



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“El efecto de la mutación de las cisteínas 14 y 126 de la  
triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* en su  
estabilidad y plegamiento”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

**MÓNICA MOLINA TORRES ARPI**

Directora de tesis:  
DRA. GEORGINA GARZA RAMOS MARTÍNEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

MÉXICO D.F. 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Molina  
Torres Arpi  
Mónica  
56632267  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303760218

### 2. Datos del tutor

Dra  
Garza Ramos  
Martínez  
Georgina Regina

### 3. Datos del sinodal 1

Dra  
Salceda  
Sacanelles  
Rocío

### 4. Datos del sinodal 2

Dr  
Fernández  
Velasco  
Daniel Alejandro

### 5. Datos del sinodal 3

Dr  
Valdés  
López  
Víctor Manuel

### 6. Datos del sinodal 4

Dr  
Pérez  
Zamorano  
Bernardo

### 7. Datos del trabajo escrito

El efecto de la mutación de las cisteínas 14 y 126 de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* en su estabilidad y plegamiento

41 p  
2012

## 1. Agradecimientos

A pocos días de mi exámen y con el nerviosismo aumentando exponencialmente, me siento a pensar a quién tengo que agradecer por esta tesis, y es complejo porque son muchas las personas a las que les debo algo:

A mi tutora oficial Georgina Garza Ramos y a mi tutora no-oficial, Valeria Guzmán. Es claro que sin ustedes no hubiera existido esta tesis. A Geo le agradezco todas las revisiones, su paciencia y el último empujón para titularme y a Vale su constante ayuda y amistad a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A las otras personas valiosísimas del laboratorio, en especial a Alejandro Fernández, que fue mi maestro y un gran apoyo, a los demás investigadores y estudiantes que hicieron mi estancia muy agradable.

A mis sinodales, los doctores Rocío Salceda, Víctor Valdés, Bernardo Pérez y de nuevo a Alejandro Fernández que leyeron mi tesis, me ayudaron a que quedara lo mejor posible, y estarán conmigo en el exámen.

A mis amigos, que los quiero mucho y que en turno me animaron a seguir, me consolaron cuando me atrasaba y me aplaudieron cuando finalmente decidí titularme, Gabilé, Monx, Ana (sí, especialmente tú que sufriste directamente todos los dramas de mi tesis), Salch, Daniel, Malu, Elena, Marcela, Marianita, Lore y otros más a quienes agradeceré personalmente.

Y finalmente a mi familia. A mis papás por darme un hogar, muchísimo apoyo y un empujón cuando lo necesitaba, a mis hermanos, que son mis mejores amigos, a mi abuela que siempre se ofreció a ayudarme con mi tesis (“yo puedo hacer sumas y mezclar cosas”) y a mi tía Mari y su increíble familia dorada. Los quiero muchísimo.

Ojalá todo el mundo tuviera tanto que agradecer.

Muchas, muchas gracias.

## 2. Índice

1. Agradecimientos	3
2. Índice	4
3. Resumen	5
4. Abreviaturas	6
5. Marco teórico.	7
5.1. Proteínas	7
5.2. Prediciendo la estructura de una proteína	10
5.3. Triosafosfato Isomerasa	15
5.4. TIM de <i>Trypanosoma brucei</i>	18
6. Planteamiento del problema	21
7. Objetivos	22
8. Hipótesis	23
9. Materiales y métodos	24
9.1. Materiales	24
9.2. Purificación de la proteína	24
9.3. Actividad	25
9.4. Experimentos de desplegamiento y replegamiento	26
9.5. Replegamiento y Desplegamiento seguidos por actividad catalítica	27
9.6. Replegamiento y Desnaturalización seguidos por IF	28
10. Resultados	29
10.1. Purificación	29
10.2. Efecto de las mutaciones en las propiedades espectroscópicas y catalíticas de la TbTIM.	29
10.3. Desnaturalización y replegamiento al equilibrio.	30
10.4. Comparación con la WT	35
10.5. Definiendo el mecanismo	37
10.6. Ecuaciones y Ajustes	40
10.7. Simulaciones	46
11. Discusión	47
12. Conclusiones	52
13. Referencias	53

### 3. Resumen

Los estudios de las contribuciones de aminoácidos específicos en la catálisis y estabilidad de las proteínas han sido posible, en gran medida, por experimentos de mutagénesis dirigida. El trabajo de esta tesis se enfoca en el estudio de la termodinámica de plegamiento de dos mutantes de cisteína de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), parásito causante de la enfermedad del sueño africana. La triosafosfato isomerasa (TIM, EC 5.3.1.1) cataliza una reacción central de la glucólisis, la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato y el D-gliceraldehído-3-fosfato. La TIM es un homodímero obligado formado por subunidades de 26 kD que adoptan un patrón de plegamiento barril ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub>. La C14 se encuentra en el asa interdigitante, expuesta en la forma monomérica y enterrada en la interfase del dímero. La C126 es un residuo estrictamente conservado, se localiza hacia el interior del barril, en la hebra  $\beta$ 5 que se encuentra a distancia de van der Waals del Glu catalítico.

Se realizaron experimentos de replegamiento y desnaturalización al equilibrio con el desnaturalizante químico hidrocloreuro de guanidino (GdnHCl). Las transiciones de plegamiento y desplegado se obtuvieron midiendo los cambios en la intensidad de fluorescencia (IF), centro espectral de masa (CEM) y actividad catalítica. Al igual que la TbTIM silvestre, las mutantes C14A y C126A exhiben un comportamiento bifásico, con un intermediario estable presente en concentraciones de GdnHCl entre 0.6 y 1.65 M. Las propiedades espectroscópicas del intermediario se caracterizan por un corrimiento hacia el rojo del máximo de emisión del espectro de IF a 335nm, con respecto al máximo del estado nativo de 322nm y del desnaturalizado a 351nm, y una disminución en la IF del 50% con respecto a la conformación nativa. Este intermediario que une fuertemente al 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS), es una especie inactiva y dimérica; la segunda fase de la transición de plegamiento al equilibrio, reversible en las enzimas mutantes, es dependiente de la concentración de proteína. Esta transición es desplazada a una mayor concentración de desnaturalizante, cuando la concentración de proteína es aumentada hasta diez veces. La presencia de estas mutaciones provoca una disminución en la estabilidad de la enzima, con un  $\Delta\Delta G$  de 1.1 kcal/mol para la mutante C14A. En la mutante C126A se favorece la presencia de un intermediario termodinámicamente más estable que el de las enzimas silvestre y la C14A ( $\Delta\Delta G_A$  de -7.9 kcal/mol), comprometiendo severamente el plegamiento hacia la conformación nativa. La estricta conservación de esta cisteína obedece al papel tan importante que juega en la estabilidad conformacional de esta enzima.

## 4. Abreviaturas

ANS	1-anilino-8-naftalenosulfonato
CEM	Centro espectral de masas
$C_{1/2}$	Concentración de desnaturalizante en el punto medio de la transición.
C14A	Triosafofatoisomerasa de <i>T brucei</i> con un residuo de alanina en lugar de la cisteína 14
C126A	Triosafofatoisomerasa de <i>T brucei</i> con un residuo de alanina en lugar de la cisteína 126
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
$\Delta G$	Cambio en la energía libre de Gibbs
GAP	D-gliceraldehído-3-fosfato
GdnHCl	Hidrocloreuro de guanidino o guanidina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
I	Intermediario de plegamiento
IPTG	Isopropiltiogalactósido
IF	Intensidad de fluorescencia
N	Estructura o estado nativo de una proteína (también $N_2$ para proteínas diméricas)
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TIM	Triosafofato isomerasa
U	Estructura o estado desnaturalizado (“unfolded”) de una proteína
WT	Secuencia silvestre de la proteína

## 5. Introducción

### 5.1. Proteínas

Si los seres vivos semejan una complejísima fábrica donde millones de elementos se combinan para asegurar un funcionamiento continuo y eficiente, las proteínas serían el elemento más importante. Serían las máquinas y la infraestructura, los obreros y el transporte. En cada célula un repertorio de varios miles de proteínas distintas que llevan a cabo los procesos que dan origen a la vida. Sin embargo, hay aun muchas cosas que no entendemos sobre ellas y por eso es muy importante su estudio y provocan un gran interés en varias ramas de la ciencia.

Una proteína es una construcción lineal de aminoácidos que se pliega, formando interacciones con sí misma o con otras cadenas para formar una estructura final, cumpliendo funciones particulares en las condiciones fisiológicas del organismo que la produce. La identidad de una proteína se puede estudiar a varios niveles: la secuencia de los residuos que la componen o *estructura primaria*, los patrones de plegamiento locales o *estructura secundaria*, la interacción de estas estructuras en el espacio tridimensional o *estructura terciaria* y por último la asociación con otras cadenas para formar una *estructura cuaternaria*.

La función de una proteína depende de la geometría final de su estructura, la cual a su vez depende esencialmente de la estructura primaria y de las condiciones en las que se encuentra. Para la bioquímica actual el reto más importante es entender esta relación entre secuencia, estructura y función, tarea que se ve complicada por la dificultad de entender la naturaleza de las causas y consecuencias de las diversas interacciones que juegan un papel en el plegamiento de una proteína. Biológicamente se puede cambiar una secuencia por medio de ingeniería genética, pero para cambiar una función, por ejemplo la temperatura a la que actúa una enzima, la eficiencia o la especificidad de sustrato, o incluso crear una función nueva para algún proceso industrial, debemos de conocer el código o relación entre su secuencia y su estructura, para poder deducir los cambios que debemos realizar.

