



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE
REACTIVACIÓN DE LAS QUIMERAS DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Trypanosoma
cruzi* y *Trypanosoma brucei*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LILIANA GUADALUPE VIGUERAS MENESES



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO**

VOCAL: **Profesor: NORA ANDREA GUTIÉRREZ NÁJERA**

SECRETARIO: **Profesor: RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT**

1er. SUPLENTE: **Profesor: ANA VALERIA MARTÍNEZ SILVA**

2° SUPLENTE: **Profesor: ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular. Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Laboratorio 201-O TE. Ciudad Universitaria, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT

SUPERVISOR TÉCNICO: BIOL. ELIZABETH NALLELY CABRERA GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: LILIANA GUADALUPE VIGUERAS MENESES

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular, por haber sido mi “casa” durante varios años. Por contribuir a mi formación académica y personal.
- Al Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort, por permitirme formar parte de su grupo. Por sus enseñanzas, su interés, su apoyo y sus comentarios.
- A la Biol. Elizabeth Nallely Cabrera González por su invaluable asesoría técnica, por compartir siempre sus conocimientos, por la infinita paciencia y por ser un gran ser humano. Eres todo un ejemplo. Muchas Gracias.
- Al Dr. Alfredo Torres Larios, por su asesoría para el uso del FPLC. Muchísimas gracias por todo.
- A todos los asistentes al seminario “de los jueves”, por sus observaciones, y por ayudarme a ver desde otros puntos de vista.
- A los profesores Raúl Genaro Aguilar Caballero y Nora Andrea Gutiérrez Silva, por las revisiones y correcciones que realizaron al presente trabajo.
- A Alejandro Flores, por ser un excelente laboratorista, por sacarnos de tantos apuros y mantener el orden cuando todo tiende al caos. Gracias por muchas cosas.
- Al personal de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular, por toda su ayuda y amabilidad.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto de CONACYT 49872:
“Desarrollo de agentes para el tratamiento de enfermedades de Chagas y
Leishmaniasis”

DEDICATORIAS

- A mis papás: María Teresa y Eduardo, por ser ejemplo constante de lucha, esfuerzo y amor. Gracias a mi madre por tratar de entenderme cuando ni yo misma me entiendo y por nunca rendirse. Gracias a mi padre por siempre dar más de lo parece posible y por ser un maestro para mí... no hay nadie en el mundo a quien me parezca más. Ambos son un ejemplo de vida. Gracias por todo.
- A mi hermano: Luis Eduardo. Por ser mi compañero de juegos, peleas, risas... y un amplio etcétera. Gracias por preocuparte siempre por mí.
- A mi familia completa. En especial a mis abuelitos: Francisco, Juana (†), Luis (†) y Tomasa. Por ser las personas más amorosas del mundo.
- A Ricardo. No puedo encontrar las palabras para agradecerte todo lo que me has dado... Gracias por compartirme tus sueños y respetar los míos. Gracias por tu alegría y por escucharme siempre sin importar si mis problemas son reales o "autoinventados". Mil Gracias por tu amor, respeto y apoyo. Gracias por ser mi amigo, mi cómplice y mi confidente. Gracias a Dios por cruzar nuestros caminos.
- A mis compañeros de clase, con quienes tuve la fortuna de coincidir en este camino.
- A mis amigos de primer semestre: "la dona". Por sus locuras, por sus consejos, por los juegos y las risas.
- A Grisel y a Brenda por TODO su enorme apoyo. Por siempre decirme la verdad, por todos los viajes casa-CU juntas y por los desayunos en vacaciones. Porque son más que amigas. Las quiero muchísimo.
- Tuve la fortuna de toparme con una bandita muy singular: el autodenominado "pokerrancho". Desde entonces los considero mis amigos. Son auténticos, excéntricos, inteligentes... simple y llanamente: diferentes. Los quiero. Muchas Gracias.
- A Fernando. Por las comidas y confesiones compartidas. Por que siempre encontraste la manera de sacarme del hoyo y hacerme reír. Significas mucho para mí.
- A Gustavo. Por ser uno de mis mejores amigos durante la carrera, por alentar todas mis locuras. Con nadie más caminaría sin zapatos en el metro. Te admiro mucho.

- A Liliana. De verdad no tengo idea de que sería de mí sin tu ayuda. No hay manera de pagarte todos los cafés, fruta y dulces que me mantuvieron fuera de mi estado “zombi” durante las clases. Eres la amiga más inteligente que tengo. Gracias por siempre escucharme y tratar de comprenderme (sé que no es nada fácil).
- A Josué. Por compartir siempre tu cultura y darme una visión diferente de la vida. Por nunca conformarte y seguir hacia delante.
- A Pablo David. Por enseñarme que uno nunca sabe cuáles son las grietas que hay en los demás y que no sabemos cuánto aguantarán sin derrumbarse. Compañero, es usted un ejemplo de bondad.
- A César, por todas platicas, canciones, poemas, videos... por tenerle un poquito de paciencia a “la mujer de la eterna tarea”. Te quiero mucho.
- A Alejandro Benítez. Por ser mí maestro durante el servicio social. Por enseñarme a trabajar en un laboratorio. Por tu apoyo, comprensión y confianza. Por enseñarme que la rebeldía es más que una palabra de moda y que la Universidad es universal. Por ser un gran amigo.
- A Alejandro Solís. Por aligerar los días de “trabajo”. Por siempre tener una sonrisa, compartirla y extenderla.
- A la Dra. Elia Brosla Naranjo. Por su apoyo en toda la carrera. Por siempre estar dispuesta a ayudarme a solucionar cualquier problema.
- A mis profesores de la Facultad de Química. Por compartir sus conocimientos y por toda la pasión con la que lo hacen.

Me queda claro que tengo una deuda enorme con el país. El que haya llegado a este punto es la suma de la contribución de muchas personas. Esto me alienta a seguir adelante con la esperanza de algún día retribuir un poco de lo que me han dado.





Sin sed

No busco intoxicarme
ni perderme, ni perderte,
quiero entender lo que pasa.
No enternecer ni provocar miradas
entre quienes me conocieron de antes
no quiero un “antes” y un “después”
no en la misma vida.

Yo busco una estocada limpia
que corte con lo que no me deja avanzar,
busco amar y ser amado
compartir mi tiempo,
no regalarlo ni robar ajenos.

Amanezco siempre con sed
y quiero agua y besos a tiempo,
que no me llame quien no me quiera
porque yo haré lo mismo,
quiero desprenderme de esta urgencia
de la necesidad de recordar el pasado,
quiero tener más porqués para andar en el presente
quiero salir de mi casa sin miedos, sin fobias,
no volver a donde fui feliz
conocer otros lugares.

En resumen quiero llamarte y proponer
un cambio
aclarar las cosas y que amanezcas sobre
mi pecho
y yo sin sed,
amándote sin remedio.

Y que amanezcas sobre mi pecho,
y yo sin sed.

Edel Juárez



ÍNDICE

Resumen	1
1. ANTECEDENTES	
1.1 Generalidades de proteínas	3
1.2 Desnaturalización de proteínas	9
1.3 Plegamiento de proteínas	12
1.4 Triosafofato isomerasa (TIM)	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
3. OBJETIVO	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 Sobreexpresión de las enzimas	35
4.2 Purificación de las enzimas	36
4.3 Determinación de concentración de proteína	37
4.4 Determinación de Actividad Específica	39
4.5 Ensayo de reactivación de la enzima desplegada por Gdn-HCl	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
5.1 Estudios de la reactivación de TIM	42
5.2 Controles para los ensayos de reactivación	43
5.3 Cinética de reactivación de las quimeras de TcTIM y TbTIM	52
5.3.1 Cinética de reactivación de TcTIM 1-6; TbTIM 7,8	53
5.3.2 Cinética de reactivación de TcTIM 1-5; TbTIM 6-8	55
5.3.3 Cinética de reactivación de TcTIM 1-4; TbTIM 5-8	56
5.3.4 Cinética de reactivación de TcTIM 1-3; TbTIM 4-8	57
5.3.5 Cinética de reactivación de TcTIM 1-2; TbTIM 5-8	59
5.3.6 Cinética de reactivación de TcTIM 1; TbTIM 2-8	61
6. CONCLUSIONES	64
7. PERSPECTIVAS	67
8. APÉNDICES	
Apéndice 1. Ingredientes para preparar medio LB (Luria-Bertani)	69
Apéndice 2. Amortiguadores utilizados para la purificación de las enzimas.	69
Apéndice 3. Preparación del sustrato (Gliceraldehído-3-fosfato)	71
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ABREVIATURAS

α -GDH	α -glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamin-tetraacético
FPLC	Cromatografía líquida de alta presión, del inglés “Fast Pressure Liquid Chromatography”
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
Gdn-HCl	Hidrocloreuro de guanidina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
MES	(Ácido 2-[N-Morfolino]etansulfónico
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
RMS	Raíz Cuadrada de la Media, del inglés “Root Mean Square”
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
PDB	Protein Data Bank
WT	Silvestre, del inglés “Wild type”

RESUMEN

La Triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima implicada en la glucólisis, se encarga de catalizar la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en dihidroxiacetonafosfato (DHAP). Es una proteína homodimérica, cada monómero cuenta con una estructura tipo barril α/β (8 hebras β , rodeadas de 8 hélices α) y pesa 27 kDa. Para su estudio en el laboratorio se ha dividido en 8 regiones, donde cada región se compone de una hebra β , una hélice α y el asa que las une (Tabla 1).

Región	Aminoácidos que la conforman
1	1-35
2	36-60
3	61-91
4	92-119
5	120-161
6	162-206
7	207-227
8	228-250

Tabla 1. Aminoácidos que conforman cada región de TIM.
(Según la numeración de TbTIM)

Las Triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), tienen el 73% de identidad en su secuencia de aminoácidos, poseen propiedades catalíticas y estructura tridimensional muy similares y los residuos del sitio activo se encuentran conservados. A pesar de todas las similitudes, se ha observado que al desnaturalizar a TbTIM con hidrócloruro de guanidina, y renaturalizarla por dilución del agente caotrópico se reactiva en un 60%, mientras que la enzima de *T. cruzi* (TcTIM) se reactiva hasta un 90% y lo hace más rápidamente. (Zomosa-Signoret et al., 2003).

En el laboratorio se cuenta con enzimas quiméricas de TcTIM y TbTIM, las cuales se construyeron sustituyendo regiones de una de las enzimas por las regiones equivalentes de la otra, con la finalidad de determinar cuáles son las secuencias de aminoácidos de estas dos proteínas similares, que son

responsables de diferencias en su comportamiento funcional (Pérez-Montfort, 2009).

En este trabajo se presenta la caracterización de la cinética de reactivación de las seis proteínas quiméricas que se muestran en la tabla 2.

Quimera	Regiones de TcTIM	Regiones de TbTIM
TcTIM 1-6; TbTIM 7,8	1-6	7,8
TcTIM 1-5; TbTIM 6-8	1-5	6-8
TcTIM 1-4; TbTIM 5-8	1-4	5-8
TcTIM 1-3; TbTIM 4-8	1-3	4-8
TcTIM 1-2; TbTIM 3-8	1,2	3-8
TcTIM 1; TbTIM 2-8	1	2-8

Tabla 2. Constitución de las quimeras de TcTIM y TbTIM con que se realizó esta tesis

El interés al realizar este proyecto, fue conocer las regiones responsables del comportamiento diferente de TcTIM y TbTIM en la reactivación. Encontramos que la quimera que tiene la región 1 de TcTIM y el resto de TbTIM no se reactiva más del 5%, tras una hora de haber retirado el agente caotrópico. También encontramos que la quimera que tiene las regiones 1 y 2 de TcTIM y las demás regiones de TbTIM, se reactiva en forma muy similar a TcTIM silvestre. Estos resultados sugieren que las diferencias en la región 2 son fundamentales para que la TIM se reactive más rápida y eficientemente.

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de proteínas

El término “proteína” tiene su origen de la palabra griega *πρωτεϊος* (*proteios*) que significa “lo primero o preeminente”. Son biomoléculas que constituyen la fracción principal de la masa de todos los organismos (aproximadamente 50% en peso seco) y resultan fundamentales en todos los aspectos de estructura y función celular. (Voet et al., 2006)

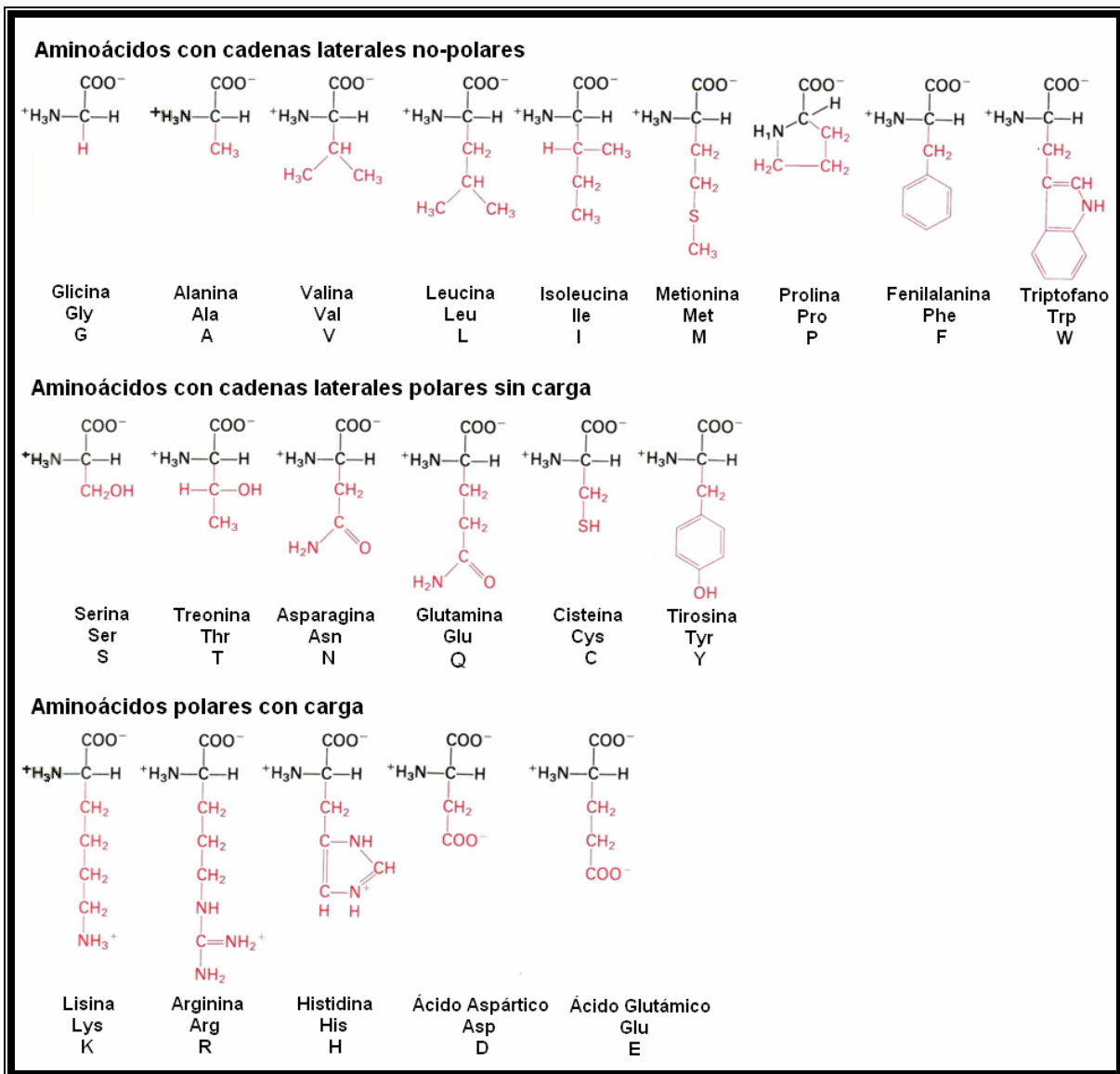


Figura 1. L- α -aminoácidos clasificados según su polaridad.

Las proteínas son polímeros constituidos por L- α -aminoácidos (Figura 1), los cuales poseen un grupo amino primario y un grupo ácido carboxílico como sustituyentes del mismo átomo de carbono. Existen 20 de ellos que se diferencian entre sí por la cadena lateral (R) la cual se encuentra unida al carbono α , y que varía en polaridad, tamaño y carga (Voet et al., 2006).

Los L- α -aminoácidos se encuentran unidos entre sí por enlaces amida entre el α -carbonilo de un residuo y el α -amino del siguiente. Este enlace es conocido como enlace peptídico, el cual es planar y, si no involucra a un residuo de prolina, se encuentra generalmente en configuración *trans* (Fersht, 1985; Schmid, 1992). Los enlaces peptídicos entre prolina y su aminoácido predecesor (X-Pro) típicamente existen en una mezcla de isómeros *cis* y *trans* en péptidos lineales cortos y en cadenas polipeptídicas con ausencia de estructura ordenada. El isómero *trans* es más común que el *cis* (Schmid, 1992).

La planaridad del enlace peptídico se debe a la resonancia provocada por la deslocalización del par de electrones desapareados del nitrógeno hacia el oxígeno del grupo carbonilo; lo que acorta el enlace C-N, y hace que posea un carácter de doble enlace (Figura 2)

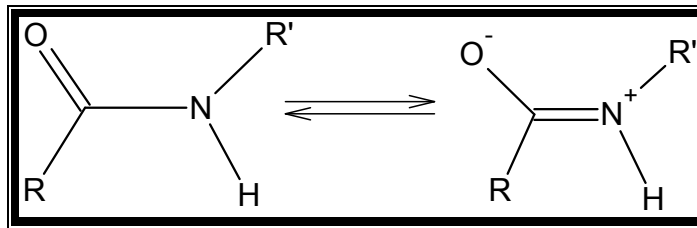


Figura 2. Resonancia del enlace peptídico que le confiere un carácter de doble enlace.

Las proteínas tienen diferentes niveles de estructuración que dependen de las fuerzas que intervienen en cada caso (Voet et al., 2006). (Figura 3).

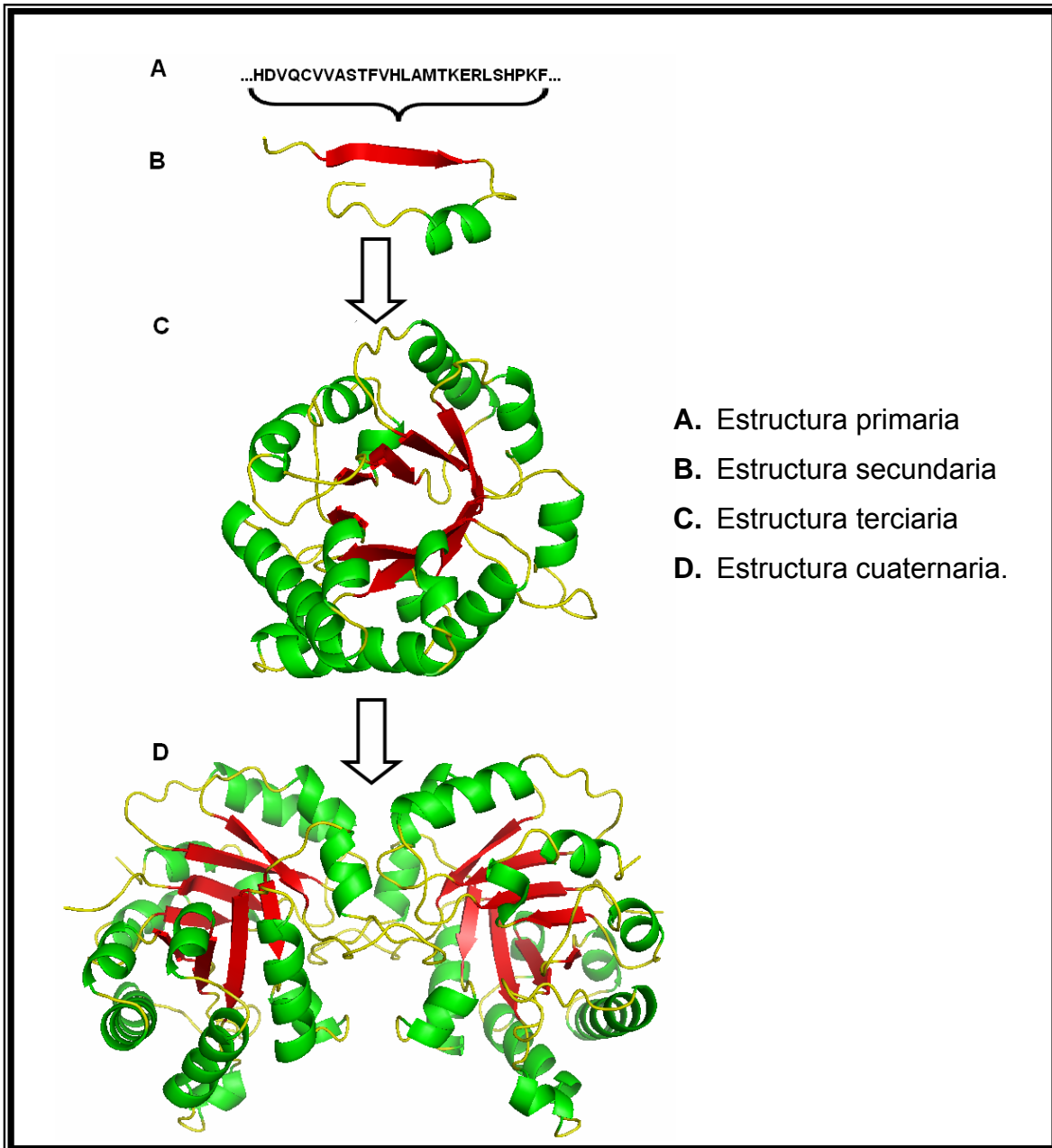


Figura 3. Representación de los niveles estructurales de las proteínas
 Elaborada con las coordenadas 5TIM de PDB

- La **estructura primaria** está definida por la secuencia en la cual los aminoácidos forman el polímero, está codificada dentro del gen de la proteína. Por convención la secuencia se escribe comenzando a la izquierda por el extremo amino terminal (Figura 3) (Fersht, 1985).

• La **estructura secundaria** de las proteínas es el arreglo espacial local de su cadena principal de átomos sin considerar la conformación de las cadenas laterales o su relación con otros segmentos y es resultado de las interacciones de corto alcance en la cadena (Figura 3). Se clasifica de la siguiente manera:

- α -hélice.- Es una estructura estable donde cada grupo amino hace un puente de hidrógeno con el tercer grupo amino que le sigue en cualquier dirección. Los grupo carbonilo se encuentran paralelos al eje de la hélice y están casi alineados con los grupos amino con los cuales forman el puente de hidrógeno. Las cadenas laterales de los aminoácidos quedan por fuera de la hélice. Cada 3.6 aminoácidos se produce un giro en la hélice.
- Hojas- β .- Una cadena polipeptídica extendida puede formar puentes de hidrógeno complementarios con una cadena extendida paralelamente formando una hoja o lámina. Existen dos arreglos estables:
 - * Hoja- β plegada paralela, en la cual todas las cadenas se alinean en la misma dirección.
 - * Hoja- β plegada antiparalela, en la cual las cadenas se alternan en dirección.
 - * Giro- β .- Es una estructura compuesta de 4 residuos sucesivos, en donde el carbonilo (C=O) del residuo i , se une por un puente de hidrógeno al grupo amino (N-H) del residuo $i+3$, en lugar de $i+4$ como en las α -hélices. Por medio de esta estructura ocurre un cambio de dirección de 180° , el cual es capaz de unir dos hojas- β plegadas antiparalelas. También se les llama giros revertidos o pliegues en horquilla (Fersht, 1985; Pace et al., 1996). Cuando una molécula de agua se inserta en una hélice- α se forma frecuentemente este tipo de estructura (Karplus y Shakhnovich, 1992).

- La **estructura terciaria** es el arreglo en el espacio de todos los átomos en una cadena polipeptídica única, o en cadenas covalentemente unidas. (Fersht, 1985). Para una proteína que consta de una cadena polipeptídica única, este es el máximo grado de estructuración (Figura 3).
- Muchas proteínas son oligómeros compuestos de subunidades que están unidas por enlaces no-covalentes. La organización de estas, es conocida como **estructura cuaternaria**. Esto se refiere al arreglo de las subunidades en el espacio y el ensamble de los contactos e interacciones entre las mismas, sin considerar su geometría interna (Figura 3).
- Se conoce como **dominios** a unidades independientes a nivel estructural y cada uno posee las características propias de una proteína globular pequeña. La estructura de un dominio consiste en dos o más elementos de estructura secundaria. A nivel funcional, los dominios tienen una función específica, como por ejemplo, unir a alguna molécula pequeña. Los dominios contienen subestructuras recurrentes llamadas **estructuras supersecundarias**, las cuales son combinaciones de estructuras α y/o β (Fersht, 1985).

