y darme su tiempo, dedicación, confianza, consejos y amistad. Además de brindarme la oportunidad de trabajar dentro de la investigación científica y siempre conducir mis pasos por un buen camino.

A mi comité tutorial el Dr. Enrique García Hernández y al Dr. Miguel Costas Basín por haber colaborado conmigo y realizar sus observaciones en el desarrollo del trabajo experimental, siempre sus comentarios fueron una guía y de ayuda muy importante para mí.

A mis sinodales, los doctores Daniel Alejandro Fernández Velasco, Enrique García Hernández, Ismael Bustos Jaimes, Georgina Garza-Ramos Martínez y Alejandro Sosa Peinado por su aportación a esta tesis.

A todos mis compañeros dentro del Instituto de Química: Ana, Francisco y Vanessa, por haber hecho mi estancia placentera y agradable; además de compartir su experiencia conmigo.

DEDICATORIAS:

A mi Papá que desde donde estés, estoy seguro que estas contento viendo el trabajo que has realizado conmigo. A mi mamá agradezco todo tu apoyo que me brindas día tras día, te quiero mucho así que sigue adelante.

A mis hermanos Rodrigo y Cristina les agradezco su amistad, comprensión y apoyo, siempre me hacen pasar muy buenos momentos. Espero que sigamos creciendo juntos y siempre los apoyaré en lo que necesiten.

A mis tíos Pepe y Malenita una vez más gracias por sus consejos y por consentirme día a día.

A Tere y Pao que hacen mi vida más amena. Pao ahora que ya sabes leer, te digo que te quiero mucho y sabes que eres la consentida de la casa.

A mis super amigos de la vida: Victor, Cynthia, Andrea, Ivan, Ross, Nallely, Physhu, Mario, Caro, Griselda, Kyoko, Cesar, Lucy, Vanesa, Ivon, Chabetty, Ivan Etzel, Gloria, Tanya, Alethia y Jacob; los extraño un buen, espero nunca separarnos y seguir juntos en este camino hasta el fin. También a mis nuevos amigos: Diana, Pepe, Jesus, Areli, Karina, Miriam, Arianna, Daniel, Yule, Silvia, Susana, Rocio y en especial a Judith, gracias por hacerme crecer.

A mis primos y amigos: Cynthia, Erik, Katya, Saúl, Irais, Diego, Mauricio, Horacio e Iliana espero siempre estemos juntos creciendo en cada aspecto de la vida.

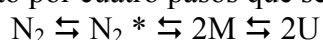
INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	
	1.1 Las proteínas.....	1
	1.2 El plegamiento.....	4
	1.3 Estructura de la TIM.....	8
	1.4 La TcTIM.....	9
II.	ANTECEDENTES.....	11
III.	HIPOTESIS.....	15
IV.	OBJETIVOS.....	16
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	5.1 Obtención de la TcTIM	
	5.1.1 Sobreexpresión de la TcTIM.....	17
	5.1.2 Purificación de la TcTIM.....	18
	5.1.3 Electroforesis.....	20
	5.1.4 Cuantificación de la TcTIM.....	21
	5.2 Caracterización de la TcTIM	
	5.2.1 Fluorescencia	
	5.2.1.1 Fluorescencia intrínseca a 280 nm y 295nm.....	22
	5.2.1.2 Fluorescencia extrínseca con ANS.....	23
	5.2.2 Actividad catalítica.....	23
	5.2.3 Dicroísmo circular.....	24
	5.3 Experimento control (Clorhidrato de guanidina).....	24
	5.4 Clorhidrato de guanidina (0.6M) y NaCl (0-2M).....	25
	5.5 Experimento con NaCl.....	25
	5.6 Recuperación de la actividad en NaCl.....	25
	5.7 Urea (0.5M) y NaCl (0-2.4M).....	26
	5.8 Urea (1 M) y NaCl (0-2.4M).....	27
	5.9 Urea (2 M) y NaCl (0-2.2M).....	27
	5.10 Cloruro de sodio (1.4M) y urea (0-4.5M).....	27
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
	6.1 Experimento control (Clorhidrato de guanidina).....	28
	Evaluación del desnaturalizante cargado y fuerza iónica.....	31
	6.2 Experimento 2 Clorhidrato de guanidina (0.6M) y NaCl variable.....	31
	6.3 Experimento 3 Únicamente con NaCl.....	33
	6.4 Experimento 4 Recuperación de la actividad en NaCl.....	35
	Evaluación del desnaturalizante neutro y fuerza iónica.....	37
	6.5 Experimento 5 Urea (0.5M) y NaCl variable.....	39
	6.6 Experimento 6 Urea (1 M) y NaCl variable.....	41
	6.7 Experimento 7 Urea (2 M) y NaCl variable.....	43
	6.8 Experimento 8 Cloruro de sodio (1.4M) y urea variable.....	45

Discusión final.....	47
VII. CONCLUSIONES.....	51
VIII. PERSPECTIVAS.....	53
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	54
APENDICE 1.....	59
APENDICE 2.....	62

RESUMEN

La Triosafosfato isomerasa (TIM), es un modelo de estudio muy ampliamente utilizado debido a su ubicuidad, elevada catálisis y su estado oligomérico. La TIM es la isomerasa que cataliza la quinta reacción de la glucólisis, su estructura es conocida como barril (β/α)₈ o barril TIM. En el presente estudio se analizó la hiperactividad de la TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), la cual se observa durante el proceso de plegamiento/desplegamiento cuando se desnaturaliza con clorhidrato de guanidina (Gnd-HCl) dicho proceso está descrito por cuatro pasos que se ilustran a continuación:



Donde

- N_2 Es el dímero nativo.
- N_2^* Es un dímero no nativo.
- M Es un monómero inactivo parcialmente plegado.
- U Es el estado desnaturalizado.

El estudio se centra en las propiedades de N_2^* , intermediario que aparece al incubar a TcTIM en bajas concentraciones de desnaturalizante y del cual se conocen algunas de sus propiedades en Gnd-HCl. Una de ellas es que presenta un aumento en la actividad catalítica con respecto a la enzima nativa.

Una posibilidad del origen de la hiperactividad mostrada podría estar relacionada con la variación de la fuerza iónica que produce el Gnd-HCl, el cual es un desnaturalizante químico con carga. Para determinar tal efecto fueron evaluadas diferentes condiciones donde se buscó modificar este parámetro y para lo cual se incubaron muestras en NaCl en presencia o ausencia de 0.6 M de Gnd-HCl; se utilizó esta concentración porque es donde se presenta la mayor hiperactividad en la desnaturalización. También fueron cuantificados los cambios en la fluorescencia intrínseca y extrínseca pero no se encontró ninguna variación. La determinación de estos parámetros no permitió relacionar directamente a la fuerza iónica con la hiperactividad ya que la actividad biológica no aumenta sino que la disminuye al ser incubada en NaCl, mientras que al ser incubada en Gnd-HCl (0.6 M) con NaCl, la hiperactividad no es modificada.

Al no encontrarse alguna relación directa de la fuerza iónica con la hiperactividad y para verificar si el efecto de hiperactividad es exclusivo del Gnd-HCl, en los experimentos posteriores se cambió el agente químico desnaturalizante por uno sin carga, la urea; aquí se buscó combinar el poder desnaturalizante de la urea con la fuerza iónica (NaCl). Los experimentos se realizaron manteniendo constante la concentración de urea y variando el NaCl o bien manteniendo constante la fuerza iónica (NaCl) y variando al desnaturalizante (Urea); se seleccionó la concentración de NaCl (1.4 M) para el último experimento por que es donde se observa la mayor unión de ANS en Gnd-HCl.

En algunas de las condiciones exploradas se encontró hiperactividad cuando las condiciones de fuerza iónica fueron constantes y las concentraciones de urea fueron bajas (0.4 M a 1.2 M), dicha hiperactividad se pierde cuando la concentración de urea aumenta (1.8 M). Por otra parte a concentraciones elevadas de urea constante (2 M) con NaCl variable no hay hiperactividad mientras que cuando la concentración de urea es menor (0.5 M y 1 M) y se varía el NaCl, se produce hiperactividad. Conforme a lo anterior se observa que la naturaleza química del desnaturalizante no es determinante en la aparición de la hiperactividad.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS PROTEÍNAS

En cuanto a su función, las proteínas son las biomoléculas más abundantes en la naturaleza y son de vital importancia para la vida. Las proteínas se encuentran formadas por aminoácidos, que son moléculas compuestas por carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y en algunos casos azufre. Los aminoácidos (Figura 1) son la unidad mínima de una proteína y en la naturaleza se encuentran 20 tipos distintos, que se diferencian en la naturaleza química de su grupo R.

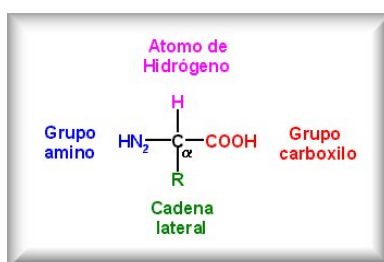


Figura 1. Estructura de un aminoácido.

Los aminoácidos se clasifican según su carga en *no polares* y *polares* y estos últimos a su vez en cargados y no cargados (Tabla 1).

Aminoácido	Polaridad	Carga	Grupo R
Alanina	No polar	Sin carga	$-CH_3$
Isoleucina	No polar	Sin carga	$-CH(CH_3)CH_2-CH_3$
Leucina	No polar	Sin carga	$-CH_2-CH(CH_3)CH_3$
Metionina	No polar	Sin carga	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
Fenilalanina	No polar	Sin carga	$-CH_2$ -Fenilo
Prolina	No polar	Sin carga	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2-$
Triptófano	No polar	Sin carga	$-CH_2$ -Indol
Valina	No polar	Sin carga	$-CH(CH_3)CH_3$
Asparagina	Polar	Sin carga	$-CH_2(NH_2)C=O$
Cisteína	Polar	Sin carga	$-CH_2-SH$
Glutamina	Polar	Sin carga	$-CH_2-CH_2(NH_2)C=O$
Glicina	Polar	Sin carga	$-H$
Serina	Polar	Sin carga	$-CH_2OH$
Treonina	Polar	Sin carga	$-CH(OH)CH_3$
Tirosina	Polar	Sin carga	$-CH_2$ -Fenil-OH
Arginina	Polar	Positiva	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH_2^+)-NH_2$
Histidina	Polar	Positiva	$-CH_2$ -Imidazol
Lisina	Polar	Positiva	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+$
Ácido aspártico	Polar	Negativa	$-CH_2-COO^-$
Ácido glutámico	Polar	Negativa	$-CH_2-CH_2-COO^-$

Tabla 1. Los 20 tipos de aminoácidos proteicos con sus propiedades polares y de carga.

La unión entre aminoácidos forma cadenas polipeptídicas, dicha unión recibe el nombre de *enlace peptídico* (Figura 2).

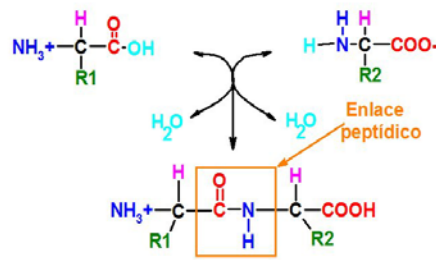


Figura 2. Formación del enlace peptídico.

Las proteínas tienen 4 diferentes niveles de organización, según las fuerzas que intervienen en cada caso (Voet D *et al.*, 1995). La estructura primaria se encuentra definida sólo por la secuencia de aminoácidos, los cuales están unidos por el enlace peptídico, dicha secuencia de aminoácidos es única para cada proteína lo que le otorga un sello molecular propio; generalmente la secuencia polipeptídica se representa con letras que aluden a los aminoácidos presentes, aunque existe también el código de tres letras para identificarlos (Figura 3).

Código de tres letras:

Asn-Cys-Tyr-Asn-Glu-Leu-Gln-Tyr-Leu-Cys-Val-Ser-Ala-Cys-Cys-Gly-Glu-Val-Ile

Código de una letra:

N-C-Y-N-E-L-Q-Y-L-C-V-S-A-C-C-G-E-V-I

Figura 3. Estructura primaria de una proteína hipotética.

En la estructura secundaria se encuentran tres principales arreglos tridimensionales:

- La alfa-hélice
 - La beta-plegada
 - Los giros o asas.
- } Repetitivas
- } No repetitivas

En todos los casos la estructura se encuentra estabilizada por los puentes de hidrógeno que se forman entre el oxígeno del grupo carboxilo y el hidrógeno del grupo amino de los aminoácidos participantes (Figura 4).



Figura 4. Estructuras secundarias repetitivas en las proteínas α -hélice (izquierda) y β -plegada (derecha).

Para la mayoría de las proteínas la estructura terciaria es el nivel de organización en el cual la cadena polipeptídica se encuentra biológicamente funcional. En este nivel de estructuración participan además del enlace peptídico y los puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrofóbicas, las fuerzas de van der Waals, los enlaces covalentes (puentes disulfuro), las interacciones iónicas (interacciones entre los grupos R de los aminoácidos cargados) y las interacciones con átomos provenientes de moléculas del medio exterior. En este nivel la proteína ya se encuentra plegada. (Figura 5).

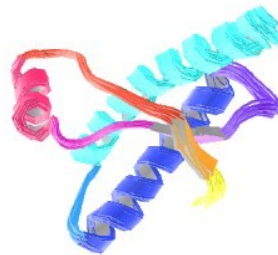
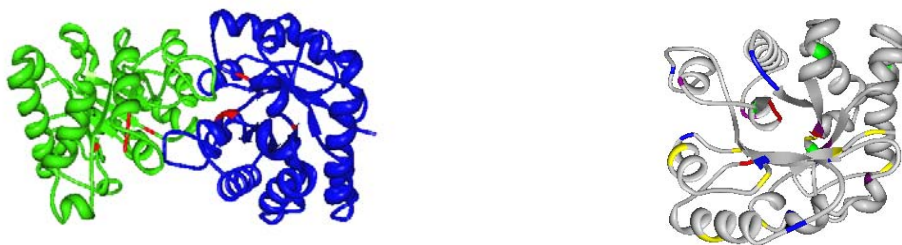


Figura 5. Estructura terciaria de una proteína (PrPc).

En la estructura cuaternaria, intervienen las mismas fuerzas que en la estructura terciaria, sólo que en ésta participan dos o más cadenas polipeptídicas, formando un oligómero (Figura 6).



A B
Figura 6. Estructura cuaternaria de una proteína (TcTIM). En A se muestra la estructura oligomérica de TcTIM formada por dos monómeros idénticos con su respectivo sitio catalítico cada uno (marcado en rojo). En B se indican los triptófanos (verde), fenilalaninas (azul), tirosinas (morado), prolina (amarillo) y el sitio activo (rojo) de un monómero de TcTIM.

1.2 EL PLEGAMIENTO

El proceso por el cual una cadena polipeptídica adquiere su estructura tridimensional así como su actividad funcional es el plegamiento (Figura 7). Dicho proceso se encuentra determinado en la secuencia de aminoácidos que conforman a la proteína (Anfinsen CB, 1973).

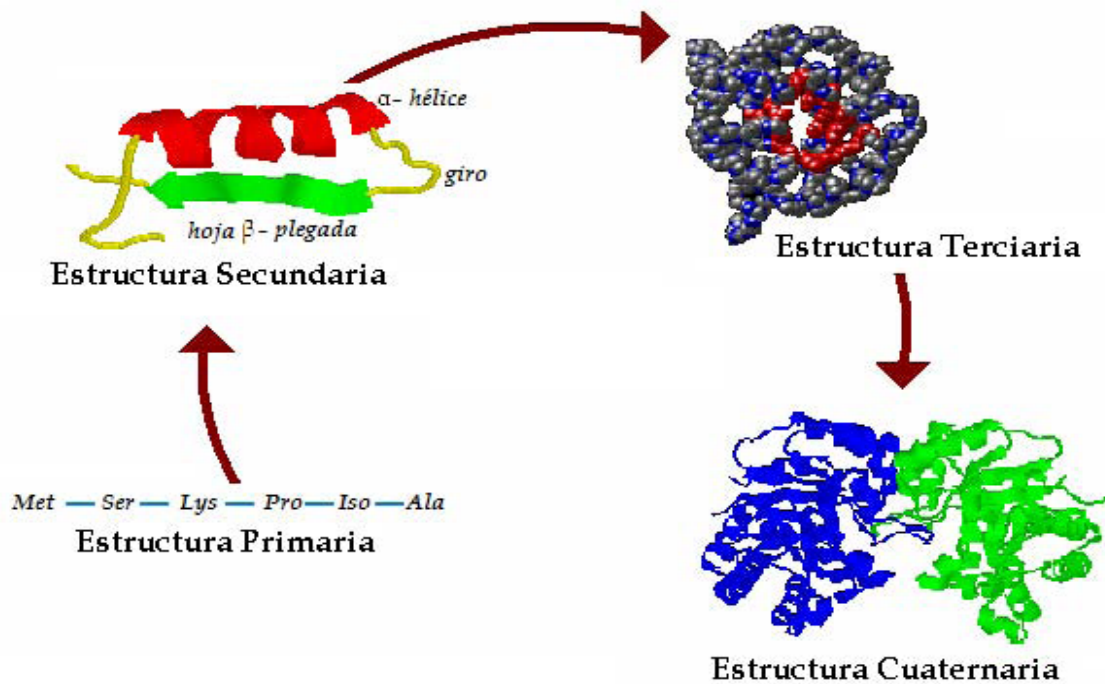


Figura 7. Representación del proceso del plegamiento de un oligómero.

Al estado en el cual la proteína se encuentra plegada y funcional, se le conoce como estado nativo, mientras que cuando la proteína pierde toda su estructura nativa se le conoce como estado desnaturalizado o desplegado. En condiciones fisiológicas el estado nativo es el estado termodinámicamente más estable en relación al estado desnaturalizado (Dobson MC, 2003).

El plegamiento es una reacción en la cual existen pasos intermedarios que son difíciles de observar debido a la velocidad con la que ocurren. La existencia de estos intermedarios transitorios que dirigen la ruta de plegamiento han generado estudios enfocados a determinar la estructura de estos estados y de esta manera determinar los factores que gobiernan el plegamiento de las proteínas.

El plegamiento es un proceso que ocurre en el orden de milisegundos a minutos, al observar este hecho el científico Cyrus Levinthal, sugirió que existen rutas preferenciales que llevan a la cadena polipeptídica a su conformación nativa, a este argumento se le conoce como paradoja de Levinthal, pues fue él quien calculó que, si cada aminoácido puede asumir solo 3 conformaciones diferentes, para una proteína pequeña de 100 aminoácidos, el número total de estructuras sería $3^{100} = 5 \times 10^{47}$; y si la conversión de una estructura en otra tarda 10^{-13} s, el tiempo total de búsqueda para hallar la estructura nativa al azar sería $(5 \times 10^{47})(10^{-13} \text{ s}) = 4 \times 10^{34}$ s, es decir 1.6×10^{27} años, el cual es un número extremadamente grande (Levinthal C, 1968). Actualmente se tiene evidencia de que el plegamiento no es una reacción aleatoria y que los intermediarios reducen en varios órdenes de magnitud la búsqueda de la conformación nativa (Dobson MC, 2003).

En el plegamiento se han identificado las interacciones que ocurren entre los diversos grupos químicos de los aminoácidos como los puentes disulfuro e interacciones iónicas, aunque se ha considerado que las interacciones que más influyen en el empaquetamiento de la proteína son las interacciones hidrofóbicas de las cadenas laterales, las fuerzas de van der Waals y los puentes de hidrógeno en medio acuoso, todas estas interacciones son las que mantienen la estabilidad conformacional de la proteína (Pace NC *et al.*, 1996).

Con la finalidad de entender el proceso del plegamiento se han realizado diversas simulaciones utilizando modelos computacionales. Un ejemplo ampliamente utilizado es el modelo del embudo, propuesto por Leopold, Montal y Onuchic (Leopold PE *et al.*, 1992). El embudo de plegamiento (Figura 8), representa las diversas rutas que puede tomar una proteína para plegarse (ejes x, z) y el nivel de energía que cada ruta posee (eje y). La forma del embudo depende tanto de la secuencia de aminoácidos de la proteína como de las condiciones externas; finalmente, el estado nativo se encuentra en el mínimo de energía.

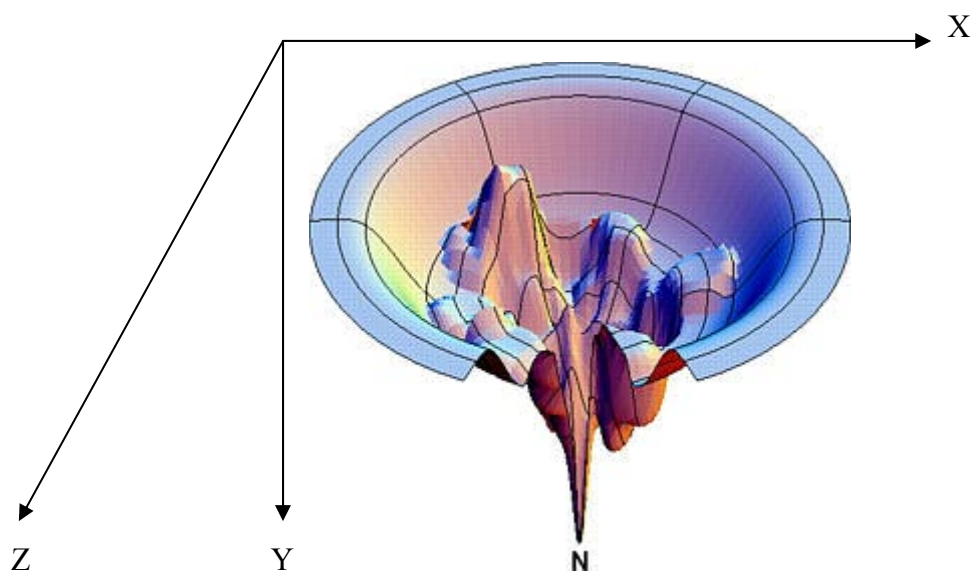


Figura 8. Modelo del embudo para el plegamiento de una proteína, se muestran los diferentes mínimos de energía.