Actualmente se está trabajando para responder esta pregunta mediante varias técnicas que incluyen el estudio de los cambios sufridos en las secuencias entre distintos organismos y la comparación con sus estructuras, la alteración química de algunos residuos y el cambio experimental de la secuencia génica para sustituir un aminoácido por otro con un posterior estudio de la proteína resultante, todo esto con la finalidad de determinar el impacto de ciertas características del residuo (como tamaño, carga, hidrofobicidad, etc) en un



sitio determinado de la estructura. El trabajo que se expone en esta tesis es un ejemplo de esta última técnica de estudio.

### 1. Aminoácidos y estructura primaria

La estructura primaria de una proteína está dada por la secuencia de residuos que conforman a una proteína en particular. Se consideran 20 aminoácidos básicos para la formación de proteínas (Tabla 5.1.1); éstos adicionalmente son sustratos para modificaciones post-traduccionales, que se llevan a cabo una vez sintetizada la proteína y llevan a un mayor universo de residuos utilizados para las funciones finales. La guía de traducción de nucleótidos a aminoácidos se conoce como el código genético y es la manera en la que se almacena y hereda la información para la producción de proteínas en una célula.

Tabla 5.1.1. Residuos de aminoácidos, sus abreviaciones y algunas características importantes.

Residuo			Característica <sup>1</sup>	Masa <sup>1</sup> (D)	Hidropatía <sup>2</sup>	Frec. en proteínas (%) <sup>1</sup>
Ácido aspártico	Asp	D	Ácido	115.1	-3.5	5.3
Ácido glutámico	Glu	E	Ácido	129.1	-3.5	6.2
<b>Alanina</b>	<b>Ala</b>	<b>A</b>	<b>Alifático</b>	<b>71.1</b>	<b>1.8</b>	<b>8.3</b>
Isoleucina	Ile	I	Alifático	113.2	4.5	5.2
Leucina	Leu	L	Alifático	113.2	3.8	9.0
Valina	Val	V	Alifático	99.1	4.2	6.6
Asparagina	Asn	N	Amida	114.1	-3.5	4.4
Glutamina	Gln	Q	Amida	128.1	-3.5	4.0
Fenilalanina	Phe	F	Aromático	147.2	2.8	3.9
Triptofano	Trp	W	Aromático	186.2	-0.9	1.3
Tirosina	Tyr	Y	Aromático	163.2	-1.3	3.2
<b>Cisteína</b>	<b>Cys</b>	<b>C</b>	<b>Azufre</b>	<b>103.2</b>	<b>2.5</b>	<b>1.7</b>
Metionina	Met	M	Azufre	131.2	1.9	2.4
Arginina	Arg	R	Básico	156.2	-4.5	5.7
Licina	Lys	K	Básico	128.2	-3.9	5.7
Serina	Ser	S	Hidroxil	87.1	-0.8	6.9
Treonina	Thr	T	Hidroxil	93.0	-0.7	5.8
Histidina	His	H	Imidazol	137.1	-3.2	2.2
Prolina	Pro	P	Iminociclo	97.1	-1.6	5.1
Glicina	Gly	G	Sencillo	57.1	-0.4	7.2

<sup>1</sup>(Creighton 1993)<sup>2</sup>(Kyte y Doolittle 1982)

Una proteína promedio contiene alrededor de 250 aminoácidos, con un peso de 28,000 D, aunque hay proteínas desde 50 hasta más de 25,000 residuos de aminoácidos (Creighton 1993). Las propiedades de los aminoácidos determinan a su vez los siguientes niveles de estructura, propiedades como tamaño, carga e hidropatía son las que generalmente determinan el acomodo de la cadena.

## 2. Estructura secundaria

La estructura secundaria de una proteína está definida por la conformación local del esqueleto polipeptídico, y los patrones de plegamiento que surgen se clasifican en hojas plegadas  $\beta$ , hélices  $\alpha$  y giros  $\beta$ . Estos patrones se dan porque son estructuras permitidas por los ángulos conformacionales y proveen una óptima interacción de los átomos del esqueleto polipeptídico: dentro de un mismo residuo de aminoácido y entre varios de una misma cadena.

- Hélices  $\alpha$ : son estructuras helicoidales o en espiral con torsión a la derecha, periódicas con 3.6 residuos por giro, que permite la interacción de un oxígeno del carbonilo (C=O) del enlace peptídico de un aminoácido en posición **n** con el hidrógeno del grupo amino (N-H) del enlace peptídico del aminoácido situado en posición **n+4**, para la formación de puentes de hidrógeno a una distancia casi óptima. Esta estructura mantiene una distancia favorable entre los átomos internos de la hélice, favoreciendo además interacciones de tipo van der Waals que aumentan su estabilidad.
- Hojas  $\beta$ : Al igual que la estructura anterior, utiliza al máximo la capacidad de formación de puentes de hidrógeno que posee el esqueleto polipeptídico, pero a diferencia de la anterior, en donde se enlazan átomos de aminoácidos contiguos en la secuencia, en esta estructura los puentes de hidrógeno se forman entre cadenas polipeptídicas y/o entre diferentes segmentos de la cadena polipeptídica. Dos o más cadenas se acercan de manera paralela o antiparalela e interactúan entre sí dando una conformación altamente extendida. Para optimizar la distancia de las interacciones, la cadena forma pliegues en su plano, por lo que a esta estructura se le conoce también como hojas plegadas. El número de hebras por hoja puede variar desde 2 hasta 15, con un promedio de 6. (Voet y Voet 1990)

Aproximadamente el 31% de los residuos en una proteína globular se encuentra en hélices y 28% en hebras- $\beta$   $\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta$ , dejando alrededor de la mitad formando estructuras no repetitivas llamadas giros y asas. Estas estructuras no son regulares y pueden presentar mucha o poca rigidez y libertad de movimiento. Estas estructuras suelen tener importancia biológica o funcional como tapas de sitios activos. (Voet y Voet 1990)

### *3. Estructura terciaria*

La separación entre la estructura secundaria y la terciaria es un tanto ambigua, pero mientras la primera se enfoca principalmente en las estructuras periódicas y definidas del esqueleto proteico, la segunda incluye la interacción espacial de todas las estructuras locales y la posición de las cadenas laterales, es decir, la topología de la proteína. Así, en este nivel de estructura, los distintos patrones se combinan para formar una estructura compleja final. Las fuerzas que estabilizan la estructura terciaria de una proteína se establecen entre las distintas cadenas laterales de los aminoácidos dando lugar principalmente a interacciones de tipo no covalente.

Las estructuras terciarias resultantes de la mayoría de las proteínas pequeñas son altamente compactas, mientras que proteínas de mayor tamaño tienden a formar más de una unidad estructural compacta, conocidas individualmente como dominios. Los dominios pueden estar conectados entre sí por una cadena o por varias.

### *4. Estructura cuaternaria*

Este nivel de estructura de una proteína aparece en proteínas compuestas de más de una cadena polipeptídica, que es el caso de muchas proteínas.

Cuando varias cadenas polipeptídicas separadas se agregan para formar un complejo, pueden formarse desde dímeros (proteínas compuestas de dos cadenas polipeptídicas) hasta agregados de cientos de monómeros como en el caso de las cápsides virales. Los monómeros pueden ser todos idénticos, en cuyo caso se conocen como homómeros o pueden ser de cadenas polipeptídicas distintas, llamadas entonces heterómeros.

La fuerza de la interacción entre las subunidades puede ser comparable a la que se observa en el interior de una proteína individual (Creighton 1993). Estas interacciones son en su mayoría electrostáticas, aunque pueden existir conexiones covalentes entre residuos de cisteína, llamadas puentes de azufre, entre cadenas o dentro de una cadena polipeptídica.

Este nivel estructural es muy importante para funciones biológicas de regulación, ya que se puede activar o inhibir una función al modificar el estado oligomérico de una proteína.

## ***5.2. Prediciendo la estructura de una proteína***

La estructura final tridimensional de una proteína plegada en todos los niveles previamente vistos es la que determina su función. Sin embargo aún no entendemos satisfactoriamente el fenómeno del plegamiento de una proteína, ya que hay una gran cantidad de fuerzas y elementos que participan en la formación y

mantenimiento de esta estructura, lo que le da una enorme complejidad al problema. Muchos grupos de investigación en todo el mundo están llevando a cabo propuestas y experimentos para describir este proceso, algunas de las cuales presentaré a continuación como las bases de lo que entendemos como el problema del plegamiento.

### *Comienzos del estudio de la estructura de proteínas*

En 1957 un bioquímico americano llamado Christian Anfinsen realizó una serie de experimentos con la ribonucleasa A, una proteína monomérica de 124 residuos con 4 enlaces disulfuro. Observó que después de desplegar la proteína con urea (8M) y romper los puentes de azufre con 2-mercaptoetanol, podía dializarla y exponerla a O<sub>2</sub> (para volver a formar los enlaces S) y así recuperar una proteína indistinguible de la original y con un porcentaje muy alto de actividad. Esto demostró que la información para la formación de la estructura tridimensional de una proteína está almacenada únicamente en la secuencia de aminoácidos y no en el proceso *in vivo* de síntesis ni en otro proceso celular.

Ahora, suponiendo que este plegamiento final representa un estado de optimización de energía, ¿Cómo es que la proteína encuentra esta estructura funcional? Sabemos que no explora todas las conformaciones posibles porque son tantas que no alcanzaría el tiempo del universo para que fueran exploradas (Figura 5.2.1). Tomando en cuenta estas observaciones, Cyrus Levinthal propuso en 1969 que la búsqueda no es aleatoria, sino que una proteína debe seguir una ruta o una serie de pasos ordenados que la llevan a la conformación nativa.