Ciertos aminoácidos son propensos a formar un tipo particular de estructura secundaria, otros a desestabilizarla; por ejemplo, las prolinas tienden a desestabilizar α -hélices (Fersht, 1985). En la tabla 3 se encuentra la predicción estadística del comportamiento de los residuos aminoácidos en estructuras secundarias.

Tipo de estructura secundaria	Aminoácidos favorables a la estructura	Aminoácidos indiferentes a la estructura	Aminoácidos no favorables a la estructura
α -hélices	A, L, M, H, E, Q, K, C	V, I, F, W, D, N, R	Y, T, G, S, P
Hojas- β	V, I, F, W, Y, T	A, L, M, H, G, S, A	E, Q, K, D, N, P, C
Giros	G, S, D, N, P	G, Q, K, Y, T, R	A, L, M, H, V, I, F, W, C, R

Tabla 3. Predicción estadística del comportamiento de aminoácidos en estructura secundaria. (Modificado de Levitt, 1978)

La estructura nativa de una proteína es la conformación que es capaz de realizar su función dentro o fuera de un organismo, también el llamado estado plegado (Kyte, 1995). Una buena parte de las reacciones catalizadas en la célula son llevadas a cabo por proteínas oligoméricas (Fernández-Velasco, 1995), cuya estabilidad y función está determinada por las subunidades que las constituyen y sus interacciones. Para el ensamblaje de oligómeros se ha propuesto que los monómeros individuales se pliegan en una estructura terciaria compacta, la cual contiene superficies no-polares expuestas al solvente. Esto hace a la proteína insoluble, de manera que por medio de la oligomerización, dichas superficies se ocultan provocando que la proteína sea soluble y funcional. En muchas proteínas, la formación de oligómeros les confiere mayor estabilidad en relación a sus constituyentes monoméricos (Eisenstein y Schachman, 1989). La evolución selecciona secuencias en las cuales las interacciones presentes en una estructura funcional no estén en conflicto, para dar como resultado una estructura de baja energía (Onuchic y Wolynes, 2004). Es por eso que la asociación de subunidades requiere la existencia de interfases bien definidas y altamente específicas (Jaenicke y Rudolph, 1989). La velocidad de asociación de monómeros depende de la concentración de proteína, ya que se trata de un proceso multi-molecular (Fernández-Velasco, 1995).

En algunos casos las interacciones entre subunidades de oligómeros pueden causar cambios conformacionales en los monómeros, que son fundamentales para su actividad. Los sitios activos frecuentemente se encuentran localizados en las interfases de los oligómeros y la actividad catalítica requiere la participación de los residuos de aminoácidos de cada una de las cadenas polipeptídicas adyacentes, por lo que muchos monómeros, generalmente son intrínsecamente inactivos (Eisenstein y Schachman, 1989).

1.2 Desnaturalización de Proteínas

La conformación nativa de una proteína está determinada por la totalidad de interacciones interatómicas de su estructura primaria en un medio ambiente apropiado (Jaenicke y Rudolph, 1989; Anfinsen, 1973). Una proteína es estructuralmente estable cuando existe bajo condiciones similares a aquellas para las cuales fue seleccionada por la naturaleza, esto es llamado el estado fisiológico (Anfinsen, 1973).

En la estructura nativa de una proteína la posición y el estado de cada átomo o grupo de átomos están determinados por el estado y posición de otros átomos, lo que implica que esta molécula es un sistema macroscópico altamente cooperativo; es decir: las interacciones no covalentes en una proteína deben cooperar fuertemente cuando la molécula está en su estado nativo, el cual se rompe bajo condiciones extremas (Privalov, 1992).

En las proteínas existen las siguientes interacciones no covalentes:

- Interacciones de Van der Waals
- Interacciones entre grupos con carga (interacciones electrostáticas o enlaces salinos)
- Interacciones entre grupos polares (puentes de hidrógeno)
- Interacciones entre grupos no polares (interacciones hidrofóbicas)

Cuando los cambios en el pH, temperatura, presión o características caotrópicas del solvente exceden un valor crítico, la proteína se desnaturaliza, lo que significa que pierde total o parcialmente su estructura nativa y biológicamente activa (Fernández-Velasco, 1995).

El estado desnaturalizado de una proteína es una distribución de varias conformaciones moleculares diferentes, en las cuales se maximizan las interacciones por puentes de hidrógeno de la proteína con el medio acuoso (Dill y Shortle, 1991; Matheson, 1977). La facilidad con la cual un oligómero dado puede disociarse en las subunidades que lo componen, depende de la fuerza de

interacción entre las subunidades y de la arquitectura del oligómero (Eisenstein y Schachman, 1989).

En el laboratorio, para desnaturalizar una proteína se hace uso de **agentes caotrópicos** como urea (8-10 M) o cloruro de guanidina (Gdn-HCl) (6 M), de los cuales, no hay un modelo generalmente aceptado de su mecanismo de acción, ya que su capacidad desnaturalizante es el resultado de una combinación de efectos (Volkin y Klibanov, 1989). Para experimentos de desnaturalización es preferible utilizar sales de guanidina, debido a que la urea en solución, con el tiempo, suele producir cianatos, los cuales producen modificación química de las cadenas laterales de los aminoácidos, en especial a pH alcalino (Jaenicke y Rudolph, 1989).

Se mencionó que no existe un modelo aceptado del mecanismo de acción de la urea y Gdn-HCl, sin embargo diversos estudios demuestran que estos reactivos disminuyen las interacciones hidrofóbicas, las cuales juegan un papel crucial en mantener la estructura terciaria, de manera que aumentan la solubilidad de los residuos no-polares en solución acuosa. Estos agentes interactúan directamente con los enlaces peptídicos de la molécula proteica provocando que más grupos amida se expongan al medio (Volkin y Klibanov, 1989; Robinson y Jencks, 1965; Dill y Shortle, 1991). Es conocido que Gdn-HCl es una sal, por tanto se espera que se ionice en solución acuosa, los iones Gdn^+ y Cl^- presumiblemente enmascaran las cadenas laterales de los aminoácidos cargados positiva o negativamente, reduciendo o eliminando cualquier interacción electrostática estabilizante o desestabilizante. Debido a que la molécula de urea no posee carga, no se piensa que tenga algún efecto significativo en las interacciones electrostáticas intermoleculares e intramoleculares en una proteína (Monera et al., 1994).

Muchas proteínas en Gdn-HCl 6 M, se encuentran como hebras al azar (*random coil*). Dicho estado es llamado así debido a que la conformación del polipéptido se encuentra continuamente cambiando, dado que la rotación entre el

enlace del nitrógeno amino y el carbono- α y entre el carbono- α y el carbono acílico está permitida, (Kyte, 1995). Pero existe evidencia de que incluso a esa alta concentración de sal de guanidina, hay proteínas que pueden conservar cantidades significativas de estructura interna, con núcleos hidrofóbicos persistentes y estructura secundaria residual considerable (Dill y Shortle, 1991).

En los casos en los que la desnaturalización se provoca por la adición de reactivos como las sales de guanidina, la renaturalización puede iniciarse por dilución o por diálisis. Sin embargo es importante considerar que concentraciones residuales de desnaturalizante pueden afectar la estabilidad y la actividad catalítica de la proteína (Janicke y Rudolph, 1989).

Durante un proceso de desplegamiento, ocurren cambios conformacionales, los cuales exponen al solvente acuoso residuos de aminoácidos hidrofóbicos que se encontraban internalizados en la estructura. Posteriormente las moléculas proteicas con esta estructura terciaria alterada se asocian unas con otras para minimizar la exposición de residuos no-polares y forman agregados. La agregación ha sido ampliamente reconocida como un mecanismo de inactivación proteica. Es un proceso cinético de segundo (o mayor) orden, y por tanto es dependiente de la concentración de proteína. Una disminución en la concentración de proteína disminuye el grado de agregación (Volkin y Klibanov, 1989; Robinson y Jencks, 1965). El mayor problema en los experimentos de desplegamiento/replegamiento, es la competencia cinética del plegamiento y de la agregación debido a la acción de interacciones intra e intermoleculares. Al disminuirse la concentración de proteína, usualmente aumenta el rendimiento de renaturalización y se elimina la agregación (Jaenicke y Rudolph, 1989; Kyte, 1995).

1.3 Plegamiento de Proteínas

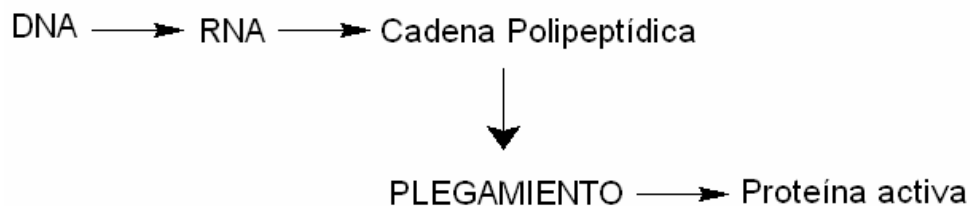
El que estructuras protéicas complejas se formen espontáneamente en periodos cortos de tiempo, es una necesidad evolutiva (Wolynes et. al, 1996). Las proteínas muestran la propiedad intrínseca de adquirir su estructura tridimensional en un ambiente determinado de manera autónoma, basándose en el orden específico de la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica (Anfinsen, 1973), siendo la formación de la estructura secundaria una parte integral de la reacción de plegamiento protéico (Sholtz et al., 1995).

El plegamiento de proteínas es complejo, ya que estas biomoléculas se organizan a sí mismas en estructuras tridimensionales específicas a través de cambios conformacionales influenciados por residuos vecinos y por el solvente (Onuchic y Wolynes, 2004), formando interacciones no-covalentes que generan diferencias energéticas entre el estado desnaturalizado y el nativo (Fernández-Velasco, 1995). En esencia, éste proceso de organización inicia con muchas configuraciones posibles y finaliza con muy pocas (Onuchic et al., 1996), ya que el estado nativo es un sistema dinámico que fluctúa entre un número limitado de conformaciones y no es una estructura única (Jaenicke, 1987).

Algunas proteínas desnaturalizadas que tienen su estructura tridimensional desorganizada, pueden replegarse desde su estado desordenado a una estructura bien definida en la cual se restaura la actividad biológica, lo cual sugiere que las proteínas nativas existen en un tipo de equilibrio termodinámico configuracional, en el que el estado de menor energía configuracional es el biológicamente activo. Según esto, Levinthal postuló que si para plegarse una proteína adopta al azar todas las configuraciones posibles, se requiere un tiempo mayor a la edad del universo para alcanzar la conformación correcta; lo cual no es posible, ya que se conoce que las proteínas se pliegan en tiempos cortos (microsegundos a segundos). Por eso propuso la existencia de vías de plegamiento que son secuencias bien definidas de eventos, los cuales se suceden uno a otro para llevar

la proteína desde el estado desplegado al estado plegado de menor energía conformacional (Levinthal, 1968).

El análisis cinético y termodinámico del proceso de plegamiento/replegamiento de una proteína tiene el objetivo de dilucidar lo que se conoce como la “segunda mitad del código genético” que se asume gobierna la transición espontánea de la información estructural unidimensional (codificada en una estructura primaria dada) al estado funcional tridimensional (Jaenicke y Rudolph, 1989).



Es diferente el estudio del plegamiento proteico *in vivo* que *in vitro*, ya que *in vivo* cada péptido empieza su existencia al emerger su extremo amino terminal del ribosoma (Kyte, 1995) y el plegamiento progresa conforme se va alargando la cadena polipeptídica. Es de considerar que en la célula ciertos pasos son catalizados por enzimas como la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa y la proteína isomerasa de disulfuros, y que el plegamiento de algunas proteínas es asistido por chaperonas moleculares las cuales evitan la agregación irreversible de la proteína al unirse a las cadenas nacientes de la proteína, lo cual disminuye la concentración de cadenas polipeptídicas uniéndose unas a otras (Fernández-Velasco, 1995; Van den Berg et al., 1999). Además, en el ambiente intracelular hay un alto aglomeramiento debido a la presencia de altas concentraciones de macromoléculas solubles e insolubles tanto en el citoplasma como en organelos (Van den Berg et al., 1999).

In vitro el proceso de plegamiento parte de una cadena polipeptídica completamente desplegada en la conformación de hebra al azar, en la cual los residuos de los aminoácidos no interactúan unos con otros. En la práctica, este estado ideal no existe: el estado inicial del plegamiento es un estado desordenado

donde son mínimas las interacciones entre grupos protéicos (Privalov, 1992). Para considerar que la comparación del plegamiento *in vivo* e *in vitro* es válida, se deben cumplir dos condiciones:

- 1) La cinética de renaturalización debe estar dentro del rango de tiempo en que ocurre el plegamiento *in vivo*.
- 2) El producto final de la renaturalización debe ser indistinguible del estado nativo inicial (Jaenicke, 1999).

Muchas proteínas pequeñas se pliegan sin intermediarios detectables, sin embargo existen proteínas que pasan por fases metaestables conocidas como intermediarios, los cuales al ser desestabilizados aceleran el plegamiento (Pande et al., 1998). En las rutas de plegamiento existen dos tipos de intermediarios: dentro de la vía (“On-pathway”) y fuera de la vía (“Off-Pathway”). Sólo los intermediarios dentro de la vía ayudan a dilucidar cómo es que las proteínas encuentran rápidamente su conformación nativa, de manera que en experimentos cinéticos, donde es posible observar intermediarios, dan una idea del código de plegamiento (Dill y Chan, 1997), mientras que los intermediarios fuera de la vía son proteínas mal plegadas (Pande et al., 1998).

El espacio conformacional de un estado desnaturalizado es muy grande; la energía de cada aminoácido depende de todos los otros residuos de la cadena polipeptídica. La búsqueda a través del espacio configuracional, con su gran número de confórmeros, lleva a la ya mencionada paradoja de Levinthal (Karplus y Shakhnovich, 1992; Sali et al., 1994). Para resolver la paradoja, y no habiendo un consenso sobre cómo ocurre el plegamiento protéico, se han propuesto varios modelos de rutas de plegamiento, los cuales se agrupan en “**Modelos clásicos**”, que ven el proceso como una secuencia lineal de eventos, y “**La nueva visión**”, que considera que se trata de un flujo de eventos paralelos, en donde se ensamblan estructuras parcialmente plegadas hasta llegar a la estructura nativa (Dill y Chan, 1997; Onuchic y Wolynes, 2004; Pande et al., 1998).

A continuación se enlistan algunos de los principales “**modelos clásicos**”:

- Modelo de **nucleación-crecimiento**.- La estructura terciaria se propaga rápidamente desde un núcleo inicial de estructura secundaria local. Se pliega primero la estructura secundaria, posteriormente se unen estas estructuras para obtener la estructura nativa (Dagget y Fersht, 2003). El paso limitante de la velocidad es la formación de núcleos (Aichards, 1992). Un sitio de nucleación se define como una conformación específica de una selección limitada de la cadena polipeptídica, cuya existencia puede incrementar significativamente la velocidad de formación de la configuración nativa de la proteína desde su estado desplegado. El núcleo tiene una configuración similar a la que ese segmento tiene en la estructura nativa (Matheson Jr y Scheraga, 1977; Kyte, 1995).
- Modelo de **compresión y ensamblaje**.- Las proteínas se pliegan rápidamente y no pasan por todos los grados de libertad posibles al mismo tiempo; se pliegan en un amplio rango de escalas de tiempo. Para las escalas de tiempo más cortas (picosegundos a nanosegundos), diferentes piezas pequeñas de la cadena peptídica exploran conformaciones locales independientemente de otras piezas. Se forma una estructura local, que después crece para incluirse a las otras estructuras que también están creciendo (Dill, 2007).
- Modelo de **difusión-colisión**.- Considera que la molécula proteica está dividida en varias partes (microdominios). Dos o más de estos microdominios tienen que difundir y colisionar para dar lugar a una estructura más estable. Posteriormente hay arreglos locales que conllevan a la estructura nativa (Aichards, 1992; Karplus y Shakhnovich, 1992).
- Modelo del **Rompecabezas**.- Hace una analogía al pasatiempo del cuál toma el nombre. Las piezas deben estar unidas para representar la cadena. Y así, tal como en un rompecabezas, sólo existe un “estado nativo” único. Si las piezas del rompecabezas tienen un color uniforme y constante, no hay un punto de inicio preferencial, es decir: cada cadena plegándose

seguirá una ruta diferente. Si el patrón de color del rompecabezas es simple, casi todas las cadenas seguirán la misma ruta. (Aichards, 1992).

- Modelo “**Framework**”.- En este modelo la estructura secundaria, que ya tiene los puentes de hidrógeno correctos, es altamente estable; la estructura se propaga hacia el estado intermediario formando estructuras supersecundarias, dominios, y finalmente, la estructura nativa (Aichards, 1992; Dagget y Fersht, 2003).
- Modelo **del colapso hidrofóbico**.- Conduce a la compactación de la proteína haciendo que el plegamiento se lleve a cabo en un volumen menor, disminuyendo el número de configuraciones accesibles para la búsqueda de la estructura nativa. La fuerza que dirige al colapso hidrofóbico provoca la internalización de residuos no-polares y expulsa moléculas de agua, y como consecuencia, se comienza a formar la estructura secundaria. (Dagget y Fersht, 2003; Kyte, 1995; Aichards, 1992).
- Modelo de **nucleación-condensación** o **nucleación-colapso**.- Combina características de los mecanismos “framework” y “colapso hidrofóbico” (Figura 4). Existe un colapso general (condensación) alrededor de un núcleo, a lo cual sigue la formación de interacciones de largo alcance e interacciones hidrofóbicas para estabilizar a las estructuras secundarias débiles. A medida que estas aumentan, el plegamiento tiende a seguir el mecanismo de “framework”. Este modelo fue introducido para explicar el comportamiento de proteínas que se pliegan aparentemente en dos estados y es aplicable no solo a proteínas pequeñas, sino a proteínas grandes, considerando el comportamiento de dominios individuales (Dagget y Fersht, 2003).

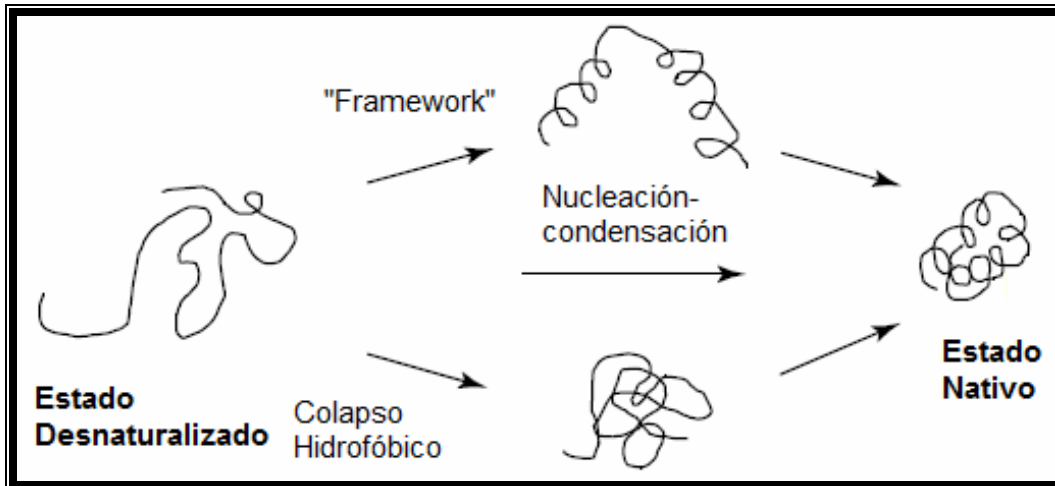


Figura 4. Representación de la combinación de los modelos "Framework" y "Colapso hidrofóbico" para dar lugar al modelo "Nucleación-condensación" (Modificado de Dagget y Fersht, 2003)

- **Modelo del glóbulo fundido.**- Ptitsyn definió a un glóbulo fundido (*"melting globule"*) como el estado en el que el polipéptido se ha colapsado a una partícula globular a partir de la hebra al azar expandida (Figura 5).

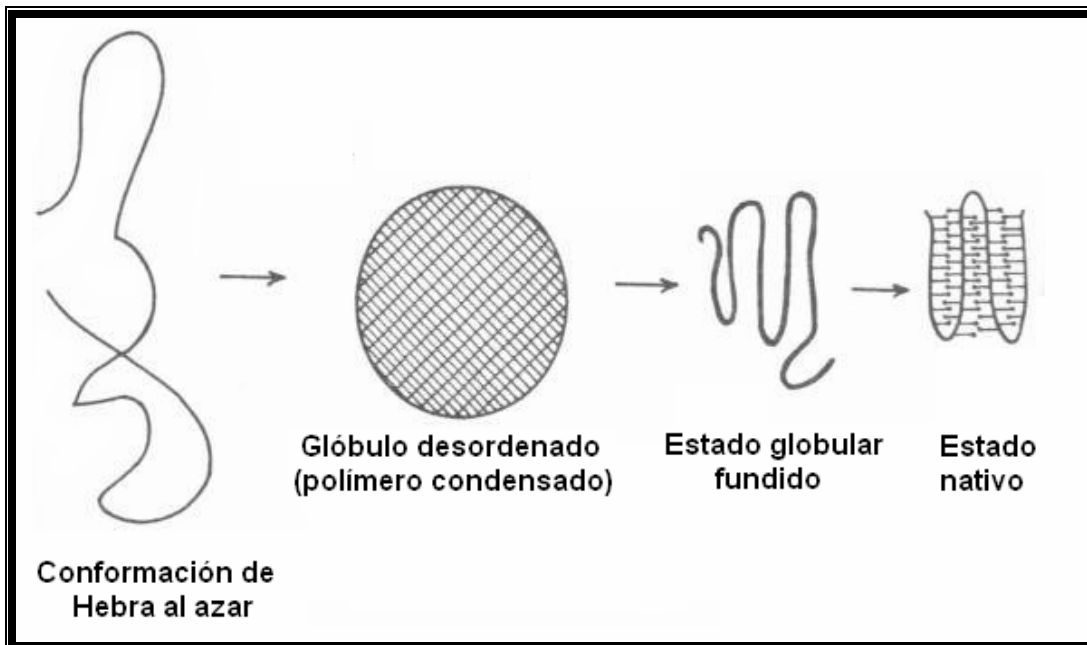


Figura 5. Esquema de la formación del estado nativo desde la conformación de hebra al azar, pasando por el "Glóbulo fundido" (Modificado de Karplus y Shakhnovich, 1992)

Se le denominó “glóbulo”, por que es menos compacto que el estado nativo, y “fundido”, porque posee una alta entalpía y entropía en relación a la estructura nativa; además, experimenta un constante cambio de conformaciones. Este estado podría ser un intermediario en la ruta normal de plegamiento (Kyte, 1995; Dill y Shortle, 1991; Karplus y Shakhnovich, 1992). El concepto de glóbulo fundido es uno de los más grandes aportes de los “modelos clásicos” a “la nueva visión”.

El aumento en el volumen de la proteína en el estado globular fundido destruye el empaquetamiento de las cadenas laterales, pero los grupos no-polares conservan su atracción, por lo que las interacciones hidrofóbicas estabilizan dicho estado. Las estructuras secundaria y terciaria son muy similares a las del estado nativo, pero difieren en que las interacciones entre residuos vecinos son más débiles que en el estado nativo (Figura 6) (Ptitsyn, 1992).

En el estado globular fundido las α -hélices y hojas- β que se encuentran en el centro hidrofóbico están menos desnaturalizadas, mientras que las asas, las regiones terminales de α -hélices y hojas- β , y aquellas regiones que no son parte del centro hidrofóbico de la proteína, se encuentran más desnaturalizadas (Ptitsyn, 1992).