El plegamiento de proteínas es un proceso de vital importancia. En el humano por ejemplo se han descrito diversas enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de las proteínas y que se conocen como plegopatías entre estas se incluyen por ejemplo a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob e inclusive alguna etiología de la diabetes tipo II (revisado en Chánez-Cárdenas *et al.*, 2002). Debido a su influencia directa o indirecta en la salud humana se le ha dado gran relevancia al estudio del proceso de plegamiento.

En algunos casos la reacción de plegamiento es reversible, por lo que puede estudiarse termodinámicamente determinando la energía libre (ΔG) involucrada en cada uno de los pasos intermedios-si es que los hay-, así como las constantes de equilibrio (K_{eq}) y el ΔG total.

La estabilidad de una proteína está relacionada con la energía necesaria para mantener su estructura y la energía libre de Gibbs está relacionada con la constante de equilibrio de la reacción del plegamiento (Konermann, 2004).

La ecuación de la reacción del plegamiento/desplegamiento para un modelo de dos estados, se ilustra a continuación:



$$K_{eq} = \frac{[U]}{[N]}$$

La estabilidad está dada por la diferencia entre la energía libre del estado desnaturalizado (G°_U) y del nativo (G°_N).

$$\Delta G^{\circ} = G^{\circ}_U - G^{\circ}_N$$

La relación entre el ΔG° y la constante de equilibrio (K_{eq}) se puede escribir como:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq}$$

Donde

R: Es la constante universal de los gases.

T: Es la temperatura en grados Kelvin.

El estudio del plegamiento es muy complejo y para lograr elucidar como ocurre se hacen estudios *in vivo*, *in vitro* y actualmente también *in silico*. En la observación *in vivo* existen factores auxiliares como chaperonas, catalizadores que aceleran el proceso, sin embargo el plegamiento puede llevarse a cabo sin la necesidad de estos factores como lo han demostrado los estudios realizados *in vitro*, los cuales han arrojado una amplia fuente de datos que han sido utilizados por los modelos computacionales para simular el plegamiento *in silico*. En base a estas metodologías la meta es poder predecir en un futuro la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos.

Los estudios de plegamiento *in vitro* implican la desnaturalización de la proteína y su posterior renaturalización. Entre los agentes más utilizados en la desnaturalización se encuentra el uso de variaciones físicas como de la temperatura o bien, agentes químicos como la variación de pH, desnaturalizantes como el clorhidrato de guanidinio o la urea y detergentes como el SDS.

Al aumentar o disminuir la temperatura, las interacciones de la proteína con el medio en el cual se encuentra se tornan sensibles debido al aumento o disminución de la energía cinética lo cual produce o reduce el desplegamiento.

Al variar el pH dentro de la solución que contiene a la proteína se permite el cambio en los estados de ionización de las cadenas laterales de aminoácidos produciendo el desplegamiento.

Los agentes desnaturizantes como el clorhidrato de guanidinio (molécula iónica cargada) y la urea (molécula orgánica neutra), permiten que la solubilidad de las cadenas laterales no polares de la proteína se incremente en agua. El mecanismo de acción de estos desnaturizantes aún no se ha descifrado totalmente, aunque se utilizan cotidianamente.

Los detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), interactúan con los residuos no polares de la proteína e interfiere con su centro hidrofóbico, que es altamente importante en el mantenimiento de su estructura nativa.

1.3 LA ESTRUCTURA DE LA TIM

En esta investigación se utilizó a la proteína Triosafosfato Isomerasa (TIM) cuya función enzimática es catalizar la quinta reacción de la glucólisis y en la cual convierte dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (Figura 9), al ser una reacción de isomerización, la TIM puede actuar en ambas direcciones de la misma, según los requerimiento energéticos de la célula, recordando que la glucólisis provee de energía a la célula al degradar la glucosa hasta la obtención de ATP, para esto se necesita GAP. Sin embargo cuando en la célula existe un exceso de energía, esta se almacena en forma de triacilglicéridos en células especializadas en almacenar este compuesto, entonces se produce más DHAP.

Cabe mencionar que la TIM es una enzima que cataliza la transformación de GAP a DHAP con una velocidad de entre 10^8 y 10^9 veces más rápido que si no estuviera presente (Kwonles *et al.*, 1991).

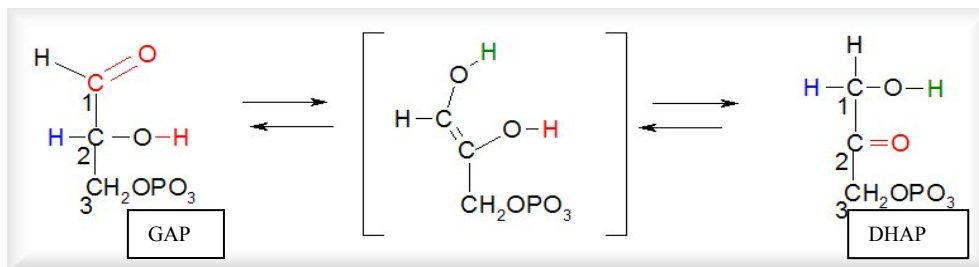


Figura 9. Reacción de isomerización catalizada por la Triosafosfato isomerasa en la glucólisis. Se muestra el intermediario enediol.

La TIM tiene una estructura ampliamente distribuida en las proteínas, alrededor del 10% de las estructuras proteicas reportadas hasta hoy, presentan este tipo de estructura conocida como barril (β/α)₈. Y como su nombre lo indica esta compuesta por 8 hélices alfa y 8 hebras betas, las cuales al plegarse le dan a la proteína la apariencia de un barril (Figura 6).

1.4 LA TcTIM

En el presente estudio se utilizó a la TIM del protozoario *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), el cual es el causante de la enfermedad de Chagas, que es una enfermedad parasitaria endémica de América Latina y que es común en zonas marginadas. La enfermedad se adquiere por medio de un insecto llamado *Triatoma infestans* (chinche besucona), que es el vehículo del *Trypanosoma cruzi*, y cuando este insecto pica al humano para alimentarse de su sangre, el protozoario alojado en el excremento del insecto pasa directamente a la circulación sanguínea del humano al rascarse por la picadura, causando la enfermedad (Zaman V, 1999).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por ser asintomática en fases tempranas, pero al transcurrir el tiempo afecta al sistema nervioso, al sistema digestivo y al corazón hasta causar la muerte, generalmente debida al daño que provoca la miocardiopatía.

La TcTIM es una proteína homodimérica, es decir cuenta con dos subunidades polipeptídicas idénticas, cada unidad polipeptídica o monómero tiene un peso de 27 KD con una estructura (β/α)₈ (Branden *et al.*, 1991) (ver Figura 6-A). Los monómeros se asocian entre sí por medio de interacciones no covalentes y cada uno contiene su sitio activo completo localizado cerca de la interfase que comparten las dos subunidades. Para asegurar al máximo su función, la enzima cuenta con un asa móvil que oculta el sustrato del solvente, esta asa se conoce como el asa 6 o asa catalítica y se mueve de una conformación conocida como cerrada a una conformación abierta (Wierenga RK *et al.*, 1992). El asa 3, también conocida como asa de interfase, encaja en una cavidad que se encuentra cerca del sitio activo de la otra subunidad lo que incrementa la estabilidad del dímero (Figura 6-A).

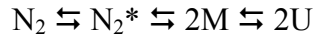
La TIM sólo es activa como dímero, aunque sus monómeros presentan los residuos necesarios para llevar a cabo la catálisis; no presentan cooperatividad entre ellos (Schnackerz KD *et al.*, 1991), pues funcionan independientemente y a la fecha no se han reportado TIM's monoméricas silvestres. Es probable 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 en esta proteína. 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 para TcTIM son lisina (K) 12, histidina (H) 94 y el ácido glutámico (E) 166, residuos que están conservados en proteínas homólogas. 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 especies (Wierenga RK *et al.*, 1991).

La TcTIM tiene 5 triptófanos, 7 fenilalaninas y 6 tirosinas en cada monómero los cuales son aminoácidos fluorescentes por lo cual esta enzima es capaz de emitir fluorescencia. Cabe mencionar que el código PDB de TcTIM es 1TCD, así como también que en su estructura contiene 9 prolinas en cada monómero, lo cual le da la posibilidad de tener isomería cis/trans bajo ciertas condiciones, según en la posición en que se encuentren (Aumüller *et al.*, 2008).

II. ANTECEDENTES

La TcTIM presenta un proceso de plegamiento de cuatro estados en clorhidrato de guanidina (Gnd-HCl) (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005) que se ilustra a continuación.



Donde

- N_2 Es el dímero nativo.
- N_2^* Es un dímero no nativo, con hiperactividad.
- M Es un monómero inactivo parcialmente plegado.
- U Es el estado desnaturalizado.

En nuestro equipo de investigación se encontró que existe un aumento en la actividad catalítica de la TcTIM al ser incubada bajo ciertas condiciones en Gnd-HCl tanto en la desnaturalización como en la renaturalización, esta hiperactividad es propia del dímero no nativo (N_2^*). La naturaleza dimérica de este intermediario se verificó por medio de experimentos de cromatografía de exclusión molecular, así mismo se determinó su estabilidad ($\Delta G_{N_2-N_2^*}$) = 4.45 kJ/mol. La especie N_2^* presenta un mayor radio de Stokes, es decir se encuentra expandida y también presenta mayor fluorescencia intrínseca con respecto a la TcTIM nativa (*Op. Cit.*, 2005).

En la desnaturalización se presenta hiperactividad entre 0.2 M y 0.8 M, presentado un máximo en 0.6 M de Gnd-HCl (aproximadamente 40% más actividad catalítica, respecto a la proteína nativa) (Figura 10).

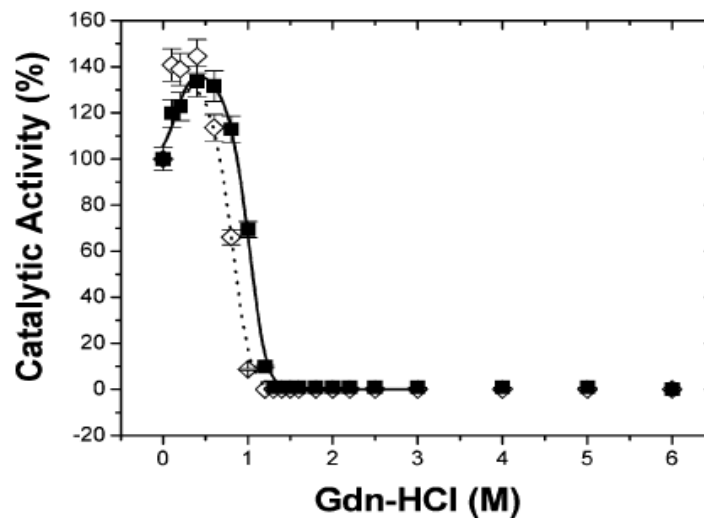


Figura 10. Gráfica extraída del artículo de Chávez-Cárdenas, et al., 2005; la cual muestra el proceso de desnaturalización de TcTIM en Gnd-HCl a una concentración de 5 µg/mL (◇) y 50 µg/mL(■) de proteína al ser incubada por 48 h.

En el proceso inverso a la desnaturalización, la renaturalización, se puede observar el efecto de hiperactividad en TcTIM (Figura 11), cuando este proceso es realizado en forma directa (\blacktriangle), es decir sin ajustar la concentración residual de Gnd-HCl, al igual que cuando es realizado con cantidades residuales de clorhidrato de guanidina fijas (0.1M \blacksquare , 0.3M \blacklozenge , 0.6M \blacktriangledown). La hiperactividad es mayor cuando la concentración residual de Gnd-HCl es 0.6 M como ocurre en la desnaturalización.

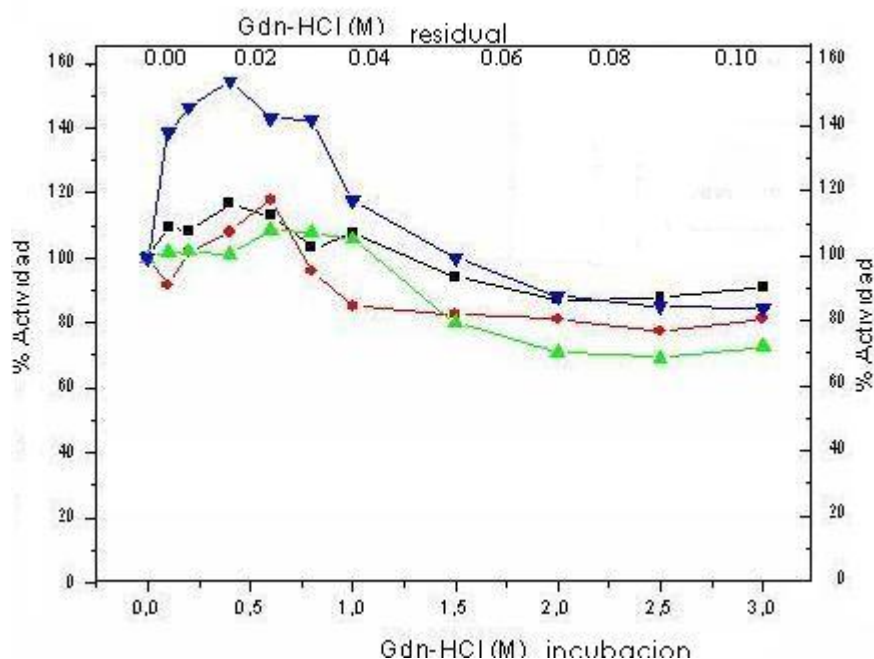


Figura 11. Hiperactividad mostrada por TcTIM a bajas concentraciones de Gnd-HCl residual en la renaturalización a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. La renaturalización se llevó a cabo primero con la desnaturalización de TcTIM por 48 h de incubación, para su posterior renaturalización medida a las 24 h de incubación.

La hiperactividad mostrada por la TcTIM en ambas condiciones puede deberse a varios factores por ejemplo a la naturaleza química del desnaturalizante o bien a la fuerza iónica ejercida por el clorhidrato de guanidina (Figura 12), ya que es una sal cargada.

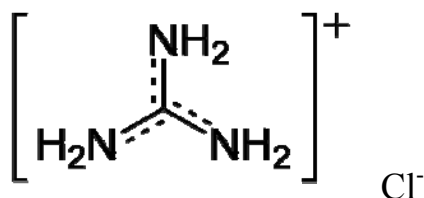


Figura 12. Estructura química del clorhidrato de guanidina (Gnd-HCl).

El mecanismo por el cual el Gnd-HCl desnaturaliza, aún no es claro, pero se tiene evidencia de que realiza este proceso afectando la hidrofobicidad de la proteína por la interacción con los aminoácidos hidrofóbicos del núcleo proteico y la modificación de la fuerza iónica que ejerce en los grupos cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos (Möglich *et al.*, 2005; Mason *et al.*, 2007; Camilloni *et al.*, 2008).

La determinación del efecto de la fuerza iónica en la hiperactividad mostrada por TcTIM se realizó cuantificando y relacionando diversos parámetros como la intensidad de fluorescencia intrínseca, la intensidad de fluorescencia extrínseca y la actividad biológica en función de una condición desnaturalizante que modifique la fuerza iónica.

Para evaluar la naturaleza química del desnaturalizante y otras interacciones se utilizó urea (Figura 13), que es una molécula neutra (Caballero-Herrera *et al.*, 2005; Möglich *et al.*, 2005; Camilloni *et al.*, 2008; Muthuselvi *et al.*, 2008), con la modificación de fuerza iónica.

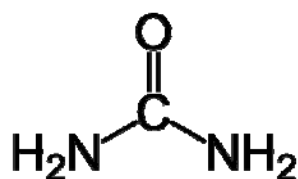


Figura 13. Estructura química de la urea (Molécula sin carga).

Plegamiento de otras TIM's

Las rutas de plegamiento de la TIM son tan diversas a pesar de tratarse de la misma enzima con la misma función dentro de las diferentes especies. Se han descrito rutas de plegamiento de la TIM en algunas especies (Tabla 2) (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005). Dentro de dichas rutas cabe resaltar que TmTIM presenta un intermediario hiperactivo como ocurre con TcTIM.

La TbTIM presenta 4 intermediarios como TcTIM con la diferencia que los intermediarios de TbTIM forman agregados de manera irreversible, también ésta enzima posee el mismo número de triptófanos que TcTIM, casi en la misma posición. TbTIM tiene sus triptófanos en las posiciones 12, 90, 159, 170 y 193; mientras que TcTIM en las posiciones 11, 89, 158, 169 y 192.

En la tabla 2 se pueden observar algunas diferencias que tienen las TIM en sus rutas de plegamiento, por mencionar algunas, es que existen procesos de plegamiento de 2 estados (LmTIM) mientras que otras TIM tienen procesos de 4 estados (TbTIM). En algunas especies de TIM el proceso de plegamiento es reversible (rTIM) en otras el proceso de plegamiento solo ocurre en una sola dirección (PfTIM). Existen algunas TIM's que unen ANS como yTIM mientras que hay otras como BsTIM que no unen ANS.

Enzima	Código PDB	Reversible	Hiper-actividad	Ruta de plegamiento	Unión a ANS	Referencia bibliográfica
BsTIM	1BTM	Si	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	No	Mainfroid V, 1996
TmTIM	1B9B	No	Si	$N_2 \rightarrow N_2^*(A) \rightarrow 2U$	No	Beaucamp N, 1997
rTIM	1R2R	Si	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	No	Pan H, 2004
PfTIM	1YDV	No	No	$N_2 \rightarrow N_2^*(A) \rightarrow 2U$	No	Gokhale RS, 1999
yTIM	1YPI	Si	No	$N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	Si	Nájera H, 2003
LmTIM	1AMK	Si	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	No	Lambeir AM, 2000
TbTIM	1TPF	No	No	$N_2 \rightleftharpoons N_2^*(A) \rightleftharpoons 2M(A) \rightleftharpoons 2U$	Si	Chávez ME, 2002
TcTIM	1TCD	Si	Si	$N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	Si	Chávez ME, 2005

Tabla 2. Rutas de plegamiento de TIM en diferentes especies (*B. stearothermophilus*, *Thermotoga maritima*, Conejo, *P. falciparum*, Levadura, *L. mexicana*, *T. brucei* y *T. cruzi*).

III. HIPOTESIS

La fuerza iónica y/o la naturaleza química del agente desnaturizante pueden ser las responsables del aumento en la actividad catalítica observada en la desnaturalización química de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Determinar el origen de la hiperactividad observada en la desnaturalización química de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

4.2 ESPECÍFICOS

- Evaluar si la fuerza iónica es la responsable de la hiperactividad observada en la desnaturalización química de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.
- Evaluar el efecto de la naturaleza química del agente desnaturalizante en la hiperactividad observada en la desnaturalización química de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 OBTENCIÓN DE LA TcTIM

5.1.1.- Sobreexpresión de la TcTIM

La TcTIM es una proteína que no se encuentra disponible en el mercado, por lo que fue necesaria su sobreexpresión en la bacteria recombinante *Escherichia coli* (BL21(DE3)). Dicha bacteria tiene insertado un plásmido que contiene el gen silvestre de la TIM del *Trypanosoma cruzi*.

A partir de la cepa recombinante se realizó un precultivo en el medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/mL). El medio LB para el precultivo como para el cultivo es previamente esterilizado en un autoclave por 20 min/103 kPa/121°C (Ostoa-Saloma P *et al.*, 1997). El medio LB utilizado tanto para el precultivo (50 mL) como para el cultivo (1L) contiene peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L.

Bajo condiciones estériles se tomó una asada de una colonia y se inoculó al medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL). Con una asada es suficiente para inocular 50 mL de medio para el precultivo; a su vez estos 50 mL de precultivo sirven para inocular 1L de cultivo. Se dejó incubar el precultivo por 12 h/37 °C/250 rpm. Cabe mencionar que la ampicilina se agregó justo en el momento de la inoculación. Una vez que transcurrió el tiempo de incubación se procedió a inocular al cultivo con el precultivo. El cultivo se dejó incubar por 4 h a 37°C con agitación constante.

Una vez transcurrido el tiempo se agregó IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), el cual funciona como inductor de la expresión de la TcTIM en la bacteria, a una concentración de 0.0004 M (95 mg/L de medio de cultivo). Una vez agregado el IPTG se dejó incubar por 12 h adicionales a 37°C a 250 rpm.

5.1.2 Purificación de la TcTIM

El cultivo bacteriano fue centrifugado a 12000 rpm/15 min en una centrifuga Beckman J2-21 para la obtención de un precipitado que es el paquete celular. El precipitado se disolvió con 40 mL de buffer de lisis por cada litro de medio de cultivo. El buffer de lisis se elaboró según la tabla 3.

Reactivo	[Concentración]
Tris-HCl pH=8	20 mM
PMSF	0.2 mM *
EDTA	1 mM

Tabla 3. Reactivos y cantidades para elaborar el buffer de lisis. (* Esta cantidad se disuelve en 1 mL de DMSO).

Una vez disuelto el precipitado en el buffer de lisis se llevó a cabo el rompimiento celular por medio de un sonicador Branson sonifier 250, con 3 ciclos (1 min de sonicar x 1 min de descanso) y 4 ciclos (30 s x 30 s). Las muestras una vez sonicadas se llevaron a ultracentrifugación a 40000 rpm /1 h/ 4°C y con vacío (200 vaccum) en una ultracentrifugadora Beckman L7-55. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se eliminó el precipitado (El cual contiene los desechos celulares).