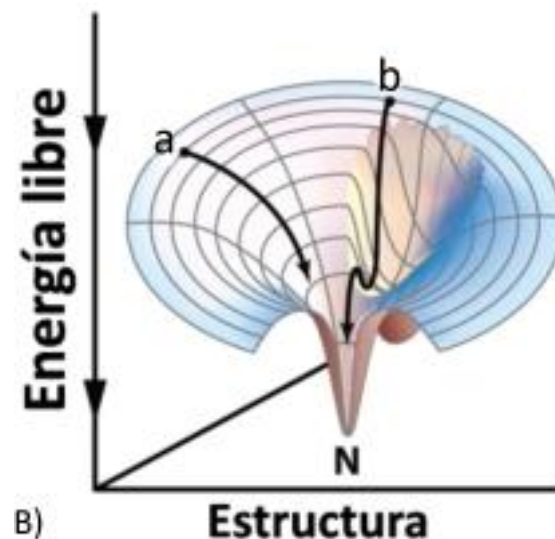


Figura 5.2.1. La paradoja de Levinthal ilustra la imposibilidad de que una proteína explore todo el espacio conformacional por igual, indicando que el proceso de plegamiento sucede a través de una o varias rutas (a o b) en las cuales se va pasando a niveles menores de energía hasta llegar al estado nativo (N), en el cual permanece al ser la estructura de

menor energía. Las rutas pueden ser directas (ruta a) o presentar mínimos locales que se conocen como intermediarios de plegamiento (ruta b)

## *Estabilidad*

El siguiente paso lógico sería explicar estas “rutas de plegamiento” y describir las fuerzas que forman parte del proceso, pero antes de hacerlo, se deben dejar claros algunos conceptos básicos que se utilizan para describir estos fenómenos.

Los primeros conceptos a aclarar son los estados estructurales opuestos de una proteína. Se le conoce como nativo al estado generalmente compacto y con gran cantidad de estructura secundaria que aparece en condiciones fisiológicas y le permite cumplir su función. Cualquier desviación de este estado puede llamarse como desnaturizado, y comprende un gran continuo de formas que van desde una estructura azarosa conocida como “randomcoil” o cualquier otra estructura, generalmente con mayor exposición al solvente y más libertad de movimiento.

El estado desnaturizado aparece cuando ciertas condiciones ambientales, como altas o bajas temperaturas o presencia de algunas sustancias desnaturizantes como urea o cloruro de guanidino (GdnHCl), provocan la pérdida de la estructura nativa. La estabilidad de una proteína, otro concepto de gran importancia, es la resistencia que presenta a la desnaturización en condiciones de estrés.

Una proteína en una solución fluctúa entre varios estados, aunque en las condiciones adecuadas se encuentra primordialmente en el estado nativo. Una medida de la estabilidad de una proteína es la relación entre la cantidad de proteína que se encuentra en estado nativo vs. la que se encuentra en el estado desnaturizado (Ec.1). Sin embargo, la cantidad de proteína desnaturizada es tan pequeña en condiciones normales que no se puede medir, por lo que experimentalmente utilizamos un gradiente de temperatura o de concentración de un agente desnaturizante que promueve el estado desnaturizado y en donde podemos medir ambas poblaciones, para extrapolar al valor en un solvente sin desnaturizante.

$$K_{eq} = [D]/[N]$$

Ecuación 1

La relación entre la concentración de proteína desnaturizada (D) y nativa (N) se conoce como  $K_{eq}$  y está relacionada a la energía libre de la macromolécula por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_f = G_N - G_D = -RT \ln K_{eq}$$

Esto es en condiciones de presión constante, donde R es la constante de los gases, T es la temperatura y el  $\Delta G_f$  la diferencia entre las energías libres de Gibbs del estado nativo ( $G_N$ ) y desnaturalizado ( $G_D$ ). El  $\Delta G$  de plegamiento es la medida más utilizada para describir la estabilidad de una proteína. Mientras más negativo sea el  $\Delta G_f$ , el estado nativo será más favorecido y la proteína más estable.

Otra manera de obtener la energía libre de Gibbs es mediante los valores de entalpía y entropía con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Donde  $\Delta H$  es el cambio en entalpía entre los estados plegado y desplegado, T es temperatura y  $\Delta S$  el cambio en la entropía.

El cambio en estos parámetros al plegarse una proteína puede entenderse como el originado por cambios en la solvatación y la conformación de la proteína (Weng y DeLisi 2001). El cambio en la entropía debido a la solvatación ( $\Delta S_s$ ) se debe a una disminución del área expuesta al solvente y a la reducción del “atrapamiento” del agua alrededor de los aminoácidos. Por otro lado, al plegarse una proteína cambian las interacciones electrostáticas y de van der Waals, ya que dejan de hacerlas con el agua que es expulsada del interior de la proteína para reemplazarlas por interacciones internas. Se propone que el cambio observado en la entalpía por la desolvatación ( $\Delta H_s$ ) es principalmente debido a las interacciones electrostáticas, ya que las interacciones de van der Waals son reemplazadas (Vajda 1994, Weng 1996). El cambio en energía debido a los cambios conformacionales es a su vez de naturaleza entrópica ( $\Delta S_c$ ) al restringir la posición de la cadena, y entálpica ( $\Delta H_c$ ) al tomar en cuenta la modificación de las distancias y ángulos de los enlaces dentro de la proteína.

$$\Delta G_f = \Delta H_s - T\Delta S_s + \Delta H_c - T\Delta S_c$$

Las proteínas son sólo estables marginalmente en condiciones fisiológicas, con valores de  $\Delta G$  entre -63 y -21 kJ/mol (Weng, DeLisi). Esto significa que por cada 10 000 000 moléculas en solución, encontramos entre 5-2000 desnaturalizadas.

Durante el estudio de la desnaturalización reversible de una proteína podemos vislumbrar las fuerzas y fenómenos que participan en la formación del estado nativo y la comprensión de estos elementos nos llevará

al diseño de estructuras y por lo tanto de funciones, lo que sería un gran avance para muchas áreas incluyendo ingeniería y medicina.

### *Estudios de mutantes*

La relación entre la secuencia y la estabilidad de una proteína puede ser estudiada mediante la comparación de las energías de plegamiento de la proteína original o silvestre (WT) con una a la cual se le ha cambiado la secuencia en al menos un aminoácido. En su mayoría, estos cambios tienden a ser desfavorables, desestabilizando a la proteína. Sin embargo, algunos estudios han generado mutantes con estabilidades mayores como en el caso de la mutación E65Q en la TIM de *Leishmania* (Williams et al 1999), que aumenta su resistencia a la desnaturalización por altas temperaturas en 26°C.

La medida más utilizada para reflejar la diferencia en estabilidad entre proteínas es el  $\Delta\Delta G$  de plegamiento.

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{WT} - \Delta G_{mut}$$

Ecuación 5

La mutación puede afectar a la proteína en distintas maneras, ya sea mediante una alteración de la estructura nativa o puede cambiar la energética de estados de transición entre distintos estados (como nativo vs. desnaturalizado) y cambiar constantes cinéticas.

Es claro entonces que las diferencias tanto en la carga como en el tamaño del residuo sustituido son de gran importancia para el resultado final en la proteína, ya que puede originar impedimentos estéricos o favorecer la exposición o enterramiento de ciertas zonas de la proteína, cambiando su energía.

Debemos también de considerar que la evolución ha trabajado por millones de años sobre todas las proteínas actuales, y que estas fuerzas de cambio han trabajado sobre la secuencia completa, para optimizar la interacción de todos los elementos, de modo que al quitar un sólo aminoácido se puede provocar una cadena de eventos, consecuencia del cambio, que alteran la estructura completa. Otros experimentos en los cuales se ha tenido más éxito para crear mutantes estables es el cambio seguido por una selección a partir de una población de mutaciones adicionales azarosas que pueden favorecer la presencia del nuevo aminoácido.

### 5.3. Triosafosfato Isomerasa

La triosafosfato isomerasa, también conocida como TIM o TPI, es una enzima de la glucólisis que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP), ya que sólo el GAP puede continuar en la ruta glucolítica para la formación de ATP.

#### *Estructura*

La TIM es una enzima homodimérica, a excepción de la de organismos termófilos, en los que es un tetramero (Maes et al. 1999, Walden et al. 2001). Cada una de sus subunidades está formada por 250 aminoácidos (27kDa). Cada monómero tiene un sitio activo completo conformado por los residuos Lys12, His95 y Glu167, pero la enzima es activa únicamente en la forma dimérica (Waley 1973). Se ha propuesto que la dimerización es necesaria para estabilizar la geometría del sitio activo (Wierenga 1992).

La estructura de la TIM es el prototipo del barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>, que consiste en un cilindro de 8 hebras  $\beta$  paralelas, rodeadas en el exterior por 8 hélices  $\alpha$ . Su estructura secundaria consiste de ocho unidades  $\beta\alpha$ , alternando a lo largo de la proteína hebras y hélices, y conectadas por asas. Éstas se numeran según su orden de aparición en la proteína lineal.