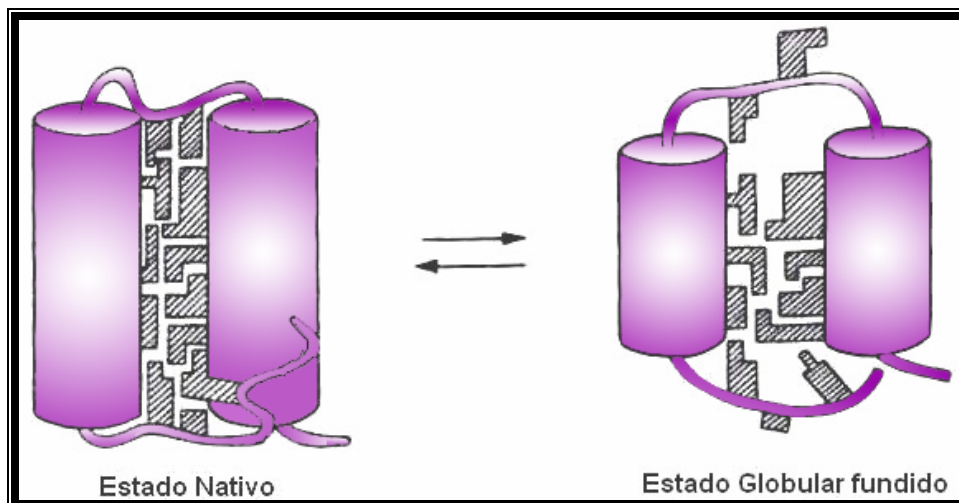


Figura 6. Esquema comparativo entre el estado nativo y el estado globular fundido.
(Modificado de Ptitsyn, 1992)

Si condensamos la información que proporcionan los “modelos clásicos” se observa que el primer paso incluye un colapso hidrofóbico; lo cual se debe a que la molécula protéica no debe tener sus grupos hidrofóbicos en contacto con medio acuoso y por tanto, dichos grupos se deben encontrar unos cerca de otros. La atracción entre grupos no polares es siempre débil en comparación con la repulsión de estos grupos con el agua, de manera que interacciones de Van der Waals contribuyen de manera sustancial al efecto hidrofóbico. Tras el paso inicial, se lleva a cabo un reordenamiento estructural mediado por puentes de hidrógeno. Para llegar al estado nativo las fuerzas hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno contribuyen en forma comparable. (Pace et al., 1996).

El “estado desnaturalizado”, el “estado nativo” y el “estado globular fundido” corresponden a ensambles de conformaciones que se interconvierten muy rápido entre sí, (en el orden de picosegundos). El número y naturaleza de las conformaciones varía para cada estado, por ejemplo, el estado desnaturalizado está asociado con un número enorme de conformaciones desplegadas no relacionadas, mientras que el estado nativo se asocia con muy pocas conformaciones cercanamente relacionadas y de baja energía (Pande et al., 1998).

“La nueva visión” emergió de combinar avances en métodos experimentales a nivel atómico y de la simplificación de modelos mecánico-estadísticos. Reconoce que el problema fundamental con la solución de Levinthal es el concepto de “vía” por si mismo; siendo la paradoja una concepción errónea, ya que las dos metas de alcanzar un mínimo energético global, y hacerlo rápidamente, no son excluyentes. También rechaza la propuesta de los “modelos clásicos” de vía de plegamiento con eventos secuenciales definidos, y en su lugar crea el concepto de embudo de plegamiento y panoramas energéticos con eventos paralelos, en donde diferentes conformaciones de la misma secuencia al final terminan en la misma estructura nativa (Dill y Chan, 1997).

Un embudo de plegamiento (Figura 7) describe la reducción progresiva en dimensionalidad del espacio conformacional accesible, comenzando por los muchos grados de libertad disponibles para cadenas desnaturalizadas y finalizando con la casi completa falta de libertad de la cadena nativa. En cinéticas de química clásica, el estado de transición es un término que describe en paso limitante de una reacción. En la “nueva visión” el estado de transición es fundamentalmente un concepto relativo a velocidades y no a estructuras específicas (Dill y Chan, 1997).

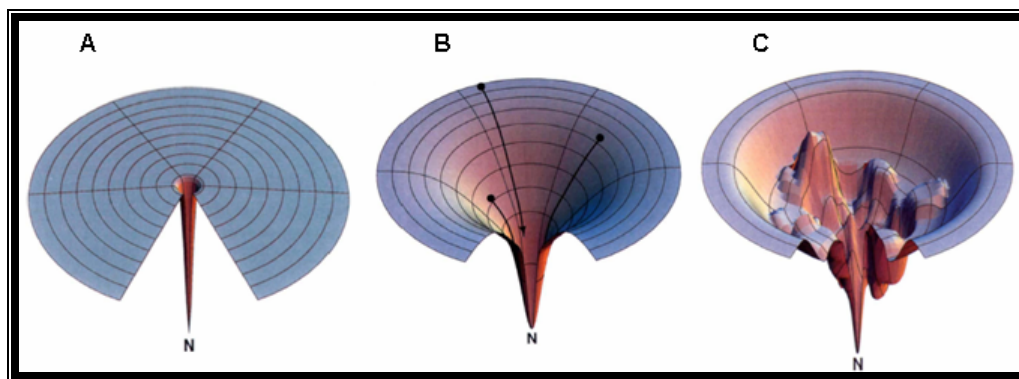


Figura 7. Diferentes representaciones de embudos de plegamiento:

A) Embudo representativo de la paradoja de Levinthal (únicamente existe una vía de plegamiento). **B)** Representación de un embudo idealizado en donde cualquier ruta tiene la misma velocidad de plegamiento. **C)** Representación de un embudo con barreras energéticas que representa un plegamiento multiestado (con uno o más intermediarios en el proceso). (Modificada de Dill y Chan, 1997)

Un panorama energético (Figura 8) representa la energía libre de cada conformación en función de los grados de libertad y provee una descripción estadística de las energías libres de las configuraciones moleculares (Onuchic et al., 1996). Muchas de las interacciones no-nativas pueden existir en una estructura protéica parcialmente desordenada, y estas pueden ser, energéticamente, tanto favorables como no favorables (Wolynes et al., 1996).

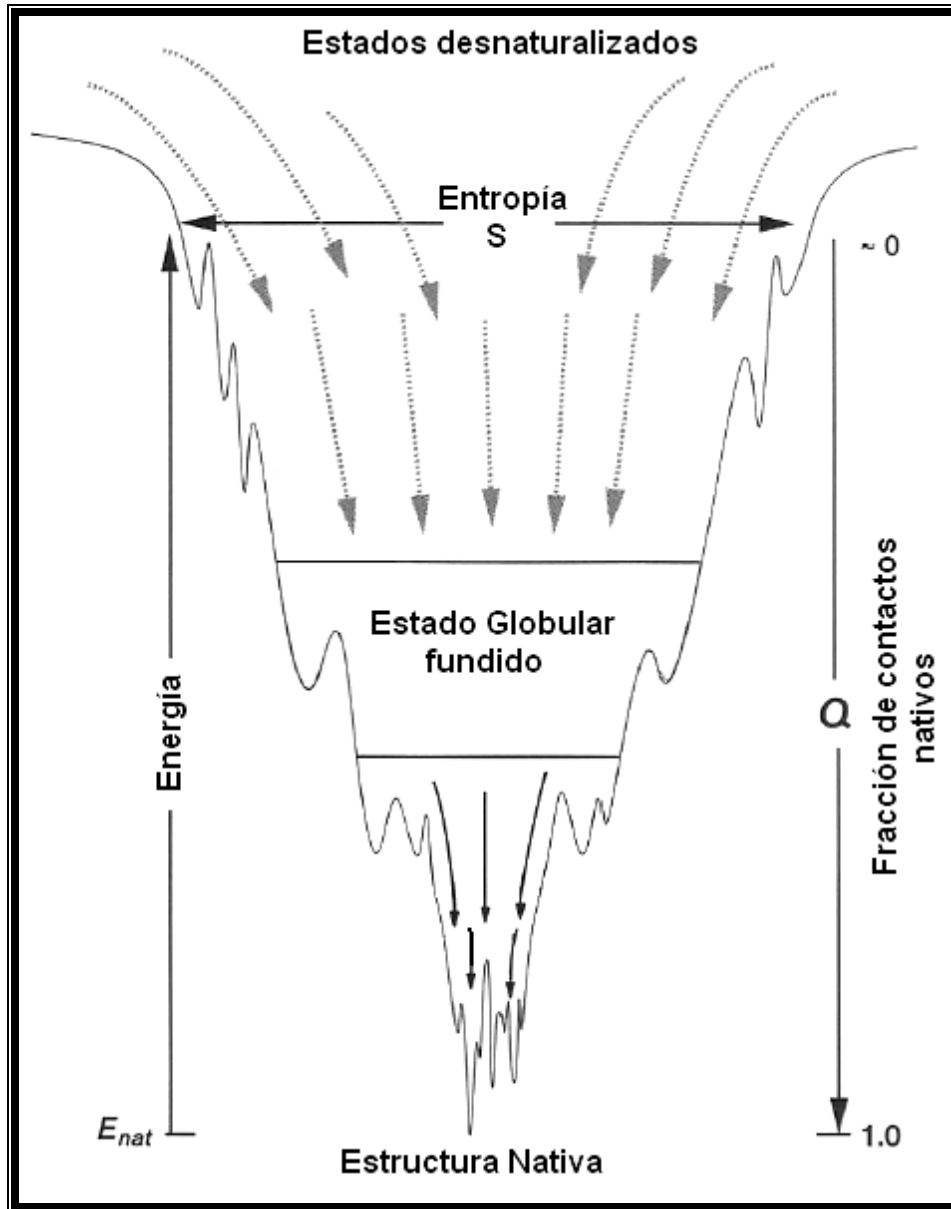


Figura 8. Panorama energético (Modificado de Wolynes et al., 1996)

En un panorama energético el eje vertical representa la energía libre interna de una conformación dada, este eje depende de la temperatura y del solvente. Los ejes laterales horizontales representan las coordenadas conformacionales. Los picos corresponden a conformaciones de alta energía, mientras que los valles son mínimos energéticos locales y representan conformaciones más favorables que otras cercanas. Si la barrera energética es muy grande pueden tratarse trampas energéticas que representen un intermediario “fuera de la vía”. Bajo condiciones

de plegamiento, la proteína tiende a cambiar su conformación, lo cual causa que la energía disminuya (Dill y Chan, 1997; Onuchic et al., 1996).

Los panoramas energéticos tienen forma de embudo debido a que conforme a proteína se va plegando, disminuye su entropía; y esta forma implica una correlación general entre cambios en la estabilidad y la velocidad de plegamiento. En un panorama energético con forma de embudo, pueden existir varios mecanismos. Por ejemplo, las estructuras secundarias se pueden formar antes o después del colapso, las cadenas laterales se pueden orientar antes o después de la cadena principal, un dominio se puede plegar antes que otro, etc. Ya que no hay ventajas evolutivas particulares aparentes que favorezcan ninguno de dichos mecanismos, es razonable esperar encontrar ejemplos de todos ellos (Onuchic y Wolynes, 2004).

1.4 Triosafosfato Isomerasa

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima perteneciente a la ruta glucolítica. Esta enzima ha sido encontrada en todos los organismos vivos en que se ha buscado (Lolis et al., 1990), y sus propiedades funcionales han sido muy bien conservadas durante la evolución (Wierenga y Noble, 1992).

Todas las TIMs silvestres estudiadas son homodímeros, con excepción de las de *Pyrococcus woesei* y *Methanothermus fervidus*, los cuales poseen TIMs homotetráméricas. Cada subunidad de la TIM posee alrededor de 250 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 27kDa.

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, por sus siglas en inglés), clasifica a la TIM con el número 5.3.1.1 (5 Isomerasas; 5.3 Oxidorreductasas intramoleculares; 5.3.1 Interconvertidores de aldolasas y cetosas) de acuerdo a la reacción que cataliza.

Solamente un producto de la aldolasa continúa la vía de la glucólisis, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P). La dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el G3P son interconvertidos por una reacción de isomerización, con un intermediario enediol o enediolato, catalizada por la TIM (Figura 9) (Voet et al., 2006; Rose y O'Connell, 1961).

La TIM es una enzima catalíticamente perfecta, lo cual significa que la velocidad de la reacción entre enzima y sustrato está controlada por difusión, la formación del producto ocurre tan rápidamente como la enzima y el sustrato se encuentran en solución (Voet et al., 2006); esto asegura un rendimiento neto positivo de ATP en la oxidación de glucosa a piruvato (Joseph-McCarthy et al., 1994). Esta isomerasa cataliza la interconversión de DHAP a G3P con una velocidad que es 10^{10} veces más rápida que la conversión no catalizada enzimáticamente (Wierenga et al., 1992).

Consideraciones mecánicas sugieren que la conversión del G3P al intermediario enediol o enediolato es catalizada por una base general, la cual sustrae un protón del C2 del G3P (Figura 9), y por un ácido general el cual protona su átomo de oxígeno carbonílico (Voet et al., 2006). La cadena lateral de Glu167 (numeración de TbTIM) se encuentra situada idealmente para sustraer el protón del C2 de G3P, mientras que la cadena lateral de His95 está posicionada apropiadamente para protonar el oxígeno carbonílico del G3P (Komives et al., 1991). La cadena lateral de la Lys13, cargada positivamente, estabiliza electrostáticamente el estado de transición que se encuentra negativamente cargado y, además forma un enlace salino con la cadena lateral del carboxilato de Glu97 (Lodi et al., 1994; Joseph-McCarthy et al., 1994). En la conversión del intermediario a DHAP, el Glu167 actúa como un ácido y protona al C1, mientras que la His95 actúa como una base y sustrae el protón del grupo OH (Voet et al., 2006; Joseph-McCarthy et al., 1994; Wierenga et al., 1992).

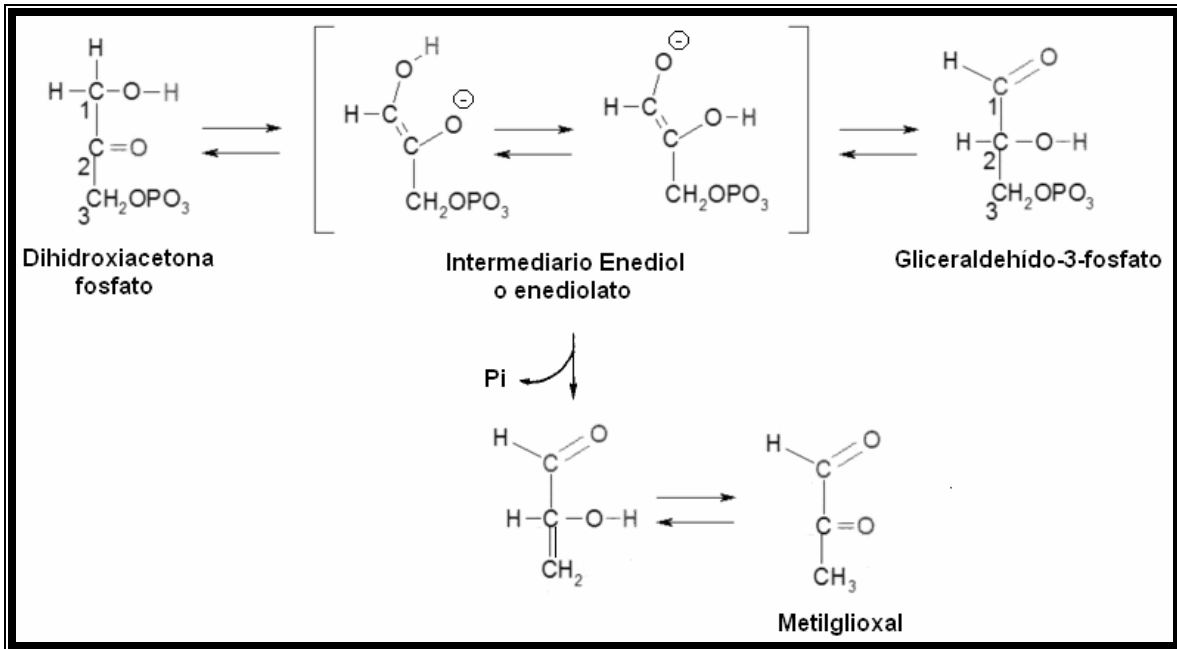


Figura 9. Reacción catalizada por la TIM

En solución, el intermediario enediol se rompe rápidamente con la subsecuente eliminación del fosfato del C3 formando un compuesto tóxico llamado metilgloxal. La TIM posee un asa flexible que es el asa 6, la cual se cierra en presencia del sustrato (Figura 10).

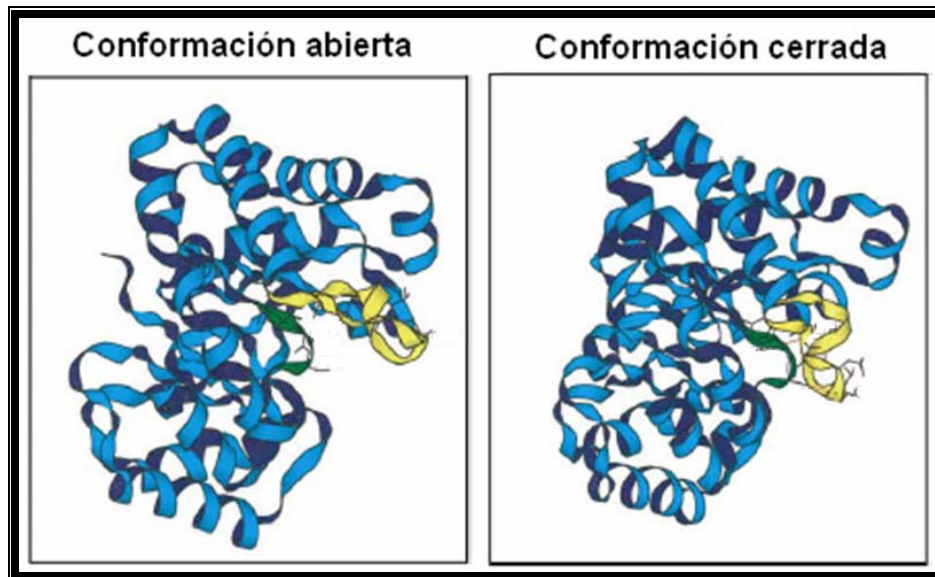


Figura 10. Conformaciones abierta y cerrada de la TIM. El asa 6 se muestra en amarillo. (Derreumaux y Schlick, 1998)

Esta asa, protege el sitio activo del contacto con el medio acuoso, y previene la formación de metilgloxal, ya que retiene al grupo fosfato del intermediario en una posición que desfavorece la reacción de eliminación de éste (Lolis y Petsko, 1990; Wierenga et al., 1991; Derreumaux y Schlick; 1998; Voet et al., 2006). Además la reacción de interconversión catalizada por la TIM es mucho más rápida que la reacción de eliminación de grupo fosfato del intermediario (Wierenga et al., 1992).

La topología de la TIM consiste en un barril $(\alpha/\beta)_8$ (Figura 11). Ésta estructura es una de las más comunes en enzimas involucradas en bioquímica metabólica, y debido a que TIM fue la primer enzima en que se observó este arreglo, permanece como el prototipo de lo que ha sido llamado patrón de plegamiento tipo barril-TIM. En la estructura de TIM el β -barril está compuesto por ocho hebras- β paralelas, las cuales forman una elipse donde los semiejes miden 12 Å y 18Å. El barril está situado en el interior de la proteína, las hebras están conectadas por asas a las hélices- α que rodean a las hebras- β . Los aminoácidos que forman el barril- β son predominantemente hidrofóbicos. Muchas de las cadenas laterales de estos aminoácidos llenan el interior del barril y forman parte del centro hidrofóbico de la enzima. El sitio activo se encuentra ubicado en el extremo carboxilo terminal de las hojas- β (Lolis et al., 1990; Wierenga et al., 1991; Wierenga et al., 1992).

TIM es únicamente activa como dímero, a pesar de que cada monómero posee los residuos requeridos para la catálisis, y de que los dos sitios activos funcionan independientemente uno de otro (Borchert et al., 1993). Se ha pensado que la dimerización induce la orientación correcta de los residuos catalíticos y que compensa las diferencias intrínsecas encontradas a nivel de monómero. Las estructuras cristalográficas del dímero nativo y de monómeros estabilizados por ingeniería molecular refuerzan esta propuesta (Chávez-Cárdenas et al., 2005; Zomosa-Signoret et al., 2007; Zárate-Pérez et al., 2009).

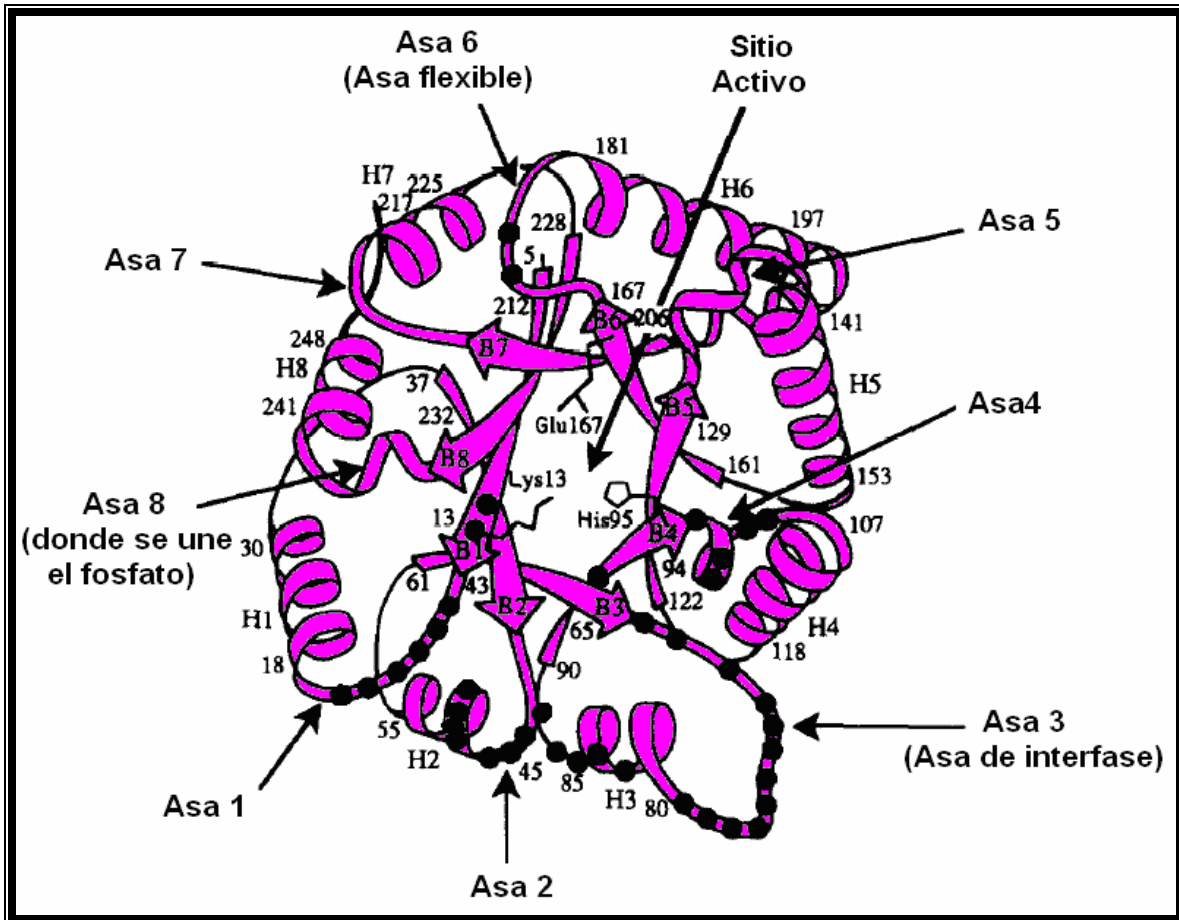


Figura 11. Topología de una subunidad de TbTIM.

Las hebras- β y las α -hélices están etiquetadas de B1 a B8 y de H1 a H8 respectivamente. Las asas que unen a las hebras y hélices están etiquetadas del asa 1 al asa 8. Se muestran las posiciones aproximadas de los residuos catalíticos Lys13, His95 y Glu167. Los 40 puntos negros indican la localización de los residuos involucrados en la interfase. (Modificado de Wierenga et al., 1991 y de Maldonado et al., 1998)

Se ha propuesto que los monómeros de la TIM son termodinámicamente inestables y que el ensamblaje de subunidades induce el máximo de estabilidad conformacional (Nájera et al., 2003). El área superficial de la interfase entre los dos monómeros es de aproximadamente 1600 \AA^2 , de manera que en el dímero hay 3200 \AA^2 de proteína que se ocultan al solvente por asociación de subunidades. A lo largo de la interfase hay 20 puentes de hidrógeno entre átomos de las dos subunidades y también hay 15 moléculas de agua que forman puentes de hidrógeno entre monómeros (Wierenga et al., 1991; Borchert et al., 1994). El 80%

de los contactos átomo-átomo entre subunidades involucran a átomos del asa 3 (Borchert et al., 1995).

Se ha observado que la TIM de *Trypanosoma cruzi* (**TcTIM**) y la TIM de *Trypanosoma brucei* (**TbTIM**) son enzimas muy similares, ya que poseen un 73% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Figura 11). Existen únicamente 65 diferencias por monómero, y de los 40 aminoácidos de interfase sólo existen 7 diferencias (Tabla 4). Al comparar las estructuras de los dímeros de TcTIM y TbTIM la raíz cuadrada de la media aritmética (RMS) para 497 átomos C α equivalentes, es 0.96 Å (Figura 12) (Zomosa-Signoret et al., 2007; Maldonado et al., 1998; Zarate-Pérez et al., 1997).