El sobrenadante se precipitó con sales de sulfato de amonio al 45% (277 g de sulfato de amonio para 1 L) durante 4 h. Transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se llevó a una concentración al 75% de sulfato de amonio (105 g de sulfato de amonio para 1 L) durante 4 horas.

Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante y se utilizó el precipitado, el cual fue disuelto en 2 mL de buffer A. El Buffer A se preparó según la tabla 4.

Reactivo	Concentración
Trietanolamina (TEA) (Amortiguador)	25 mM
Azida de sodio (Bactericida)	1 mM
Ditiotreitol (DTT) (Agente reductor)	0.5 mM
EDTA (Quelante)	2 mM
Agua destilada	Aforar *

Tabla 4. Reactivos y cantidades para elaborar el Buffer A. (*El pH del buffer se ajusta a 8, utilizando perlas de NaOH).

Con la finalidad de separar a la TcTIM de otras proteínas por medio del tamaño molecular, se realizó una cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna de Sephadex G-100 que separa proteínas globulares de 4000 a 150000 Daltons, el tamaño de las esferas de sephadex G-100 es de 40 a 120 μm .

La columna de exclusión molecular, la cual debe estar equilibrada previamente con buffer A (Volumen 120 mL, flujo 0.2 mL/min, durante 10 horas) fue cargada con la muestra y se llevó a cabo el muestreo por un tiempo aproximado de 24 horas para 100 tubos, a una temperatura de 4 °C y con un flujo de 0.2 mL/min, recolectando 3 mL para cada fracción.

Las muestras una vez colectadas fueron sometidas a la cuantificación de la absorbancia y aquellas cuya absorbancia fue superior a 1 se reunieron, obteniéndose de esta manera dos picos y por lo tanto dos fracciones (Ver apéndice 1). Posteriormente solo la fracción 1 fue concentrada en el amicon con nitrógeno a 60 psi.

Una vez concentrada dicha fracción que es donde se encuentra la proteína de interés se procedió a realizar una separación por medio de las propiedades de carga de la TcTIM, para lo cual se utilizó una columna de intercambio catiónico, una carboximetil sefarosa, la cual intercambia aniones.

La fracción 1 (5mL) procedente de la exclusión molecular, se carga y se deja adsober en la columna de intercambio catiónico (20 cm x 1.5 cm de diámetro) que fue previamente calibrada con el buffer A con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min y 3 mL por fracción.

Se colectaron como mínimo 6 tubos con solo buffer A; pasando estos 6 tubos se adicionó el buffer B, que es buffer A más NaCl 110 mM. Se dejó muestreando por alrededor de dos horas, obteniéndose 20 a 25 tubos.

Posteriormente se leyeron los tubos a una longitud de onda de 280 nm, con buffer A como blanco, los tubos cuya absorbancia fue superior a 0.4, fueron reunidos obteniéndose dos picos, la fracción 2 o pico 2 (Ver apéndice 1) corresponde a la proteína pura que fue corroborado por medio de una electroforesis en gel (Ver apéndice1).

Finalmente la fracción 2 fue concentrada en el amicon a un volumen de 10 mL.

5.1.3 Electroforesis

Con la finalidad de monitorear e identificar la pureza de la proteína, en el proceso de purificación se corrió un gel de electroforesis de tamaño de poro de 0.75 mm; en el equipo de Mini-PROTEAN 3Cell (BIO RAD).

En la elaboración de los geles se utilizaron 2.5 mL de solución concentradora y 5 mL de solución separadora por cada placa de gel (Tabla 5).

Reactivo	Solución Concentradora (2.5mL)	Solución Separadora (5mL)
Acrilamida 40%	250 µL	1.5 mL
Buffer para el gel concentrador pH =6.8	2.25 mL	No
Buffer para el gel separador pH=8.8	No	3.5 mL
Persulfato de amonio 10%	25 µL	25 µL
TEMED	3 µL	5 µL

Tabla 5. Reactivos y cantidades usadas en la preparación de las soluciones para la elaboración de un gel de electroforesis. Cada solución debe ser preparada casi al instante del uso para evitar que polimerice en el recipiente.

Las muestras colectadas a través de toda la purificación, fueron desnaturalizadas previamente, utilizando 10 μL de muestra con una solución desnaturalizante (4 μL); la cual contenía glicerol, SDS, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol.

Este procedimiento se repitió de igual manera para un control de TcTIM pura.

Los pozos se llenaron con 10 μL de las mezclas anteriores y colocando un marcador de peso en los extremos del gel; se procedió a correr las muestras por 2 horas aproximadamente a un voltaje de 80 volts (Resultados en el apéndice 1).

5.1.4 Cuantificación de la TcTIM

Una vez identificada la proteína como pura, se cuantificó la cantidad presente por medio de dos métodos para obtener una mayor certeza.

El primer método utilizado fue por medio de un kit comercial de la marca Pierce, usando el reactivo llamado BCA (Acido Bicinconínico), el cual se basa en una reacción de Biuret (Reducción de una sal de Cu^{2+} a Cu^{1+}), dicha reacción se detecta colorimétricamente a 562 nm. En este tipo de ensayos es necesario realizar curvas estándar y de esta manera poder interpolar el valor de la muestra (Resultados en el apéndice1).

El segundo método utilizado fue totalmente espectrofotométrico por ser mas práctico fue utilizado en todas la determinaciones posteriores. Este método se basa en la ley de Lambert-Beer

$$A = C \epsilon l$$

En donde:

A: La absorbancia obtenida experimentalmente.

C: La concentración con unidades determinadas por el ϵ .

ϵ : El coeficiente de extinción molar, que es un valor teórico ya reportado.

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

$$\epsilon (\text{TcTIM}) = 36440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (Ostoa-Saloma P } et al, 1997; \text{ Pace CN } et al, 1995)$$

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA TcTIM

Los resultados de esta parte experimental se encuentran en el apéndice 2.

5.2.1 Fluorescencia

La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en un espectrofluorómetro Olis (DM45), celdas de cuarzo de 0.5 cm, y una temperatura de 25 °C.

5.2.1.1 Fluorescencia intrínseca.

Al excitar a 280 nm se observa la fluorescencia de todos los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína, el espectro de emisión fue tomado de 300 a 400 nm. Los resultados obtenidos fueron normalizados para la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda máxima de la emisión de la proteína nativa, sin desnaturizante: 327 nm. Para normalizar los datos se utilizó la siguiente fórmula:

$$Y = (Y_u - Y_x) / (Y_u - Y_n)$$

Donde:

Y = La fracción normalizada. En la proteína nativa el valor es igual a 1.

Y_u = La IF de la proteína desnaturizada

Y_n = La IF de la proteína nativa

Y_x = La IF de la proteína en la fracción problema.

Al excitar a 295 nm se observa la fluorescencia sólo de los triptófanos presentes en la proteína, el espectro de emisión fue recogido de 310 a 410 nm. Los datos resultantes fueron tratados de igual forma que en la determinación anterior con la diferencia en la longitud de onda máxima de la emisión de la proteína nativa, sin desnaturizante, fue 328 nm.

El desplazamiento de la longitud de onda máxima emisión en función de la concentración desnaturizante fue graficado para ambas determinaciones: 280 y 295 nm.

5.2.1.2 Fluorescencia extrínseca con ANS (A 360 nm)

El ANS (1-Anilino-8-naftalensulfonato) es un fluoróforo extrínseco que se puede unir a los grupos hidrofóbicos de la proteína. La concentración utilizada fue 100 μM de ANS en los ensayos de fluorescencia extrínseca.

La longitud de onda de excitación utilizada fue 360 nm y el espectro de emisión fue tomado de 400 a 560 nm. Los resultados obtenidos de esta determinación fueron cuantificados en relación al porcentaje de unión del ANS a la proteína a la longitud de onda máxima de la emisión de la proteína nativa, sin desnaturizante (480 nm).

5.2.2 Actividad Catalítica

Una vez purificada la enzima se verificó y se cuantificó su actividad catalítica por medio de una reacción acoplada descrita por Rozacky EE *et al.*, 1971.



GAP: Gliceraldehido 3 -fosfato

TIM: Triosafosfato isomerasa

DHAP: Dihidroxiacetona fosfafo

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotido reducido

NAD+: Nicotinamida adenina dinucleotido oxidado

G3P: Glicerol 3 fosfato

αGDH : Alfa Glicerolfosfato deshidrogenasa

La actividad fue cuantificada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Enzimática Especifica} = \frac{\Delta \text{Absorbancia/min}}{6.22 * [\text{Proteína mg/mL}]}$$

$\mu\text{mol/mL}$

5.2.3 Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular se utiliza para el estudio de la estructura secundaria de las proteínas ya que cuantifica por medio de un espectropolarímetro la cantidad de estructuras α -hélices y β -plegadas existentes.

Una muestra de proteína (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue introducida en el espectropolarímetro Jasco (J720) para obtener un espectro de la distribución de estructura secundaria en la proteína nativa.

5.3 EXPERIMENTO CONTROL CLORHIDRATO DE GUANIDINA

Con la finalidad de tener un control interno y reproducir lo reportado por Chánez-Cárdenas ME *et al.*, 2005, se realizó el experimento de desnaturalización en clorhidrato de guanidina. Las muestras fueron incubadas a diferentes concentraciones de Gnd-HCl (0-6 M), utilizando una concentración de proteína de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 48 h a 25 °C en medio TED 20:1:1 (Trietanolamina 20 mM, EDTA 1 mM, Ditiotretitol 1 mM), pH=7.4.

Las muestras fueron monitoreadas por fluorescencia y por actividad catalítica, de esta manera se siguieron los cambios en la estructura terciaria y cuaternaria, respectivamente. Para obtener el patrón por fluorescencia las muestras fueron leídas en el espectrofluorómetro y se obtuvieron tres espectros por cada muestra; el primero correspondiente a la fluorescencia intrínseca de los fluoróforos (280 nm), el siguiente solo a la fluorescencia emitida por los triptófanos (295 nm) y el último correspondiente a la unión de ANS. Los datos fueron tratados para obtener el patrón de desnaturalización monitoreado por fluorescencia según se indica en el punto 5.2.1.

En la desnaturalización de TcTIM seguida por la actividad catalítica, fue necesario después de incubar, hacer una dilución utilizando TED 100:10:1 mM, para llegar a una disolución cuya concentración de TcTIM fuera 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La dilución fue necesaria ya que para el ensayo de actividad catalítica se utilizó una concentración de 5 ng/mL de TcTIM y los compuestos señalados en el punto 5.2.2.

En ambos casos los datos fueron normalizados con los valores obtenidos de la proteína sin desnaturizante y de esta manera se obtuvieron los patrones por fluorescencia y actividad catalítica.

5.4. CLORHIDRATO DE GUANIDINA (0.6 M) Y CLORURO DE SODIO (0-2 M).

En esta parte se buscó evaluar el efecto de la fuerza iónica en el punto máximo de hiperactividad encontrado en Gnd-HCl (0.6 M), para lo cual se agregó a una concentración fija de TcTIM, NaCl a diferentes concentraciones, manteniendo constante la concentración de Gnd-HCl a 0.6 M. Las muestras fueron incubadas por 48 h/25 °C, a las diferentes condiciones desnaturizantes, utilizando 50 µg/mL de proteína en TED 20:1:1 (pH= 7.4). Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

5.5 EXPERIMENTOS CON CLORURO DE SODIO

Para determinar el efecto que la fuerza iónica ejerce directamente en la hiperactividad de TcTIM se realizó este experimento, en el cual se agregaron diferentes concentraciones de NaCl a la TcTIM. Las muestras fueron incubadas por 48 h/25 °C, utilizando 50 µg/mL de proteína en medio TED 20:1:1 (pH= 7.4).

Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

5.6 RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN CLORURO DE SODIO

En esta parte se determinó si el efecto producido por el cloruro de sodio sobre la actividad catalítica era reversible. Las muestras fueron incubadas por 48 h/25 °C, a las diferentes condiciones desnaturizantes, utilizando 150 µg/mL de proteína en medio TED 20:1:1

(pH= 7.4). Posteriormente para observar la recuperación de la actividad catalítica de TcTIM se realizaron dos tipos de diluciones la primera fue una directa, es decir se tomó una alícuota de las muestras desnaturalizadas y se agregó medio TED (100:10:1); la segunda se realizó ajustando a una concentración de NaCl (0.1 M), en ambos casos con una posterior incubación de 24 h/ 25 °C y luego se determinó la actividad catalítica (Figura 14).

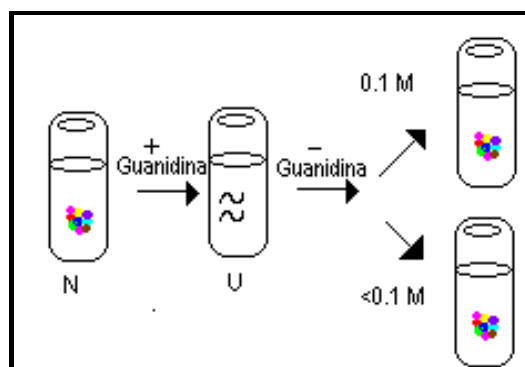


Figura 14. Representación del experimento de recuperación de la actividad catalítica de TcTIM (150µg/mL), dilución directa y ajustada a 0.1 M de NaCl.

Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

5.7 UREA (0.5 M) Y CLORURO DE SODIO (0-2.4 M)

Evaluar si la naturaleza química del desnaturalizante es la responsable de la hiperactividad observada en la desnaturalización de TcTIM fue parte fundamental de este trabajo, por lo cual se utilizó a la urea, desnaturalizante sin carga. En el presente experimento y los consecutivos la urea fue el agente desnaturalizante utilizado.

Las muestras fueron incubadas por 200 horas, a una concentración de 50 µg/mL de proteína en medio TED (20:1:1) a pH= 7.4, con urea 0.5 M y NaCl variable.

Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

5.8 UREA (1 M) Y CLORURO DE SODIO (0-2.4 M)

Las muestras fueron incubadas por 200 horas, a una concentración de 50 µg/mL de proteína en medio TED (20:1:1) a pH= 7.4, con urea 1 M y NaCl variable.

Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

5.9 UREA (2 M) Y CLORURO DE SODIO (0-2.2 M)

Las muestras fueron incubadas por 200 horas, a una concentración de 50 µg/mL de proteína en medio TED (20:1:1) a pH= 7.4, con urea (2 M) y NaCl variable.

Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

5.10 CLORURO DE SODIO (1.4 M) Y UREA (0-4.5 M)

Este último experimento se realizó manteniendo una concentración fija de NaCl (1.4 M), y variando la concentración de urea, contrario a los tres últimos experimentos. Se utilizó la concentración de 1.4 M de NaCl debido a que en el experimento control, esta es la concentración de Gnd-HCl en la cual existe mayor unión a ANS.

Las muestras fueron incubadas por 200 horas, a una concentración de 50 µg/mL de proteína en medio TED (20:1:1) a pH= 7.4, con NaCl 1.4 M y urea variable.

Los datos experimentales fueron tratados de la misma forma que el control (Gnd-HCl) y de esta manera se determinó el patrón seguido por fluorescencia y actividad catalítica.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Experimento Control (Clorhidrato de guanidina)

En este experimento utilizado como control podemos apreciar la aparición de los cuatro estados y las tres transiciones en el plegamiento de la TcTIM, monitoreado por fluorescencia intrínseca: el estado nativo (N_2), el dímero con hiperactividad (N_2^*), el estado monomérico (2M) y el estado desplegado (2U); estados reportados anteriormente por Chánez-Cárdenas ME *et al.*, en el 2005 (Figura 15).

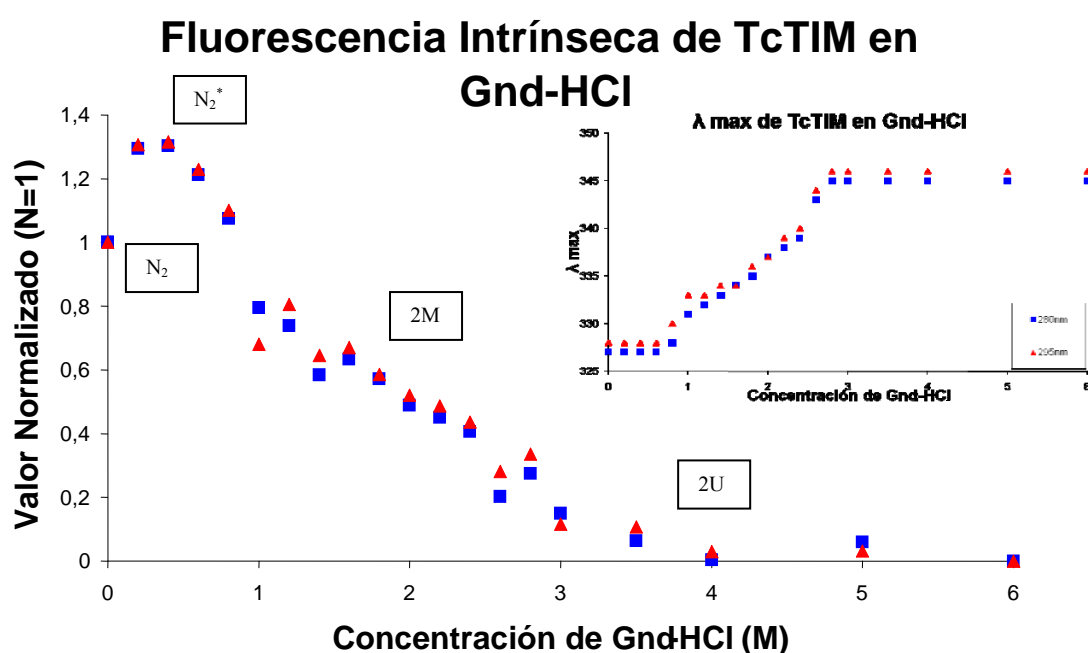


Figura 15. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 48 h en Gnd-HCl; IF excitando a 280 nm y medida a 327 nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295 nm y medida a 328 nm (Triangulo, rojo); Estado nativo ($N=1$). Recuadro 15. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de Gnd-HCl.

En el estado nativo, la proteína se encuentra sin desnaturizante y por lo tanto no se encuentra alterada en su estructura ni en sus propiedades naturales motivo por el cual todos los resultados están referidos a este estado ($N=1$).

La aparición del estado N_2^* se puede apreciar en la figura 15, donde la fluorescencia intrínseca excitando a 280 nm ó 295 nm muestra un incremento entre las concentraciones de 0.2 M y 0.8 M de Gnd-HCl; así como también en la figura 17 donde se puede apreciar la hiperactividad mostrada por la enzima en las mismas condiciones anteriores de incubación en Gnd-HCl.

Los estados N_2 y N_2^* son diméricos con la diferencia que N_2^* presenta mayor actividad catalítica y mayor fluorescencia intrínseca, pero ambas especies presentan la misma longitud de onda de máxima emisión como se puede observar en el recuadro 15.

Unión de ANS a TcTIM en Gnd-HCl

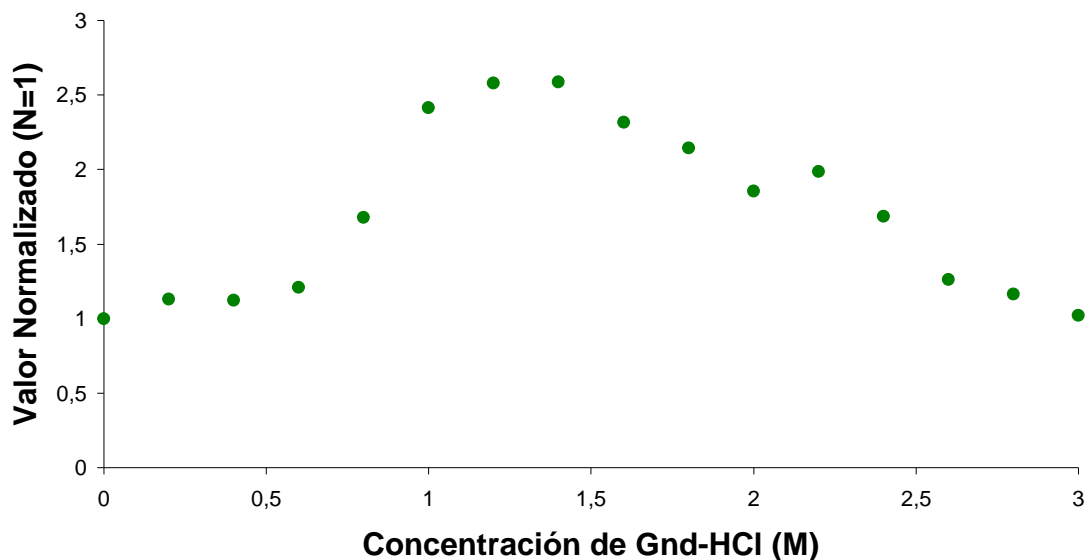


Figura 16. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 48 h en Gnd-HCl y en presencia de ANS; IF excitando a 360 nm y medida a 480 nm; Estado nativo (N=1).