Zonas de interés de la estructura terciaria de la TIM son el asa 6 o asa catalítica (residuos 167-176), que se cierra sobre el sitio activo al entrar el sustrato, y las asas 1, 2, 3 y 4, que forman parte de la interfase del dímero. El asa 3 (residuos 71-78) en particular se conoce como asa interdigitante por los contactos que forma con el monómero complementario (Wierenga 1991). (Figura 5.3.1)



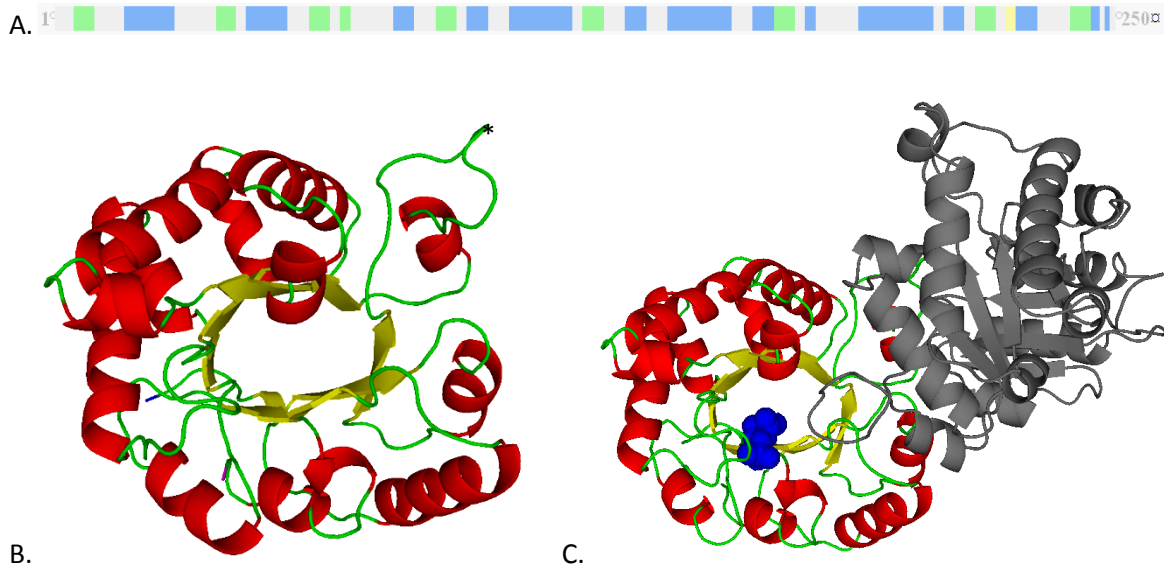


Figura 5.3.1. La figura A presenta la estructura secundaria de la TIM mostrando la secuencia lineal de los aminoácidos que forman hebras  $\beta$  en verde y los que forman hélices  $\alpha$  en azul. La figura B es un monómero de TIM coloreado según su estructura secundaria, se puede ver el barril  $\beta$  en amarillo y el asa interdigitante(\*). La figura C presenta un dímero de TIM, con uno de los monómeros en gris y un análogo del sustrato en azul. Todas son 4TIM de PDB.

Las estructuras tridimensionales de las TIMs de distintas especies están altamente conservadas. A la fecha se han depositado las coordenadas cristalográficas de 23TIMs provenientes de diferentes organismos, y todas presentan estructuras tridimensionales similares.

Es interesante resaltar que aun cuando todas las TIMs poseen una misma estructura básica y un nivel de conservación de aminoácidos alto, se han descrito distintas vías de plegamiento para estas proteínas. Las vías de desnaturalización que han sido reportadas son diferentes en complejidad, van desde un proceso de dos estados (TIM de conejo en Pan et al 2004), procesos en los que se detecta un intermediario monomérico (TIM de levadura en Vázquez-Contreras et al 2000) o en las que se presentan dos intermediarios, dimérico y monomérico (TIM de *T. cruzi* en Cháñez-Cárdenas et al 2005), a reacciones multiestado que involucran agregación de la proteína (*Termotoga maritima* y *Plasmodium falciparum*; Cháñez-Cárdenas et al 2005 y Samanta et al 2011).

### Mecanismo de reacción

El Glu167 (que se encuentra en la posición 165 en la TIM de levadura) ha sido identificado como la base catalítica y es el responsable de sustraer un protón del C1 de la DHAP para producir GAP, ó del protón del C2 del GAP para producir DHAP. La His95 transfiere protones entre los dos oxígenos del intermediario enediolato

en la reacción y la Lys12 produce una carga positiva en el ambiente del sitio activo, para que el sustrato fosfodianión pueda unirse. El asa 6 o asa catalítica de la triosafosfato isomerasa consta de aproximadamente 10 residuos (167-177) que se cierran sobre el sitio activo tras la unión del sustrato, formando un nuevo puente de hidrógeno con uno de los grupos fosfato del sustrato. Al cerrarse el asa, se estabiliza un intermediario de tipo enediol que permite la interconversión entre GAP y DHAP en el interior de la proteína.

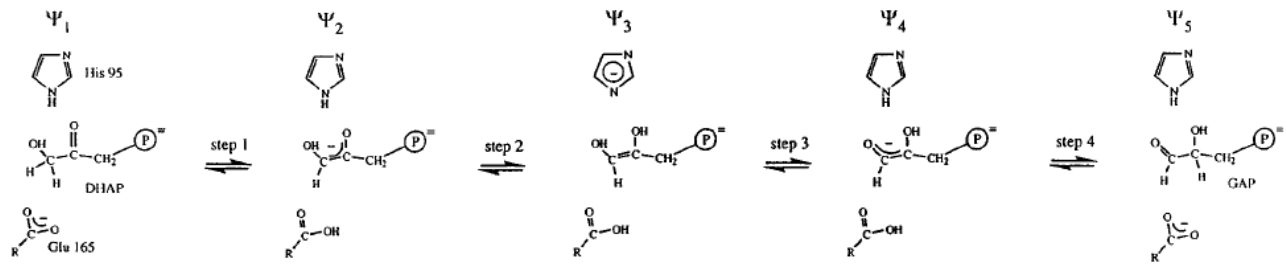


Figura 5.3.2. Mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa según Åqvist y Fothergill 1996. El mecanismo consta de cuatro pasos en donde el Glu165 actúa como una base catalítica y la His95 como un ácido. Esta figura no incluye los pasos de unión y liberación y presenta cinco configuraciones (Ψ 1-5).

La triosafosfato isomerasa es una enzima altamente eficiente, ya que a concentraciones fisiológicas de sustrato y producto, su velocidad está limitada por la difusión del sustrato. (Knowles et al 1988). Aunque sus propiedades funcionales dependen de contactos originados por la dimerización, la actividad catalítica de esta enzima sigue una cinética Michaeliana y no requiere de cofactores.

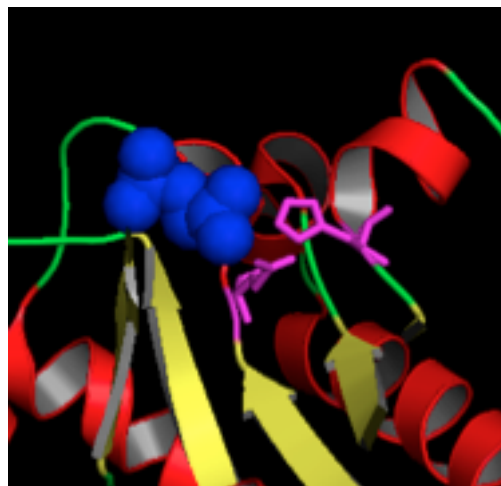


Figura 5.3.3. Estructura del sitio activo de la triosafosfato isomerasa. Se muestra en azul un análogo del sustrato y en rosa los aminoácidos catalíticos Glu167 e His95.

## 5.4. TIM de *Trypanosoma brucei*

Para entender bien las características de la enzima, se tiene que saber algo sobre el organismo en el que se encuentra, ya que no sólo comparten una historia en el tiempo evolutivo, sino que las características de la enzima están finamente ajustadas a las condiciones y necesidades del organismo.

Hay un particular interés en el estudio de la TIM de *Trypanosoma brucei* ya que este organismo tiene muchas singularidades en las cuales se ve involucrada la glucólisis y el paso catalizado por esta enzima.

*T. brucei* es un protozoo del grupo de los kinetoplastidos (que incluyen a *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* entre otros), es un parásito sanguíneo que utiliza como vector a la mosca tse tse. Algunas subespecies causan la enfermedad tripanosomiasis africana humana, también conocida como la enfermedad del sueño, que llegó a ser la primer causa de muerte en algunas tribus africanas antes del 2005. A partir de ese año, se inició una campaña de control y las cifras se han reducido inmensamente hasta que se redujo el número de casos reportados debajo de los 10 mil. Actualmente la Organización Mundial de la Salud supone que hay aproximadamente 30 mil casos de tripanosomiasis africana en el mundo. La enfermedad es compleja de detectar y tratar y requiere de tratamiento muy especializado. (Organización Mundial de la Salud, Nota descriptiva N° 259, Octubre de 2010).

En su forma sanguínea, el organismo presenta una reducción en el número de mitocondrias y carece de ciclo del ácido tricarbóxico y cadena de transporte de electrones, por lo que depende enteramente de la glucólisis para la obtención de energía, y recurre a un aumento en la concentración de las enzimas de esta vía, resultando en una glucólisis 50 veces más rápida en *T. brucei* que en su huésped (Fairlamb y Opperdoes 1986 y Sommer-Cheng et al 1992).