A pesar de todas sus similitudes, este par de enzimas exhibe un comportamiento diferente al ser enfrentadas a la misma sustancia: ambas enzimas presentan una susceptibilidad muy diferente a inactivación por derivatización de cisteínas con metilmetano tiosulfonato (MMTS), en donde TbTIM es aproximadamente 70 veces más resistente que TcTIM (Pérez-Montfort, 2009); cuando dichas enzimas son proteolizadas con subtilisina, se observa que TcTIM es hidrolizada al 100% mientras que en TbTIM se observa la presencia de un monómero hidrolizado y el otro monómero intacto; lo cual aparentemente es debido a una mayor flexibilidad intrínseca por parte de TcTIM (Reyes-Vivas et al., 2002). También la vía de desplegamiento inducido por Gdn-HCl es diferente para ambas enzimas: TbTIM presenta un equilibrio de desplegamiento complejo e irreversible, mientras que TcTIM posee dos intermediarios estables en el desplegamiento (Chávez- Cárdenas y Vázquez-Contreras, 2002; Chávez-Cárdenas et al., 2005); y, en el caso de ensayos de reactivación de las dos enzimas desnaturalizadas con Gdn-HCl, la formación de dímeros activos es mayor y más rápida en el caso de TcTIM que en el caso de TbTIM (Gao et al., 1998; Zomosa-Signoret et al., 2003).

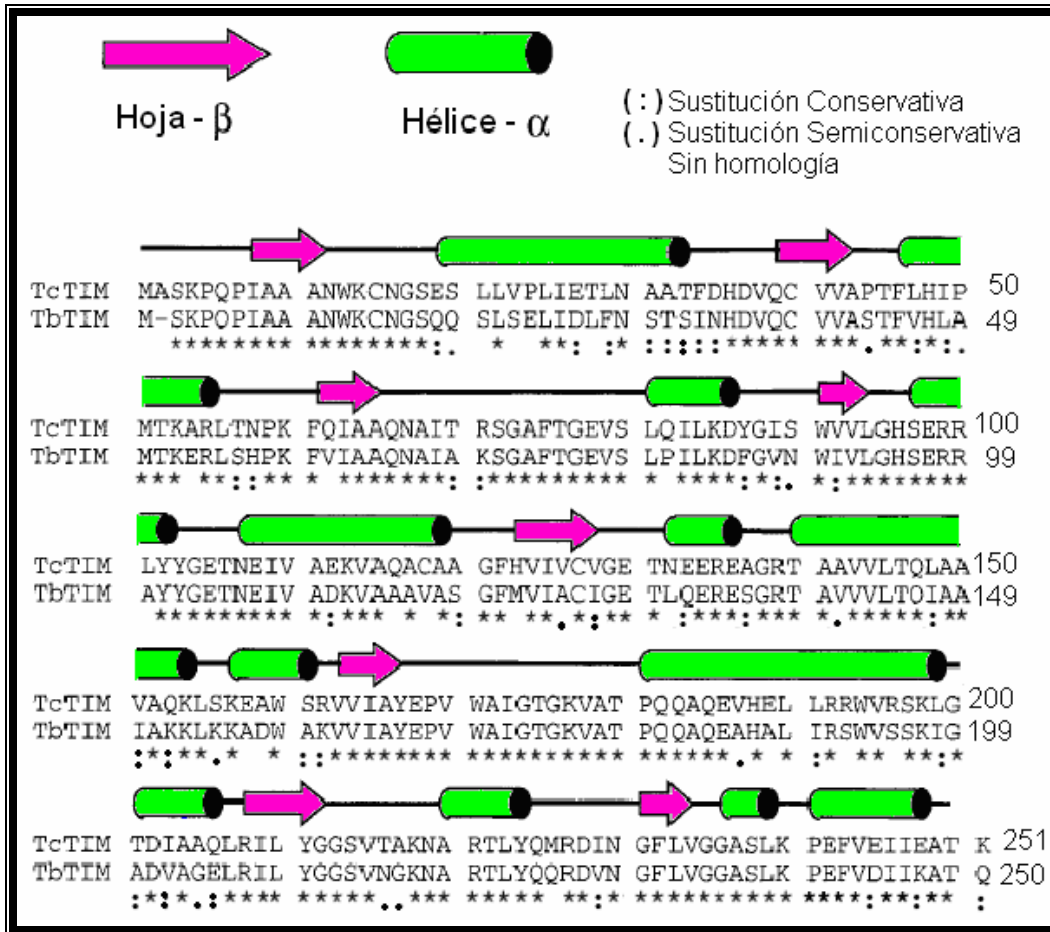


Figura 11. Alineamiento de las secuencias aminoácidos de TcTIM y TbTIM. (Modificado de Maldonado et al., 1998)

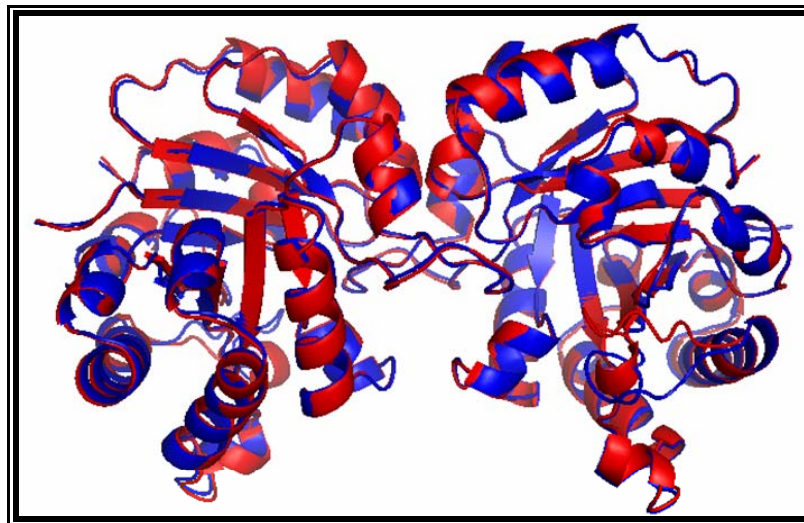


Figura 12. Sobreposición de los homodímeros de TcTIM (rojo) y TbTIM (azul). Elaborada con las coordenadas 1TCD y 5TIM de PDB

TcTIM	TbTIM	Localización en estructura
Asn12	Asn11	Hoja- β 1
Lys14	Lys13	Asa1
Cys15	Cys14	Asa1
Asn16	Asn15	Asa1
Gly17	Gly16	Asa1
Ser18	Ser17	Asa1
Glu19 *	Gln18 *	Hélice- α 1
Ser20 *	Gln19 *	Hélice- α 1
Thr45	Thr44	Asa 2
Phe46	Phe45	Asa 2
Leu47 *	Val46 *	Asa 2
His48	His47	Asa 2
Ile49 *	Leu48 *	Hélice- α 2
Pro50 *	Ala49 *	Hélice- α 2
Met51	Met50	Hélice- α 2
Gln66	Gln65	Asa 3
Asn67	Asn66	Asa 3
Ile69	Ile68	Asa 3
Ser72	Ser71	Asa 3
Gly73	Gly72	Asa 3
Ala74	Ala73	Asa 3
Phe75	Phe74	Asa 3
Thr76	Thr75	Asa 3
Gly77	Gly76	Asa 3
Glu78	Glu77	Asa 3
Val79	Val78	Asa 3
Ser80	Ser79	Asa 3
Ile83	Ile82	Hélice- α 3
Leu84	Leu83	Hélice- α 3
Asp86	Asp85	Hélice- α 3
Tyr87 *	Phe86 *	Hélice- α 3
Ile89 *	Val88 *	Hélice- α 3
Val93	Val92	Hoja- β 4
His96	His95	Asa 4
Glu98	Glu97	Asa 4
Arg99	Arg98	Asa 4
Tyr102	Tyr101	Asa 4
Tyr103	Tyr102	Asa 4
Ile173	Ile172	Asa 6
Gly174	Gly173	Asa 6

Tabla 4. Residuos de interfase en TcTIM y TbTIM, y su localización en la estructura. Los residuos marcados con * son aquellos no conservados entre ambas enzimas. (Modificado de Maldonado et al., 1998 y Wierenga y Noble, 1992)

Aunque las proteínas oligoméricas tienen procesos de desnaturalización más complejos que las monoméricas, debido a que puede existir agregación, lo que vuelve al proceso parcial o totalmente irreversible; este tipo de enzimas son excelentes modelos para estudiar las consecuencias energéticas del desplegamiento/plegamiento proteico. TIM es un homodímero, por lo tanto representa el modelo más sencillo para estudiar tanto la desnaturalización como el plegamiento y ensamblaje de una proteína oligomérica (Vázquez-Contreras et al., 2000; Cháñez-Cárdenas et al., 2002).

En la tabla 5 se resume el **patrón de desplegamiento** de la TIM de varios organismos. Se observa que en el caso de la TIM de músculo de conejo (rTIM) se trata de un proceso de dos estados (Pan et al., 2004), mientras que en TbTIM es un proceso de cuatro estados con agregación irreversible (Cháñez-Cárdenas et al., 2002).

Organismo	Patrón de desplegamiento
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (BsTIM)	$D \longrightarrow 2U$
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) (rTIM)	$D \rightleftharpoons 2U$
<i>Plasmodium falciparum</i> (PfTIM)	$D \longrightarrow D^* \longrightarrow A \longrightarrow 2U$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yTIM)	$D \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$
<i>Leishmania mexicana</i> (LmTIM)	$D \rightleftharpoons 2U$
<i>Trypanosoma brucei</i> (TbTIM)	$ \begin{array}{ccccccc} D & \rightleftharpoons & D^* & \rightleftharpoons & 2M & \rightleftharpoons & 2U \\ & & \downarrow & & \downarrow & & \\ & & A & & A & & \end{array} $
<i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM)	$D \rightleftharpoons D^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$

Tabla 5. Patrón de desplegamiento de la TIM de diferentes organismos. D es el dímero nativo, D* representa al dímero no-nativo, M* el monómero plegado. U es el monómero desplegado y A son agregados. (Modificado de Cháñez-Cárdenas et al., 2005)

Las transiciones de desplegamiento inducido por agentes caotrópicos, han sido usadas para estimar la estabilidad conformacional de las proteínas, siendo necesaria la reversibilidad de estas reacciones para el análisis termodinámico del proceso de plegamiento (Chávez-Cárdenas et al., 2002). El conocimiento de la vía de desplegamiento no puede por si mismo determinar la vía cinética de plegamiento, ya que un estado intermediario parcialmente plegado que es estable a algunas concentraciones de desnaturizante, puede no estar presente cuando la proteína se repliega en ausencia de desnaturizante (Reyes-López et al., 2008). Los estudios de plegamiento protéico involucran la caracterización termodinámica, cinética y estructural de las proteínas nativas, desplegadas y de sus estados intermedios (Chávez-Cárdenas et al., 2002).

Existen diversos estudios cinéticos y al equilibrio de proteínas homólogas; en muchos de los casos las rutas de plegamiento siguen caminos similares para estas proteínas, y ciertas conformaciones se conservan durante la evolución. Sin embargo, existen proteínas homólogas que se pliegan por vías diferentes como es el caso de la TIM (Vázquez-Contreras et al., 2004). Debido a que la estructura terciaria y cuaternaria de TIM en diferentes especies es esencialmente idéntica, TIM es un excelente modelo de estudio de evolución de mecanismos de plegamiento (Chávez-Cárdenas et al., 2002).

La **reactivación de TIM** de diferentes organismos a partir de monómeros desnaturizados también ha sido objeto de diversos estudios (Waley, 1973; McVittie et al., 1977; Garza-Ramos et al., 1992; Rietveld y Ferreira, 1998; Gao et al., 1998; Zomosa-Signoret et al., 2003), los cuales señalan que, para el plegamiento de TIM, inicialmente los monómeros deben plegarse para formar “sitios de reconocimiento” característicos para la dimerización (Waley, 1973), y también que esta asociación entre subunidades es el paso determinante de la renaturalización (McVittie et al., 1977)

En los ensayos de reactivación de las diferentes TIM's, es claro que la formación del dímero activo a partir de monómeros desplegados no es del 100%.

Esta es una observación común en estudios de reactivación de enzimas. De hecho está bien documentado que la fracción de proteína que falla en formar enzimas catalíticamente competentes se agrega a través de una reacción de segundo (o mayor) orden que compite con las reacciones de la vía de reactivación (Zomosa-Signoret et al., 2003; Rodríguez-Almazan et al., 2007).

Se ha visto que, a pesar de que TcTIM y TbTIM son muy similares estructuralmente, poseen cinéticas de reactivación muy diferentes. Como ya se mencionó, la reactivación a partir de monómeros desplegados es más rápida y mas eficiente en TcTIM que en TbTIM (Gao et al., 1998; Zomosa-Signoret et al., 2003). Además, para TcTIM la renaturalización es reversible, lo cual indica que en el proceso no se forman agregados como los que se forman en el caso de TbTIM (Vázquez-Contreras et al., 2004)

Zomosa-Signoret, realizó los ensayos de reactivación de TcTIM y TbTIM a diferentes concentraciones de enzima (Figura 13), y observó que el proceso es una secuencia de reacciones moleculares uni-bi-uni. La primera reacción unimolecular incluye el plegamiento de monómeros, en la reacción bimolecular dos monómeros plegados se unen y forman un dímero no-nativo, esto es seguido por arreglos internos que llevan a la formación del dímero nativo catalíticamente competente (Zomosa-Signoret et al., 2003).

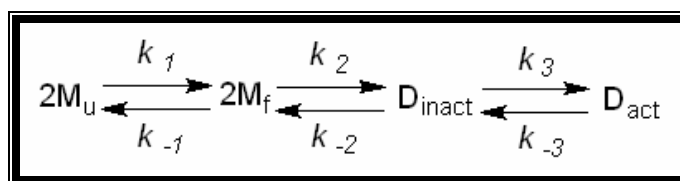


Figura 13. Secuencia de Reactivación TIM.

M_u es monómero desplegado. M_f es monómero plegado. D_{inact} es el dímero inactivo.

D_{act} es dímero activo (Zomosa-Signoret et al., 2003)

Las constantes de velocidad de la reacción indican que a relativamente bajas concentraciones de proteína, el paso limitante en la reactivación es la reacción de asociación. En cambio a altas concentraciones de proteína la transición de dímero inactivo a dímero activo es el paso limitante. En TcTIM la

asociación y los arreglos internos de dímero inactivo a dímero activo son más rápidos que en TbTIM (Zomosa-Signoret et al., 2003).

TcTIM se reactiva alrededor del 90% con concentraciones de monómero de 200 nM (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima), mientras que a 400 nM la formación del dímero activo es solamente alrededor del 50% (Figura 14). Esto indica que la concentración de monómeros es fundamental para determinar la vía que siguen los intermediarios de la reacción, ya que a altas concentraciones de proteína se favorece la agregación. En el caso de TbTIM la máxima reactivación se produjo a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima y fue del 60% (Figura 14) (Zomosa-Signoret et al., 2003).

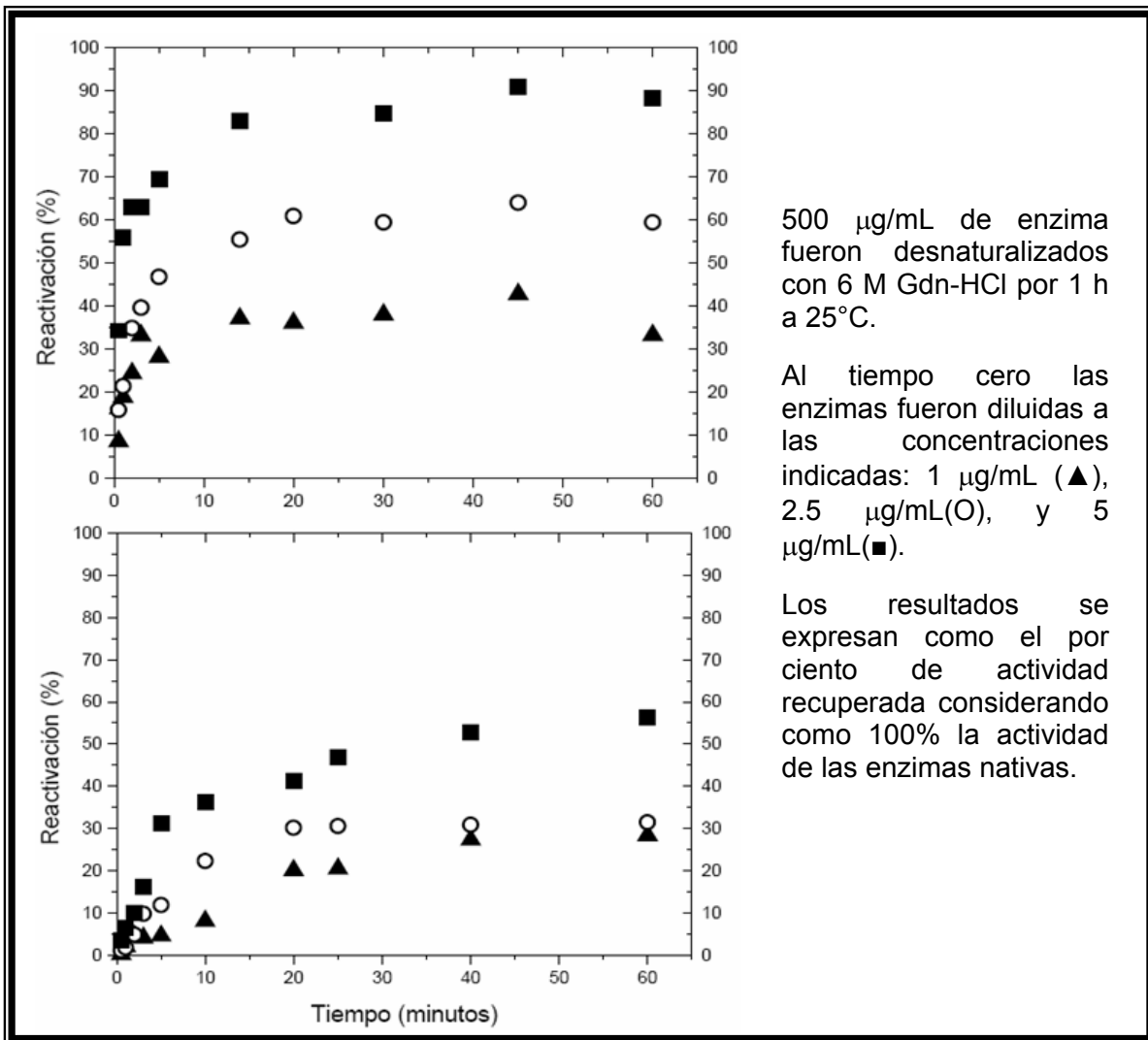


Figura 14. Reactivación de TcTIM (arriba) y de TbTIM (abajo) a diferentes concentraciones. (Modificado de Zomosa-Signoret et al., 2003)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad biológica de las proteínas depende de su estructura cuaternaria. Si una proteína se encuentra incorrectamente plegada, es probable que su actividad biológica disminuya. Por tanto, el plegamiento de proteínas es un problema fundamental en bioquímica.

Estudios de desplegamiento/plegamiento, han revelado que TcTIM y TbTIM se comportan de forma muy diferente, a pesar de ser enzimas homólogas (con tan sólo 65 de 250 aminoácidos diferentes por monómero). Es por eso que el estudio de la reactivación de TbTIM y TcTIM, es relevante como un ejemplo de plegamiento de proteínas.

En nuestro caso, deseamos conocer cuáles regiones de TcTIM y TbTIM son importantes en el diferente comportamiento de la reactivación de ambas enzimas. Para resolver este problema, utilizamos las seis quimeras de TcTIM y TbTIM existentes en el laboratorio (Tabla 2).

3. OBJETIVO

Determinar las regiones que hacen mas eficiente el plegamiento de TcTIM con respecto al de TbTIM mediante la caracterización de la cinética de reactivación de las quimeras de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las quimeras utilizadas en el presente proyecto fueron diseñadas por M.C. Itzhel García Torres anteriormente, según la estrategia resumida en la tabla 6.

Quimera	Estrategia
TcTIM 1-6; TbTIM 7,8	Síntesis comercial
TcTIM 1-5; TbTIM 6-8	Síntesis comercial
TcTIM 1-4; TbTIM 5-8	Síntesis comercial
TcTIM 1-3; TbTIM 4-8	Restricción con <i>HaeIII</i>
TcTIM 1-2; TbTIM 3-8	Restricción con <i>SgrAI</i>
TcTIM 1; TbTIM 2-8	Restricción con <i>DraIII</i>

Tabla 6. Estrategia utilizada para la obtención de las quimeras de TbTIM y TcTIM

El gen que codifica para cada una de las quimeras fue clonado en el plásmido de sobreexpresión pET-3a, el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina (Novagen) y posteriormente introducido mediante transformación a *Escherichia coli* de la cepa BL21(DE3)pLysS (pET System, Novagen). Las células bacterianas que contienen la información para expresar las enzimas, se conservan en glicerol al 8% a -70°C para su posterior uso.

4.1 Sobreexpresión de las enzimas

A partir del glicerol de las células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que contienen la información para sobreexpresar la enzima de interés, se inocularon 20 mL de medio Luria-Bertani (LB) (Apéndice 1), complementado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina (Sigma); este precultivo se incubó a 37°C con agitación constante durante toda la noche.

Con el precultivo se inoculó un litro de medio LB, complementado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, para dar una $A_{600\text{nm}} = 0.1$. Posteriormente se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una $A_{600\text{nm}} = 0.6-0.8$; en ese momento se le agregó el inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Organic Research) a una concentración final de 0.4 mM. Durante 3 horas se continuó la incubación a 37°C con agitación constante. El cultivo se centrifugó 20 minutos a $4\ 637 \times g$ a 4°C , y posteriormente el botón se congeló a -70°C .

4.2 Purificación de las enzimas

Para purificar TcTIM silvestre (WT) se resuspendió el botón de las células que sobreexpresaron la proteína en 15 mL de amortiguador de lisis (Ver apéndice 2), el cual, para la purificación de TbTIM WT contiene además NaCl a una concentración de 300 mM para aumentar la fuerza iónica y despegar la proteína de las membranas.

Debido a que TIM es una proteína que permanece soluble en el citoplasma celular, fue necesario lisar las células. Para ello se usaron ondas de alta frecuencia (sonicación), realizando de 4 a 7 ciclos de 40 segundos con 1 minuto de descanso entre cada ciclo. La muestra se mantuvo en un baño de hielo-agua para evitar que se calentara. El lisado se ultracentrifugó a 143 791 x g durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante, en el caso de TbTIM WT, se diluyó en MES 50 mM (pH 6.3), hasta que la concentración final de NaCl fuera 20mM; en el caso de TcTIM WT el sobrenadante no se diluyó.

El sobrenadante del paso anterior se cargó en una columna de intercambio catiónico, *SP Sepharose Fast Flow* (Amersham Bioscience); en un sistema de FPLC (Biorad, BioLogic System), con un flujo constante de 3 mL/min. Posteriormente se eluyó con un gradiente de NaCl 0 a 500 mM (mezclando automáticamente amortiguador A y B; ver apéndice 2), manteniendo el flujo a 3 mL/min. Se colectaron las fracciones del pico mayoritario del cromatograma (el pico comienza generalmente cuando hay 28% de amortiguador B) y se precipitaron con sulfato de amonio al 70% de saturación (472 g/L), a 4°C con agitación constante durante 2 horas, tras las cuales se centrifugó a 13 865 x g durante 20 minutos a 4°C.

El botón se resuspendió en 2 mL de amortiguador C (trietanolamina (TEA) 100 mM y EDTA 1 mM, pH7.4), y, una vez disuelto, se agregaron 3 mL de una disolución 3.6 M de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄); (con la finalidad de tener el botón resuspendido con 2.2 M de (NH₄)₂SO₄, que es la concentración a la cual se debe encontrar equilibrada la columna en la cual se va a cargar la muestra).

La muestra se cargó en una columna hidrofóbica, *Butyl-Toyopearl* (Supelco), y se eluyó con un gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.2 a 0 M de (mezclando de manera automática el amortiguador C y el amortiguador D; ver apéndice 2) con un flujo constante de 3 mL/min. Se colectaron las fracciones del pico mayoritario del cromatograma, el cual generalmente inicia cuando hay en la mezcla 8% de amortiguador D. Con esta purificación se obtienen 25 mg de enzima por litro de cultivo.

De los ensayos realizados anteriormente en el laboratorio, se determinó el método de purificación para las enzimas quiméricas (Tabla 7).