Actividad Catalítica de TcTIM en Gnd-HCl

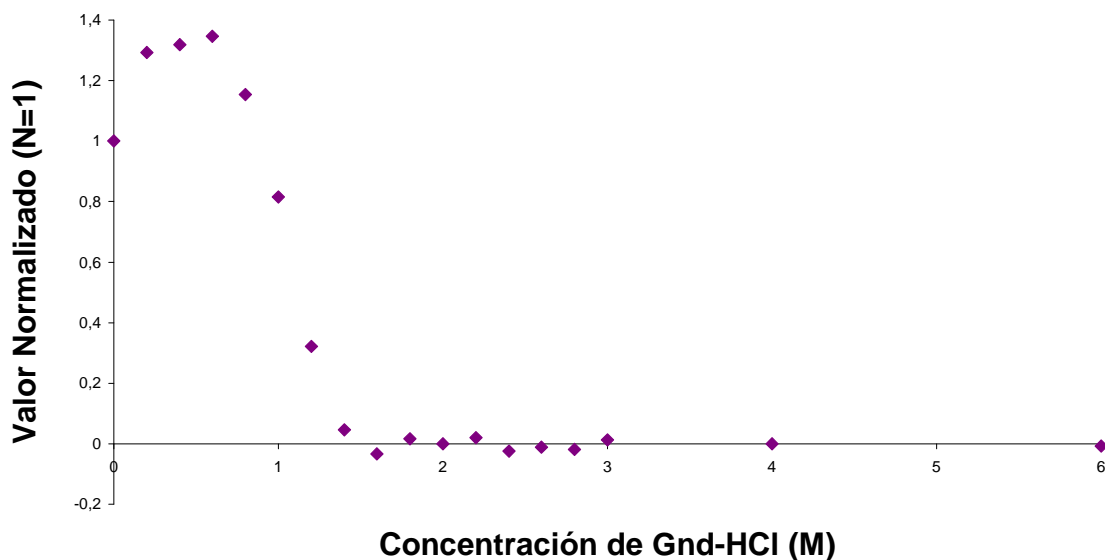


Figura 17. Actividad catalítica de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al ser incubada 48 h en Gnd-HCl; Estado nativo (N=1).

El estado monomérico (M) puede observarse en la figura y recuadro 15, las cuales muestran cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca y en la longitud de onda de máxima emisión, respectivamente, en concentraciones de 1 M a 2.8 M de clorhidrato de guanidina. La figura 16 correspondiente a la unión de ANS en las mismas condiciones de concentración de Gnd-HCl, la TcTIM presenta mayor unión a este compuesto, el cual se une con mayor afinidad a zonas hidrofóbicas con estructura y fluoresce con mayor intensidad, este hecho en la figura indica que el estado dimérico se va monomerizando, recordando que la interfaz que existe en los dímeros es una zona hidrofóbica, razón por la cual aumenta la fluorescencia del ANS.

El estado monomérico también se manifiesta en la figura 17 en donde la actividad catalítica desaparece totalmente a la concentración de 1.4 M de Gnd-HCl, recordando que la TcTIM solo tiene actividad catalítica en estado dimérico.

Finalmente el estado desplegado (U), aparece desde 3 M de Gnd-HCl en adelante, esto se puede observar principalmente en las figuras 15, donde se encuentra las mínimas intensidades de fluorescencias intrínsecas tanto cuando son monitoreados todos los fluoróforos (280 nm) como cuando sólo se monitorean los triptófanos (295 nm), considerando que los triptófanos aportan la mitad de la fluorescencia total en la proteína (Figura 46 y 47) e igualmente en el recuadro 15 cuando se monitorea a la TcTIM por medio de la longitud de onda de máxima emisión se observa la transición al estado desplegado a la concentración de 2.8 M de Gnd-HCl cuando a partir de este punto la longitud de onda de máxima emisión se vuelve constante. En la figura 16 se puede apreciar que de 2.8 M en adelante disminuye la unión al ANS, recordando que éste fluoróforo extrínseco se une a grupos hidrofóbicos con estructura y en el estado desplegado la proteína ya no cuenta con estructura funcional; concordante con estos resultados se encuentra la figura 17 donde se presenta la actividad catalítica y se observa que no presenta ningún tipo de funcionamiento catalítico a dichas concentraciones.

EVALUACIÓN DEL DESNATURALIZANTE CARGADO Y FUERZA IÓNICA.

6.2 Experimento 2: Clorhidrato de Guanidina constante (0.6 M) y NaCl variable.

Al encontrarse una mayor actividad catalítica en 0.6 M de clorhidrato de guanidina, en este segundo experimento se buscó aumentar la fuerza iónica en este punto, para evaluar la actividad catalítica; para lo cual se agregó cloruro de sodio manteniendo fija la concentración de clorhidrato de guanidina.

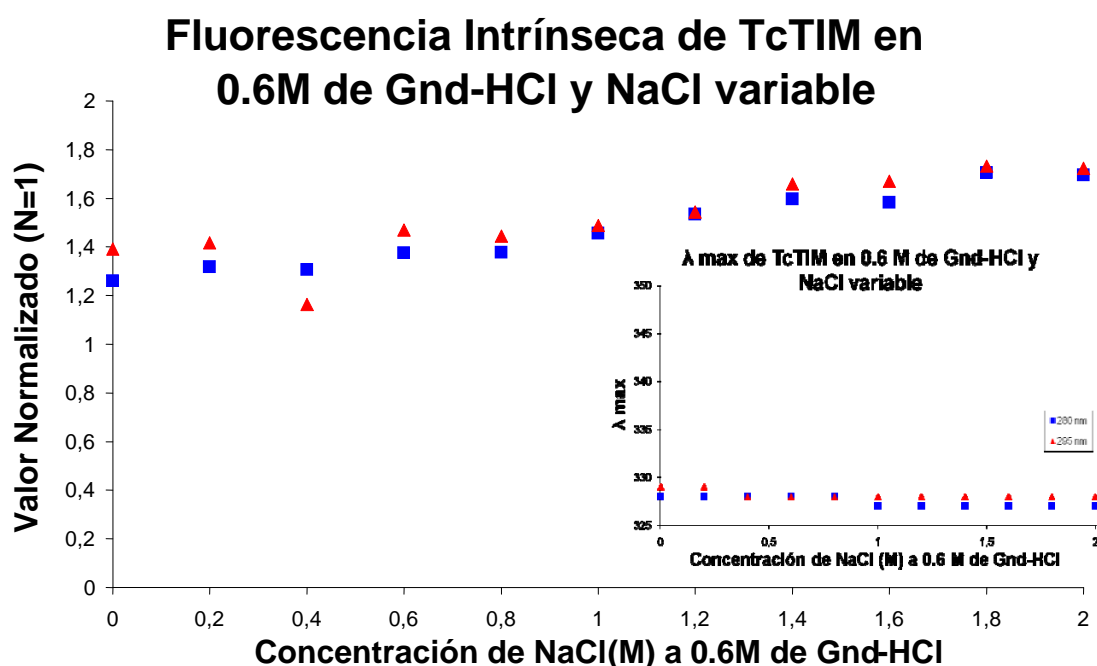


Figura 18. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g/mL}$) cuando es incubada 48 h en Gnd-HCl (0.6 M) y NaCl variable; IF excitando a 280 nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295 nm (Triángulo, rojo); Estado nativo (N=1). Recuadro 18. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de 0.6M de Gnd-HCl y NaCl variable.

En la figura 18 que corresponde a la fluorescencia intrínseca se puede ver un aumento en la fluorescencia aproximadamente un 30% mayor si se compara con la nativa y que va aumentando cuando las concentraciones de NaCl fueron mayores, mientras en el recuadro 18 no se observa ningún cambio en la longitud de onda de máxima emisión. En base a la figura y recuadro 18, se puede decir que aunque hay aumento de la fluorescencia intrínseca no significa que este habiendo un cambio en la estructura terciaria de la proteína ya que la longitud de onda de máxima emisión no cambia.

Unión de ANS a TcTIM en 0.6 M de Gnd-HCl y NaCl variable

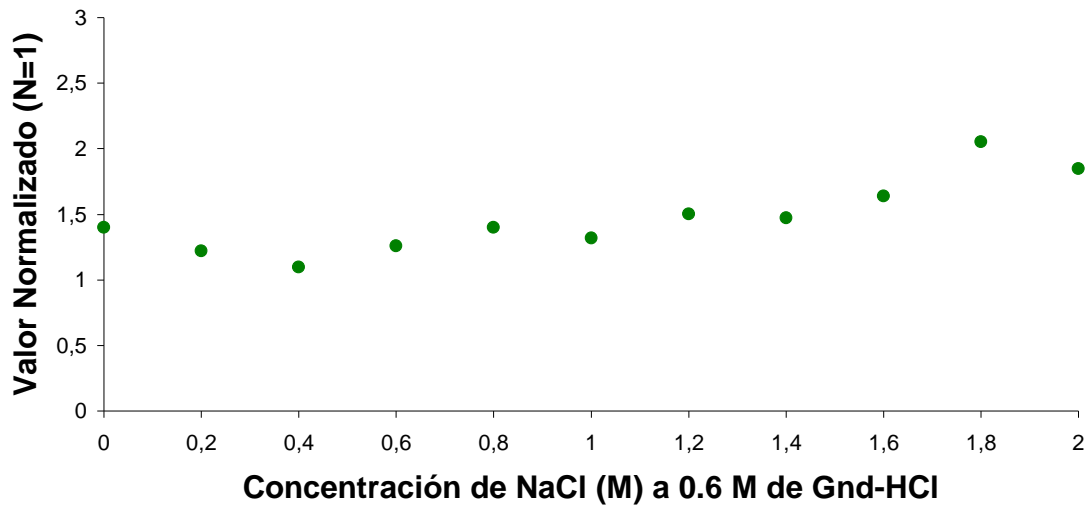


Figura 19. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 µg/mL) cuando es incubada 48 h en Gnd-HCl (0.6 M) y NaCl variable al agregar ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo (N=1).

Actividad Catalítica de TcTIM a 0.6 M de Gnd-HCl y NaCl variable

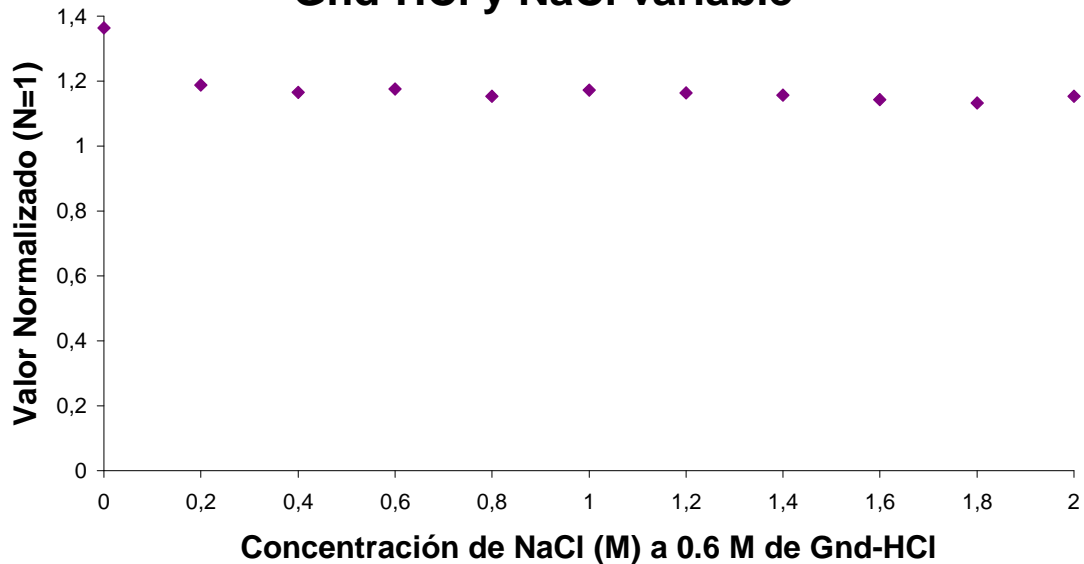


Figura 20. Actividad catalítica de TcTIM (50 µg/mL) al ser incubada 48 h en Gnd-HCl (0.6 M) y NaCl variable; Estado nativo (N=1).

El ligero aumento de la fluorescencia en la unión al ANS (Figura 19), al incrementar la concentración de NaCl en 0.6 M de GndHCl, estaría indicando en primera instancia una mayor exposición de área hidrofóbica, dicha área podría ser la interfase entre los

monómeros, lo cual indicaría un posible movimiento de los mismos diferente al que se observa en el dímero nativo.

La hiperactividad se mantiene constante a lo largo de las concentraciones estudiadas en la figura 20, aún cuando se le agregó NaCl, la hiperactividad es sólo 20% mayor respecto a la nativa.

6.3 Experimento 3: NaCl

El experimento 3 consistió en la incubación de la TcTIM en NaCl, en donde no se encontró ninguna variación en la intensidad de fluorescencia intrínseca (Figura 21) ya que permanece casi constante excitando tanto a 280 nm como a 295 nm, lo que indica que la estructura terciaria no cambia como se puede confirmar en la figura 21-A, en la cual también se observa que no cambio la longitud de onda de máxima emisión.

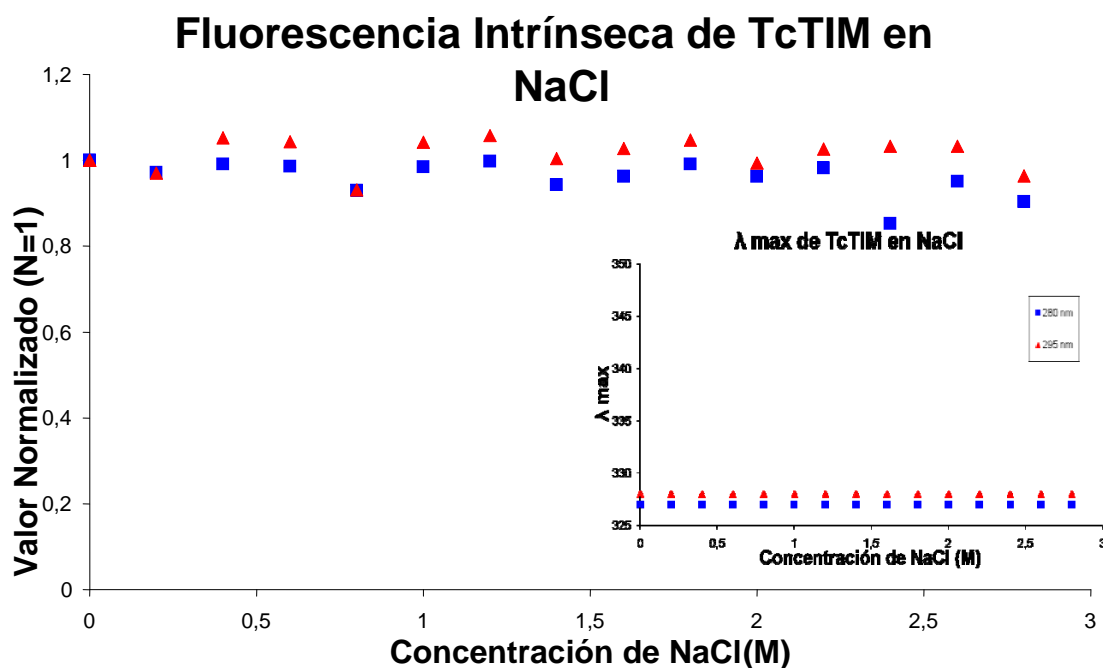


Figura 21. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 µg/mL) cuando es incubada 48 h en NaCl; IF excitando a 280 nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295 nm (Triángulo, rojo); Estado nativo (N=1). Recuadro 21. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de NaCl.

En la figura 22 se observa un ligero aumento en la unión a ANS, el cual podría deberse a una interacción hidrofóbica entre el medio, la proteína y el ANS.

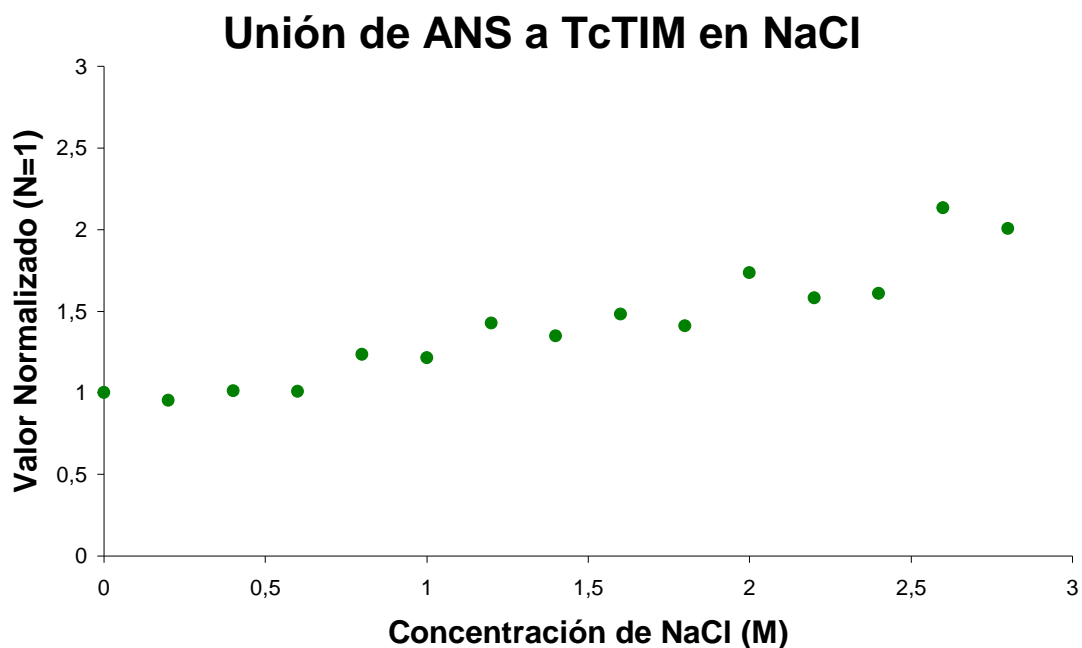


Figura 22. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 µg/mL) cuando es incubada 48 h en NaCl al agregar ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo (N=1).

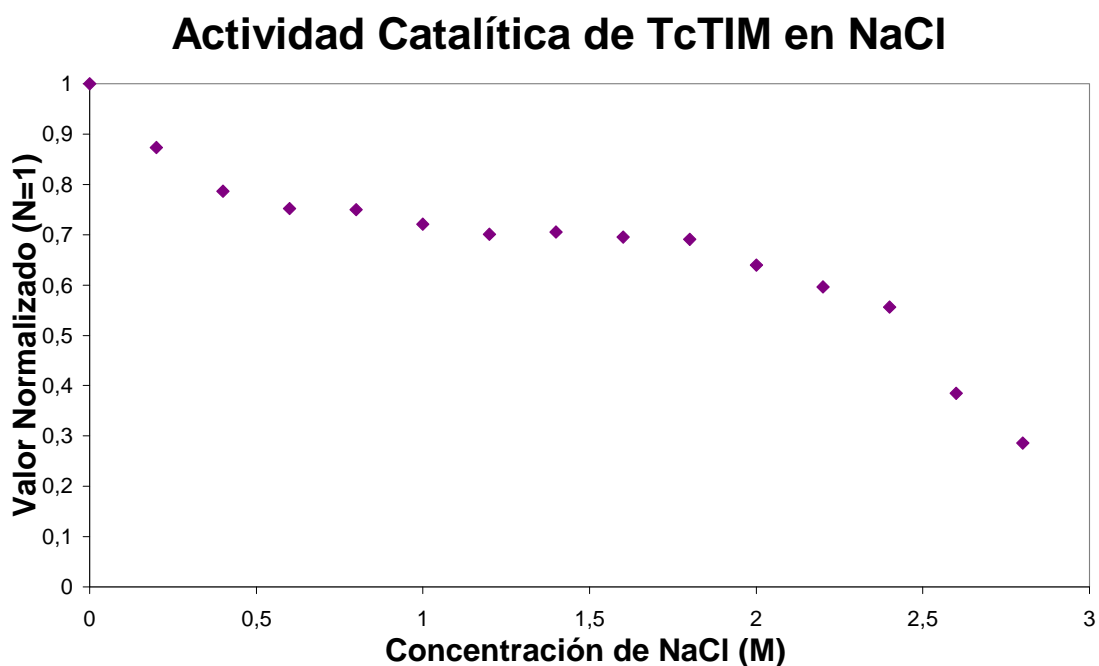


Figura 23. Actividad catalítica de TcTIM (50 µg/mL) al ser incubada 48 h en NaCl; Estado nativo (N=1).

La figura 23 refiere la actividad catalítica en NaCl y se puede observar la disminución de la actividad biológica, resultado sorprendente, ya que se esperaba un aumento en la actividad catalítica y el resultado mostró lo contrario, esta disminución se podría justificar de dos maneras posibles; la primera es que como los sitios catalíticos de

TcTIM están compuestos por aminoácidos cargados, la lisina e histidina y éstos tienen cargas positivas y el ácido glutámico tiene carga negativa, es posible que el NaCl al disociarse en el medio genera contraiones que pueden unirse a los aminoácidos del sitio activo que por su naturaleza se encuentran cargados y de esta forma los iones pueden ocultar el sitio activo a su sustrato el gliceraldehído-3-fosfato.

La segunda opción es que los iones del NaCl al encontrarse en el medio de reacción también pueden unirse al sustrato en este caso al gliceraldehído-3-fosfato, teniendo en consideración que es una molécula cargada, aunque sea parcialmente, que puede atraer a los iones sodio y cloro, de manera que interfieran en la unión enzima-sustrato.

6.4 Experimento 4: Recuperación de la Actividad Catalítica en NaCl

La figura 24 muestra la recuperación de la TcTIM después de haber sido incubada en NaCl, ya que al diluir el NaCl, la actividad catalítica de la enzima se recupera. En esta gráfica se muestran dos curvas, una correspondiente a la “renaturalización” directa (Realizada sólo diluyendo el NaCl a una mínima cantidad de NaCl) y otra cuando se fija a una concentración constante de NaCl residual, en este caso 0.1 M de NaCl.