Uno de los mecanismos que utilizan para el aumento de la tasa glucolítica, que a su vez es una característica original de los kinetoplastidos como *T. brucei*, es la relocalización de las enzimas glucolíticas a los glicosomas, unos organelos similares a los peroxisomas tanto en su estructura como en su función. Al igual que los peroxisomas, los glicosomas realizan la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de lípidos que contienen un enlace éter, y el metabolismo del peróxido, carecen de catalasa y en lugar de ello llevan a cabo algunos pasos del metabolismo de carbohidratos. (van den Bosch et al 1992, Galland et al 2007, Fairlamb y Opperdoes 1986, Hart et al 1987)

Las proteínas de los glicosomas son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en el citoplasma e importadas inmediatamente al glicosoma sin modificaciones proteolíticas (en menos de 5 minutos se

encuentran ya dentro del organelo) (Hart et al 1987). Las proteínas que son enviadas suelen tener una señal conocida como PTS1 o PTS2, aunque en algunos casos, como es el caso de la TIM, no las poseen y pueden presentar señales internas o pasar acarreadas a otras proteínas (van den Bosch et al 1992, Galland et al 2007). La mayoría de las proteínas glicosomales se translocan plegadas, manteniendo su estructura nativa durante el paso por la membrana. Algunas atraviesan incluso formando oligómeros. (Wickner y Schekman 2005). Los componentes proteicos del glicosoma presentan algunas características en común, como un tamaño ligeramente mayor al de sus homólogas citoplasmáticas, donde el aumento corresponde a la secuencia señal para importación, y un punto isoeléctrico muy básico, que se cree podría tener un rol en interacciones dentro del glicosoma o en el transporte o retención dentro del organelo (Borst et al 1986)

De la vía de la glucólisis, las primeras siete enzimas se encuentran localizadas dentro del glicosoma, incluyendo a la TIM. Se ha estudiado este proceso de compartimentalización y se ha encontrado que la translocación errónea al citosol de tan solo un pequeño porcentaje de algunas enzimas glicolíticas, incluyendo la TIM, puede resultar en la muerte del parásito (Helfert et al 2001).

### Cisteínas de la TbTIM

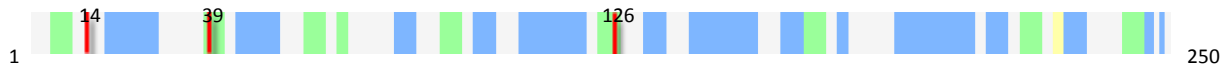


Figura 5.4.1. Visualización de la estructura secundaria de manera lineal de la TbTIM (hebras  $\beta$  en verde, hélices en azul) con las cisteínas 14, 39 y 126 en rojo en sus posiciones correspondientes.

La TbTIM contiene en su secuencia tres residuos de cisteína en las posiciones 14, 39 y 126. Dentro de la estructura, éstos se encuentran en el asa 1 y hebras  $\beta 2$  y  $\beta 5$  respectivamente (Figura 5.4.1). La C126A es uno de los 11 residuos estrictamente conservados en todas las TIMs conocidas y se encuentra a distancia de van der Waals del Glu catalítico (González-Mondragón 2004) (Figura 5.4.2.A). Su fuerte conservación a pesar de que no es un aminoácido catalítico ha hecho de esta cisteína un punto de interés para estudios de estabilidad, no sólo en la TbTIM sino en otras TIMs como las de levadura y de *P. falciparum* (González-Mondragón 2004; Samanta et al 2011).

La C14 es uno de los 3 residuos que se encuentran completamente expuestos en el monómero pero se entierran por completo en la interface del dímero (Hernández-Alcántara et al 2002); Su cadena lateral está

rodeada por los residuos del asa interdigitante (asa3) del monómero complementario (Figura 5.4.2.B) formando un enlace de hidrógeno con la Gly72 de la otra subunidad. Este residuo se encuentra conservado en parásitos y algunas plantas, mientras que otros organismos presentan sustituciones en esa posición, Met (como en la TIM humana) y Leu principalmente y Ser, Thr, Gln y Ala en menor frecuencia (Hernández Alcántara et al 2002). Por esta razón este residuo ha provocado interés como blanco para fármacos (Gómez-Puyou et al 1995, Garza-Ramos et al 1998). Adicionalmente, Por último, la C39 es un residuo no conservado que se encuentra enterrado en el interior de la proteína y se localiza en el extremo amino terminal de la hebra  $\beta$ 2.

Es importante notar que ninguna de las cisteínas se encuentra formando puente disulfuro en la proteína nativa.

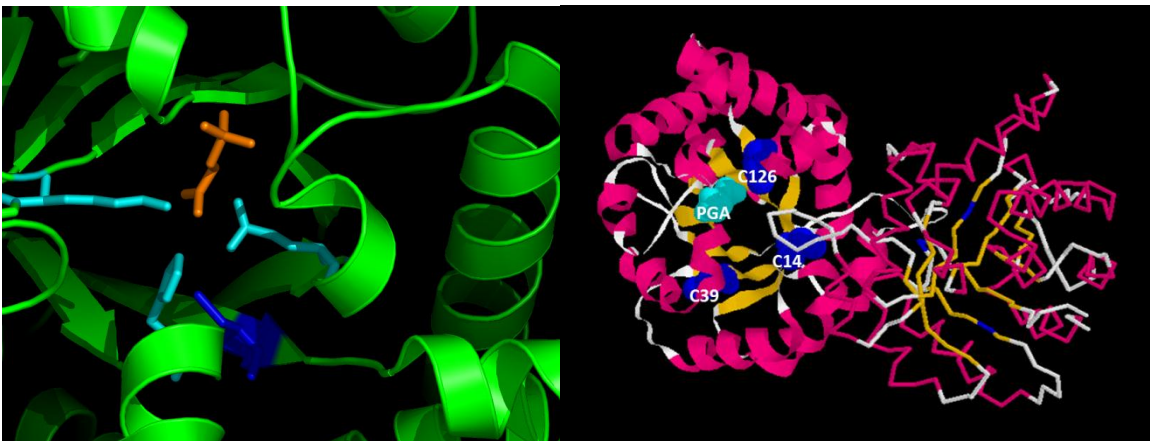


Figura 5.4.2. (A) Sitio catalítico de la TbTIM con un análogo del sustrato en naranja, los aminoácidos catalíticos en azul cian y la C126A en azul oscuro. (B) Estructura del dímero de la TbTIM, con las cisteínas en azul oscuro, un análogo del sustrato en cian. Se puede observar el esqueleto polipeptídico del asa interdigitante del segundo monómero sobre la C14 del primero.

## 6. Planteamiento del Problema

La TbTIM ha sido objeto de varios estudios desde la publicación de su estructura cristalográfica en 1987 (Wierenga et al 1987). En 2002 se publicó un primer estudio del mecanismo de desplegamiento de la TbTIM inducido por desnaturalizantes químicos (Chávez-Cárdenas et al 2002). En este trabajo se describió el desplegamiento de la enzima con dos poblaciones de intermediarios y utilizaron mutaciones en los residuos de triptófano para tratar de explicar los distintos eventos del desplegamiento. Sin embargo no fue posible obtener condiciones de reversibilidad en la desnaturalización, por lo que no se presentaron parámetros termodinámicos asociados a este proceso. Aproximadamente en las mismas fechas se realizó un estudio sobre la actividad enzimática y estabilidad térmica de mutantes de la cisteína de interfase (Cys14) de la TbTIM, en el cual se estudió el efecto de distintos residuos en esta posición de importancia, encontrando una relación entre las diferencias del tamaño y polaridad del residuo con las alteraciones cinéticas y estructurales que provocaban en la proteína. (Hernández-Alcántara et al 2002). Dos tesis posteriores se dedicaron a esta enzima, una enfocada a el efecto que tiene el sustituir la Cys126 sobre la actividad catalítica y especificidad del sitio activo (Díaz 2005) y la segunda retomando el estudio del mecanismo de desplegamiento de la TbTIM en las que fue posible obtener condiciones de reversibilidad del proceso (Guzmán 2006).

De los trabajos previamente mencionados, los que tratan sobre la vía de plegamiento de la TbTIM concuerdan en la existencia de un intermediario muy bien definido al desnaturalizar por distintas técnicas. Sin embargo, la naturaleza (e incluso el número) del intermediario ha sido objeto de varias especulaciones, culminando en un muy reciente estudio exhaustivo de sus propiedades y su papel en la vía. El plegamiento al equilibrio de la TbTIM silvestre involucra un mecanismo de tres estados con un intermediario dimérico que se favorece a concentraciones intermedias de cloruro de guanidina (Guzmán 2012)

Dada la importancia de las cisteínas 14 y 126 en el mantenimiento catalítico y estructural de la TbTIM, en este trabajo se estudió la contribución de estos residuos a la estabilidad termodinámica de la enzima. La diferencia en los valores de energía de Gibbs ( $\Delta G$ ) obtenidos entre las mutantes y la silvestre nos pueden dar información sobre las interacciones que estas cisteínas aportan a la estabilidad total de la enzima.

## 7. Objetivos

Estudiar el efecto de las mutaciones individuales de las cisteínas 14 y 126 en la estabilidad y plegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*

Caracterizar el desplegamiento reversible por hidrocloreuro de guanidino (GdnHCl) de las mutantes C14A y C126A de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*.

Comparar el plegamiento de las mutantes con el exhibido por la enzima nativa.

## 8. Hipótesis

La C126 se localiza en el interior del barril por lo que esperamos que contribuya de manera significativa en la estabilidad de los monómeros de la TIM. La C14, por su ubicación en la interfase entre subunidades, suponemos que participe en la formación del homodímero y por lo tanto que su sustitución afecte la dimerización de la proteína.

El reemplazo de las cisteínas 14 y 126 por alaninas de la TbTIM disminuirá su estabilidad total ( $\Delta G_T$ ), ya que estamos modificando dos residuos que contribuyen al mantenimiento estructural de la enzima. Esperamos que la magnitud de la reducción en la estabilidad de la enzima refleje la conservación de estos residuos.



## 9. Materiales y Métodos

### 9.1. Materiales

#### *Soluciones*

Medio sólido: Bactotripton 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5g/l, ampicilina 0.1g/l, agar 25g/l.