Quimera	Método de purificación
TcTIM 1-6; TbTIM 7,8	TcTIM WT
TcTIM 1-5; TbTIM 6-8	TcTIM WT
TcTIM 1-4; TbTIM 5-8	TbTIM WT
TcTIM 1-3; TbTIM 4-8	TbTIM WT
TcTIM 1-2; TbTIM 3-8	TbTIM WT
TcTIM 1; TbTIM 2-8	TbTIM WT

Tabla 7. Método de purificación de las enzimas quiméricas.

(TcTIM WT= sin NaCl en el amortiguador de lisis.

TbTIM WT= 300 mM en el amortiguador de lisis y dilución del sobrenadante obtenido de la ultracentrifugación de las células lisadas.)

Las enzimas puras fueron mantenidas a 4°C precipitadas al 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en TEA 100 mM y EDTA 1 mM, pH 7.4.

Para realizar los ensayos, la suspensión se centrifugó y el botón se resuspendió en 100mM de TEA/1 mM EDTA, pH 7.4, y se dializó a 4°C con agitación constante, con el mismo amortiguador durante 30 minutos, transcurridos los cuales, se renovó el amortiguador y se dializó bajo las mismas condiciones durante dos horas más.

4.3 Determinación de concentración de proteína

La concentración de enzima fue determinada por el método descrito por Pace, según el cual la absorbancia de una proteína a 280nm depende del

contenido de Trp, Tyr y Cistinas (cisteínas formando puentes disulfuro); según lo cual el coeficiente de absortividad molar $\epsilon(\lambda=280\text{ nm})$ de una proteína plegada en agua puede ser predicho con la siguiente ecuación (Pace et al., 1995):

$$\epsilon(\lambda) = (\#\text{Trp}) (\epsilon_{\lambda} \text{ Trp}) + (\#\text{Tyr}) (\epsilon_{\lambda} \text{ Tyr}) + (\#\text{Cistinas}) (\epsilon_{\lambda} \text{ Cistinas})$$

En donde:

$$\epsilon(\lambda=280\text{ nm}) \text{ Trp} = 5\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon(\lambda=280\text{ nm}) \text{ Tyr} = 1\,490\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon(\lambda=280\text{ nm}) \text{ Cistinas} = 125\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$$

La determinación de $\epsilon(280)$ de una proteína es útil para estimar la concentración de la misma haciendo uso de la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon IC$$

En donde:

ϵ = Coeficiente de absortividad molar ($\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)

l = Longitud de paso de luz a través de la celda (cm)

C = Concentración molar de la proteína (M)

Para TbTIM $\epsilon(\lambda=280\text{ nm})$ es $34950\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y para TcTIM $36440\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Para fines prácticos se utilizó el coeficiente de absortividad específica (a), con el cual se obtuvo la concentración de proteína en g/L (Tabla 8).

Enzima	$a(\lambda=280\text{ nm}) (\text{L g}^{-1}\text{ cm}^{-1})$
TbTIM WT	1.302
TcTIM WT	1.333
TcTIM 1-6; TbTIM 7,8	1.335
TcTIM 1-5; TbTIM 6-8	1.349
TcTIM 1-4; TbTIM 5-8	1.348
TcTIM 1-3; TbTIM 4-8	1.353
TcTIM 1-2; TbTIM 3-8	1.301
TcTIM 1; TbTIM 2-8	1.302

Tabla 8. Coeficiente de absortividad específica a 280 nm de enzimas silvestres (*Wild Type*) y quimeras, calculado con la herramienta ProtParam Tool en <http://expasy.org/tools/protparam.html>

$$A = a l C$$

En donde:

a = Coeficiente de absortividad específica ($L g^{-1} cm^{-1}$)

l = Longitud de paso de luz a través de la celda (cm)

C = Concentración de la proteína (g/L)

Para cuantificar las enzimas se midió su absorbancia a 280nm en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud.

4.4 Determinación de Actividad Específica

La actividad enzimática de las triosafosfato isomerasas silvestres y quiméricas fue determinada a 25°C y pH 7.4 en 1 mL de mezcla de reacción (Tabla 9), en la dirección de G3P a DHAP mediante una reacción enzimática acoplada a la enzima α -glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (α -GDH), la cual se encarga de reducir DHAP a glicerol-3-fosfato, utilizando como cofactor al dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH), que es oxidado a NAD^+ (Figura 15). La reacción acoplada consume un mol de NADH por cada mol de DHAP que se forma. Con un exceso de α -GDH, la velocidad de oxidación de NADH es equivalente a la velocidad de producción de DHAP a partir del G3P.

Mezcla de reacción	
Sustancia	Concentración
Trietanolamina-HCl (Sigma)	100 mM
EDTA (Sigma)	1 mM
Gliceraldehído-3-fosfato (Ver apéndice 3)	1 mM
NADH (Roche)	0.2 mM
α -glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (Roche)	1.25 U/mL

Tabla 9. Mezcla de reacción para medir la actividad enzimática de la triosafosfato isomerasa. La reacción se inicia por la adición de la TIM (generalmente 5ng).

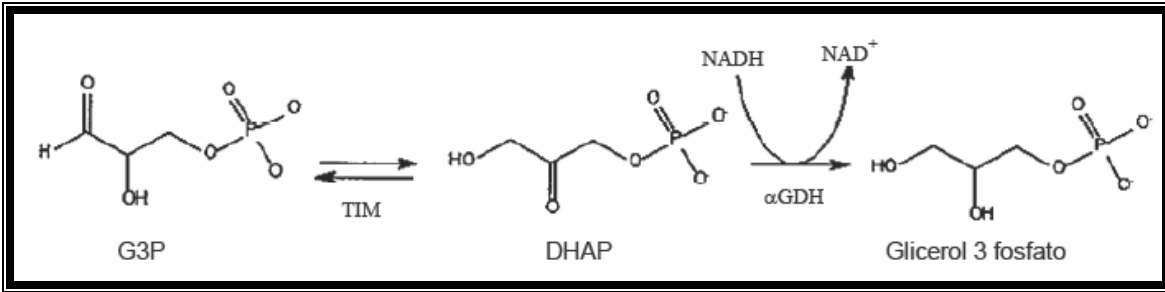


Figura 15. Reacción enzimática acoplada usada para determinar la actividad de TIM.

Ya que NADH tiene un máximo de absorbancia a $\lambda = 340\text{nm}$, y su forma oxidada (NAD^+) no absorbe a esa longitud de onda; la actividad enzimática fue determinada por el decremento en la absorbancia de la mezcla a 340 nm como función del tiempo en un espectrofotómetro Beckman DU7500 con un dispositivo multicelda termorregulado a 25°C . La reacción fue iniciada por la adición de TIM.

Una unidad de actividad (u.a.) representa la conversión de $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto a 25°C , mientras que la actividad específica se define como unidad de actividad por miligramo de enzima, y las unidades en que se expresa son $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Debido a que, para calcular la actividad específica de la triosafosfato isomerasa, se sigue espectrofotométricamente la desaparición de NADH, es necesario conocer su coeficiente de absortividad molar, el cual es: $\epsilon(\lambda = 340 \text{ nm}) 6.22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, lo que es igual a $6.22 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad específica se calculó de la siguiente manera:

$$AE = \frac{\Delta OD / \text{min}}{\epsilon_{340} \text{NADH} \left(\frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right) * \text{proteína} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * l(\text{cm})} = \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$$

En donde:

AE = Actividad Específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

$\Delta\text{OD}/\text{min}$ = Cambio de densidad óptica por minuto. (min^{-1})

$\varepsilon(\lambda = 340 \text{ nm})$ de NADH = $6.22 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Proteína = Cantidad de enzima usada para la medición (mg/mL)

l = Longitud de paso de luz a través de la celda (cm)

4.5 Ensayo de reactivación de la enzima desplegada por Gdn-HCl

Las enzimas fueron desnaturalizadas incubando $500 \mu\text{g}$ de proteína por mL a 25°C durante 1 hora en una solución de 100 mM TEA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 6 M Gdn-HCl a pH 7.4.

Para comenzar el proceso de reactivación, alícuotas de la mezcla anterior se diluyeron 100 veces en 100 mM TEA, 1 mM EDTA y 1 mM DTT pH 7.4. Después de la dilución se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, e inmediatamente se adicionaron a la mezcla de reacción para medir actividad. Para todos los ensayos la concentración de Gdn-HCl remanente en el medio en el cual las enzimas se reactivaron fue 60 mM . Esta concentración de desnaturalizante no afecta la reactivación de las enzimas, ni a la α -GDH de la mezcla de reacción, lo cual se corroboró midiendo la actividad específica de la enzima con esa cantidad remanente de Gdn-HCl, y resultó ser la misma que la de la enzima sin desnaturalizante.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudios de la reactivación de TIM

Los procesos de desplegamiento y de reactivación de la TIM de varias especies han sido objeto de diversos estudios. La vía de desplegamiento inducido por Gdn-HCl para la TIM de diferentes organismos (Tabla 5) varía grandemente, pudiendo tratarse de un proceso de dos estados (como es en el caso de *Bacillus stearothermophilus*), hasta un equilibrio de desplegamiento complejo e irreversible como es el caso de TbTIM (Chávez- Cárdenas y Vázquez-Contreras, 2002; Chávez-Cárdenas et al., 2005). La cinética de reactivación a partir de monómeros desplegados ha sido estudiada por Waley (1973), Rietveld y Ferreira (1998) y Pan et al. (2004) en TIM de conejo; McVittie et al. (1977) en TIM de pollo; Gao et al. (1998) en TIM de humano y TIM de *Leishmania mexicana*; y por Gao et al. (1998) y Zomosa-Signoret et al. (2003) en TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) y TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM). Todos estos grupos coinciden en que el proceso de reactivación de la TIM inicia con el plegamiento de los monómeros, con lo cual se forman “sitios de reconocimiento” para la dimerización, lo que da como resultado un dímero inactivo (al cual se le considera el estado de glóbulo fundido) y por reacomodos intramoleculares se forma el dímero activo (Figura 16).

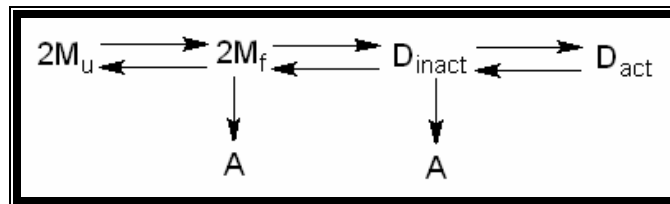


Figura 16. Equilibrio de Reactivación TIM.

M_u es monómero desplegado. M_f es monómero plegado. D_{inact} es el dímero inactivo.

D_{act} es dímero activo y A son los agregados

(Modificado de Zomosa-Signoret et al., 2003)

En este trabajo nos enfocamos a la reactivación de TcTIM y de TbTIM; ya que en el caso de cinéticas de reactivación de las dos enzimas silvestres desnaturalizadas con Gdn-HCl, la formación de dímeros activos es mayor y más rápida en el caso de TcTIM que en el caso de TbTIM; lo cual es inesperado debido a que este par de enzimas son muy similares (únicamente 65 aminoácidos diferentes por monómero de 250 aminoácidos). Esto sugiere que variaciones

aparentemente pequeñas en la composición de aminoácidos de ambas enzimas, tienen un impacto importante en su plegamiento (Gao et al., 1998; Zomosa-Signoret et al., 2003); es por eso que se utilizaron enzimas quiméricas de TcTIM y TbTIM (Tabla 2) para determinar cuál o cuáles son las regiones involucradas en el diferente comportamiento de ambas TIM durante su proceso de reactivación.

5.2 Controles para los ensayos de reactivación.

Debido a la relación estructura-función de la TIM, es decir, a que únicamente en forma dimérica es activa, la medición de la actividad específica es el criterio más sensible para monitorear el plegamiento de la enzima.

El método para seguir la cinética de reactivación consistió en incubar durante 1 hora 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las enzimas, en 6 M de Gdn-HCl, ya que se ha reportado que a esta concentración de agente caotrópico los monómeros se despliegan. Transcurrida la incubación, la mezcla anterior se diluyó 100 veces iniciándose así el proceso de reactivación, de manera que en el tubo donde se reactiva la enzima, ésta se encuentra a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 60 mM de Gdn-HCl.

Para asegurar que la concentración remanente de Gdn-HCl no afecta ni a la TIM, ni a la α -GDH usada en la mezcla de reacción para la medición de la actividad; se realizaron controles en los que se midió la actividad específica a la TIM sin agente caotrópico y con 60 mM de Gdn-HCl inmediatamente después de diluirla 100 veces (En las gráficas 1 a 12 las barras marcadas como 0 mM- t_0 y 60 mM- t_0 respectivamente). Además, dichos tubos (con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TIM) se incubaron a 25°C durante 1 hora (debido a que ese es el tiempo en que se siguió la reactivación de las enzimas) para conocer el efecto de la incubación sobre la TIM (En las gráficas 1 a 12 la barra marcada como 0 mM-1 h), y el efecto de la incubación mas la concentración remanente de Gdn-HCl (En las gráficas 1 a 12 la barra marcada como 60 mM-1 h). Para conocer el porcentaje de actividad específica que se pierde por efecto de incubación, los datos de las gráficas 1, 3, 5,

7, 9 y 11 se normalizaron considerando como 100 por ciento la actividad específica de la enzima recién diluida a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin agente caotrópico. Los datos normalizados se encuentran en las gráficas 2, 4, 6, 8, 10 y 12 y en las tablas 11 a 16. Todas las gráficas son el resultado del promedio de dos mediciones con su correspondiente error estándar.

En las gráficas 1 a 12 se observa que no existe diferencia entre la barra que representa la enzima recién diluida a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin Gdn-HCl (0 mM- t_0) y la barra de la enzima recién diluida y con la concentración remanente de Gdn-HCl (60 mM- t_0); lo que indica que dicha concentración de desnaturizante no afecta ni a la TIM ni a la α -GDH utilizada para medir la actividad. En todos los casos notamos una disminución de la actividad específica cuando la enzima fue incubada 1 hora a 25°C a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin y con concentración remanente de Gdn-HCl (0 mM-1 h y 60 mM-1 h). La pérdida de actividad sin y con desnaturizante fue del mismo orden, lo que nos hace pensar que ese cambio en la actividad específica es resultado de la incubación de la enzima bajo las condiciones ya mencionadas, y no de la cantidad remanente de Gdn-HCl.

Observamos que la actividad específica de las quimeras se incrementó conforme se intercambiaban regiones de TcTIM por regiones de TbTIM, a excepción de la quimera TcTIM 1; TbTIM 2-8 (Tabla 10).

Quimera	Actividad Específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
TcTIM 1-6; TbTIM 7,8	1422
TcTIM 1-5; TbTIM 6-8	2477
TcTIM 1-4; TbTIM 5-8	3657
TcTIM 1-3; TbTIM 4-8	4274
TcTIM 1-2; TbTIM 3-8	4566
TcTIM 1; TbTIM 2-8	3822

Tabla 10. Actividad específica de las enzimas quiméricas. En las gráficas 1, 3, 5, 7, 9 y 11 corresponde a la barra 0 mM- t_0

La quimera TcTIM 1-6; TbTIM 7,8 (Figura 19) fue la de menor actividad específica, lo que significa que el cambio de las regiones 7 y 8 de cada monómero

de TcTIM por las de TbTIM, da como resultado una enzima funcionalmente afectada. Es decir, la región carboxilo-terminal de cada monómero juega un papel importante en la funcionalidad de la enzima. En estas dos regiones existen 7 diferencias entre TcTIM y TbTIM, de las cuales 4 son sustituciones conservativas, 2 son sustituciones semiconservativas y 1 es una sustitución sin homología (Figura 17). El cambio de estos 7 aminoácidos es el responsable de que se haya abatido la actividad específica con respecto a TcTIM silvestre.

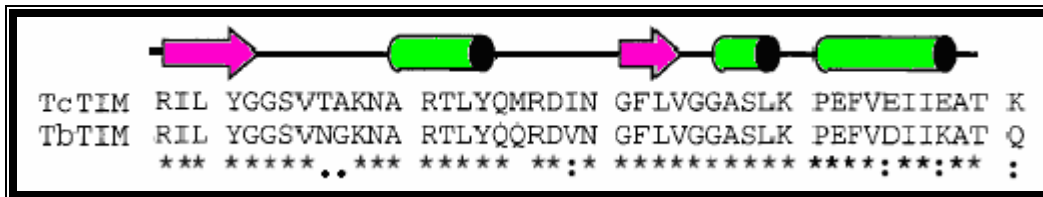


Figura 17. Alineamiento de las regiones 7 y 8 de TcTIM y TbTIM. (Aminoácidos 207 a 250).

(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y (sin símbolo) Sustitución sin homología.

Conforme se fueron intercambiando más regiones de TcTIM por las de TbTIM la enzima fue recuperando funcionalidad, lo cual se reflejó en un aumento en la actividad específica. Con la quimera TcTIM 1; TbTIM 2-8 (Figura 24) no se observó un aumento en la actividad como sería esperado de seguir con la tendencia, sino que la actividad específica disminuyó en relación a la quimera TcTIM 1-2; TbTIM 3-8, lo cual indica que el cambio de la región 2 de TcTIM por la de TbTIM tuvo como resultado que la enzima perdiera funcionalidad. Entre la región 2 de TcTIM y TbTIM existen 7 diferencias: 4 son sustituciones conservativas, 2 son sustituciones semiconservativas y 1 es sustitución sin homología (Figura 18).

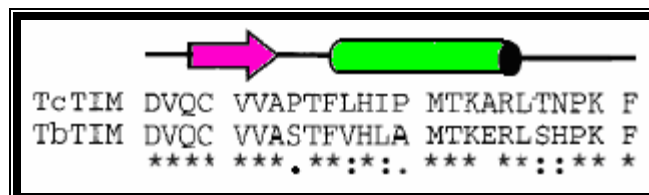
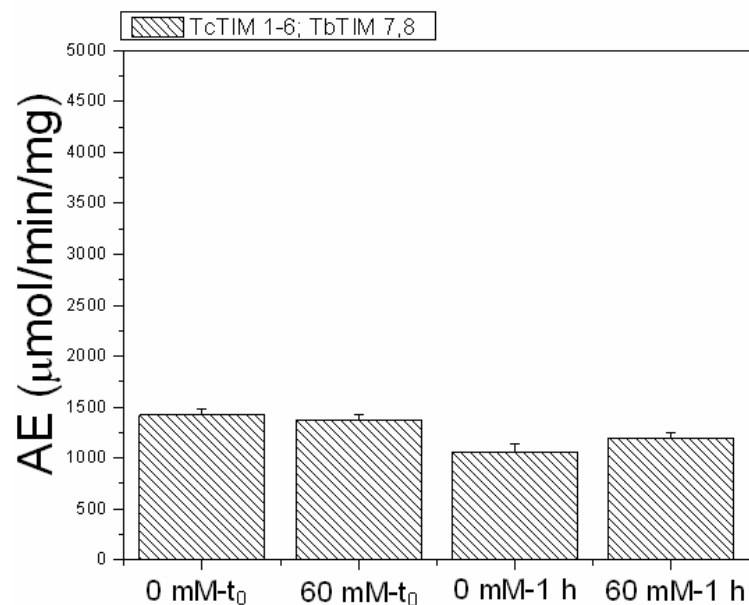
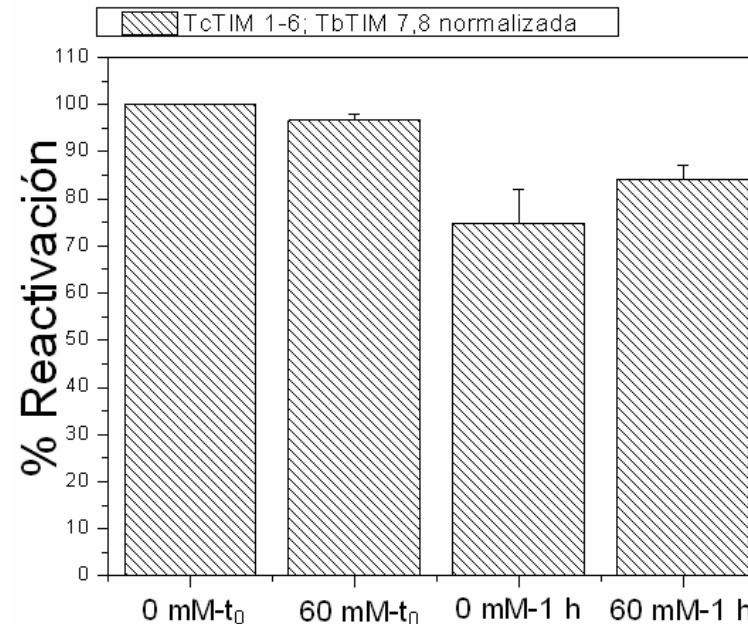


Figura 18. Alineamiento de la región 2 de TcTIM y TbTIM. (Aminoácidos 36 a 60).

(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y (sin símbolo) Sustitución sin homología.



Gráfica 1. Controles de TcTIM 1-6; TbTIM 7,8.

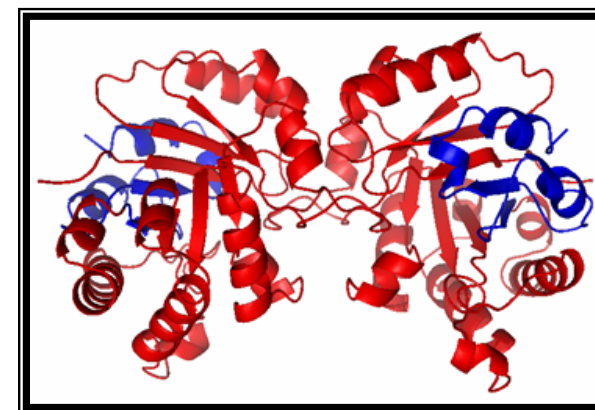


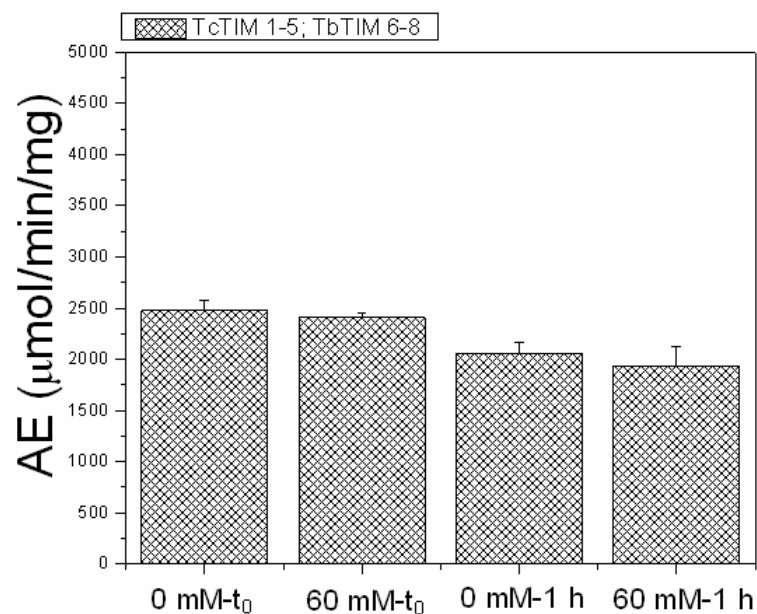
Gráfica 2. Controles normalizados de TcTIM 1-6; TbTIM 7,8.

	Porcentaje promedio	Error estándar
0 mM Gnd-HCl t ₀	100	0
60 mM Gnd-HCl t ₀	96.68	1.31
0 mM Gnd-HCl 1 h	74.78	7.12
60 mM Gnd-HCl 1 h	84.22	3.02

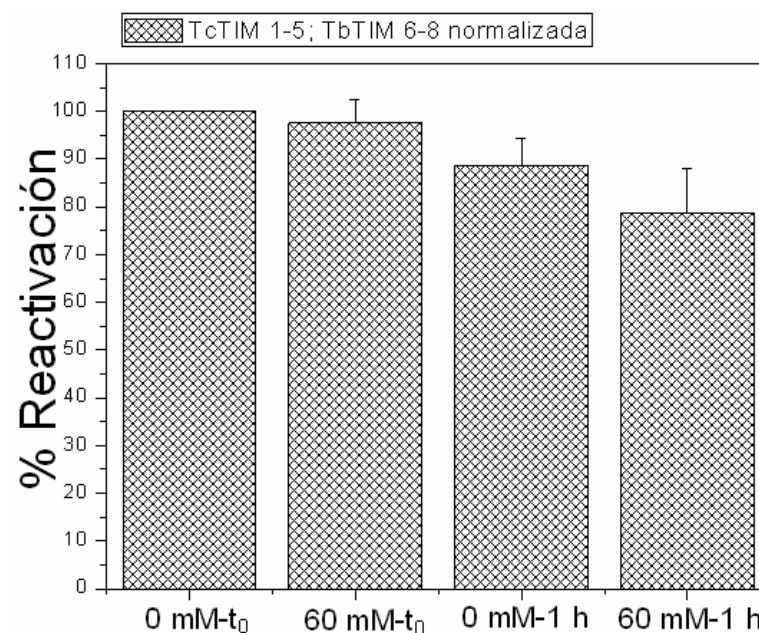
Tabla 11. Valores numéricos de los controles normalizados de TcTIM 1-6; TbTIM 7,8.