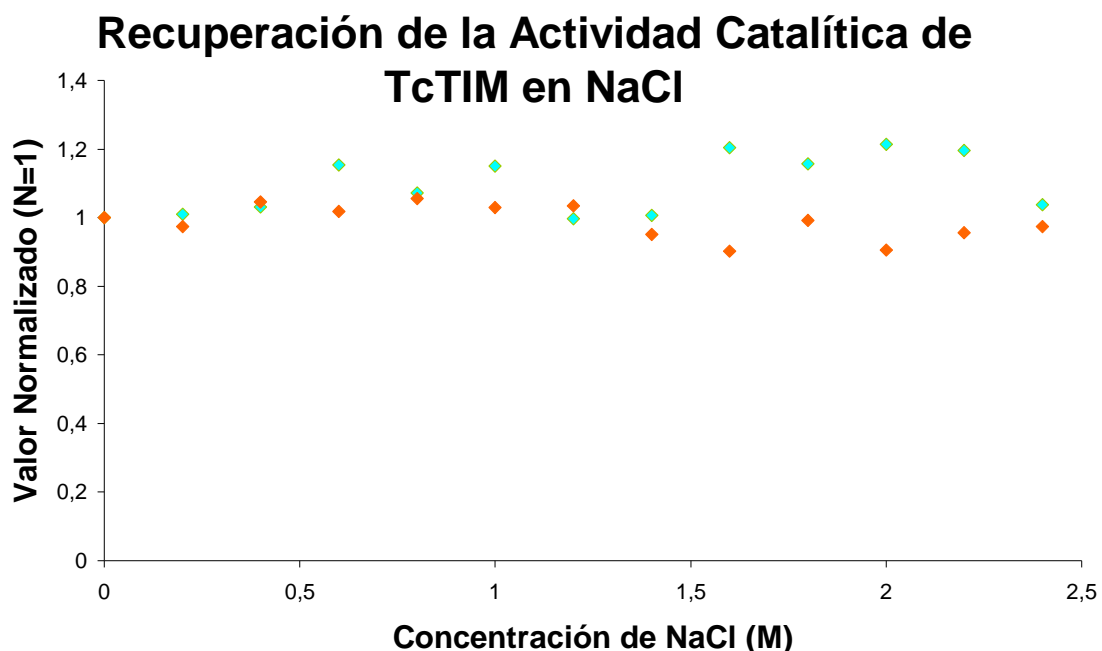


Figura 24. Recuperación de la actividad catalítica de TcTIM (150µg/mL) al ser incubada 48 h en NaCl; Directa (Rombos, Cian) y 0.1 M residual (Rombos, Naranja); Estado nativo (N=1).

A partir de los cuatro experimentos anteriores podemos descartar a la fuerza iónica como responsable única de la hiperactividad de la TcTIM, ya que como pudimos observar en las figuras 20 y 23, no hubo mayor actividad catalítica al agregarle NaCl, al contrario en la figura 23 hubo una disminución de casi el 70% en la actividad, pero que puede ser recuperada si se diluye al NaCl (Figura 24). Además se mantuvo constante el nivel de estructura terciaria ya que no hubo cambios importantes cuando se varió solo la fuerza iónica (Figura y Recuadro 21), mientras que presenta un ligero aumento en la fluorescencia intrínseca cuando además de NaCl esta también presente Gnd-HCl a bajas concentraciones (Figura 18), sin embargo no hay cambio en la longitud de onda de máxima emisión (Recuadro 18).

En base a los resultados de fluorescencia intrínseca parece que el NaCl no afecta a este tipo de propiedad.

Las figuras 19 y 22 muestran un pequeño aumento en la fluorescencia del ANS al aumentar el NaCl, lo cual como ya se ha dicho, indicaría mayor exposición de área hidrofóbica, pero resulta poco congruente con las figuras 18 y 21 de fluorescencia intrínseca, respectivamente; las cuales permanecen prácticamente constantes al igual que los Recuadros 18 y 21 de longitud de máxima emisión.

Por otro lado siempre se ha señalado que para que exista un cambio en la estructura terciaria en referencia a la exposición de áreas hidrofobicas debe haber un aumento de unión de ANS (Mayor fluorescencia) con una menor intensidad de fluorescencia en los fluoróforos intrínsecos como se muestra en el experimento control; la mayor unión de ANS (Figura 16) coincide con una disminución en la fluorescencia intrínseca (Figura 15) y esto sugiere la aparición del estado monomérico.

Se ha reportado que un aumento en las interacciones hidrofóbicas puede ser producido por sales como NaCl y Gnd-HCl debido a la reducción de la difusividad del agua y el aumento de estructura de la misma (Fujita *et al.*, 2007); esto podría explicar el poco aumento y constante valor en la intensidad de fluorescencia intrínseca y extrínseca que se presenta en las figuras 18, 19, 21 y 22.

Adicionalmente se puede confirmar mediante los recuadros 18 y 21, en las cuales se ilustra el comportamiento de la longitud de máxima emisión de TcTIM, que en las condiciones donde esta presente el NaCl con o sin 0.6 M de Gnd-HCl, no existe un proceso de desnaturalización como el que ocurre en la desnaturalización directa con Gnd-HCl (Recuadro 15), en donde sí se aprecia un cambio en la longitud de máxima emisión de TcTIM.

EVALUACIÓN DEL DESNATURALIZANTE NEUTRO Y FUERZA IÓNICA.

Las condiciones 5, 6 y 7 se realizaron utilizando otro desnaturalizante: la urea, molécula que no posee carga, a diferentes concentraciones (0.5M, 1M y 2M), las cuales fueron elegidas en base a los resultados reportados en la tesis de Anaya, Ana (2008). En las condiciones experimentales 5, 6 y 7, además de urea se agregaron cantidades crecientes de NaCl con la finalidad de variar la fuerza iónica y evaluar su influencia, así como la naturaleza química de la urea con respecto al Gnd-HCl, en relación con la hiperactividad presentada por la TcTIM. Las figuras 25, 26 y 27 fueron extraídas del trabajo de tesis de Anaya, Ana (2008).

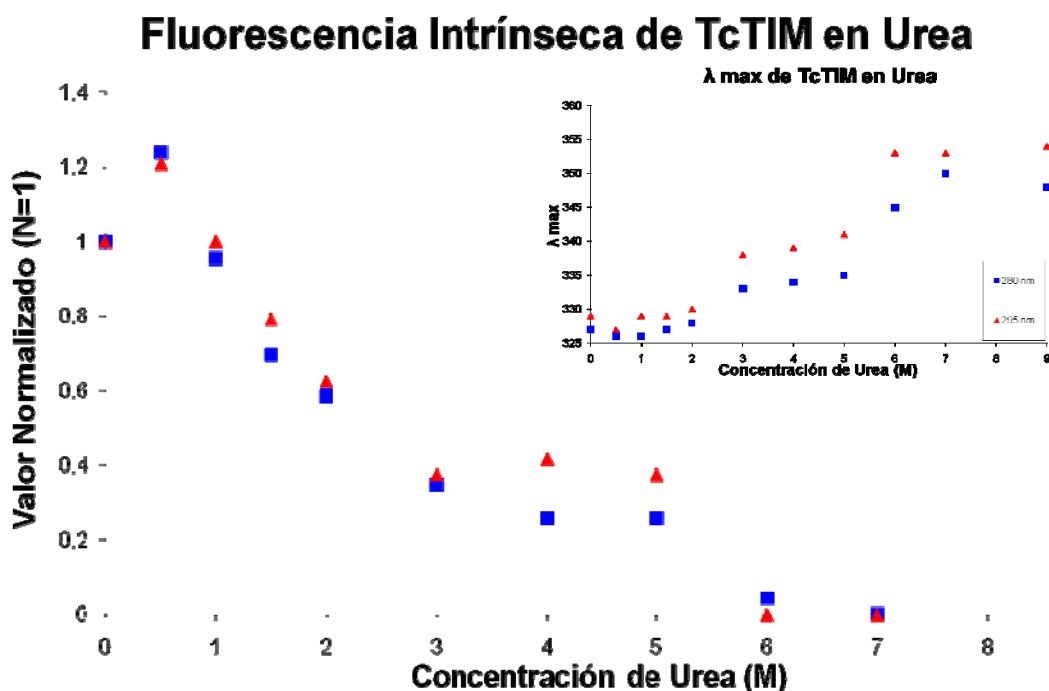


Figura 25. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 200 h en urea; IF excitando a 280 nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295nm (Triangulo, rojo); Estado nativo (N=1). Recuadro 25. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de urea.

En la figura 25 se puede observar el estado nativo, cuando la proteína se encuentra sin desnaturalizante (N=1). En esta misma figura al igual que como ocurre con Gnd-HCl, aparece el estado N_2^* , donde la fluorescencia intrínseca excitando a 280 nm ó 295 nm muestra una elevación en la concentración de 0.5 M de urea; así como también en la figura 27 se puede apreciar la hiperactividad mostrada por la enzima como ocurre en la desnaturalización con Gnd-HCl.

El estado N_2 y N_2^* son estados diméricos que presentan prácticamente la misma longitud de onda de máxima emisión como se puede observar en el recuadro 25.

El estado monomérico (M) puede observarse en la figura y recuadro 25, los cuales muestran cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca y en la longitud de onda de máxima emisión, respectivamente, en concentraciones de 3 a 5 M de urea. La figura 26 corresponde a la unión de ANS con TcTIM en condiciones desnaturalizantes con urea, y en dicha figura la TcTIM presenta mayor unión a este compuesto a la concentración de 5M. El estado monomérico también se manifiesta en la figura 27 en donde la actividad catalítica desaparece totalmente a la concentración de 3 M de urea, recordando que la TcTIM solo tiene actividad catalítica en estado dimérico.

Finalmente el estado desplegado (U), aparece desde 6 M de urea en adelante, esto se puede observar principalmente en las figuras 25, donde se encuentra las mínimas intensidades de fluorescencias intrínsecas tanto cuando son monitoreados todos los fluoróforos (280 nm) como cuando sólo se monitorean los triptófanos (295 nm) e igualmente en el recuadro 25 cuando se monitorea a la TcTIM por medio de la longitud de onda de máxima emisión se observa la transición al estado desplegado a la concentración de 6 M de Gnd-HCl cuando a partir de este punto la longitud de onda de máxima emisión se vuelve constante. En concordancia se encuentra la figura 27 en donde TcTIM no presenta ningún tipo de actividad catalítica a dichas concentraciones.

Unión de ANS a TCTIM en Urea

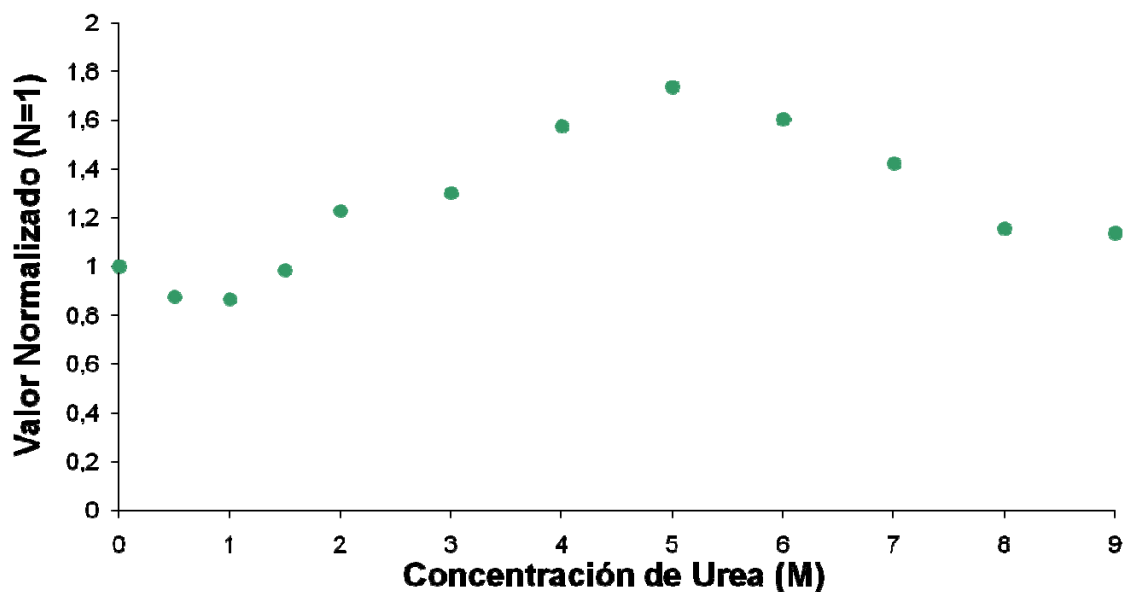


Figura 26. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 200 h en Urea y en presencia de ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo (N=1).

Actividad Catalítica de TcTIM en Urea

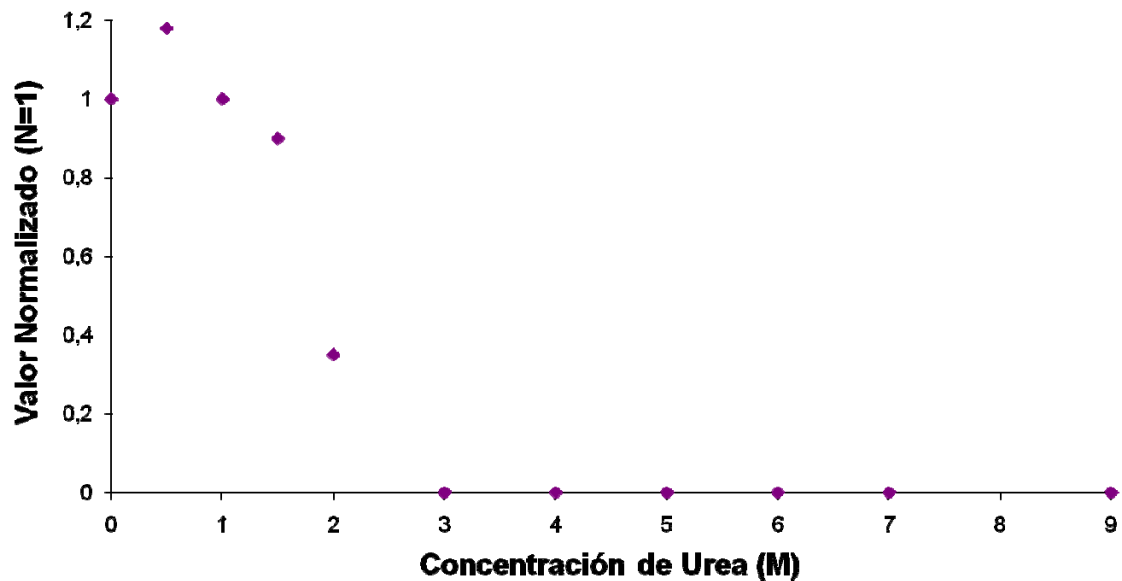


Figura 27. Actividad catalítica de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al ser incubada 200 h en urea; Estado nativo (N=1).

6.5 Experimento 5: Urea constante (0.5M) y NaCl variable.

La figura 28 muestra que la fluorescencia intrínseca de TcTIM tiene un aumento el cual se mantiene casi constante a partir de concentraciones mayores a 0.4 M de NaCl (0.5 M de urea constante) dicho aumento es respecto a la proteína nativa y podría indicar que los fluoróforos podrían estar menos expuestos al medio y la proteína se encuentra más empaquetada, sin embargo, la longitud de onda de máxima emisión permanece constante (Recuadro 28). Bajo esta condición también se observa una mayor actividad catalítica (30%) con respecto a la proteína nativa, como se aprecia en la Figura 30. En la figura 29 se muestra una mayor fluorescencia de ANS en todos los puntos en referencia al estado nativo (N=1), pero el aumento no muestra ningún comportamiento y probablemente se deba a la interacción del ANS con la interfase de las subunidades, como ya se ha comentado anteriormente.

Fluorescencia Intrínseca de TcTIM en 0.5M de Urea y NaCl variable

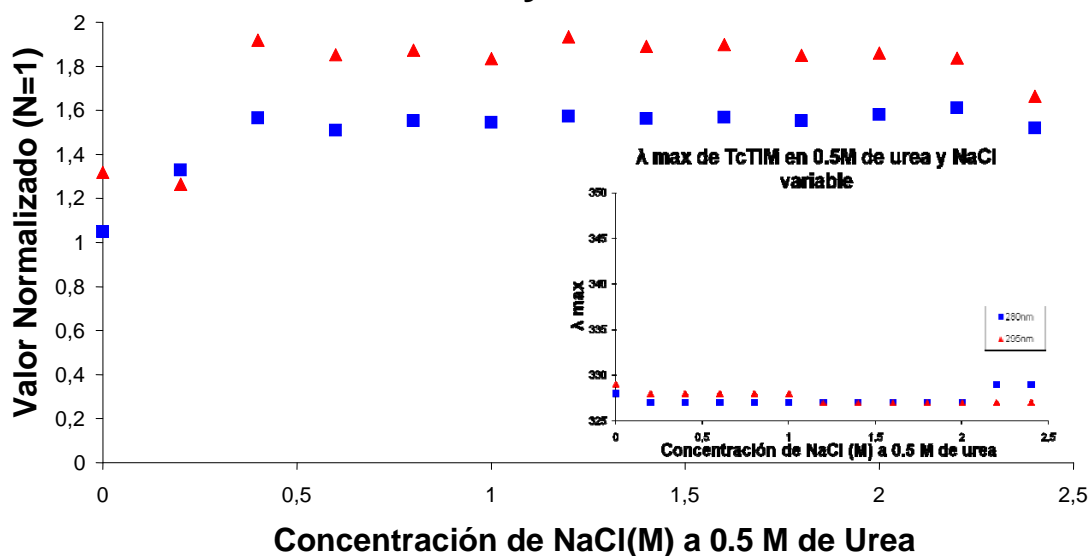


Figura 28. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 200 h en urea (0.5 M) y NaCl variable; IF excitando a 280 nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295nm (Triángulo, rojo); Estado nativo (N=1). Recuadro 28. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de 0.5 M de urea y NaCl variable.

Unión de ANS a TcTIM en 0.5M de Urea y NaCl variable

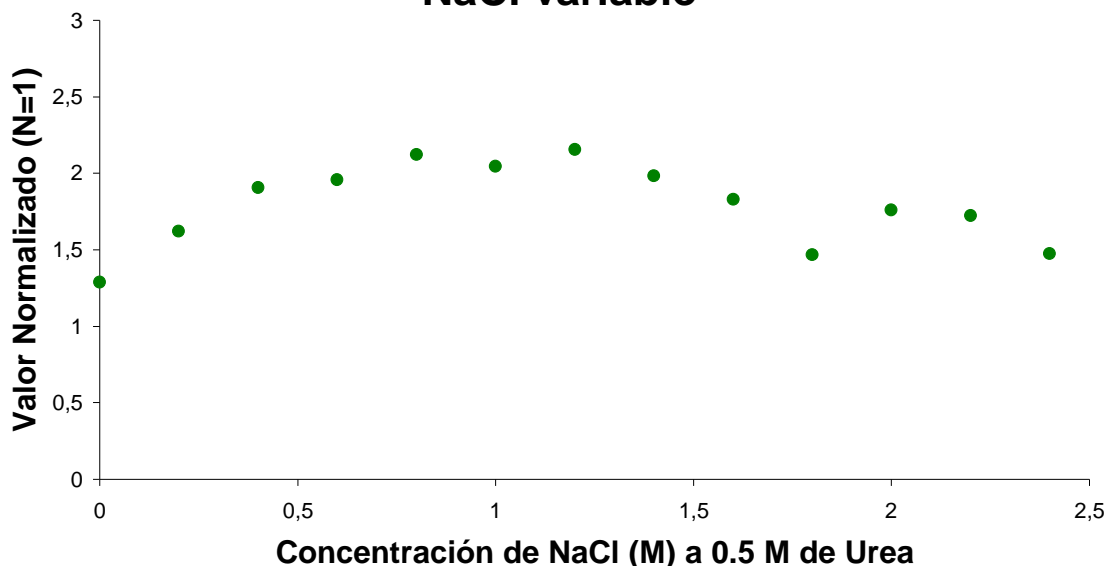


Figura 29. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 200 h en Urea (0.5 M) y NaCl variable y en presencia de ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo (N=1).

Actividad Catalítica de TcTIM en 0.5 M de Urea y NaCl variable

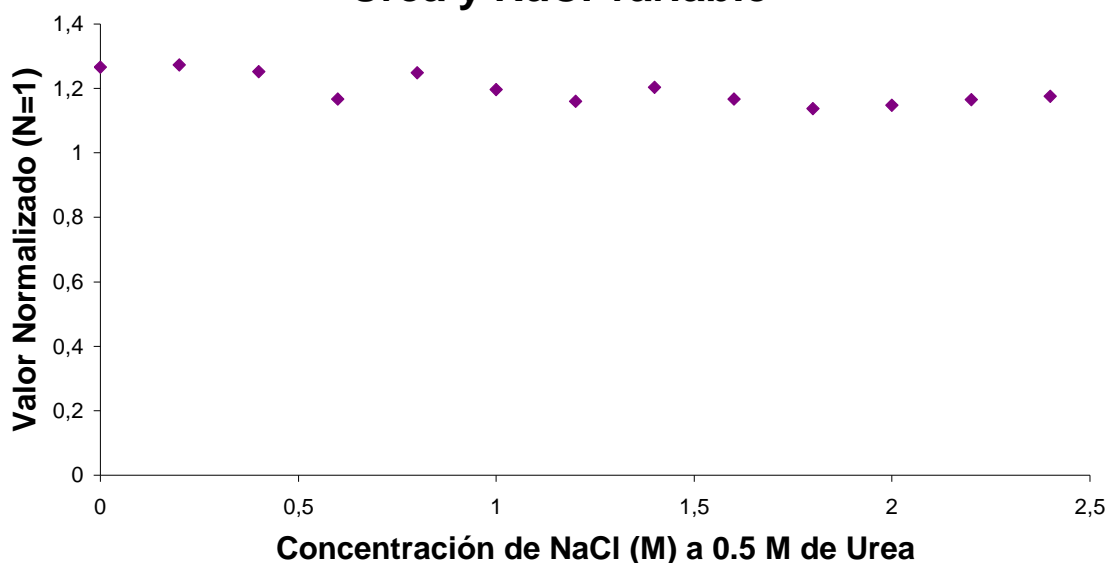


Figura 30. Actividad catalítica de TcTIM (50 $\mu\text{g/mL}$) al ser incubada 200 h en urea (0.5M) y NaCl variable; Estado nativo (N=1).