Medio líquido: Bactotripton 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5g/l, ampicilina 0.1g/l

Buffer de lisis: Mes 25mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, PMSF 0.2mM, pH 6.5

Buffer A: TEA 100mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Azida de sodio 0.5mM, NaCl 25mM, pH 8.0

Buffer B: TEA 100mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Azida de sodio 0.5mM, NaCl 150mM, pH 8.0

Buffer TE: TEA 100mM, EDTA 10mM, pH 7.4

Buffer TED: TEA 100mM, EDTA 10mM, DTT 1mM, pH 7.4

### 9.2. Purificación de la proteína

Las mutantes de cisteína se purificaron según un procedimiento estandarizado en el laboratorio, derivado del método descrito por Borchet et al (1993). Se utilizaron células de *E. coli* de la cepa BL21DE3pLysS transformadas por choque térmico con los genes mutados en un vector de expresión pET3a (de pETSystem, Novagen) con resistencia a ampicilina y expresión dependiente de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). (células donadas por la Dra Georgina Garza Ramos)

Las células transformadas se crecieron en placas con medio de cultivo Luria-Bertani (LB)-agar-ampicilina, y a partir de una única colonia se creció un cultivo líquido LB-amp de 50ml (precultivo), que se incubó por 12 horas en agitación continua a 37°C. Las células se centrifugaron por 10 minutos a 5000rpm y se resuspendieron con 1 ml de medio LB-ampicilina, se inoculó un litro del mismo medio de cultivo hasta una absorbancia a 600nm de 0.1, a partir de la cual se incubó a 37°C en agitación continua hasta llegar a aproximadamente 0.6 de DO. La sobreexpresión de la proteína se inició con la adición del inductor IPTG a 0.4mM. El cultivo se incubó por 12 horas en agitación constante a 37°C para la C14A y a 30° para la C126A.

Las células se separaron por centrifugación a 5000rpm por 15 minutos a 4°, se resuspendieron en 40ml de buffer de lisis y se rompieron por sonicación en intervalos de 45 s con descanso de dos minutos para evitar el

calentamiento de la solución. El buffer de lisis incluye PMSF como inhibidor de proteasas. El extracto total se centrifugó por 15 minutos a 15000 rpm, eliminando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 40 ml de buffer de lisis con 200 mM de NaCl, agitando en hielo por 30-60 minutos para solubilizar la proteína. Se centrifugó por 15 minutos a 15000 rpm y se recuperó el sobrenadante. El siguiente paso es la precipitación fraccionada de la mezcla de proteínas para eliminar proteínas contaminantes. El sobrenadante se llevó a 45% de saturación con sulfato de amonio. Tras 12 horas a 4°C, se centrifugó la mezcla por 15 minutos a 15000 rpm y el sobrenadante se llevó a 65% con sulfato de amonio. La proteína de nuestro interés precipita a esta concentración de la sal y el botón (obtenido tras centrifugar a 15000 rpm por 15 minutos) se resuspendió en 5 ml de buffer A y se dializó en 500 ml del mismo buffer por 24 horas a 4°C con un cambio a las 12 horas para eliminar el sulfato de amonio. La muestra resultante se inyectó a una columna de carboximetil CM-sefariosa equilibrada con el mismo buffer, controlada por un equipo de FPLC (Akta). La *TbTIM* tiene un punto isoeléctrico (9.8) mayor que la mayoría de las proteínas de *E. coli*, incluyendo la TIM de *E. coli* (6.8). La proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de 25 mM a 150 mM de NaCl, se confirmó la pureza de las fracciones elegidas y se juntaron y concentraron en Centricon (Millipore)

Para establecer la pureza de la muestra a distintos pasos del procedimiento y en las fracciones finales, se llevó a cabo electroforesis desnaturizantes en gel de poliacrilamida al 12.5% SDS-PAGE (Laemmli) teñidos con azul de Coomassie. La concentración de la proteína pura se cuantificó midiendo su absorbancia a 280 nm (25°C) y dividiendo el valor de absorbancia entre el coeficiente de extinción molar de la *TbTIM*,  $\epsilon^{0.1\%} = 1.298$ .

Previo a su uso final, la solución se dializó nuevamente con buffer TE por 24 horas a 4°C y se volvió a determinar su concentración.

### **9.3. Actividad**

Para medir la cantidad de DHAP que se forma a partir de GAP, se requiere de un ensayo acoplado a otra reacción enzimática, que permita monitorear un cambio de absorbancia contra tiempo. El NADH tiene una absorbancia específica a 340 nm. Cada molécula de DHAP que se forma a partir del GAP, la  $\alpha$ -GDH la convierte a glicerol 3-P y se oxida una molécula de NADH.

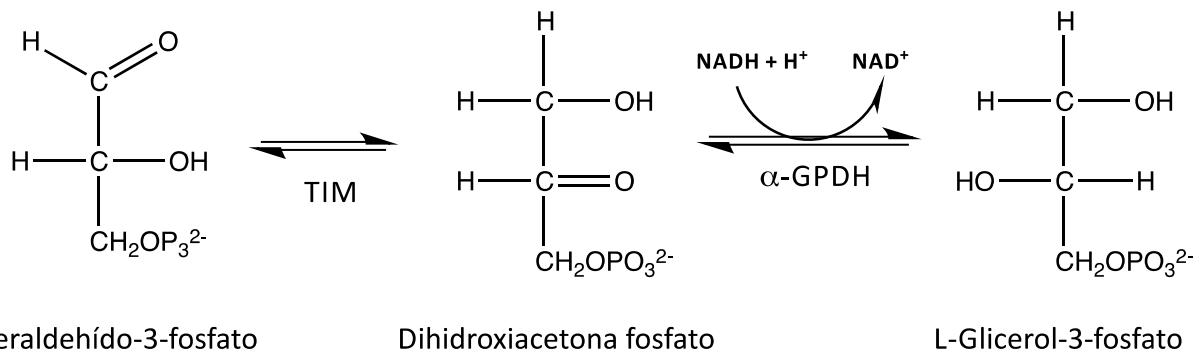


Figura 9.3.1. Ensayo de actividad de la TIM acoplado a la oxidación de NADH.

Los ensayos de actividad se realizaron a 25°C siguiendo la disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm de 1 mL de mezcla de reacción que contiene buffer TE, 0.20 mM de NADH, 1 mM de GAP y 10 µg de α-GDH en 1ml de volumen final. Se midió la absorbancia de la solución por 2 minutos para asegurar la ausencia de TIM en la solución y la reacción se inició adicionando 6ng de TIM previamente diluida. El cambio en la absorbancia fue lineal en el tiempo en todas las ocasiones, indicando que no ocurre una disociación significativa del dímero durante la medición de actividad. La actividad se cuantificó dividiendo el cambio en la absorbancia entre el coeficiente de extinción molar del NADH = 6.22 y entre la concentración de proteína, expresando el valor resultante en micromolas de producto por minuto y mg de proteína.

#### 9.4. Experimentos de desplegamiento y replegamiento.

Una vez asegurada la pureza, concentración y actividad de la proteína, se procedió a realizar experimentos de desnaturalización y renaturalización con el agente caotrópico hidrocloreuro de guanidinio (GdnHCl). El primer paso en el estudio de estas mutantes fue obtener la transición de desnaturalización, para lo cual se siguió un protocolo previamente establecido en el laboratorio y que se expone a continuación:

Para los experimentos de desplegamiento se utilizó buffer TED que incluye 1 mM de DTT, un agente reductor que evita la formación de puentes disulfuro. La proteína se diluyó hasta una concentración final de 20 µg/ml a concentraciones de GdnHCl entre 0 y 6 M y se mantuvo a 23°C, midiéndose la intensidad de fluorescencia diariamente hasta que no se observaran cambios entre un día y el siguiente. De esta manera podemos asegurar haber alcanzado el equilibrio, lo que en caso de ser un desplegamiento reversible, nos permite obtener los parámetros termodinámicos que rigen su plegamiento.

Para los experimentos de replegamiento, la proteína se incubó por 10 minutos a una concentración de 1 mg/ml de TIM y 6 M de GdnHCl y una vez determinada su desnaturalización mediante la obtención de su

espectro de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 280\text{nm}$  y  $\lambda_{em} = 300\text{-}400\text{nm}$ ), se diluyó a una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$  de proteína y concentraciones entre 0.12 y 6 M de GdnHCl.

Se utilizó como control una solución similar, con una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$  de proteína y que sufrió la misma dilución inicial a 1mg/ml, pero sin GdnHCl. A la concentración de proteína a la cual se llevaron a cabo los experimentos, la enzima se encuentra dimérica y es activa en condiciones normales durante el tiempo máximo de incubación.

### ***9.5. Replegamiento y Desplegamiento seguidos por actividad catalítica***

Los experimentos para medir la actividad de la enzima a varias concentraciones de desnaturizante se realizaron combinando los protocolos de actividad (9.3) y de replegamiento y desplegado al equilibrio (9.4). Para estos experimentos se realizaron las diluciones de desnaturización y replegamiento descritas en la sección 9.4 pero antes de medir actividad se realizaron diluciones hasta una concentración de 3  $\mu\text{g/ml}$ . Esta dilución se realizó en el mismo buffer de incubación de cada muestra, manteniendo la misma concentración de desnaturizante para evitar el replegamiento de la enzima previo a la medición, y se realizó rápidamente conforme se iban utilizando las muestras. Para dar inicio a la reacción, se adicionaron a la mezcla de reacción 6ng de enzima en 20 $\mu\text{l}$  de solución, obteniendo concentraciones finales de: 6ng/ml de TbTIM, 0.2 mM de NADH, 1 mM de GAP y 50  $\mu\text{g/ml}$  de GPDH, todo en buffer TE.