Figura 19. Esquema representativo de la quimera TcTIM 1-6; TbTIM 7,8. En rojo las regiones 1 a 6 y en azul las regiones 7 y 8 de TIM. Elaborada con las coordenadas 5TIM de PDB





Gráfica 3. Controles de TcTIM 1-5; TbTIM 6-8.

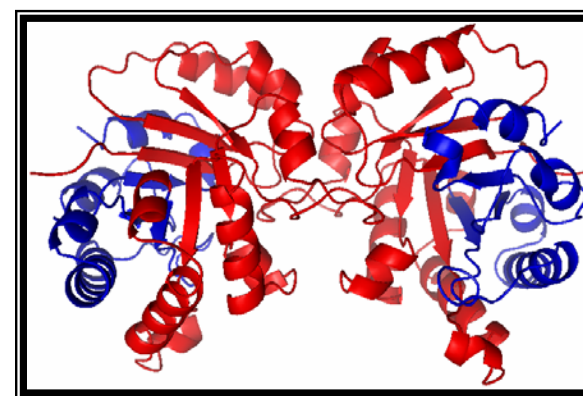


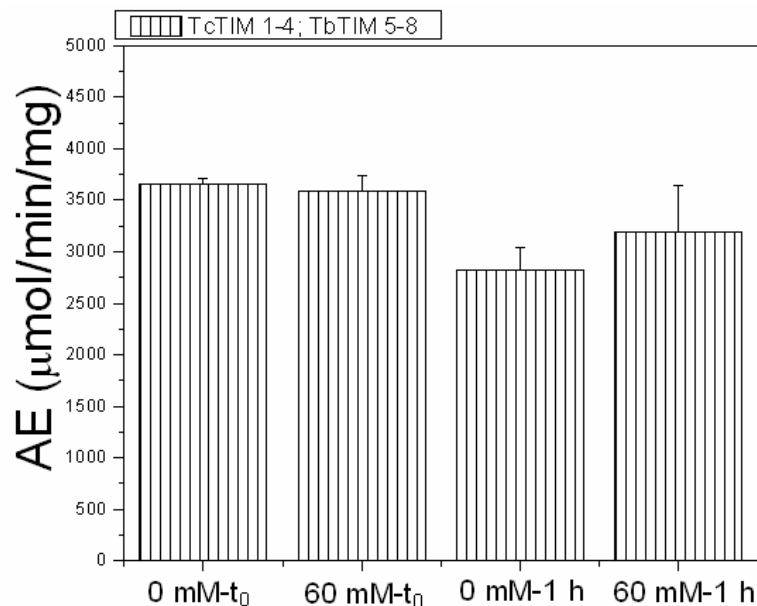
Gráfica 4. Controles normalizados de TcTIM 1-5; TbTIM 6-8.

	Porcentaje promedio	Error estándar
0 mM Gnd-HCl t ₀	100	0
60 mM Gnd-HCl t ₀	97.50	4.97
0 mM Gnd-HCl 1 h	88.71	5.66
60 mM Gnd-HCl 1 h	78.63	9.38

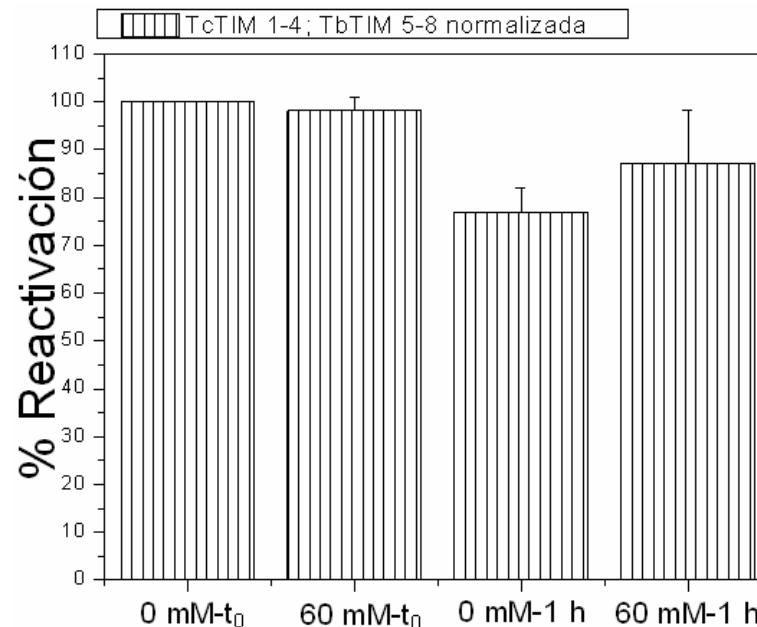
Tabla 12. Valores numéricos de los controles normalizados de TcTIM 1-5; TbTIM 6-8.

Figura 20. Esquema representativo de la quimera TcTIM 1-5; TbTIM 6-8. En rojo las regiones 1 a 5 y en azul las regiones 6 a 8 de TIM. Elaborada con las coordenadas 5TIM del PDB





Gráfica 5. Controles de TcTIM 1-4; TbTIM 5-8.

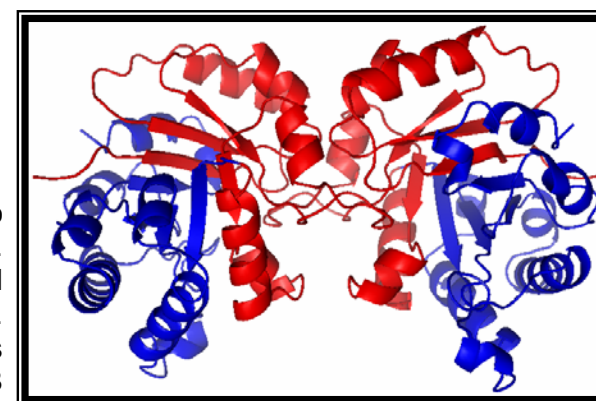


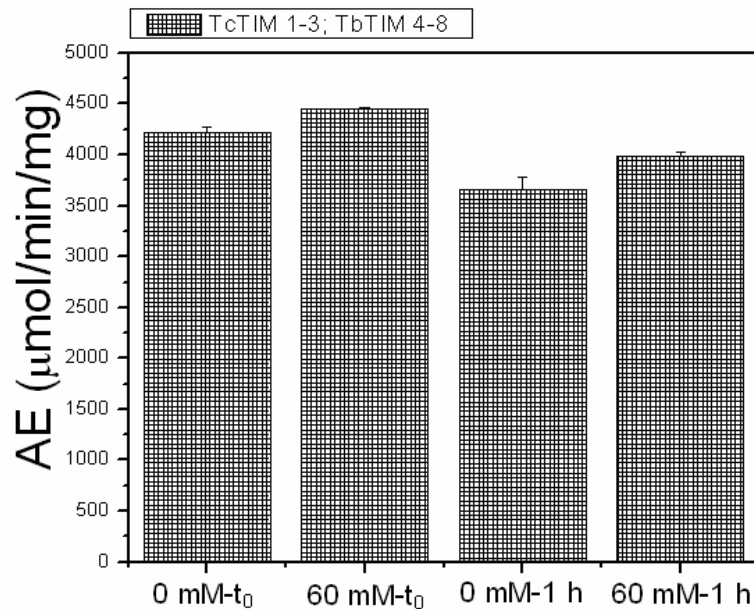
Gráfica 6. Controles normalizados de TcTIM 1-4; TbTIM 5-8.

	Porcentaje promedio	Error estándar
0 mM Gnd-HCl t ₀	100	0
60 mM Gnd-HCl t ₀	98.16	2.91
0 mM Gnd-HCl 1 h	77	4.97
60 mM Gnd-HCl 1 h	87.14	11.17

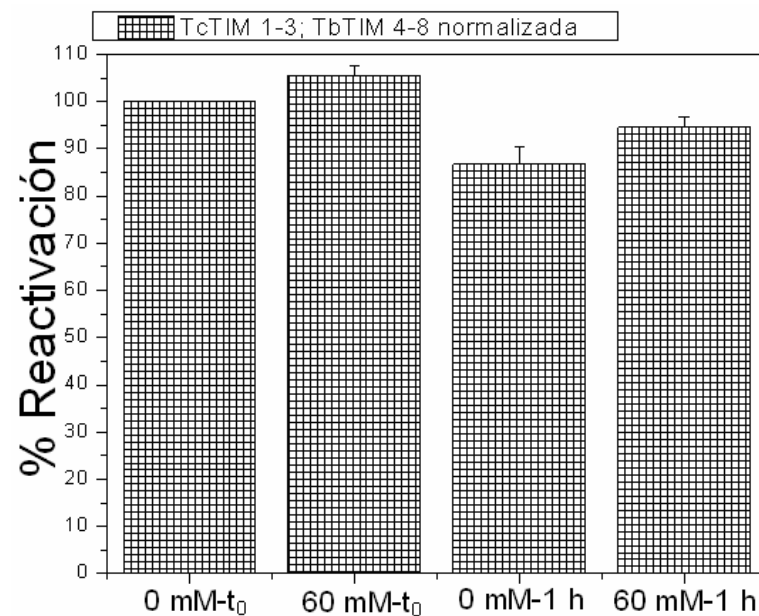
Tabla 13. Valores numéricos de los controles normalizados de TcTIM 1-4; TbTIM 5-8.

Figura 21. Esquema representativo de la quimera TcTIM 1-4; TbTIM 5-8. En rojo las regiones 1 a 4 y en azul las regiones 5 a 8 de TIM. Elaborada con las coordenadas 5TIM de PDB





Gráfica 7. Controles de TcTIM 1-3; TbTIM 4-8.

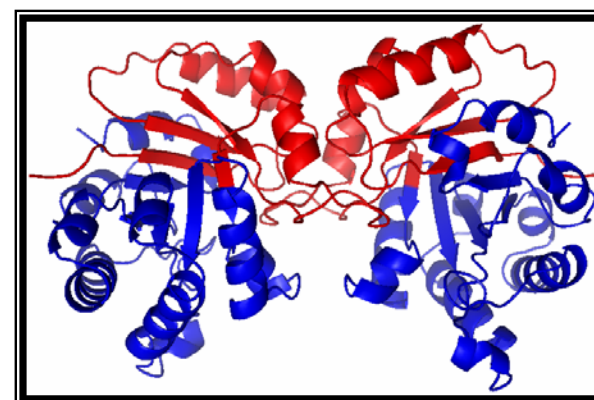


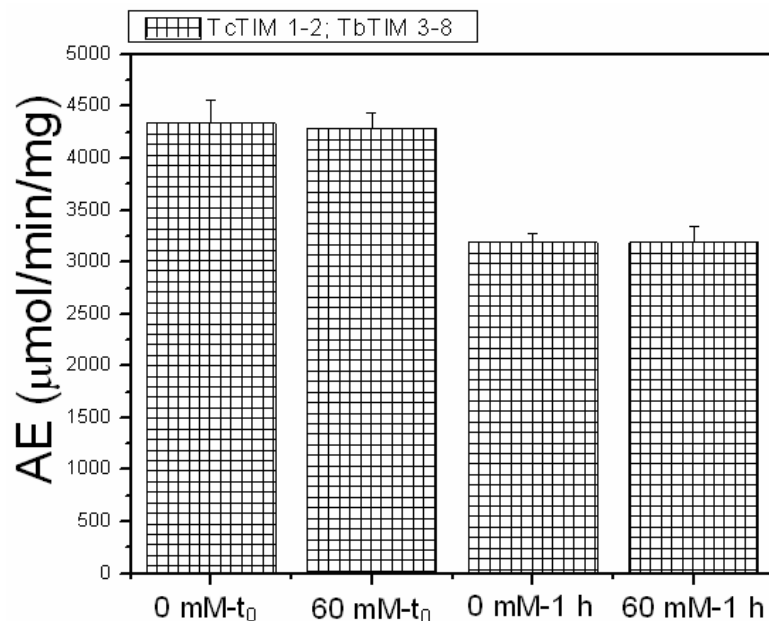
Gráfica 8. Controles normalizados de TcTIM 1-3; TbTIM 4-8.

	Porcentaje promedio	Error estándar
0 mM Gnd-HCl t ₀	100	0
60 mM Gnd-HCl t ₀	105.55	1.9
0 mM Gnd-HCl 1 h	86.75	3.82
60 mM Gnd-HCl 1 h	94.57	2.08

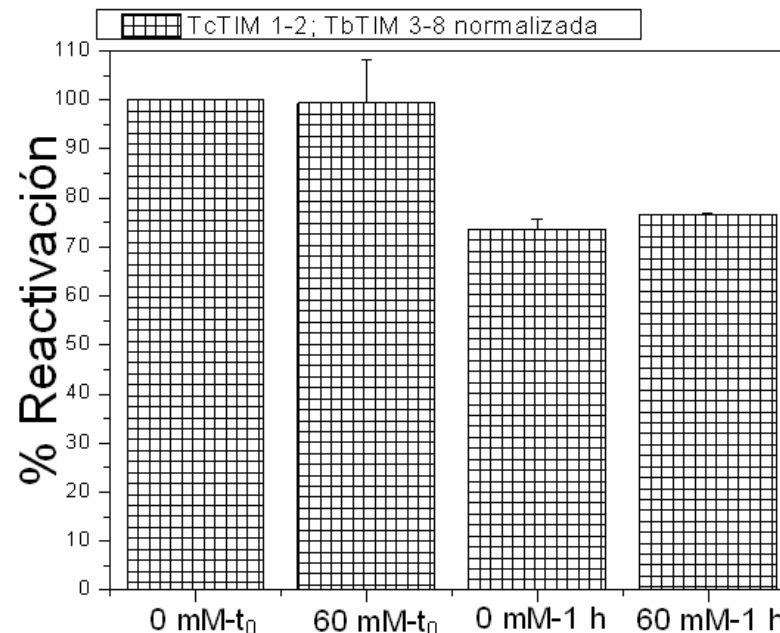
Tabla 14. Valores numéricos de los controles normalizados de TcTIM 1-3; TbTIM 4-8.

Figura 22. Esquema representativo de la quimera TcTIM 1-3; TbTIM 4-8. En rojo las regiones 1 a 3 y en azul las regiones 4 a 8 de TIM. Elaborada con las coordenadas 5TIM de PDB





Gráfica 9. Controles de TcTIM 1-2; TbTIM 3-8.

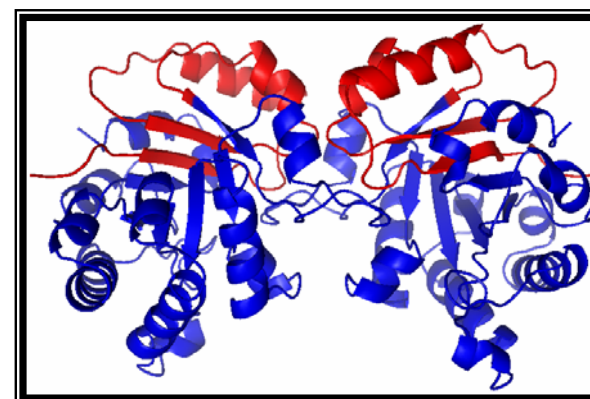


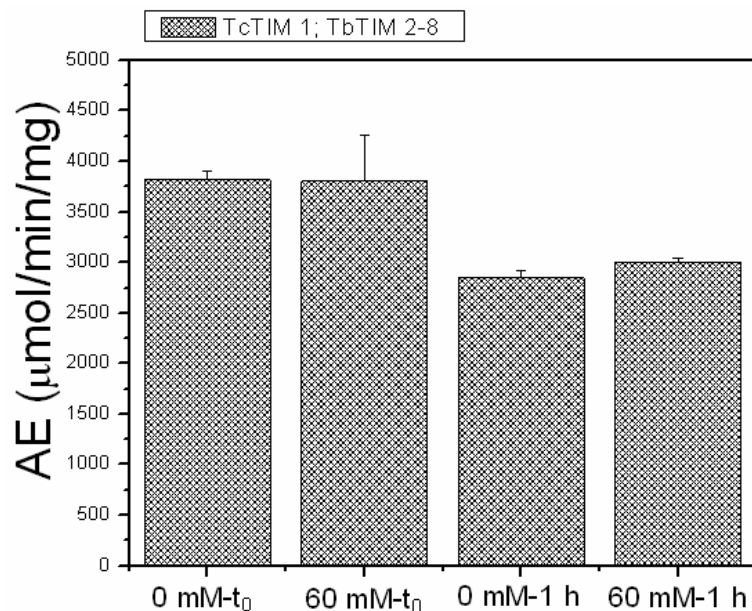
Gráfica 10. Controles normalizados de TcTIM 1-2; TbTIM 3-8.

	Porcentaje promedio	Error estándar
0 mM Gnd-HCl t ₀	100	0
60 mM Gnd-HCl t ₀	99.44	8.84
0 mM Gnd-HCl 1 h	73.7	1.91
60 mM Gnd-HCl 1 h	76.65	0.265

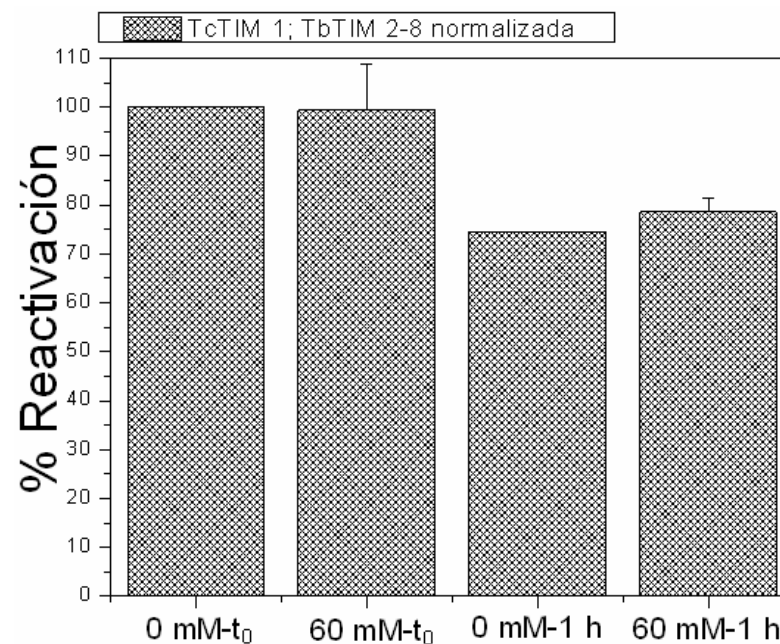
Tabla 15. Valores numéricos de los controles normalizados de TcTIM 1-2; TbTIM 3-8.

Figura 23. Esquema representativo de la quimera TcTIM 1-2; TbTIM 3-8. En rojo las regiones 1 y 2 y en azul las regiones 3 a 8 de TIM. Elaborada con las coordenadas 5TIM de PDB





Gráfica 11. Controles de TcTIM 1; TbTIM 2-8.

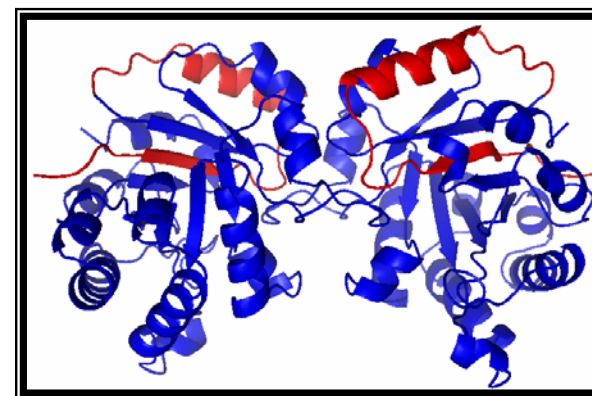


Gráfica 12. Controles normalizados de TcTIM 1; TbTIM 2-8.

	Porcentaje promedio	Error estándar
0 mM Gnd-HCl t ₀	100	0
60 mM Gnd-HCl t ₀	99.31	9.55
0 mM Gnd-HCl 1 h	74.48	0.11
60 mM Gnd-HCl 1 h	78.57	2.92

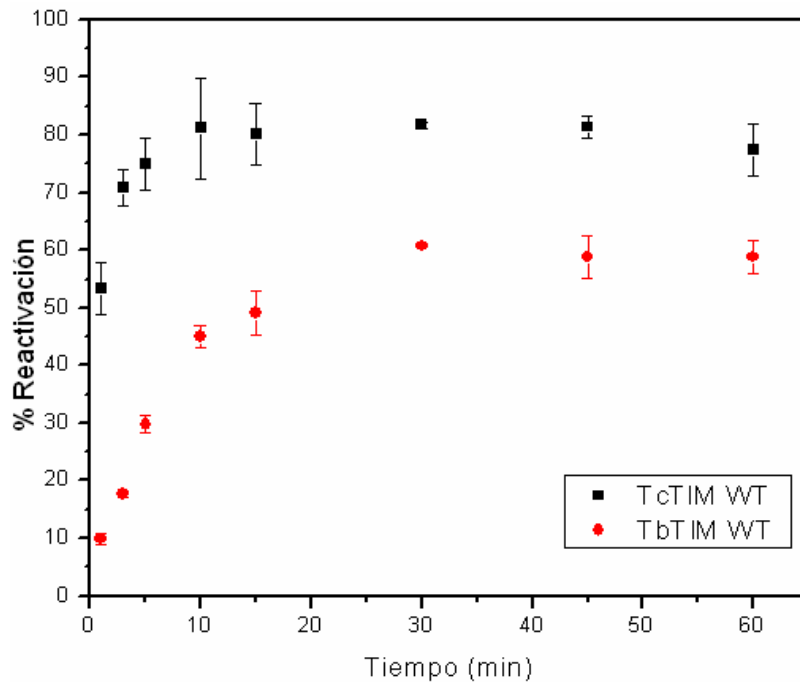
Tabla 16. Valores numéricos de los controles normalizados de TcTIM 1; TbTIM 2-8.

Figura 24. Esquema representativo de la quimera TcTIM 1; TbTIM 2-8. En rojo la región 1 y en azul las regiones 2 a 8 de TIM. Elaborada con las coordenadas 5TIM de PDB



5.3 Cinética de reactivación de las quimeras de TcTIM y TbTIM.

Zomosa-Signoret et al. (2003) realizó estudios de cinética de reactivación de TcTIM y TbTIM a partir de monómeros desplegados a diferentes concentraciones (Figura 14). Notó que la mayor reactivación para TcTIM se observa con concentraciones de monómero de 200 nM (5 $\mu\text{g/mL}$ de enzima), mientras que con el doble de concentración de monómero, la formación del dímero activo es alrededor de la mitad. Esto indica que la concentración de monómeros es importante para determinar la vía que siguen los intermediarios de la reacción, ya que a altas concentraciones de enzima se favorece la agregación. En el caso de TbTIM la máxima reactivación se produjo a 5 $\mu\text{g/mL}$ de enzima (Zomosa-Signoret et al., 2003). Es por eso que para las enzimas quiméricas se caracterizó la cinética de reactivación con una concentración de enzima de 5 $\mu\text{g/mL}$. En las gráficas 13 a 20 se observa el promedio de dos mediciones de reactivación con su correspondiente error estándar. Para obtener el porcentaje de reactivación se consideró como 100% a la actividad específica de la enzima incubada a 5 $\mu\text{g/mL}$, 1 hora a 25°C con la cantidad remanente de Gdn-HCl (Condiciones representadas por la barra 60 mM-1 h en las gráficas 1,3,5,7,9, y 11).



Gráfica 13. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●).