6.6 Experimento 6: Urea constante (1 M) y NaCl variable.

En la figura 31 se observa que hay un aumento de la intensidad de fluorescencia intrínseca igual que en el experimento anterior, aunque en esta figura se muestra que a concentraciones altas de NaCl la fluorescencia disminuye y cae a valores muy parecidos al de la proteína nativa. La longitud de onda de máxima emisión se mueve ligeramente a valores mayores con respecto al estado nativo (Recuadro 31). En esta condición se podría decir que se está afectando ligeramente la estructura terciaria.

La actividad catalítica (Figura 33) muestra el mismo comportamiento del experimento anterior (Figura 30), es decir, aumenta alrededor de 20 %.

En la figura 32 aumenta la unión a ANS de manera proporcional con el aumento de NaCl y tal efecto se deba a la interacción de NaCl, el ANS y el medio interfásico del dímero. Otra posibilidad es que ya se encuentre aumentada la población monomérica de TcTIM debido a la concentración de urea (1 M, constante).

Fluorescencia Intrínseca de TcTIM en 1 M de Urea y NaCl variable

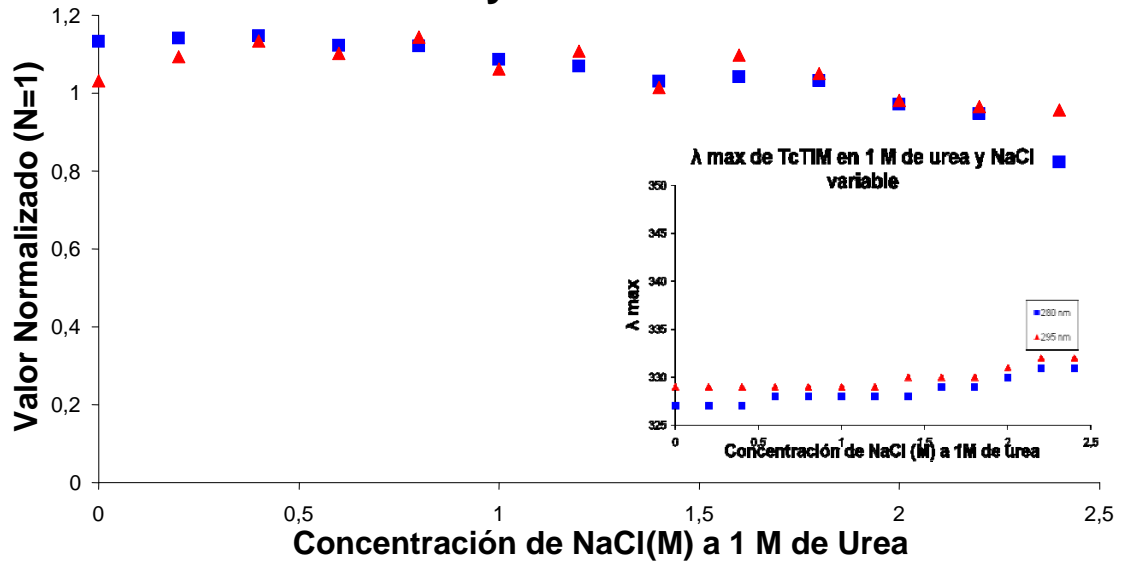


Figura 31. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 200 h en urea (1 M) y NaCl variable; IF excitando a 280nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295nm (Triangulo, rojo); Estado nativo (N=1). Recuadro 31. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de 1 M de urea y NaCl variable.

Unión de ANS a TcTIM en 1 M de Urea y NaCl variable

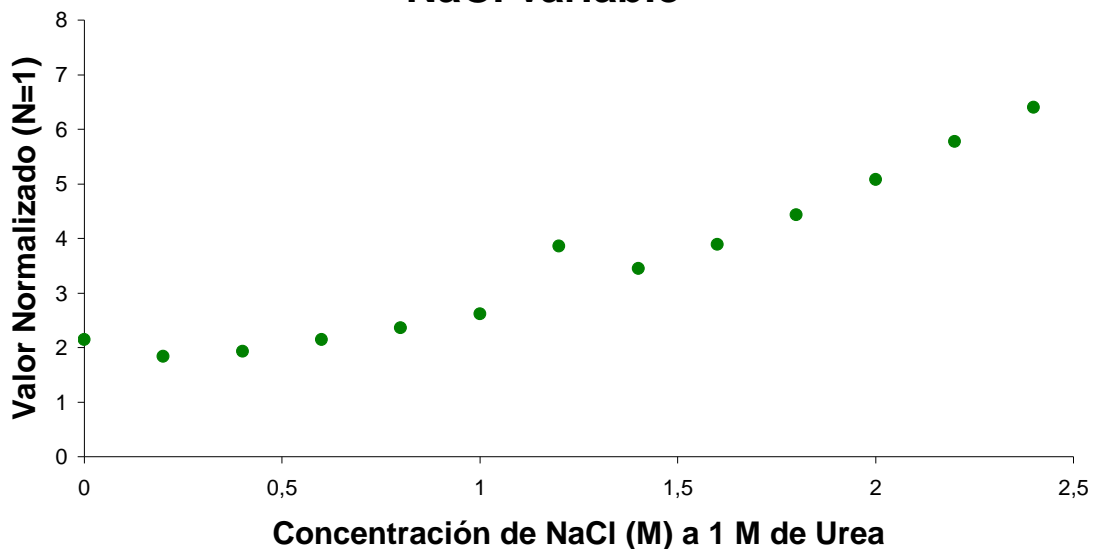


Figura 32. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cuando es incubada 200 h en urea (1 M) y NaCl variable en presencia de ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo (N=1).

Actividad Catalítica de TcTIM en 1 M de Urea y NaCl variable

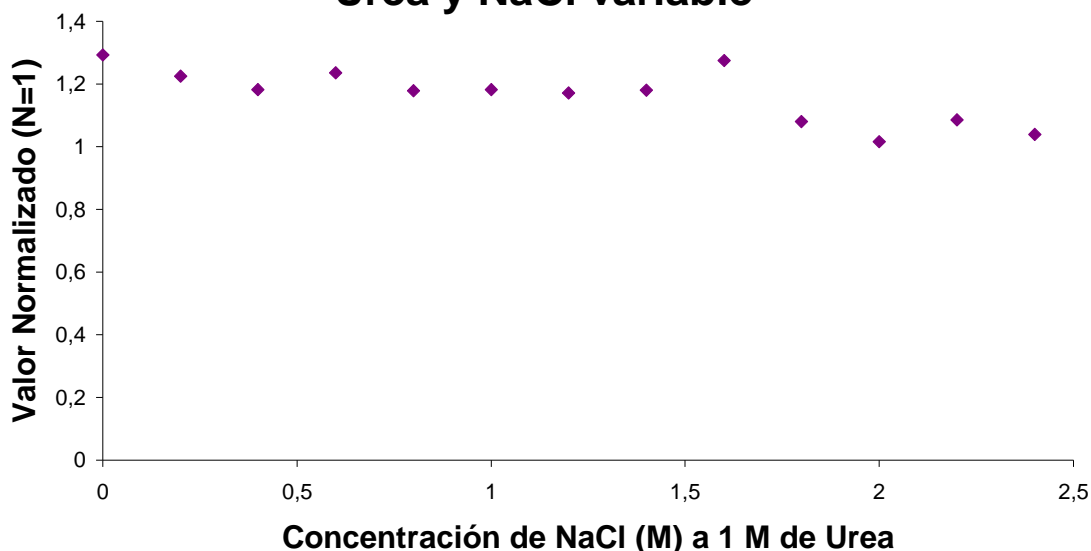


Figura 33. Actividad catalítica de TcTIM (50 $\mu\text{g/mL}$) al ser incubada 200 h en urea (1M) y NaCl variable; Estado nativo (N=1).

6.7 Experimento 7: Urea constante (2 M) y NaCl variable.

En el experimento 7 fue realizado una condición constante de urea 2 M y NaCl variable, pero en esta condición la concentración de urea ya es alta para asegurar que se trata del dímero no-nativo (N_2^*), puede ser el proceso de desplegamiento ya se encuentre muy avanzado, en este caso ya se podría estar hablando del estado monomérico, esto por que la fluorescencia intrínseca (Figura 34) ya es menor que en el estado nativo y que la longitud de onda de máxima emisión (Recuadro 34) es mayor que el estado nativo (N=1).

La actividad biológica de la enzima (Figura 36) se encuentra alrededor del 80 %, lo cual indica que el proceso de desnaturalización causado por la concentración de urea ya esta afectando el estado dimérico y por lo tanto la actividad catalítica.

La unión de ANS (Figura 35) es mucho mayor que en los experimentos 5 y 6 (Figuras 29 y 32), por lo que se podría pensar que la proteína esta exponiendo área hidrofóbica porque fluoresce con más intensidad y bajo esta condición es posible que se trate del estado monomérico.

Fluorescencia Intrínseca de TcTIM en 2 M de Urea y NaCl variable

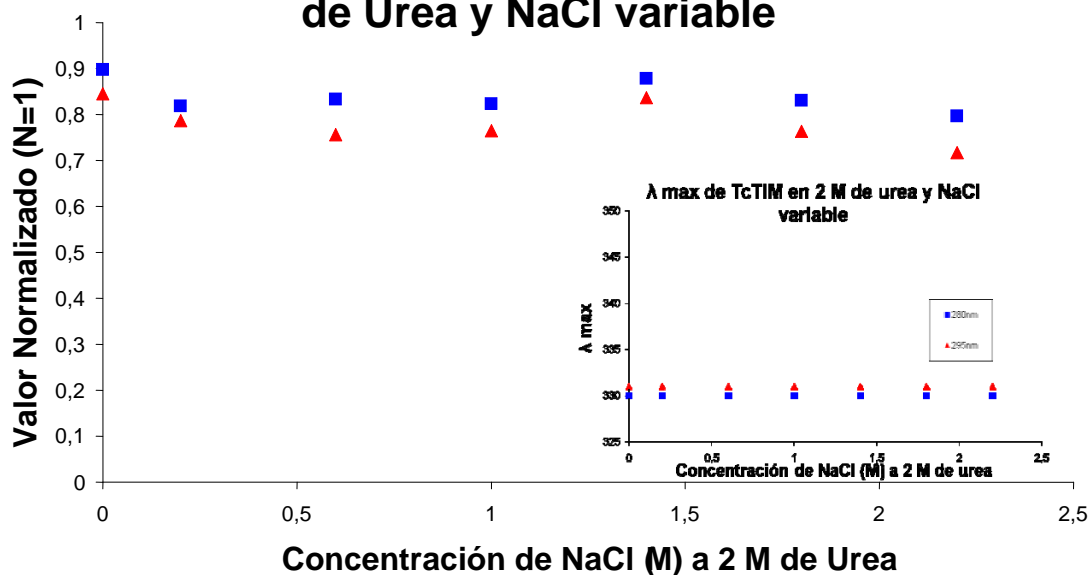


Figura 34. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 µg/mL) cuando es incubada 200 h en urea (2 M) y NaCl variable; IF excitando a 280nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295nm (Triangulo, rojo); Estado nativo (N=1). Recuadro 34. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de 2 M de urea y NaCl variable.

Unión de ANS a TcTIM en 2 M de Urea y NaCl variable

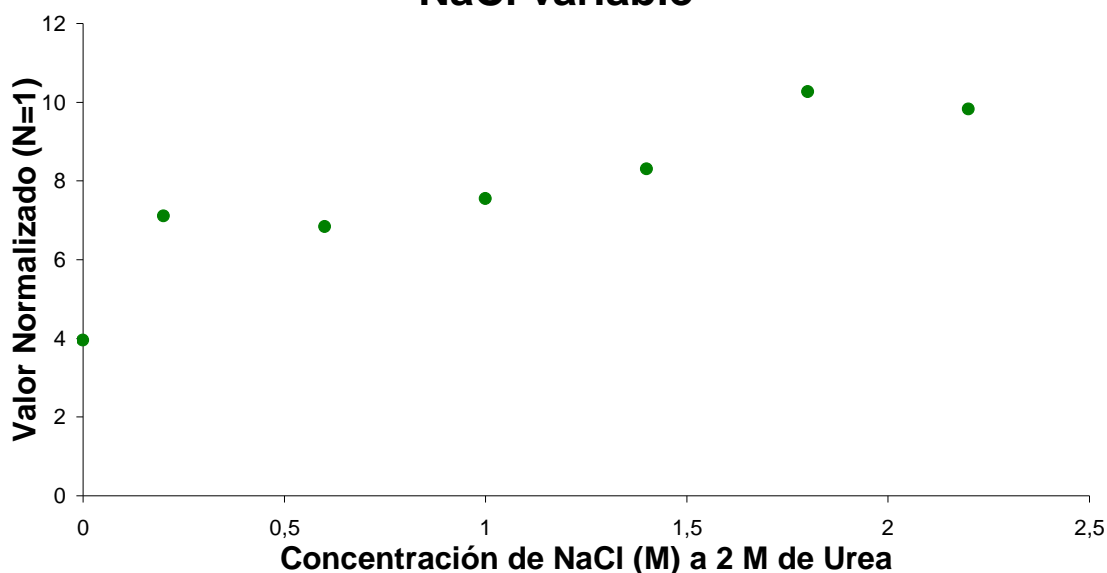


Figura 35. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 µg/mL) cuando es incubada 200 h en urea (2 M) y NaCl variable en presencia de ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo (N=1).

Actividad Catalítica de TcTIM en 2 M de Urea y NaCl variable

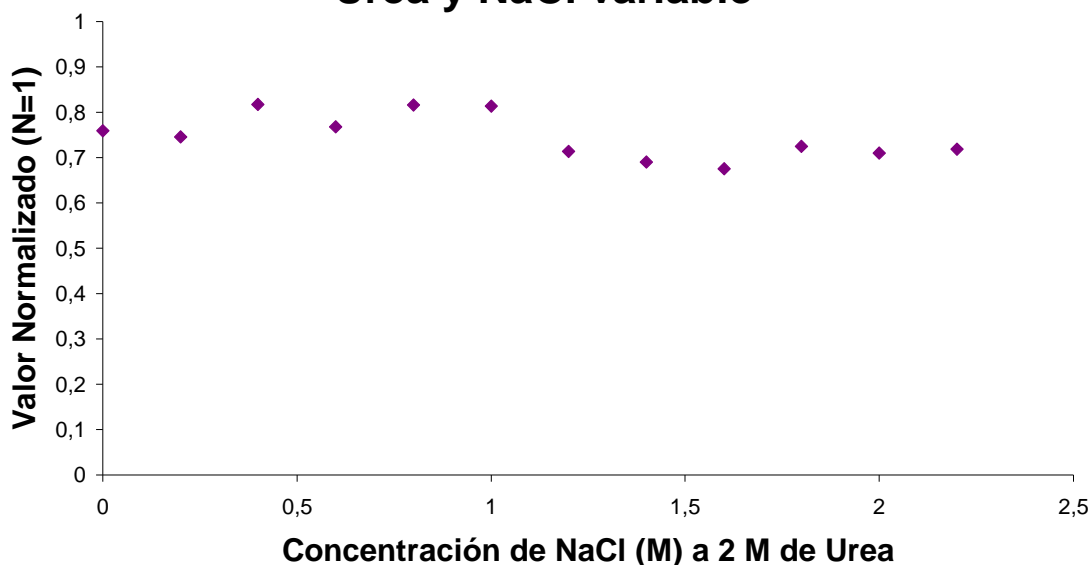


Figura 36. Actividad catalítica de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al ser incubada 200 h en urea (2M) y NaCl variable; Estado nativo (N=1).

A partir de los experimentos 5, 6 y 7 se puede decir que el dímero no nativo (N_2^*), posee un estado de hiperactividad y de mayor emisión de fluorescencia intrínseca respecto al dímero nativo (N_2) dichas características le confieren a este estado intermediario (N_2^*) de TcTIM propiedades únicas y como se ha observado, la hiperactividad de la enzima no se debe únicamente a la fuerza iónica ni tampoco a la naturaleza química del desnaturalizante, es decir, que el desnaturalizante se encuentre cargado como es el caso del Gnd-HCl (Experimentos 1 y 2) o que el desnaturalizante sea neutro como es el caso de la Urea (Experimentos 5, 6 y 7); ya que en ambos casos existe hiperactividad.

6.8 Experimento 8: NaCl constante (1.4 M) y Urea variable.

El último experimento consistió en mantener fija una concentración de 1.4 M de NaCl y agregar cantidades crecientes de urea (0 a 4.5 M), condiciones limitadas por la dilución del NaCl; con el fin de llevar a cabo una mayor desnaturalización de TcTIM con urea.

En la figura 37 se observa al inicio una mayor intensidad de fluorescencia pero que va disminuyendo conforme aumenta la concentración de urea, esto concuerda con los datos de la figura 38 donde hay una elevada unión de ANS a TcTIM, que corresponde al estado monomérico, según lo reportado por Anaya A, (2008).

Fluorescencia Intrínseca de TcTIM a 1.4 M de NaCl y Urea variable

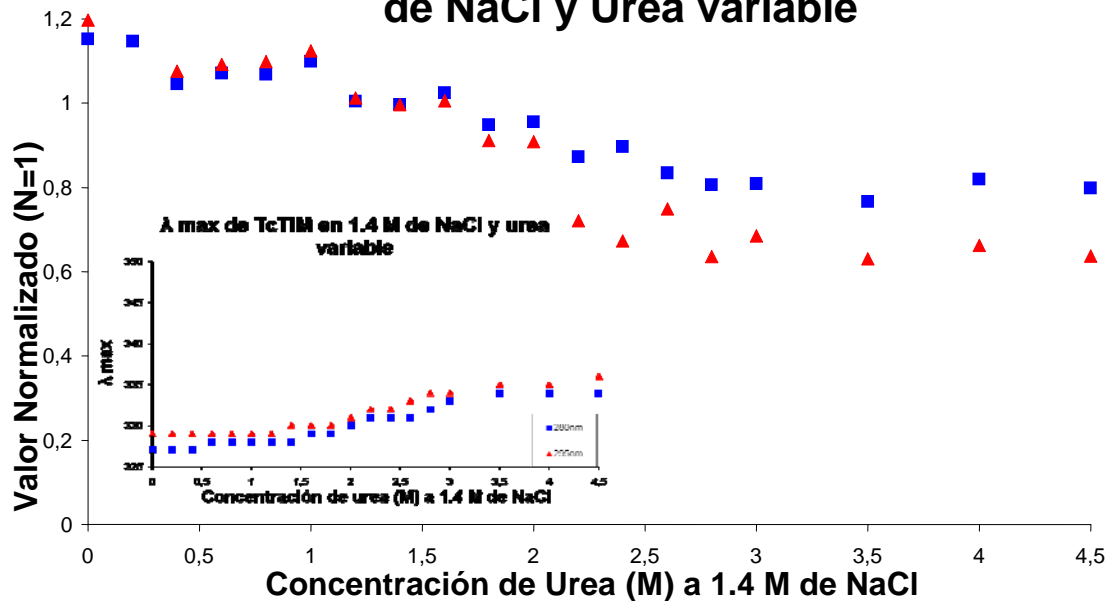


Figura 37. Fluorescencia intrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g/mL}$) cuando es incubada 200 h en 1.4 M de NaCl y urea variable; IF excitando a 280nm (Cuadro, azul); IF excitando a 295nm (Triángulo, rojo); Estado nativo(N=1). Recuadro 37. Longitud de onda de máxima emisión de TcTIM en función de la concentración de 1.4 M de NaCl y urea variable.

Unión de ANS a TcTIM en 1.4 M de NaCl y Urea variable

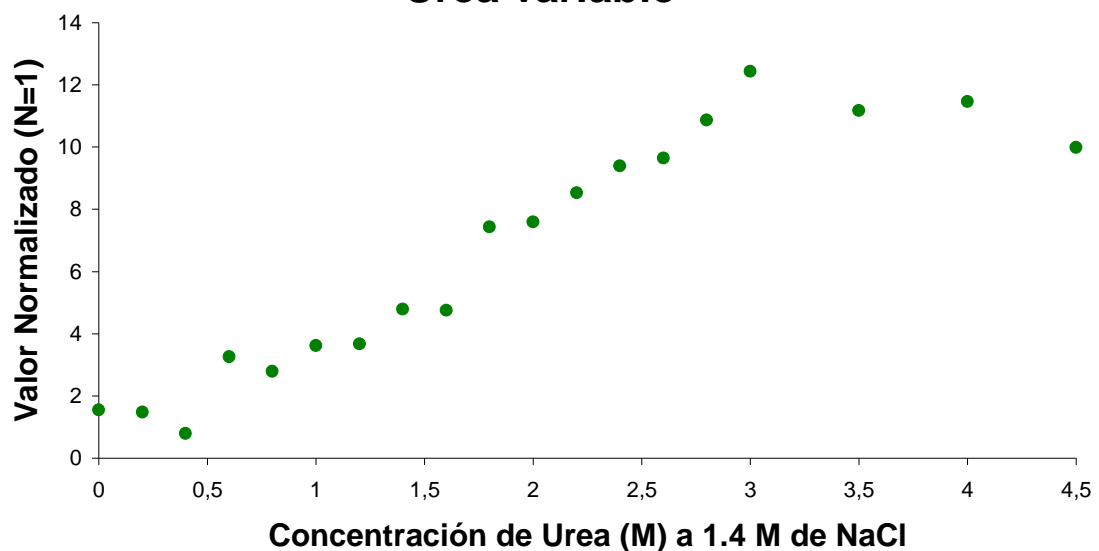


Figura 38. Fluorescencia extrínseca de TcTIM (50 $\mu\text{g/mL}$) cuando es incubada 200 h en NaCl (1.4 M) y urea variable en presencia de ANS; IF excitando a 360 nm; Estado nativo(N=1).