Una vez agitada la solución, se colocó en un espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 340 nm a lo largo de 10 minutos, registrando la pendiente que producía cada muestra. La linealidad de la pendiente indica que no están siendo registrados efectos de disociación o replegamiento. Adicionalmente, las curvas obtenidas por actividad son consistentes con los perfiles obtenidos por otros métodos como IF, lo que indica que no hay replegamiento significativo en los tiempos de la medición que pudieran afectar la interpretación de los perfiles seguidos por actividad según este protocolo.

Estos experimentos fueron realizados por duplicado para la desnaturización y en triplicado para el replegamiento de ambas enzimas.

## **9.6. Replegamiento y Desnaturalización seguidos por intensidad de fluorescencia**

Cuando una molécula absorbe luz, uno de sus electrones es excitado. El estado de excitación del electrón decae al estado basal liberando energía por distintos mecanismos. Uno de estos es la emisión de luz, y los compuestos que decaen mediante este mecanismo se llaman compuestos fluorescentes. Existen algunas biomoléculas que incluyen grupos químicos fluorescentes, que incluyen el NADH, FAD y los aminoácidos triptófano y tirosina. La fluorescencia de estos últimos se utiliza durante el estudio de una proteína, ya que la intensidad y la longitud de máxima emisión,  $\lambda_{max}$ , del espectro de fluorescencia cambian al exponer a los aminoácidos fluorescentes a distintos ambientes. El triptófano y la tirosina son aminoácidos hidrofóbicos (Tabla 5.1.1), y en una estructura nativa generalmente se encuentran en el interior de la proteína, por lo que cambios en su espectro de fluorescencia nos permite deducir cambios en la estructura terciaria de la proteína.

La TbTIM tiene un total de 5 triptófanos en las posiciones 11, 90, 159, 170 y 193, que a excepción del 193 se encuentran localizados en el interior de la proteína (Chávez Cárdenas et al 2002). Adicionalmente cuenta con 5 residuos de tirosinas que participan en la fluorescencia de la proteína. Se ha reportado el uso de todos estos sensores como reflejo de cambios en la estructura terciaria promedio de la proteínas (Lakowicz).

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro ISS PC1. Se utilizaron celdas de cuarzo de 500  $\mu$ l de volumen, excitando a una longitud de onda de 280nm, longitud en la cual tanto los residuos de tirosina como los de triptófano absorben luz, y midiendo la señal de emisión a cada nanómetro desde 300 hasta 400nm. Así obtenemos información de cambios conformacionales terciarios globales de la proteína.

El cambio en fluorescencia intrínseca fue seguido en las transiciones de desplegamiento y replegamiento. La intensidad de fluorescencia de las muestras fue medida a la longitud de onda correspondiente al máximo de las estructuras nativas (320nm) y el centro espectral de masas (CEM) se calculó de los datos de intensidad ( $I_\lambda$ ) obtenidos a diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ), usando la siguiente ecuación:

$$CEM = \frac{(\sum \lambda) * I_\lambda}{\sum I_\lambda}$$

Ecuación 6

Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado para la desnaturalización y cuatro repeticiones para el replegamiento tanto para la C14A como para la C126A.

## 10. Resultados

### 10.1. Purificación

Las mutantes de *TbTIM*, C14A y C126A, fueron purificadas exitosamente con la metodología previamente descrita, dando un rendimiento aproximado de 30 a 40 mg de enzima por cada litro de cultivo. La pureza de la solución final puede observarse mediante electroforesis, como aparece en la figura 10.1.1, donde se observan las bandas de algunas de las fracciones más concentradas que eluyen de la columna CM-sefarosa, a una distancia correspondiente al peso específico de 27 kDa.

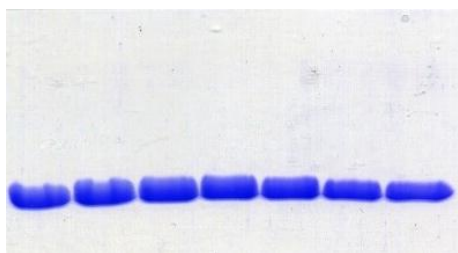


Figura 10.1.1. Gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS que muestra las fracciones obtenidas después de pasar por la columna de CM-sefarosa

### 10.2. Efecto de las mutaciones en las propiedades espectroscópicas y catalíticas de la *TbTIM*

En cuanto a sus características espectroscópicas, las mutantes C14A y C126A presentan espectros de fluorescencia nativos idénticos, con un máximo de emisión a 320nm y CEM en 331nm (Figura 10.2.1). En la tabla 10.2.2 se comparan las propiedades espectroscópicas y los parámetros cinéticos de las mutantes y la WT.

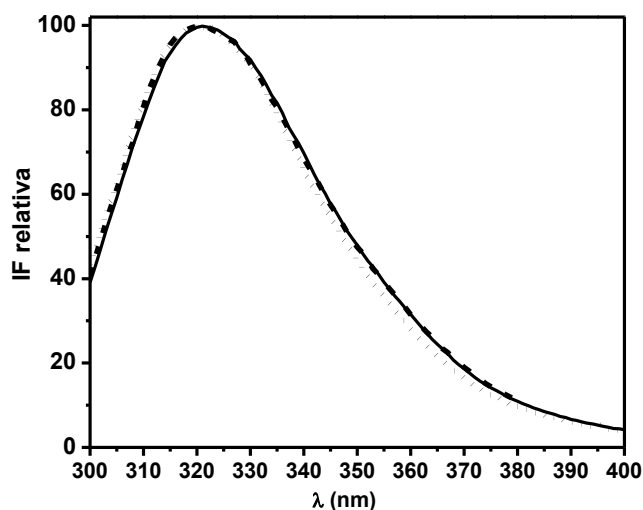


Figura 10.2.1. Espectros de Fluorescencia intrínseca de las mutantes C14A y C126A. Los espectros de las enzimas nativas exhiben la misma forma, con un máximo en 320. Se muestra C14A con línea continua, C126A con línea punteada y WT con línea a rayas.

Tabla 10.2.2. Parámetros cinéticos y de fluorescencia intrínseca de laTIM WT, C14A y C126A en su estructura nativa.

	WT	C14A	C126A
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	320 *	320	320
CEM (nm)	331 *	331	331
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) $\times 10^3$	4.33 *	5.01**	1.85**
$K_m$ (mM)	0.38 *	0.4**	0.2**

(\* Datos de Guzmán 2006. \*\* Datos de Díaz 2005).

### ***10.3. Desnaturalización y replegamiento al equilibrio.***

La obtención de los parámetros termodinámicos asociados al proceso de plegamiento/desplegamiento de una proteína, requiere determinar si el proceso es reversible, así como establecer las condiciones de equilibrio.

Al desnaturalizar a las mutantes de cisteína de la TbTIM con el agente caotrópico hidrocloreurode guanidina (GdnHCl), se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia acompañada por un desplazamiento de la  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión y CEM hacia mayores longitudes de onda, comportamiento característico de la solvatación de los triptófanos. Las transiciones de desnaturalización alcanzaron el equilibrio alrededor de 4 días después de su exposición a la concentración final del desnaturalizante; por lo que los datos siguientes se obtuvieron incubando las muestras durante 4 días, a las diferentes concentraciones de GdnHCl.

Las curvas de desnaturalización de ambas mutantes exhibieron una transición bifásica, en la que se observa una meseta muy marcada a concentraciones de GdnHCl entre 1-1.5 M y 0.6-1.5 M para la C14A y C126A respectivamente (Figura 10.3.2). Esta meseta entre las dos transiciones implica la presencia de un estado intermediario en la vía de desplegamiento de las mutantes de cisteína. Los espectros de emisión de las mutantes a lo largo de esta meseta muestran una reducción del 60% en intensidad de fluorescencia y un desplazamiento de la  $\lambda_{\text{max}}$  a un valor entre 335 y 338 nm, con un CEM de 342 nm para ambas (Figura 10.3.1). Estos espectros se mantienen prácticamente idénticos a lo largo de la meseta (en cuanto a intensidad y forma) hasta una concentración de 1.5 M de GdnHCl; a partir de este punto, el equilibrio es desplazado hacia la conformación desplegada, esto es a 3 y 2.5 M de GdnHCl para la C14A y la C126A, respectivamente. En la conformación desnaturalizada, ambas mutantes presentan un espectro con una disminución en la IF del 90% y un desplazamiento de la  $\lambda_{\text{max}}$  hasta 355 nm, con un CEM de 350 nm (Figura 10.3.1).

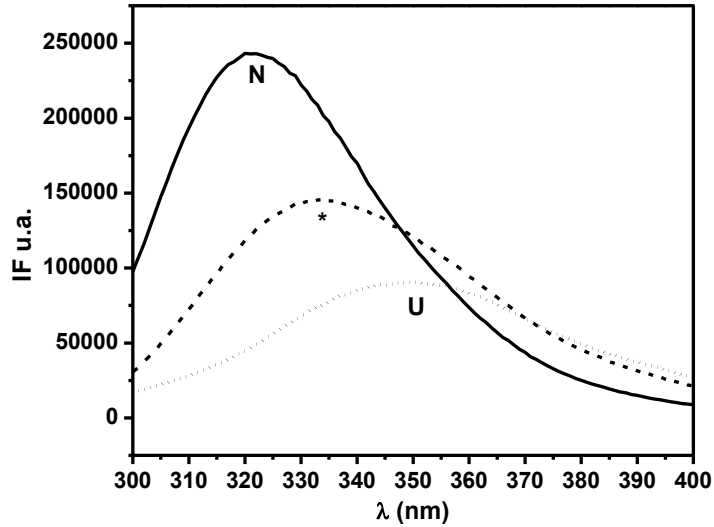


Figura 10.3.1. Espectros de fluorescencia intrínseca de C14A en el estado nativo (N en línea continua, con el máximo en 320nm), en la meseta del perfil a 1.5M GdnHCl (\* en línea discontinua, máximo en 334nm) y en el estado desnaturalizado a 3M GdnHCl (U en línea punteada, máximo en 350nm).