En la gráfica 13 se observan las cinéticas de reactivación de las enzimas silvestres. La reactivación de TcTIM es mayor y más rápida que la de TbTIM; al primer minuto se observa que TcTIM se reactivó más del 50% mientras que TbTIM únicamente se reactivó el 10%; lo cual se debe a que en TcTIM la asociación de monómeros y los arreglos internos de dímero inactivo a dímero activo son más rápidos que en TbTIM (Zomosa-Signoret et al., 2003)

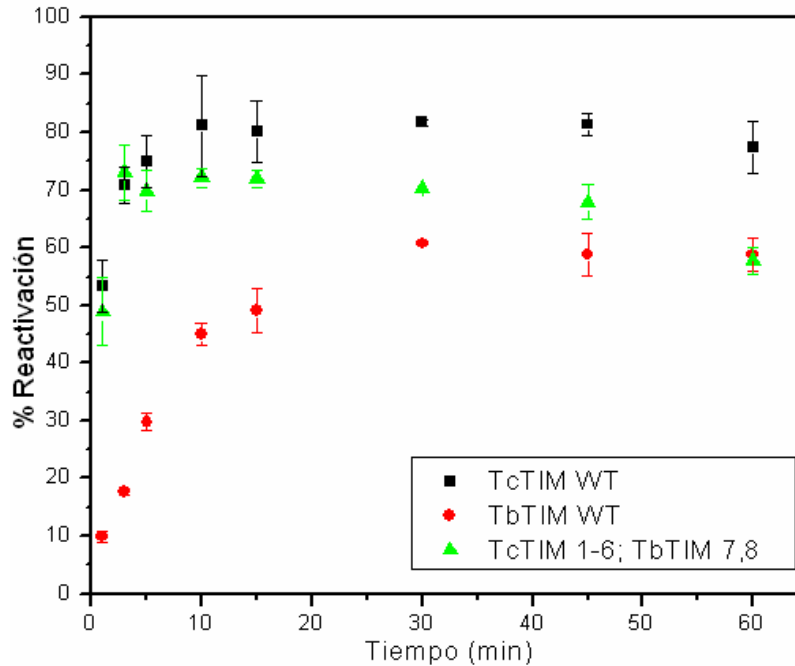
Las gráficas 14 a 19 muestran la cinética de reactivación de cada una de las seis quimeras en relación a las dos enzimas silvestres. En la gráfica 20 se colocaron las cinéticas de reactivación de las dos enzimas silvestres y las de las 6 quimeras, con la finalidad de comparar el comportamiento en la reactivación de las 8 enzimas.

En los ensayos de reactivación de las TIMs, se observa que la formación del dímero activo a partir de monómeros desplegados no es del 100%. Esta observación es común en estudios de reactivación de enzimas. Está bien documentado que la fracción de proteína que falla en formar enzimas catalíticamente competentes se agrega a través de una reacción de segundo (o mayor) orden que compite con las reacciones de la vía de reactivación (Zomosa-Signoret et al., 2003; Rodríguez-Almazan et al., 2007). En la gráfica 13 es posible observar que TbTIM se reactiva menos que TcTIM; lo cual indica que durante el proceso de reactivación se forma un mayor porcentaje de agregados en el caso de TbTIM.

5.3.1 Cinética de reactivación de TcTIM 1-6; TbTIM 7,8

En la gráfica 14 se aprecia la cinética de reactivación de la enzima quimérica **TcTIM 1-6; TbTIM 7,8** (Figura 19), en relación a las cinéticas de reactivación de TcTIM y TbTIM silvestres. Se observa que en el primer minuto el porcentaje de reactivación es similar al de TcTIM; sin embargo, conforme transcurrió la cinética se observó que la reactivación de la quimera no sólo no fue

de igual magnitud que la de TcTIM, sino que además el porcentaje de reactivación fue disminuyendo; lo cual lo atribuimos a que el plegamiento de la proteína es un proceso dinámico (Figura 16).

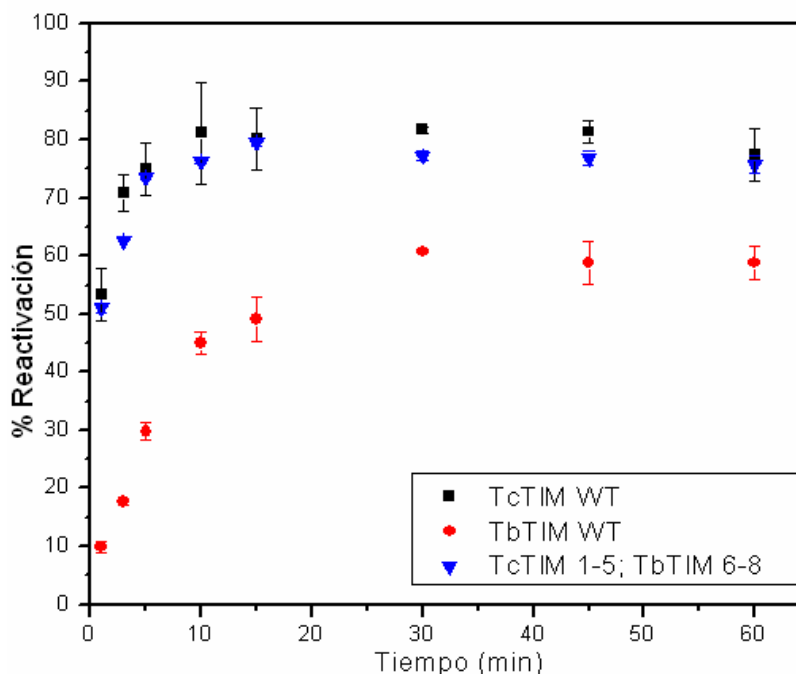


Gráfica 14. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●) y TcTIM 1-6; TbTIM 7,8 (▲).

Zomosa-Signoret et al. (2003) observaron que 1 minuto es suficiente para que se plieguen los monómeros, por lo que en el tiempo siguiente ocurre la formación del dímero inactivo y los arreglos moleculares que dan como resultado el dímero activo; especie que nosotros podemos monitorear en los ensayos de reactivación, debido a que únicamente el dímero activo es capaz de catalizar la interconversión de G3P a DHAP. El que disminuyera el porcentaje de reactivación conforme avanzó el tiempo, sugiere que el equilibrio se desplazó a especies diferentes al dímero activo, por ejemplo a monómeros plegados o dímeros inactivos. También pudo ocurrir agregación por interacción con cadenas proteicas incorrectamente plegadas (Figura 16). Esto es indicativo que el cambio de las regiones 7 y 8 de TcTIM por las de TbTIM altera el equilibrio de reactivación con respecto a la enzima silvestre.

5.3.2 Cinética de reactivación de TcTIM 1-5; TbTIM 6-8

La gráfica 15 muestra a la cinética de reactivación de la enzima quimérica **TcTIM 1-5; TbTIM 6-8** (Figura 20). Se aprecia que es casi idéntica a la cinética de reactivación de TcTIM. En este caso no se observó la disminución en el porcentaje de reactivación conforme avanzó el tiempo como en el caso anterior. Esto nos hace pensar que la región 6 de TbTIM, en adición a las regiones 7 y 8 de la misma enzima, estabiliza el equilibrio de reactivación (Figura 16) una vez que se ha formado el dímero activo.



Gráfica 15. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●) y TcTIM 1-5; TbTIM 6-8 (▼).

Entre la región 6 de TcTIM y de TbTIM existen 10 diferencias: 5 son sustituciones conservativas, hay 2 sustituciones semiconservativas y 3 sustituciones sin homología (Figura 25). Hay que resaltar que ninguna de las diferencias se encuentra en el asa 6 (Figura 10), que corresponde a los residuos 170 a 180; esta asa se conoce como asa flexible o asa catalítica, porque se cierra en presencia del sustrato para evitar la eliminación del grupo fosfato del intermediario.

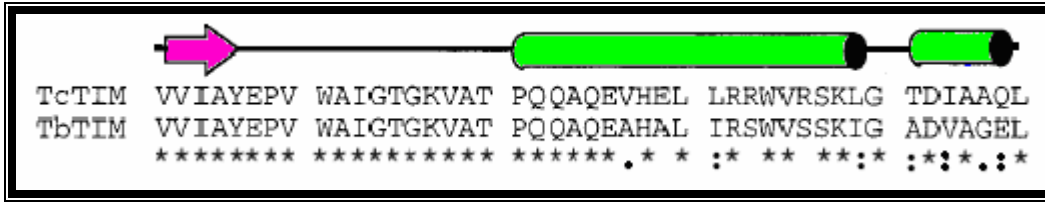
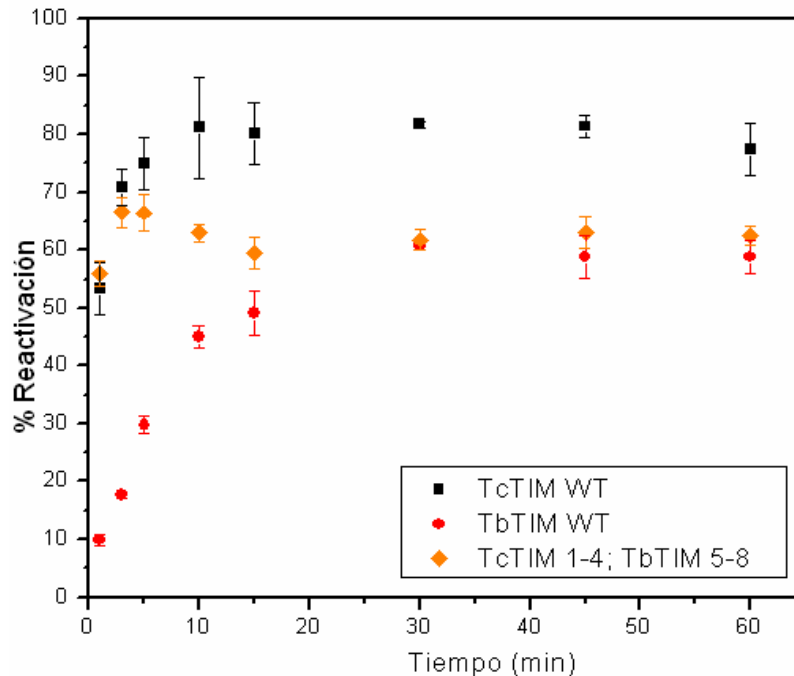


Figura 25. Alineamiento de la región 6 de TcTIM y TbTIM. (Aminoácidos 162 a 206).

(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y (sin símbolo) Sustitución sin homología.

En total entre las regiones 6, 7 y 8 TcTIM y TbTIM suman 17 aminoácidos diferentes. El cambio de estos 17 residuos en TcTIM por los de TbTIM en la quimera TcTIM 1-5; TbTIM 6-8, estabiliza el dímero activo en relación a la quimera TcTIM 1-6; TbTIM 7-8, la cual únicamente tiene 7 diferencias con respecto a TcTIM.

5.3.3 Cinética de reactivación de TcTIM 1-4; TbTIM 5-8



Gráfica 16. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●) y TcTIM 1-4; TbTIM 5-8 (◆).

En la gráfica 16 se muestra la cinética de reactivación de la enzima quimérica **TcTIM 1-4; TbTIM 5-8** (Figura 21), la cual corresponde a la mitad de TcTIM (regiones 1 a 4) y la mitad de TbTIM (regiones 5 a 8). Se observa que en el primer minuto el porcentaje de reactivación es igual al de TcTIM; pero como en el caso de TcTIM 1-6; TbTIM 7-8 (Gráfica 14), la reactivación final no fue de igual magnitud a la de TcTIM. Además, se observa una disminución en el porcentaje de reactivación al transcurrir el tiempo. Esta disminución en el porcentaje de reactivación fue mayor a la de la quimera TcTIM 1-6; TbTIM 7,8.

La diferencia entre la quimera TcTIM 1-4; TbTIM 5-8 (Gráfica 16) con la TcTIM 1-5; TbTIM 6-8 (Gráfica 15), es que se le intercambié la región 5 de TcTIM por la de TbTIM, además de las regiones 6, 7 y 8. La adición de la región 5 provocó la desestabilización del equilibrio de reactivación (Figura 16), dando como resultado que al avanzar la cinética, se inactivara una fracción de la enzima que ya se había reactivado. La región 5 es la que posee mayor cantidad de diferencias entre TcTIM y TbTIM (Figura 26). De las 15 diferencias totales 8 son sustituciones conservativas, 3 son sustituciones semiconservativas y 4 son sustituciones sin homología.

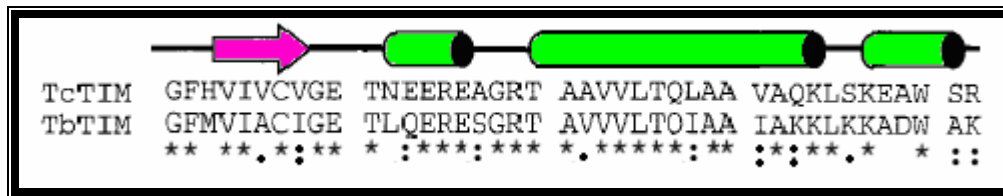


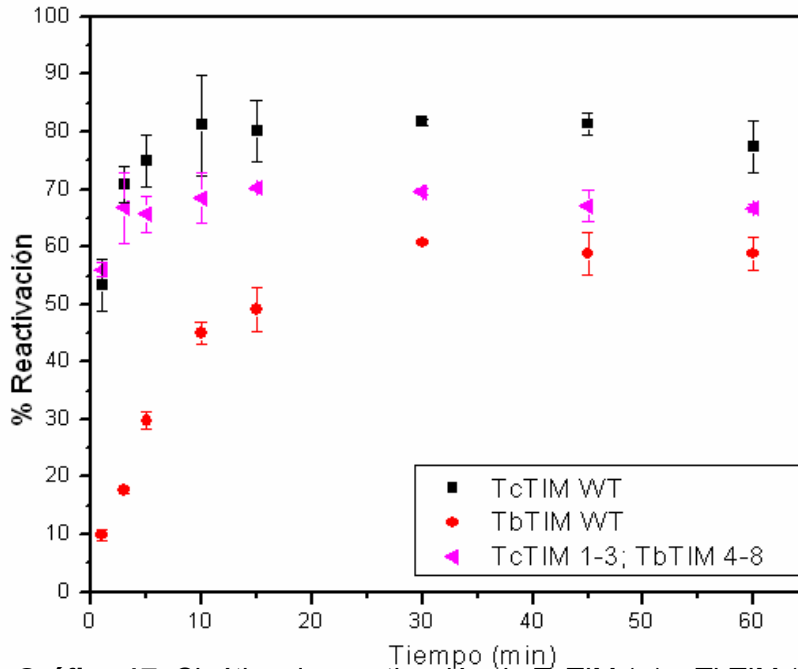
Figura 26. Alineamiento de la región 5 de TcTIM y TbTIM.
(Aminoácidos 120 a 161).

(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y
(sin símbolo) Sustitución sin homología.

5.3.4 Cinética de reactivación de TcTIM 1-3; TbTIM 4-8

La gráfica 17 corresponde a la cinética de reactivación de la enzima quimérica **TcTIM 1-3; TbTIM 4-8** (Figura 22). Observamos que en el primer minuto la enzima se reactiva aproximadamente de la misma manera que TcTIM, es decir, más rápidamente que TbTIM. A partir del minuto 5 es posible ver que la

reactivación de la quimera fue mayor que la de TbTIM pero menor que la de TcTIM. A diferencia de la quimera de la gráfica 16, no se observa una drástica disminución de dímero activo.



Gráfica 17. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●) y TcTIM 1-3; TbTIM 4-8 (◄).

A la enzima quimérica TcTIM 1-4; TbTIM 5-8 (Gráfica 16), se le cambió la región 4 de TcTIM por la de TbTIM y se obtuvo la quimera TcTIM 1-3; TbTIM 4-8. Entre la región 4 de TcTIM y TbTIM existen 5 diferencias, de las cuales 2 son sustituciones conservativas, y 3 son sustituciones sin homología.

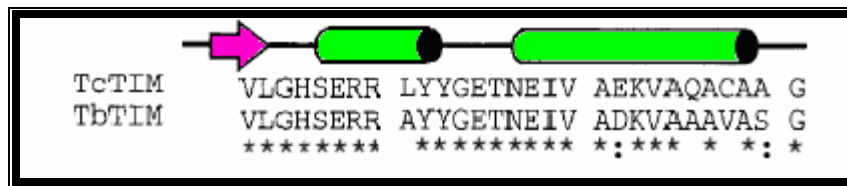


Figura 27. Alineamiento de la región 4 de TcTIM y TbTIM. (Aminoácidos 92 a 119).

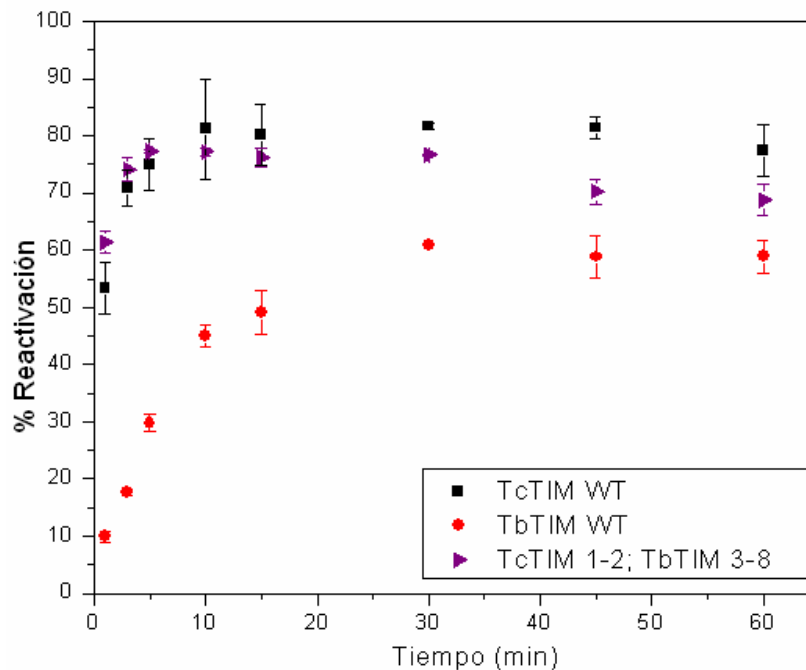
(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y (sin símbolo) Sustitución sin homología.

El cambio de esta región dio como resultado la estabilización del equilibrio de reactivación una vez que se formó el dímero activo; sin embargo, esta enzima tuvo una reactivación intermedia entre los valores finales de TbTIM y TcTIM.

Cuando una enzima se despliega, puede perder solubilidad y agregarse, lo cual se debe a interacciones intramoleculares de porciones proteicas que no estaban disponibles en la enzima nativa; de manera que si una fracción de la enzima al desnaturalizarse se agregó, es posible que no se renaturalice al eliminar el agente caotrópico, tal como sucede con TbTIM. Lo anterior nos hace pensar que el cambio de la región 4 de TcTIM por la de TbTIM provoca que al desnaturalizarse la enzima, una fracción de ésta se agregue.

5.3.5 Cinética de reactivación de TcTIM 1-2; TbTIM 3-8

La gráfica 18 representa la cinética de reactivación de la enzima quimérica TcTIM 1-2; TbTIM 3-8 (Figura 23).



Gráfica 18. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●) y TcTIM 1-2; TbTIM 3-8 (▲).

En esta gráfica observamos que la reactivación de la quimera al primer minuto es incluso un poco mayor que la de TcTIM WT. Esto nos indica que en la enzima que tiene únicamente las regiones 1 y 2 de TcTIM y el resto de TbTIM, la asociación de los monómeros y los arreglos internos para formar el dímero activo son ligeramente más rápidos que en TcTIM. Lo anterior puede ser explicado con el hecho de que de los 40 residuos que establecen contacto entre subunidades en la interfase del dímero, existen sólo 7 diferencias entre TcTIM y TbTIM (Tabla 17), de las cuales 5 se encuentran en la región 1 y 2.

TcTIM	TbTIM	Localización
Glu19	Gln18	Hélice- α 1
Ser20	Gln19	Hélice- α 1
Leu47	Val46	Hélice- α 2
Ile49	Leu48	Hélice- α 2
Pro50	Ala49	Hélice- α 2
Tyr87	Phe86	Hélice- α 3
Ile89	Val88	Hélice- α 3

Tabla 17. Diferencias entre los residuos que establecen contacto entre subunidades de TcTIM y TbTIM, y su localización en la estructura.

También podemos observar que el porcentaje de reactivación disminuyó al avanzar la cinética, lo cual nos indica que la adición de la región 3 desestabilizó el equilibrio de reactivación provocando la desaparición de dímero activo y la aparición de otras especies que pueden ser monómeros plegados, dímero inactivo o agregados. Entre la región 3 (Figura 28) de TcTIM y TbTIM existen 8 diferencias, de las cuales 5 son sustituciones conservativas, 1 es sustitución semiconservativa y 2 son sustituciones sin homología. En el asa 3, también llamada asa de interfase, se encuentran 2 de las sustituciones conservativas.

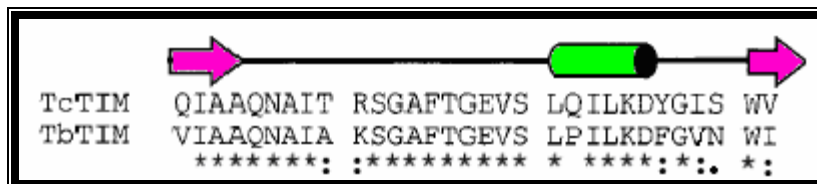
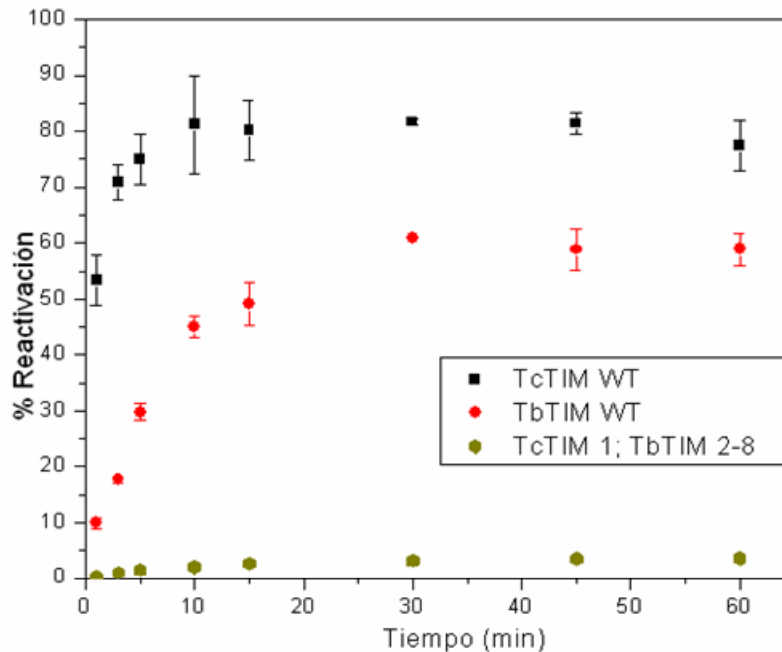


Figura 28. Alineamiento de la región 3 de TcTIM y TbTIM. (Aminoácidos 61 a 91).

(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y (sin símbolo) Sustitución sin homología.

5.3.6 Cinética de reactivación de TcTIM 1; TbTIM 2-8

En la gráfica 19 se encuentra la cinética de reactivación de la enzima quimérica **TcTIM 1; TbTIM 2-8** (Figura 24). Esta enzima posee únicamente la región 1 de TcTIM y el resto de TbTIM. El efecto que tiene la región 1 de TcTIM sobre la reactivación de la enzima es inesperado, ya que, como podemos observar, la reactivación de esta quimera es muy baja. Al primer minuto el porcentaje de reactivación es substancialmente menor que para TbTIM, lo cual indica que la región 1 de TcTIM provoca que la asociación de los monómeros de la quimera, y los arreglos internos para formar el dímero activo, sean mucho más lentos que para TbTIM. Otra posibilidad es que, esta quimera, tras ser desnaturalizada, se agregue casi completamente y por tanto no se reactive.



Gráfica 19. Cinética de reactivación de TcTIM (■) y TbTIM (●) y TcTIM 1-3; TbTIM 4-8 (●).

De las 7 diferencias entre TcTIM y TbTIM de los aminoácidos que establecen contacto entre subunidades (Tabla 17), dos pertenecen a la región 1, lo que nos indica que este par de aminoácidos es importante para la asociación del dímero. Entre la región 1 de TcTIM y TbTIM existen 13 diferencias, de las cuales 8

son sustituciones conservativas, 1 es sustitución semiconservativa y 4 son sustituciones sin homología (Figura 29).