Finalmente en la figura 39 se observa una hiperactividad máxima de 40% a bajas concentraciones de urea (0.2-1.2 M) con 1.4 M de NaCl constante, dicha actividad se pierde a la concentración de 3.5 M donde toda la población se supone monomérica (Anaya A, 2008).

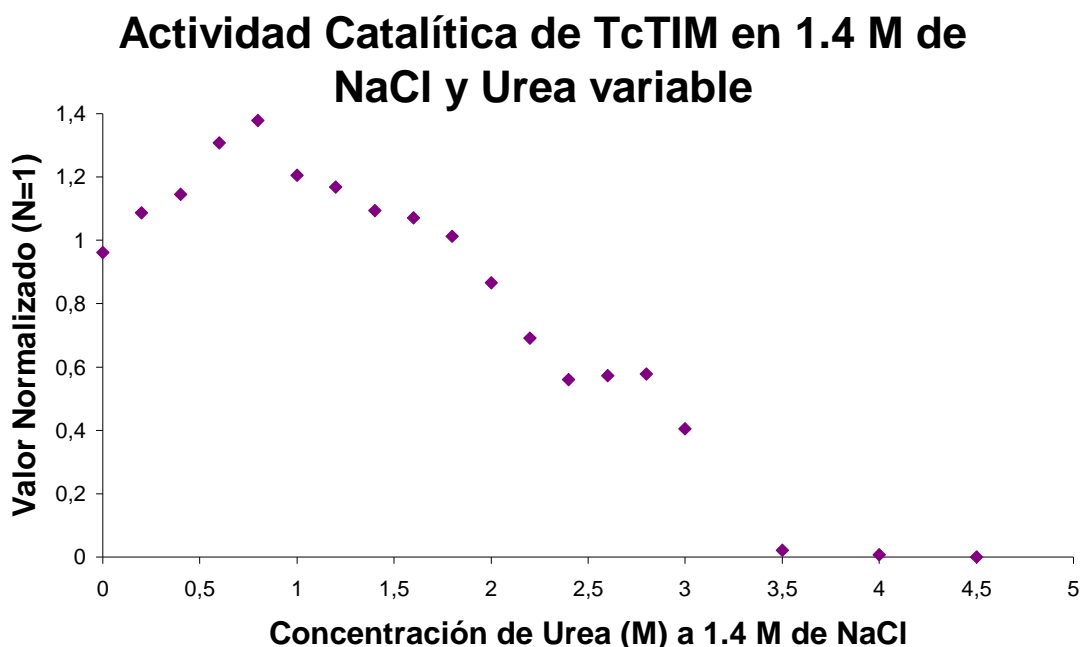


Figura 39. Actividad catalítica de TcTIM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al ser incubada 200 h en NaCl (1.4 M) y urea variable; Estado nativo (N=1).

DISCUSIÓN FINAL

Bajo las condiciones evaluadas se estudió la influencia de la fuerza iónica y/o la naturaleza del agente químico desnaturizante sobre la hiperactividad de TcTIM, no encontrándose ninguna relación directa. Ahora entonces la cuestión es cómo la TcTIM adquiere más actividad biológica en esas condiciones. Cabe mencionar que para que exista tal hiperactividad, en los casos donde existe, es necesario un periodo de incubación (Cierta tiempo y temperatura) para que la enzima alcance un estado de equilibrio, ya que de no existir este periodo de incubación, no es posible observar el incremento en la actividad biológica.

Hay que considerar que se ha descrito el patrón de plegamiento de otras TIM y solo en TcTIM y en la TIM de *Thermotoga maritima* se ha observado hiperactividad en presencia de concentraciones “bajas” de desnaturizante en este caso Gnd-HCl (Beaucamp N *et al*, 1997).

Retomando los hechos anteriores y que el estado del dímero no nativo (N_2^*) de TcTIM, tiene mayor actividad biológica y mayor intensidad de fluorescencia intrínseca, propiedades únicas de esta especie, respecto al estado nativo, es importante conocer las causas que elevan la fluorescencia intrínseca de una proteína.

El aumento de la intensidad de fluorescencia intrínseca indica dos posibilidades: mayor empaquetamiento de la proteína o fluorescencia adquirida debida a fluoróforos que pudiesen estar apagados por otros fluoróforos en ciertas condiciones que se encuentre la proteína (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002).

La primera posibilidad de mayor empaquetamiento de proteína no explica la hiperactividad debido a que no relaciona directamente con un rearrreglo en la estructura tridimensional de la TcTIM, es decir una contracción de la proteína. Hay que recordar que el sitio activo debe estar accesible al sustrato y cuando se agrega el agente químico desnaturizante, este cambia el medio de polar a no polar. Es decir si hay aumento de la fluorescencia indica en primera instancia que la proteína se está contrayendo y esto tal vez la lleve al ocultamiento o rigidez del sitio activo, con lo cual habría una disminución de la actividad catalítica; la idea resulta contradictoria, si se considera a la TcTIM como una enzima que cataliza su reacción al 100% de eficiencia.

La idea de un rearrreglo es posible aunque exista el empaquetamiento, si el rearrreglo favorece al sitio activo, esto podría explicar la hiperactividad, esto solo puede ser si tal arreglo es a nivel de la estructura cuaternaria. Además como se indica en las figuras de unión a ANS existe mayor exposición de área hidrofóbica por lo cual se estaría hablando de la interfase de los monómeros y recordando que el sitio activo se encuentra en cada monómero en la superficie y es activo mientras la proteína se encuentre en forma dimérica.

Como ya se mencionó anteriormente se reportó que un aumento en las interacciones hidrofóbicas puede ser producido por sales como el NaCl debido a la reducción de la difusividad del agua y el aumento de estructura de la misma (Fujita *et al.*, 2007); esto podría explicar el aumento y/o constante valor en la intensidad de fluorescencia intrínseca y extrínseca que se presenta en las figuras 28, 29, 31 y 32.

En las condiciones de las figuras 34, 35, 37 y 38; además del efecto anterior se debe tomar en cuenta que las concentraciones de urea utilizadas son mayores y que por sí misma la urea desnatura a la TcTIM por la modificación de las interacciones hidrofóbicas (Caballero-Herrera *et al.*, 2005; Möglich *et al.*, 2005; Camilloni *et al.*, 2008; Muthuselvi *et al.*, 2008), lo que da como resultado una intensidad de fluorescencia intrínseca menor y una intensidad de fluorescencia extrínseca mayor o sea una mayor fluorescencia de ANS, respecto a la TcTIM nativa.

La desnaturación de TcTIM es mayor cuando la concentración de urea es mayor, esto se puede confirmar mediante los recuadros 25, 28, 31, 34 y 37; en los cuales se ilustra el comportamiento de la longitud de onda de máxima emisión de TcTIM, en dichas figuras se puede observar que la longitud de onda se va desplazando a valores mayores conforme aumenta la concentración de urea, lo que indica una mayor desnaturación.

Retomando la explicación del aumento en la fluorescencia intrínseca, es que la fluorescencia adquirida sea debida a fluoróforos que pudiesen estar apagados por otros fluoróforos en ciertas condiciones, también es posible y quizá sea la más probable, ya que en la condición de cero desnaturante y cero condición de incubación, existen fluoróforos que se encuentran apagados por algún o algunos otros fluoróforos que se encuentren cercanos entre sí, como ocurre por ejemplo en TbTIM (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002). En el caso de TbTIM se encontró que el triptófano (W) 159 se encontraba apagado por el W193, debido a su cercanía, en condiciones sin desnaturante. Y se observó que al eliminar el W193 mediante un estudio de mutagénesis dirigida, el W159 era el que emitía fluorescencia al sistema. En este mismo estudio se determinó que el W12 era el principal responsable de la fluorescencia en bajas concentraciones de desnaturante (Gnd-HCl), es decir cuando ocurre la transición de N_2 a N_2^* ; también en este trabajo se menciona que W90 está expuesto al solvente. Los datos anteriores son importantes ya que TbTIM tiene alta similitud con TcTIM. La TcTIM tiene un aminoácido menos que TbTIM y las posiciones de los triptófanos se encuentran en una posición menos que TbTIM.

En base a lo anterior se podría decir que la fluorescencia incrementada que presenta N_2^* con respecto al estado nativo de TcTIM es debida a la exposición de W11.

Adicionalmente se puede justificar que la hiperactividad mostrada por TcTIM sea debida a una mayor exposición del sitio catalítico, lo cual se puede comprobar por el hecho de que la lisina (K) 12 que forma parte del sitio activo esta junto al W11.

Cabe mencionar que la hiperactividad que presenta TcTIM también esta influenciada por el Gnd-HCl y la Urea, ya que éstos pueden ejercer sobre las prolinas un efecto en la conformación *cis/trans* de estos aminoácidos, como lo describe Aumüller *et al.*, 2008, quien dice que ciertas enzimas isomerasas son susceptibles a adoptar ciertas conformaciones *cis/trans* y que dependiendo en cual conformación se encuentren son más activas, debido a que el cambio *cis/trans* puede ocultar o exponer el sitio catalítico dependiendo si en el sitio activo se encuentra un aminoácido sensible al cambio de conformación *cis/trans* y que dicho cambio se ve influenciado por el medio. En el caso de TcTIM podría ser la Prolina (P) 167 sensible al cambio por encontrarse relativamente expuesta al medio y debido a que se encuentra junto al Ácido Glutámico (E) 166, el cual forma parte del sitio activo, podría modificar la conformación *cis/trans* haciendo a TcTIM más activa.

Otros autores basados en la teoría cinética de Kramer la cual dice que la desnaturalización depende de la viscosidad del solvente y la accesibilidad del agua para interactuar con el centro hidrofóbico de la proteína proponen que a bajas concentraciones de Gnd-HCl y urea, primero existe una expansión de la proteína debida a la perdida de interacciones entálpicas entre las cadenas, que viene seguido de un incremento en la movilidad de las cadenas polipeptídicas (Jacob *et al.*, 2002). Esta movilidad podría dar como consecuencia una sobre activación de la enzima.

VII. CONCLUSIONES

- El estado intermediario dimérico no nativo (N_2^*), posee características únicas: presenta hiperactividad catalítica y aumento en la fluorescencia intrínseca, con respecto a N_2 , pero solo es posible observar este efecto a bajas concentraciones desnaturizantes de Urea o Gnd-HCl (Tabla 6).

	Gdn Var	Gnd 0.6M NaCl Var	NaCl Var	Urea Var	Urea 0.5M NaCl Var	Urea 1.0M NaCl Var	Urea 2.0M NaCl Var	NaCl 1.4M Urea Var
Actividad Catalítica	↑30% (0.6M)	↑20%	↓65% (2.8M)	↑20% (0.5M)	↑20%	↑20%	↓30%	↑40% (0.8M)
IF 280	↑30% (0.4M)	↑40%	Constante	↑20% (0.5M)	↑60%	↑5%	↓20%	Variable
IF 295	↑30% (0.4M)	↑40%	Constante	↑20% (0.5M)	↑80%	↑5%	↓25%	Variable
λ de máxima emisión 280	Variable	Constante	Constante	Variable	Constante	Variable	Constante	Variable
λ de máxima emisión 295	Variable	Constante	Constante	Variable	Constante	Variable	Constante	Variable
ANS	↑150% (1.4M)	↑100% (1.8M)	↑100% (2.6M)	↑80% (5.0M)	↑110% (1.2M)	↑550% (2.4M)	↑900% (1.8M)	↑1100% (3.0M)

Tabla 6. Datos relevantes del análisis de las propiedades estructurales y funcionales de TcTIM enfocado en el intermediario dimérico no nativo (N_2^*). La información entre paréntesis indica la concentración a la cual ocurre el máximo ó mínimo efecto en la actividad catalítica, intensidad de fluorescencia o unión de ANS de TcTIM. Todos los resultados fueron comparados con respecto al estado nativo ($N=100$).

- La fuerza iónica no es responsable directa de la hiperactividad de la TcTIM observada en su desnaturización, ya que al aumentar la fuerza iónica en ausencia o presencia de bajas concentraciones de desnaturizante, no se produjo un aumento, al contrario disminuyó o se mantuvo constante la actividad.

- La naturaleza química del desnaturalizante tampoco es el responsable de la hiperactividad de la TcTIM ya que fueron evaluados dos desnaturalizantes uno neutro (Urea) y otro cargado (Clorhidrato de guanidina) y en ambas condiciones los resultados fueron muy similares.
- Es muy probable que exista un rearrreglo en la estructura cuaternaria de la proteína que favorece la mayor disposición del sitio activo al sustrato, lo cual se puede explicar por los aumentos en la unión a ANS y la fluorescencia intrínseca, cuando hay hiperactividad.
- En base a los resultados presentados en este trabajo con respecto a TcTIM, algunos datos reportados para TbTIM y recordando que poseen gran similitud estas enzimas, se podría decir que la fluorescencia incrementada que presenta N_2^* con respecto al estado nativo de TcTIM es debida a la exposición de W11. De esta manera también se puede justificar que la hiperactividad mostrada por TcTIM sea debida a una mayor exposición del sitio catalítico, lo cual se puede comprobar por el hecho de que la lisina (K) 12 que forma parte del sitio activo esta junto al W11.
- Adicionalmente la hiperactividad presentada por TcTIM es también influenciada por desnaturalizantes como la urea o el Gnd-HCl que ejercen un efecto en la conformación cis/trans de las prolinas, en enzimas isomerasas susceptibles y debido al cambio conformacional cis/trans se puede ocultar o exponer el sitio catalítico dependiendo de su posición. En el caso de TcTIM podría ser sensible al cambio la Prolina (P) 167, por encontrarse relativamente expuesta al medio y debido a su cercanía al Ácido Glutámico (E) 166, el cual forma parte del sitio activo, se podría modificar la conformación *cis/trans* haciendo a TcTIM más activa.
- Finalmente la teoría cinética de Kramer dice que la desnaturalización depende de la viscosidad del solvente y la accesibilidad del agua para interactuar con el centro hidrofóbico de la proteína y proponen que a bajas concentraciones de Gnd-HCl y urea, primero existe una expansión de la proteína debida a la perdida de interacciones entálpicas entre las cadenas, que viene seguido de un incremento en la movilidad de las cadenas polipeptídicas, lo cual podría dar como consecuencia una sobre activación de la enzima.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Encontrar el modelo que describe la transición en urea y urea más sal.
2. Determinar la fracción de N_2^* en estas condiciones.
3. Determinar los parámetros catalíticos de N_2^* .
4. Calcular las constantes de equilibrio para el proceso total.
5. Determinar la energética en cada caso (ΔG parciales).
6. Comparar la energética obtenida con los valores ya conocidos para otras TIMs y esta misma en Gnd-HCl $\Delta(\Delta G)$.

IX. BIBIOGRAFÍA

Anaya A. 2008. Efecto de la urea en el plegamiento y desplegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura FES-Zaragoza UNAM, México.

Anfinsen CB. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.

Aumüller T, Fischer G. 2008. Bioactivity of folding intermediates studied by the recovery of enzymatic activity during refolding. *Journal of Molecular Biology* 376:1478–1492.

Beaucamp N, Hofmann A, Kellerer B, Jaenicke R. 1997. Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science* 6, 2159-2165.

Branden CI, Tooze J. Introduction to protein structure. *Garland Publishing Inc.* 1991. New York.

Caballero-Herrera A, Nordstrand K, Berndt KD, Nilsson L. 2005. Effect of urea on peptide conformation in water: molecular dynamics and experimental characterization. *Biophysical Journal* 89:842–857.

Camilloni C, Guerini-Rocco A, Eberini I, Gianazza E, Broglia RA, Tiana G. 2008. Urea and guanidinium chloride denature protein L in different ways in molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* 94:4654–4661.

Chávez-Cárdenas ME, Cisneros DA, Del Pozo L, Baltazar B, Fernández-Velasco DA. 2002. Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de las proteínas. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, UNAM, D.F., México (ISSN-0188-137X). 73-97. <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>.

Chávez-Cárdenas ME, Fernández A, Vázquez E, Coria R, Saab G, Pérez R. 2002. Unfolding of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 39(2): 117-129. March 15.

Chávez-Cárdenas ME, Pérez-Hernández G, Sánchez-Rebollar BG, Costas M, Vázquez-Contreras E. 2005. Reversible equilibrium unfolding of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in Guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* 44: 10883-10892.

Dobson CM. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426 (6968):884-890.

Fernández-Velasco A, Najera H, Ramírez-Silva L, Vázquez-Contreras E. 2002. Enzyme behavior in non-conventional systems. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science by Marcel Dekker, Inc*". 2140-2151. ISBN: 0-8247-0859-8.

Fujita T, Watanabe H, Tanaka S. 2007. Effects of salt addition on strength and dynamics of hydrophobic interactions. *Chemical Physics Letters* 434:42-48.

Gasymov OK, Glasgow BJ. 2006. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1774: 403-411.

Gokhale RS, Ray SS, Balaram H, Balaram P. 1999. Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: Evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* 38:423-431.

Jacob M, Saudan C, Holtermann G, Martin A, Perl D, Merbach AE, Schmid FX. 2002. Water contributes actively to the rapid crossing of a protein unfolding barrier. *Journal of Molecular Biology* 318:837-845.

Konermann L. 2004. Protein unfolding and denaturants. *Nature encyclopedia of life sciences* 1-7.

Knowles, J. R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better, *Nature* 350: 121-124.

Lambeir AM, Backmann J, Ruiz-Sanz J, Filimonov V, Nielsen JE, Kursula I, Norledge BV, Wierenga RK. 2000. The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triosephosphate isomerase. *European Journal of Biochemistry* 267:2516-2524.

Levinthal C. 1968. Are these pathways for protein folding? *Chim Ohys* 65:44-45.

Leopold PE, Montal M, Onuchic JN. 1992. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc Natl Acad Sci USA*. Sep15; 89(18):8721-8725.

Mainfroid V, Mande SC, Hol WGJ, Martial JA, Goraj K. 1996. Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual R-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein, *Biochemistry* 35:4110-4117.

Mason PE, Brady JW, Neilson GW, Dempseyz CE. 2007. The interaction of guanidinium ions with a model peptide. *Biophysical Journal: Biophysical letters*: Received for publication 7 March 2007 and in final form 17 April 2007.

Mathews CK, Hole KE, Ahem KG. 2002. Bioquímica. 3 Ed. *Addison Wesley*. 414.

Matulis D, Baumann CG, Bloomfield VA, Lovrien R. 1-Anilino-8-Naphtalene Sulfonate as a protein conformational tightening agent. 1999. *John Wiley & Sons Inc. Biology* 49:451-458.

Möglich A, Krieger F, Kiefhaber T. 2005. Molecular basis for the effect of urea and guanidinium chloride on the dynamics of unfolded polypeptide chains. *Journal of Molecular Biology* 345:153-162.

Moreau VH, Rietveld AWM, Ferreira ST. 2003. Persistent conformational heterogeneity of triosephosphate isomerase: Separation and characterization of conformational isomers in solution. *Biochemistry* 42:14831-14837.

Morgan CJ, Wilkins DK, Smith LJ, Kawata Y, Dobson CM. 2000. A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology* 300:11-16.

Muthuselvi L, Miller R, Dhathathreyan A. 2008. How does urea really denature myoglobin?. *Chemical Physics Letters* 465:126–130.

Najera H, Costas M, Fernandez-Velasco DA. 2003. Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochemistry Journal* 370:785-792.

Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza I, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R. 1997. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *European Journal Biochemistry* 244: 700-705.

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science* 4: 2411-2423.

Pan H, Raza AS, Smith DL. 2004. Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology* 336:1251-1263.

Rozacky EE., Sawyer TH., Barton RA., Gracy RW. 1971. Studies on human triosephosphate isomerase. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 146: 312-320.

Rietveld AW, Ferreira ST. 1996. Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: Persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* 35:7743-7751.

Schnackerz KD, Gracy RW. 1991. Probing the catalytic site of triosephosphate isomerase by P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *European Journal of Biochemistry*. 199: 231 – 238.

Tellez-Valencia A, Olivares V, Hernandez-Santoyo A, Perez-Montfort R, Costas M, Rodriguez-Romero A, Lopez-Calahorra F, Tuena de Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. 2004. Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *Journal of Molecular Biology* 341: 1355-1365.

Vázquez-Contreras E, Zubillaga R, Mendoza-Hernández G, Costas M, Fernández-Velasco DA. 2000. Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: A monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* 7, 57-64.

Voet D, Voet J. 1995. Biochemistry. Ed. John Wiley & Sons. USA. Cap. 11.

Wedemeyer WJ, Scheraga HA. 2001. Protein folding: Overview of pathways. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.

Wierenga RK, Noble MEM, Postma JPM, Groendijk H, Kalk KH, Hol WGJ y Opperdoes. 1991. The crystal structure of the “open” and the “closed” conformation and the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins* 10: 33 – 49.

Wierenga RK y Noble MEM. 1992. Comparison of the refined crystals structures of liganded and unliganded chicken yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology*. 224:1115 – 1126.

Zaman V. 1999. Atlas a color de parasitologia clinica. 2 ed. *Editorial médica panamericana*. Buenos Aires, Argentina 59-92.

APÉNDICE 1

RESULTADOS DE LA PURIFICACIÓN DE TcTIM

Purificación

Una vez lograda la sobre-expresión de la proteína en la cepa recombinante *E. coli* BL21(DE3), se lisó a las bacterias por sonicación. Posteriormente se realizó una precipitación con sales de amonio para de esta forma eliminar una buena cantidad de proteínas que no interesan a este estudio. La fracción obtenida se pasó por una columna de exclusión molecular, en donde por peso molecular, se realizó una selección de la proteína de interés. Las fracciones colectadas para este fin, son las que aparecen dentro del cuadro rojo de la Figura 40.

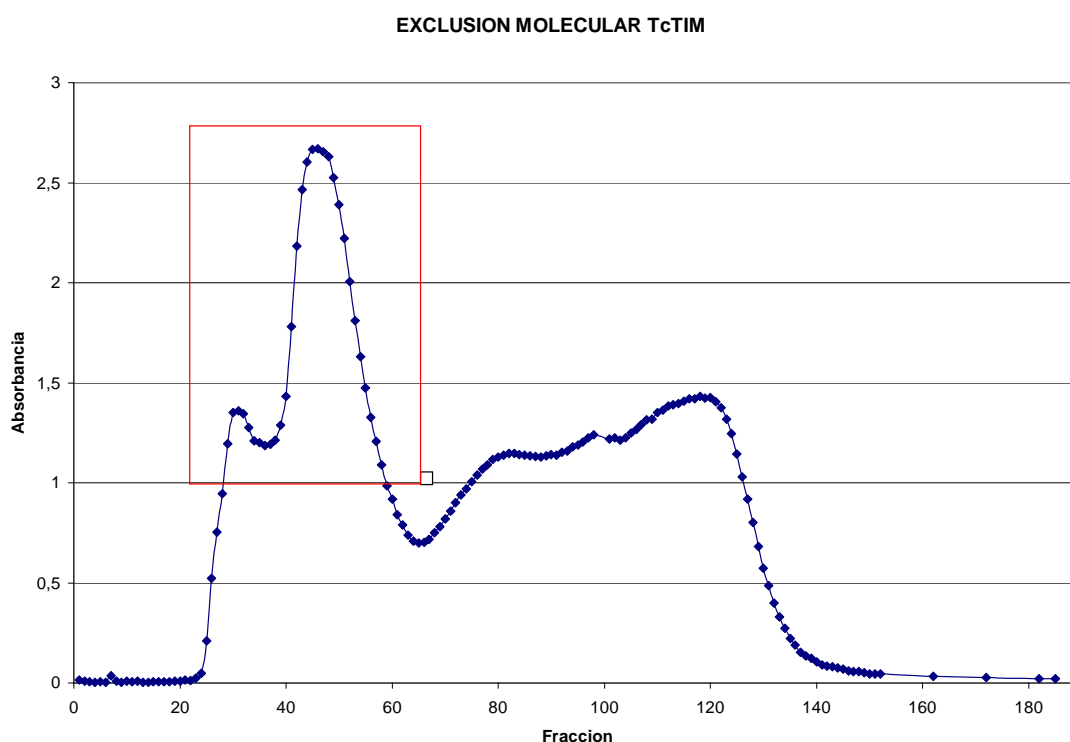


Figura 40. Exclusión molecular y fracciones colectadas con absorbancia mayor a 1 (Fracciones 29-58).

Las fracciones colectadas en la exclusión molecular fueron reunidas e introducidas en una columna de intercambio catiónico (Carboximetil sefarosa). De esta columna se colectaron las fracciones 18-24, las cuales tienen una absorbancia mayor a 0.4 y que corresponden a la TcTIM pura (Figura 41).

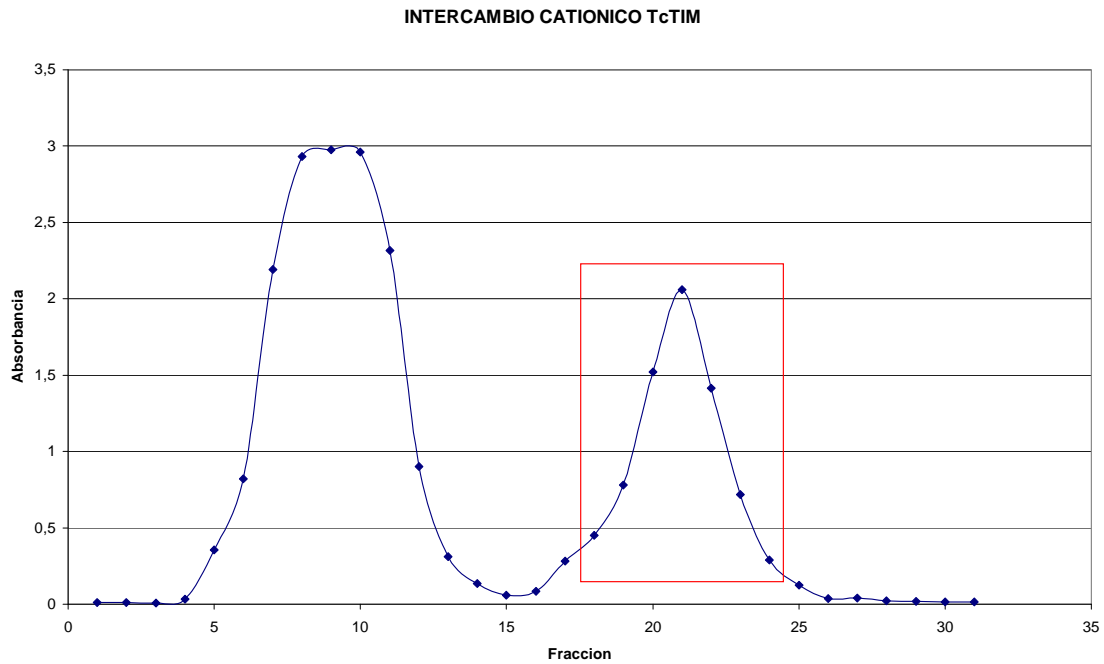


Figura 41. Intercambio catiónico y fracciones colectadas con absorbancia mayor a 0.4 (fracciones 18-24) correspondientes a TcTIM.

Con el fin de verificar y monitorear la pureza de la enzima (TcTIM), se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel, en la cual se puede observar la pureza total de esta enzima (Figura 42).

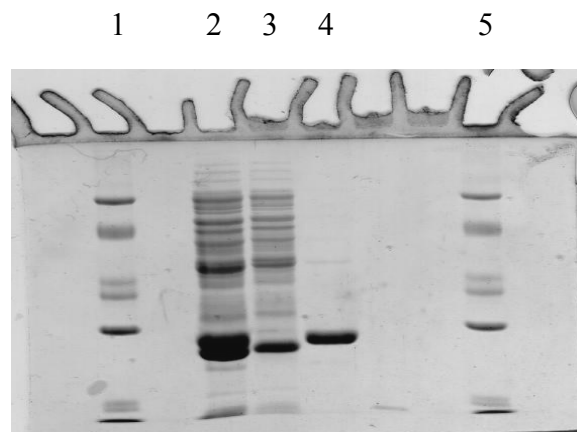


Figura 42. Electroforesis desnaturalizante. 1: Marcador de peso; 2: Fracciones obtenidas en la exclusión molecular; 3: Fracciones del pico 1 obtenidas en la columna de intercambio catiónico y 4: Fracciones del pico 2 obtenidas en la columna de intercambio catiónico y que corresponden a la TcTIM pura.

Cuantificación de la proteína (TcTIM) por medio del Ácido Bicinconínico (BCA).

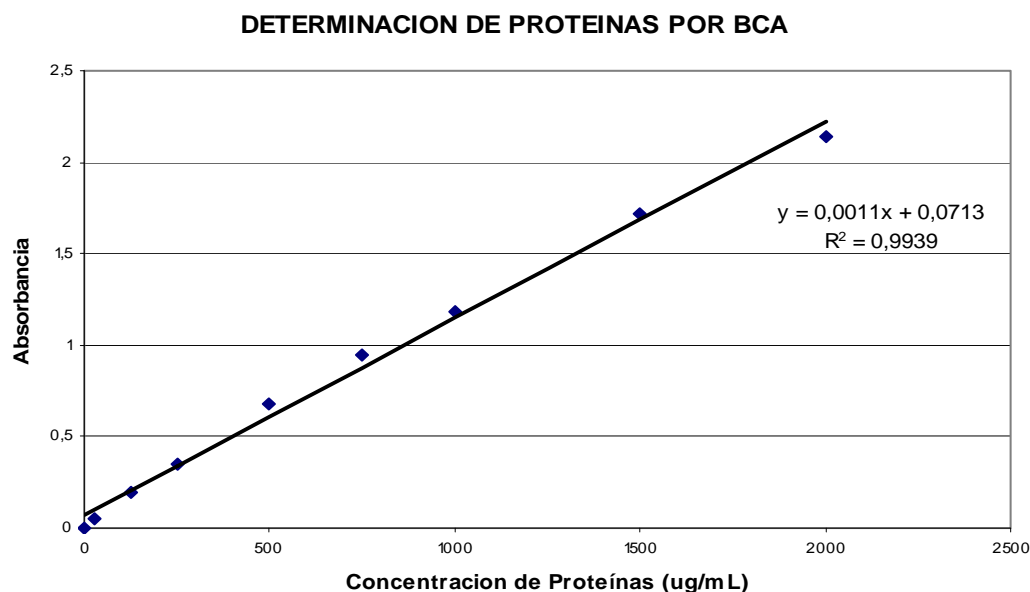


Figura 43. Curva estándar de la determinación de proteína por BCA.

Se obtuvieron dos fracciones de TcTIM pura, cada una con una concentración de:

La muestra 1 tuvo 740.0 µg/mL

La muestra 2 tuvo 833.5 µg/mL

Cuantificación de muestras de TcTIM por Coeficiente de extinción molar.

En esta cuantificación se utiliza la ley de Lambert-Beer

$$A = C \epsilon l$$

En donde:

A: La absorbancia obtenida experimentalmente. $A=0.5$

C: La concentración con unidades determinadas por el ϵ .

ϵ : El coeficiente de extinción molar. ϵ (TcTIM)= $36440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ostoa-Saloma P *et al*, 1997; Pace CN *et al*, 1995).

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

$$C = 0.5 / (36440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * 1 \text{ cm}) = 1.37 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$1.37 \times 10^{-5} \text{ mol/L} * 27244 \text{ g/mol} = 0.3738 \text{ g/L}$$

$C = 373.8 \text{ µg/mL}$. (Concentración de TcTIM de un segundo proceso de purificación; verificado con el Kit anteriormente usado).

APÉNDICE 2

CARACTERIZACIÓN DE TcTIM

Cuantificación de la actividad enzimática.

En la Figura 44 se muestra el trazo cinético obtenido al cuantificar una alícuota de 5 ng de TcTIM pura con respecto a su actividad catalítica de ambas muestras obtenidas.

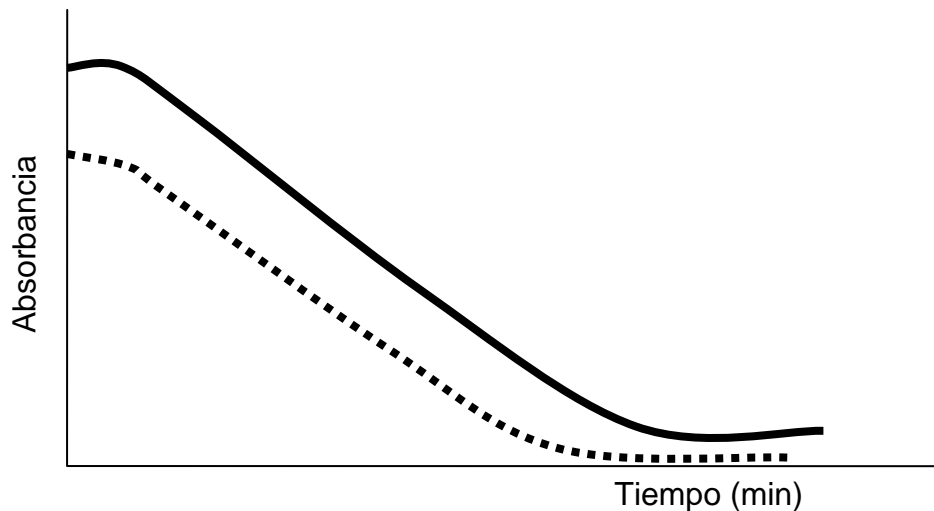


Figura 44. Comportamiento catalítico de la enzima TcTIM nativa de la muestra 1 $\Delta\text{abs}/\text{min}=0.0761$ (línea continua) y la muestra 2 $\Delta\text{abs}/\text{min}=0.0644$ (línea discontinua).

La actividad catalítica específica de cada muestra fue de:

La TcTIM 1 tuvo una actividad de **2070 $\mu\text{gmol}/\text{min}*\text{mg}$** (línea continua)

La TcTIM 2 tuvo una actividad de **2447 $\mu\text{gmol}/\text{min}*\text{mg}$** (línea discontinua)

Distribución de la estructura secundaria de la TcTIM nativa (Dicroísmo circular).

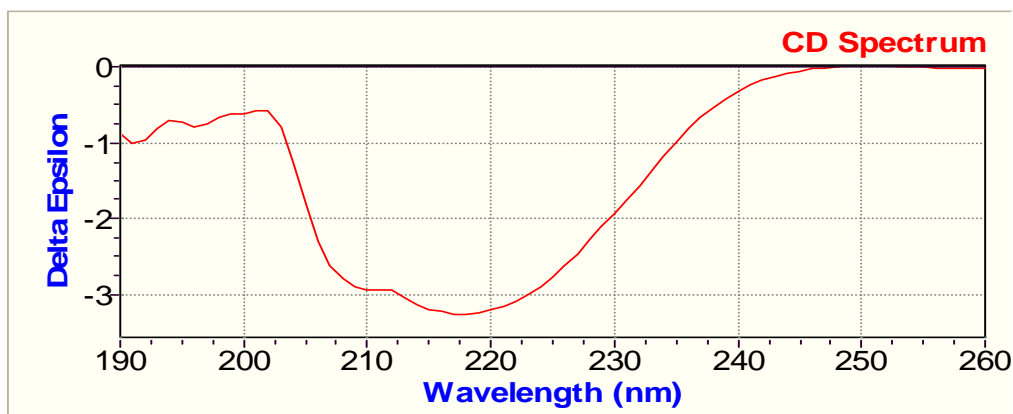


Figura 45. Dicroísmo circular de la TcTIM nativa (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Los datos obtenidos en el espectropolarímetro fueron introducidos en la siguiente fórmula:

$$\Phi = \frac{(\text{Dato obtenido del Espectropolarímetro})(110)(100)}{(\text{Concentración de proteína mg/mL})(0.1)(1000)}$$

Una vez obtenida la elipticidad molar (Φ), mediante un programa computacional (CDNN), se calcula el porcentaje de α hélices y β -plegadas presentes en rangos de longitud de onda.

La TcTIM nativa presenta un 32% de α hélices y 17 % de β -plegadas en el rango de 205-260 nm.

Flourescencia a 280 nm

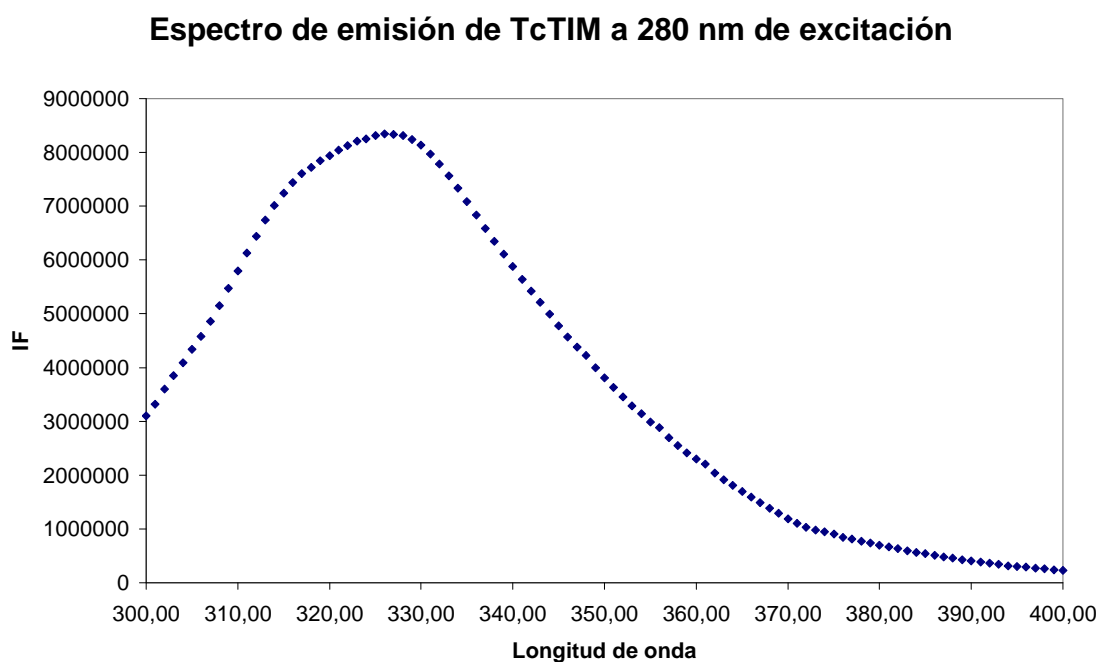


Figura 46. Espectro de emisión (300 -400nm) de TcTIM a una longitud de excitación de 280 nm (Flourescen todos los fluoróforos).

Fluorescencia medida a 295 nm

Espectro de emisión de TcTIM a 295 nm de excitación

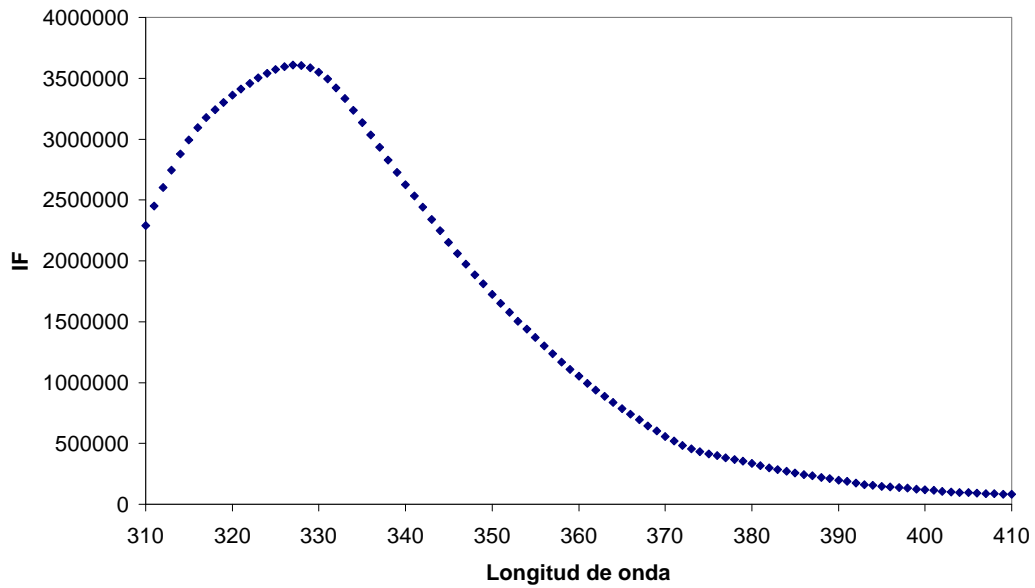


Figura 47. Espectro de emisión (310 -410nm) de TcTIM a una longitud de excitación de 295 nm (Solo fluorescen los triptófanos).

Fluorescencia del ANS

Espectro de emisión de TcTIM a 360 nm de excitación

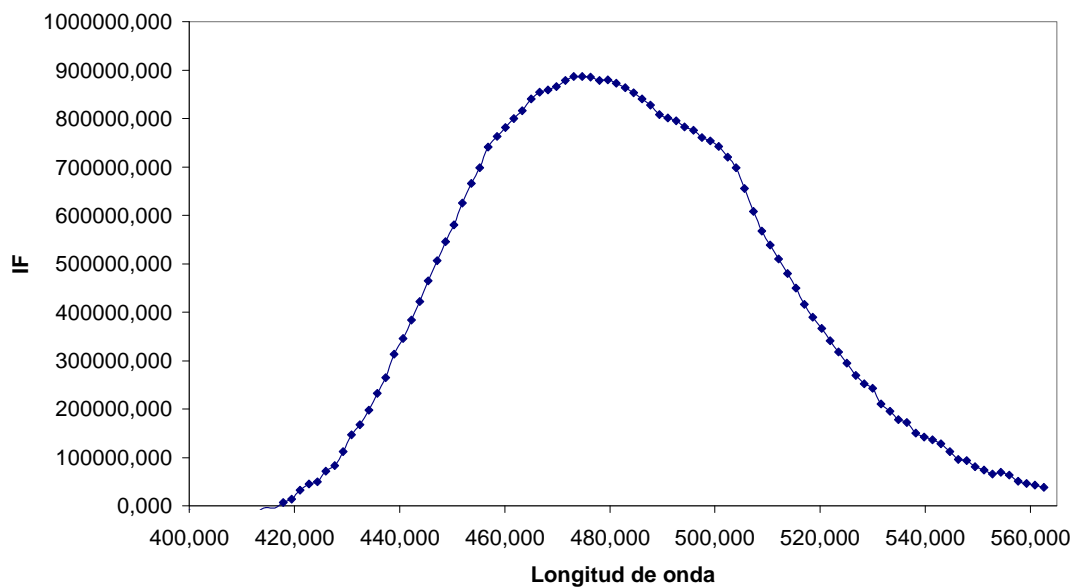


Figura 48. Espectro de emisión (400-560nm) de TcTIM a una longitud de excitación de 360 nm (Fluorescencia emitida por el ANS).