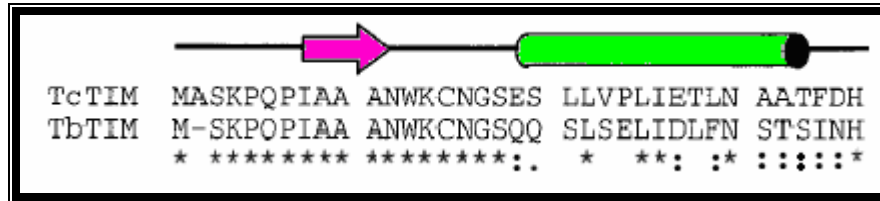


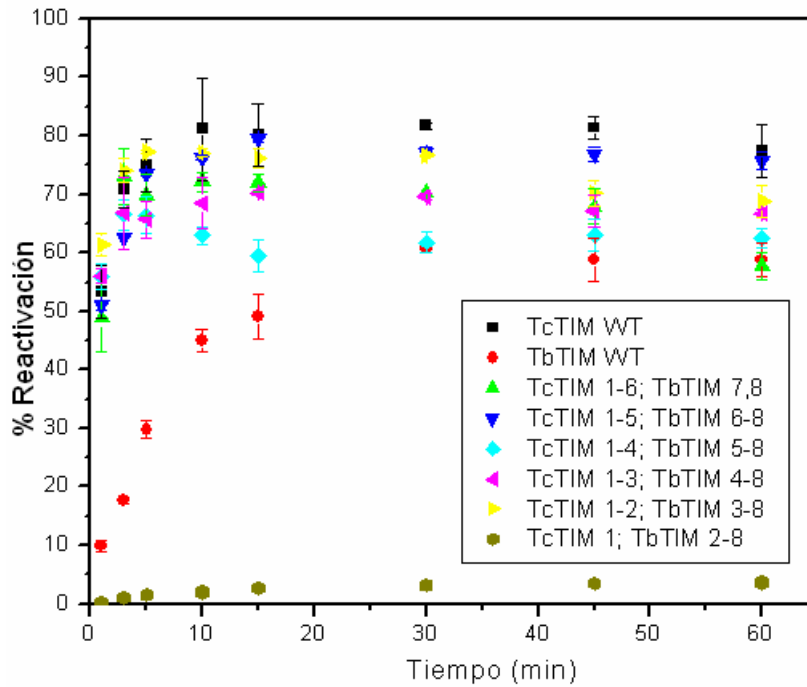
Figura 29. Alineamiento de la región 1 de TcTIM y TbTIM. (Aminoácidos 1 a 35).

(:) Sustitución conservativa (.) Sustitución semiconservativa y (sin símbolo) Sustitución sin homología.

Como podemos ver, la quimera TcTIM 1-2; TbTIM 3-8 (Gráfica 18), en el primer minuto alcanza un porcentaje de reactivación ligeramente mayor que TcTIM, mientras que la quimera TcTIM 1; TbTIM 2-8 (Gráfica 19) al primer minuto de la cinética tiene un porcentaje de reactivación mucho menor que TbTIM. Esto nos indica que la región 2 de TcTIM juega un papel importante en la reactivación. Entre la región 2 de TcTIM y TbTIM existen 7 diferencias: 4 son sustituciones conservativas, 2 son sustituciones semiconservativas y 1 es sustitución sin homología (Figura 18).

Entre las sustituciones semiconservativas de la región 2, se encuentran el cambio de Pro44 y Pro50 de TcTIM por Ser43 y Ala49 de TbTIM respectivamente. Se sabe que el residuo prolina confiere rigidez a una estructura proteica; en este caso se observa el cambio de las prolinas por un aminoácido polar y un residuo no polar de menor tamaño respectivamente. La sustitución sin homología se trata de la Ala54 de TcTIM por el Glu53 de TbTIM: un residuo no polar pequeño por un residuo polar con carga. Estos cambios pueden redundar en que tras la desnaturalización existan interacciones entre cadenas proteicas que conlleven a la formación de agregados.

La gráfica 20 es un esquema comparativo de la cinética de reactivación de las seis quimeras en relación a TcTIM WT y TbTIM WT.



Gráfica 20. Gráfica comparativa de la cinética de reactivación de las dos enzimas silvestres y de las 6 quimeras.

Se observa que al primer minuto la única quimera que no se reactivó fue la que no posee la región 2 de TcTIM, lo cual indica que esta región es importante para que se lleve a cabo la asociación y arreglos moleculares para formar el dímero activo; además de que la región 1 de TcTIM provoca que la reactivación sea menor que la de TbTIM WT.

6. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue determinar la o las regiones responsables del comportamiento diferente de la reactivación de TcTIM y TbTIM; lo cual hicimos al caracterizar cinéticas de reactivación de enzimas quiméricas.

A partir de nuestros resultados podemos concluir que:

- Al cambiar las **regiones 7 y 8** de TcTIM por las de TbTIM, se altera el equilibrio de reactivación con respecto a la enzima silvestre, de manera que, al transcurrir la cinética, disminuye la cantidad de dímero activo. Además, el cambio de estas dos regiones afecta la funcionalidad de la enzima, lo cual se observa en una actividad específica disminuida con respecto a las enzimas silvestres.
- La **región 6** de TbTIM, en adición a las regiones 7 y 8 de la misma enzima, estabiliza el equilibrio de reactivación una vez que se ha formado el dímero activo. De manera que, la quimera con estas tres regiones de TbTIM y el resto de TcTIM, se comporta como TcTIM WT en la cinética de reactivación.
- La adición de la **región 5** de TbTIM a la quimera, provocó la desestabilización de su equilibrio de reactivación, dando como resultado que, al avanzar la cinética, se inactivara una fracción de la enzima que ya se había reactivado.
- Cuando se reemplazó la **región 4** por la de TbTIM, se estabilizó el equilibrio de reactivación una vez formado el dímero activo. Esta quimera (TcTIM 1-3; TbTIM 4-8) tuvo una reactivación intermedia entre los valores finales de TbTIM WT y TcTIM WT, lo cual se atribuye a agregamiento de la proteína.

- El cambio de la **región 3** de TcTIM por la de TbTIM dio como resultado que la asociación de los monómeros y los arreglos internos para formar el dímero activo fueran ligeramente más rápidos que en TcTIM. El porcentaje de reactivación disminuyó al avanzar la cinética. Esto indica que la región 3 desestabiliza el equilibrio de reactivación, provocando la desaparición de dímero activo. Dos de las ocho diferencias en la región 3 de TcTIM y TbTIM se encuentran en el asa 3, que también es llamada asa de interfase. La quimera TcTIM 1-2; TbTIM 3-8 posee únicamente las regiones 1 y 2 de TcTIM. En estas dos regiones se concentran 5 de las 7 diferencias entre TcTIM y TbTIM a nivel de interfase. La interfase de esta enzima quimérica es en sí más parecida a la de TcTIM; aunque posee el asa de interfase de TbTIM.
- Al reemplazar la región 2 de TcTIM por la de TbTIM, se obtuvo una quimera que sólo tiene la **región 1** de TcTIM (TcTIM 1; TbTIM 2-8). Esta región provoca que la asociación de los monómeros de la quimera, y los arreglos internos para formar el dímero activo sean mucho más lentos que para TbTIM WT.
- La **región 2** de TcTIM juega un papel importante en la reactivación de la enzima, ya que al reemplazarla por la misma región de TbTIM se obtuvo una quimera que se reactivó menos de 5%. Esto también puede significar que la enzima no se reactive por que se esté agregando. Lo único que nos indica la cinética de reactivación, es que no se está formando la estructura cuaternaria (y biológicamente activa). Ésta región, además está involucrada en la funcionalidad de la enzima, ya que TcTIM 1; TbTIM 2-8 es menos activa que la quimera que tiene la región 2 de TcTIM. De las diferencias de interfase entre TcTIM y TbTIM, tres están ubicadas en la región 2.

Durante la evolución de las especies, se permiten en una proteína diversas mutaciones, pero, un número limitado de residuos, destinado a formar parte del centro hidrofóbico de la proteína, debe ser conservado o reemplazado por otros residuos con propiedades hidrofóbicas similares (Anfinsen, 1973). Es por eso que observamos que sustituciones en residuos que establecen contacto entre subunidades (Tabla 17), tienen como resultado cambios en el comportamiento de la cinética de reactivación de las quimeras.

7. PERSPECTIVAS

Los ensayos de cinéticas de reactivación, únicamente reflejan la formación del dímero activo (estructura cuaternaria). Es por eso que, con los resultados obtenidos, únicamente podemos concluir sobre la formación del dímero de TIM, y no sobre el plegamiento de la enzima.

La quimera TcTIM 1; TbTIM 2-8, se reactiva únicamente 5%. Lo que significa que, tras eliminar el agente caotrópico, sólo 5% de la enzima forma dímero activo. Entonces la pregunta es: ¿Qué pasa con el 95% de enzima que no se reactiva? Para responder esto proponemos:

- Es conocido que al disminuir la concentración de proteína, se desfavorece la agregación (que es un proceso multimolecular). Por eso se plantea realizar la cinética de reactivación de TcTIM 1; TbTIM 2-8, a concentraciones menores a 5 µg/mL. Si el bajo porcentaje de reactivación es debido a formación de agregados, al disminuir la concentración de enzima, el porcentaje de reactivación debe ser mayor a 5%.
- Realizar con la quimera TcTIM 1; TbTIM 2-8, ensayos de dicroísmo circular. Por medio de ellos, conoceremos si la estructura secundaria de esta quimera está afectada con respecto a la de las enzimas silvestres. En caso de obtener resultados positivos, esto nos daría pie a pensar en un plegamiento incorrecto de la enzima, que también explicaría su actividad específica, la cual es menor que la de las enzimas silvestres.
- Realizar ensayos de desplegamiento/replegamiento seguidos por fluorescencia. Mediante estos ensayos observaríamos si hay cambios en la estructura terciaria de la enzima.
- Un estudio del desplegamiento mediante cromatografía de exclusión molecular nos informaría si se forman agregados durante el proceso de desplegamiento. Esto nos daría una idea de la ruta de desplegamiento y

plegamiento de la enzima, de manera que sabríamos si la región 1 de TcTIM provoca que la enzima se está agregando, y por tanto no se está reactivando.

Nuestros resultados apuntan a que, el cambio de la región 2 de TcTIM por la misma región de TbTIM, es responsable de que la enzima no se reactive; y también que la región 1 de TcTIM provoca que la asociación de monómeros y rearreglos intramoleculares sean más lentos que para TbTIM WT. Por esa razón proponemos elaborar una enzima quimérica que contenga únicamente la región 2 de TcTIM y el resto de TbTIM. Esperamos que esta quimera se reactive más que TcTIM 1; TbTIM 2-8.

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Ingredientes para preparar medio LB (Luria-Bertani)

Para 1 L de medio

- Bacto-Triptona (Research Organic) 10 g
- Extracto de levadura (BD) 5 g
- Cloruro de Sodio (J. T. Baker) 10 g

Apéndice 2. Amortiguadores utilizados para la purificación de las enzimas.

- Amortiguador de Lisis para TcTIM pH 6.3

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MASA MOLECULAR	Para 100 mL pesar
MES (U.S. Biological)	100 mM	195.2 g/mol	1.9520 g
DTT (Sigma)	1mM	154.25 g/mol	0.0154 g
EDTA (Sigma)	0.5 mM	380.2 g/mol	0.0190 g

- Amortiguador de Lisis para TbTIM (+ 300 mM NaCl) pH 6.3

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MASA MOLECULAR	Para 100 mL pesar
MES (U.S. Biological)	100 mM	195.2 g/mol	1.9520 g
DTT (Sigma)	1mM	154.25 g/mol	0.0154 g
NaCl (J.T. Baker)	300mM	58.44 g/mol	1.7532 g
EDTA (Sigma)	0.5 mM	380.2 g/mol	0.0190 g

- Amortiguador A pH 6.3

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MASA MOLECULAR	Para 1 L pesar
MES (U.S. Biological)	50 mM	195.2 g/mol	9.7600 g

- Amortiguador B pH 6.3

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MASA MOLECULAR	Para 1 L pesar
NaCl (J. T. Baker)	500mM	58.44 g/mol	29.2200 g
MES (U.S. Biological)	50 mM	195.2 g/mol	9.7600 g

- Amortiguador C pH 7.4

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MASA MOLECULAR	Para 1 L pesar
Trietanolamina·HCl (Sigma)	100mM	185.65 g/mol	18.5650 g
EDTA (Sigma)	1 mM	380.2 g/mol	0.3802 g

- Amortiguador D pH 7.4

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN	MASA MOLECULAR	Para 1 L pesar
Trietanolamina·HCl (Sigma)	100mM	185.65 g/mol	18.5650 g
EDTA (sigma)	1 mM	380.2 g/mol	0.3802 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma)	2.2 M	132.14 g/mol	290.708

- Stock (NH₄)₂SO₄: Pesar 472g para un Litro (Tiene una concentración de aproximadamente 3.6M)

Apéndice 3. Preparación del sustrato (Gliceraldehído-3-fosfato)

Para los ensayos el gliceraldehído-3-fosfato fue preparado a partir de DL-gliceraldehído-3-fosfato diacetato de bario (Fluka), el cual se desacetiló con resina Dowex 500 WXZ-100 (Sigma), mediante los siguientes pasos:

- Pesar 1.5 g de resina Dowex 500 WXZ-100 (Sigma) y resuspender en 10 mL de agua desionizada.
- Agitar en vortex durante 1 minuto, dejar sedimentar y extraer el agua por succión. (Repetir este paso hasta que la resina no desprenda colorante anaranjado)
- Secar la resina con ayuda de vacío.
- Pesar 100 mg de DL-gliceraldehído-3-fosfato diacetato de bario (Fluka) y adicionar 5 mL de agua desionizada en ebullición.
- Colocar el tubo de la mezcla anterior en un baño de agua en ebullición y agitar durante 3 minutos, o hasta que se disuelva por completo el DL-gliceraldehído-3-fosfato diacetato de bario.
- Enfriar la mezcla en hielo.
- Filtrar la mezcla por una membrana de 0.22 μm de poro (Millipore).
- Ajustar el pH entre 4 y 5 con bicarbonato de sodio en polvo (Sigma).
- Alicuotar en tubos de eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetados
- Guardar a -70°C .

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aichards, F. M. (1992) Folded and unfolded proteins. En: Protein Folding. Creighton, T. E. (Ed) W.H. Freeman y Company New York. pp 1-58
2. Anfinsen, C. B. (1973) Studies on the principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181: 203-230
3. Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M. E. M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M. y Wierenga, R. K. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase en *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *European Journal of Biochemistry*. 211: 703-710
4. Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1994) Design, creation and characterization of stable monomeric triosephosphate isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 1515-1518
5. Borchert, T. V., Zeelen, J., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1995) An Interface point-mutation variant of triosephosphate isomerase is a compactly folded and monomeric at low concentrations. *FEBS Letters*. 367: 315-318
6. Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincon, G. y Pérez-Montfort, R. (2002) Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and Insight into the denaturation pathway using Tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 399: 117-129
7. Cháñez-Cárdenas, M. E. y Vázquez-Contreras, E. (2002) Two Notable similar proteins follows different unfolding pathways. *Revista de la Sociedad Química de México*. 46: 219-222
8. Cháñez-Cárdenas, M. E., Pérez-Hernández, G. Sánchez-Rebollar, B. G., Costas, M. y 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
9. Daggett, V. y Fersht, A. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *TRENDS in Biochemical Sciences*. 28: 18-25
10. Derreumaux, P. y Schlick, T. (1998) The Loop Opening/Closing motion of the enzyme Triosephosphate Isomerase. *Biophysical Journal*. 74: 72-81

11. Dill, K.A., Shortle, D. (1991) Denaturated states of proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 60:795-825
12. Dill, K. A. y Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*. 4: 10-18
13. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Weikl, T. R., Chodera, J. D. y Voelz, V. A. (2007) The protein folding problem: When Will it be solved? *Current Opinion in Structural Biology*. 17: 342-346
14. Eisenstein, E. y Schachman, K. (1989) Determining the roles of subunits in protein function. En: Protein function a practical approach. Creighton, T. E. (Ed) IRL Press, Oxford University pp135-176
15. Fernández-Velasco, D. A. (1995) Plegamiento de proteínas. *Boletín de Educación Bioquímica*. 14: 5-10
16. Fersht, Alan. (1985) Enzyme, Structure and Mechanism. 2ª edición. W. H. Freeman y Company. 475pp.
17. Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Gracy, R. W. (1992) Dimerization and Reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *European Journal of Biochemistry*. 208: 389-395
18. Gao, X. G., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R. y Gómez-Puyou, A. (1998) Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of Suramin. *Biochemistry. J*. 332: 91-96
19. Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 49, 117-237
20. Jaenicke, R. y Rudolph, R. (1989) Folding Proteins. En: Protein Structure a practical approach. Creighton, T.E. (Ed) IRL Press, Oxford University. pp 191-223
21. Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 71, 155-241
22. Joseph-McCarthy, D., Lolis, E., Komives, E. A. y Petsko, G. A. (1994) Crystal structure of the K12M/G15A Triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry*. 33: 2815-2823

23. Karplus, M. y Shakhnovick, E. (1992) Protein Folding: Theoretical studies of Thermodynamics and Dynamics. (1992) En: Protein Folding. Creighton, T. E. (Ed) W.H. Freeman y Company New York. pp 127-195
24. Komives, E. A., Chang, L. C., Lolis, E., Tilton, R. F., Petsko, G. A. y Knowles, J. R. (1991) Electrophilic catalysis in Triosephosphate isomerase: The role of Histidine95. *Biochemistry*. 30: 3011-3019
25. Kyte, Jack. (1995) Structure in protein chemistry. Garland Publishing, Inc. New York y London. Pp 606
26. Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *Journal of Chemical Physics*. 65: 44-45
27. Levitt, Michael. (1978) Conformational preferences of Amino acids in Globular proteins? *American Chemical Society*. 17: 4277-4285
28. Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R. y Komives, E. A. (1994) Triosephosphate Isomerase Requires a Positively charged Active site: The role of Lysine-12. *Biochemistry*. 33: 2809-2814
29. Lolis, E. y Petsko, G. A. (1990) Crystallographic Analysis of the complex between Triosephosphate Isomerase and 2-Phosphoglycolate 2.5Å Resolution: Implication for catalysis. *Biochemistry*. 29, 6619-6625
30. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. y Petsko, G. A. (1990) Structure Yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9Å Resolution. *Biochemistry*. 29: 6609-6618
31. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Pérez-Montfort, R. (1998) Differences in the Intersubunit Contacts in Triosephosphate Isomerase from Two Closely Related Pathogenic Trypanosomes. *Journal of Molecular Biology*. 283: 193-203
32. Matheson Jr, R. R., y Scheraga, H.A. (1977) A method for predicting nucleation sites for protein Folding based on Hydrophobic contacts. *Macromolecules*. 11:819-829
33. McVittie, J. D., Esnouf, M. P. y Peacocke, A. R. (1977) The denaturation-renaturation of chicken-muscle Triosephosphate isomerase in Guanidinium Chloride. *European Journal of Biochemistry*. 81: 307-315
34. Monera, O. D., Kay, C.M. y Hodges, R. (1994) Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability

- depending on the contributions of electrostatic interactions. *The protein society*. 3:1984-1991
35. Nájera, H., Costas, M. y Fernández-Velasco, A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochemistry. J.* 370: 785-792
36. Onuchic, J. N., Socci, N. D., Luthey-Schulten, Z. y Wolynes, P. G. (1996) Protein folding funnels: The nature of the transition state ensemble. *Folding y Design*. 1: 441-450
37. Onuchic, J. N. y Wolynes, P. G. (2004) Theory of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*. 14: 70-75
38. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L. Grimsley, G. y Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 4: 2411-2423
39. Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M. y Gajiwala, K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 10:75-83
40. Pan, H., Raza, A. S. y Smith, D. L. (2004) Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen Exchange Mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*. 336: 1251-1263
41. Pande, V. S., Grosberg, A. Y., Tanaka, T. y Rokhsar, D. S. (1998) Pathways for protein folding: is a "New view" needed? *Current Opinions in Structural Biology*. 8: 1-12
42. Pérez-Montfort, R. (2009) Proteínas similares con propiedades diferentes: Explorando porque. Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 2:33
43. Privalov, P. L. (1992) Physical basis of the folded conformation of proteins. En: Protein Folding. Creighton, T. E. (Ed) W.H. Freeman y Company New York. pp 83-126
44. Ptitsyn, O.B. (1992) The Molten Globule State. En: Protein Folding. Creighton, T. E. (Ed) W.H. Freeman y Company New York. pp 243-300
45. Reyes-López, C. A., González-Mondragón, E., Benítez-Cardoza, C. G., Chánez-Cárdenas, M. E., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R. y Hernández-Arana, A. (2008) The conserved salt bridge linking two C-terminal β/α units

- in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate on the monomer. *Proteins*. 72: 972-979
46. Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Mendoza-Hernández, G., López-Velázquez, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2002) Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact and nicked monomer. *Proteins*. 48, 580-590
47. Rietveld, A. W. M. y Ferreira, S. T. (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: The importance of Oligomerization for Conformational Persistence and Chemical Stability of Proteins. *Biochemistry*. 37: 933-937
48. Robinson, D. R. y Jencks, W.P. (1965) The Effect of Compounds of the Urea-Guanidinium Class on the Activity Coefficient of Acetyltetraglycine Ethyl Ester and Related Compounds. *Journal of the American Chemical Society*. 5: 2462-2470
49. Rodríguez-Almazán, C., Torner, F. J., Costas, M., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gomez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (2007) The Stability and Formation of Native Proteins from Unfolded Monomers Is Increased through Interactions with Unrelated Proteins. *Public Library of Science Biology*. 2: e497
50. Rose, I. A. y O'Connell E. (1961) Intramolecular Hydrogen Transfer in the Phosphoglucose Isomerase Reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 236: 3086-3092
51. Sali, A., Shakhnovich, E. y Karplus, M. (1994) How does protein folding? *Nature*. 369: 248-251
52. Schmid, F. X. (1992) Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins. En: *Protein Folding*. Creighton, T. E. (Ed) W.H. Freeman y Company New York. pp 197-242
53. Scholtz, J. M., Barrick, D., York, E. J., Stewart, J. M., y Baldwin, R. L. (1995) Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Biochemistry*. 92: 185-189
54. Van den Berg, B., Ellis, R. J. y Dobson, C. M. (1999) Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 18: 6927-6933
55. Vázquez-Contreras, E. Zubillaga, R. A., Mendoza-Hernández, G., Costas, M. y Fernández-Velasco, A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast

- Triosephosphate Isomerase: A monomeric intermediate in Guanidine-HCl and Two-State behavior in Urea. *Protein and Peptide Letters*. 7: 57-64
56. Vázquez- Contreras, E., Sánchez-Rebollar, B. G. y Chánez-Cárdenas, M. E. (2004) The equilibrium unfolding of Triosephosphate Isomerase from *T. cruzi* in Guanidinium Hydrochloride is a four state process. Intrinsic Fluorescence Studies. *Revista de la Sociedad Química de Mexico*. 48: 296-299
57. Volkin, D. B. y Klibanov, A. M. (1989) Minimizing protein inactivation. En: Protein function a practical approach. Creighton, T. E. (Ed) IRL Press, Oxford University. pp 1-24
58. Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. (2006) Fundamentals of Biochemistry. Life at the molecular Level. 2^a edición. Wiley. Pp 1130
59. Waley, S. G. (1973) Refolding of Triose Phosphate isomerase. *Biochemistry Journal*. 135: 165-172
60. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G. y Nauche, S. (1991) Refined 1.83Å structure of Trypanosomal Triosephosphate Isomerase Crystallized in the presence of 2.4M Ammonium Sulphate. A comparison with the structure of the Trypanosomal Triosephosphate isomerase- Glycerol-3-Phosphate complex. *J. Mol. Biol.* 220: 995-1015
61. Wierenga, R. K. y Noble, M. E. M. (1992) Comparison of the refined cristal structures of liganded and unliganded Chicken, Yeast and Trypanosomal Triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology*. 224: 1115-1126
62. Wierenga, R. K., Borchert, T. V. y Noble, M. E. M. (1992) Cristallographic binding studies with triosephosphate isomerases: conformational changes induced by substrate and substrate-analogues. *FEBS Letters*. 307: 34-39
63. Wolynes. P. G., Luthey-Schulten, Z. y Onuchic, J. N. (1996) Fast folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes. *Chemistry y Biology*. 3: 425-432
64. Zárate-Pérez, F., Chánez-Cárdenas, M. E., Arreola, R., Torres-Larios, A. y Vázquez-Contreras, E. (2009) Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 382: 626-630
65. Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., y Gómez-Puyou, A. (2003) Control of the reactivation Kinetics of

Homodimeric Triosephosphate Isomerase from unfolded Monomers. *Biochemistry*. 42, 3311-3318

66. Zomosa-Signoret, V., Aguirre-López, B., Hernández-Alcántara, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (2007) Crosstalk between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 67: 75-83

Consultas de Internet

- a. International Union Of Biochemistry And Molecular Biology: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
- b. Centrifuge Rotor Calculations, rotor speed calculations, g-calculations, and k-factors: <http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/centrifuges/rotorcalc.asp>
- c. ProtParam Tool: <http://expasy.org/tools/protparam.html>