La desnaturalización a 6M sucede por completo en tiempos muy cortos, de modo que para el replegamiento bastó dejar desnaturalizar las proteínas por 10 minutos a 6M de GdnHCl y posteriormente diluir las muestras a las concentraciones finales de GdnHCl. El equilibrio se alcanzó a las 24 hrs, por lo que las mediciones de replegamiento se realizaron a este tiempo. Se obtuvo una recuperación de la IF de 85-90% para la C14A y de 60% para la C126A. Las transiciones de replegamiento también son bifásicas, observándose una meseta a concentraciones de GdnHCl entre 1-1.5 M en la C14A y 0.6-1.5M para la C126A.

Las transiciones de los perfiles de desplegamiento y replegamiento de la mutante C14A son coincidentes, lo que refleja condiciones de equilibrio. La mutante C126A exhibe un replegamiento parcial, las transiciones se sobreponen hasta el intermediario estable pero no son coincidentes en la región que comprende los puntos a bajas concentraciones de GdnHCl. Adicionalmente, la disminución de la IF se da a la par del desplazamiento de los espectros hacia mayores longitudes de onda, de modo que los perfiles seguidos por IF y CEM presentan el mismo comportamiento y las transiciones se dan en las mismas concentraciones de desnaturalizante (Figura 10.3.2).



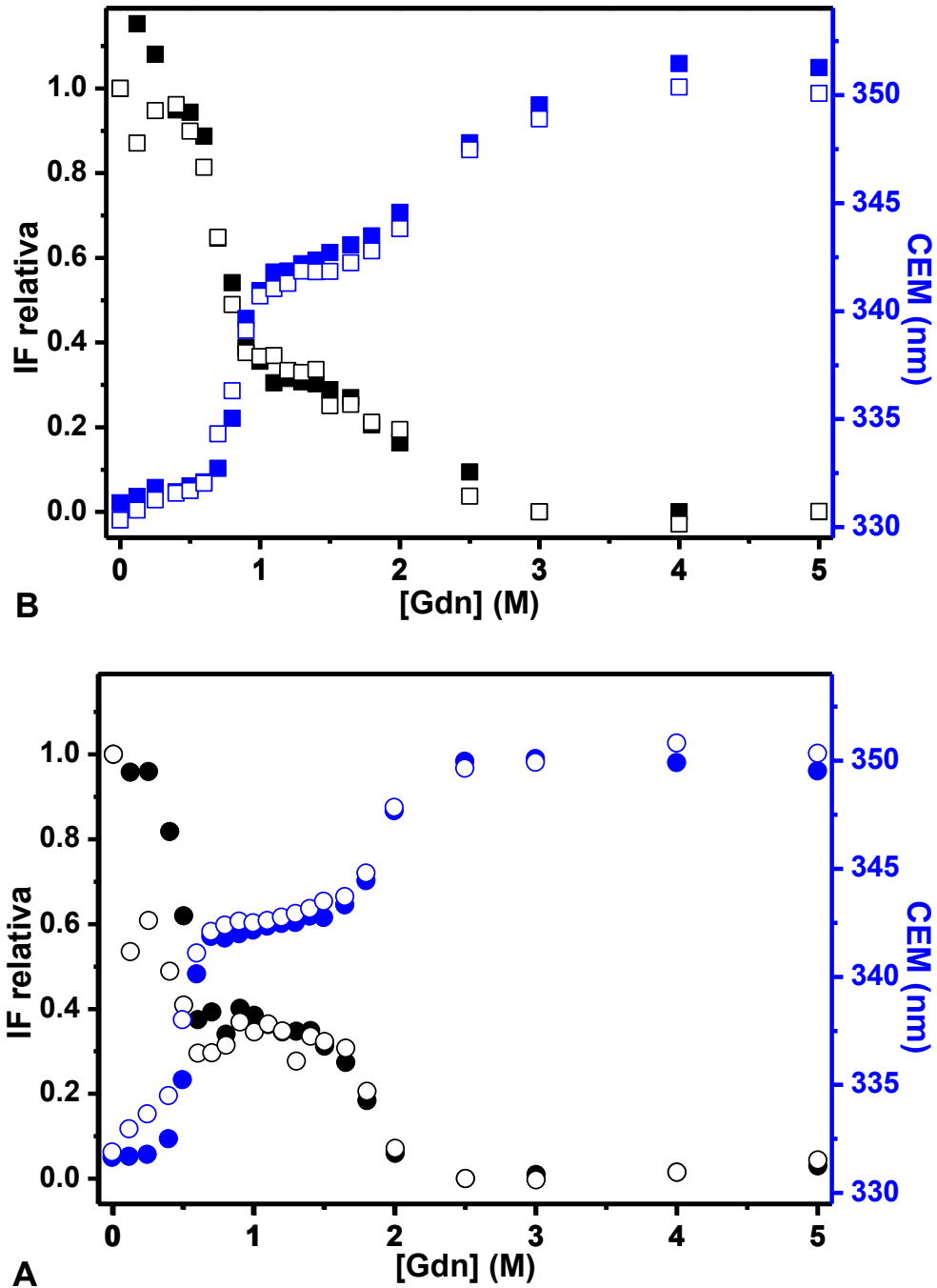


Figura 10.3.2. Perfiles de desplegamiento (figuras sólidas) y replegamiento (figuras vacías) como función de la concentración de desnaturalizante (GdnHCl) seguidos por intensidad de fluorescencia a 320nm (en negro) y por CEM (en azul). A) C14A B) C126A. Estos datos se obtuvieron a una concentración de proteína de 20 $\mu$ g/ml (0.74  $\mu$ M) en buffer TED a pH 7.4 a una temperatura de 23°C.

Los espectros de emisión de las enzimas replegadas a 0.12M GdnHCl (mínima concentración a la que se pueden replegar directamente desde 6M) presentan una  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión y un CEM igual que el presentado por las enzimas nativas, aunque exhiben menor intensidad de fluorescencia, principalmente en la mutante C126A.

Los espectros de emisión de las proteínas en la meseta presentan las mismas características ( $\lambda_{\max}$ , IF y CEM) en ambas mutantes, tanto en el sentido de la desnaturalización (N→I) como en el del repliegamiento (D→I) (Figura 10.3.3).

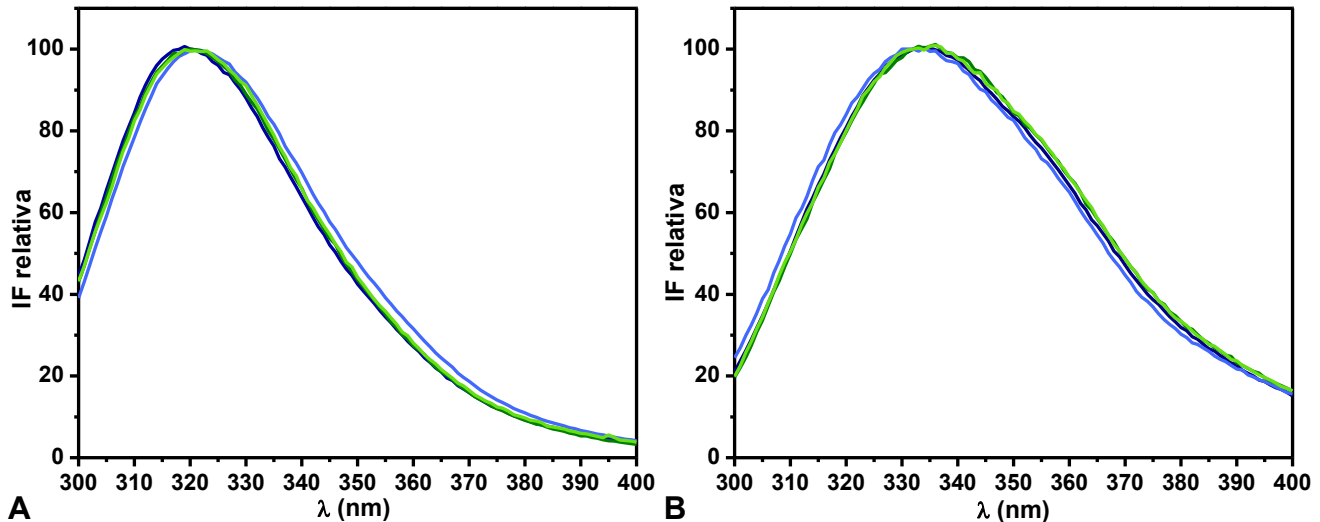


Figura 10.3.3. Espectros de fluorescencia de las especies identificadas en el perfil de plegamiento. A) Espectros de las enzimas nativas (C14A en azul oscuro y C126A verde oscuro) y replegadas a 0.12M de GdnHCl (C14A azul claro y C126A verde claro). B) Espectros de las enzimas en la meseta del perfil (1.5M de GdnHCl), tanto en el sentido de la desnaturalización (C14A en azul oscuro y C126A verde oscuro) como en el del repliegamiento (C14A azul claro y C126A verde claro). Los cuatro espectros presentan un máximo en 334-336nm. Estos datos se obtuvieron a una concentración de proteína de 20 $\mu$ g/ml (0.74  $\mu$ M) en buffer TED a pH 7.4 a una temperatura de 23°C.

Al seguir el plegamiento de ambas mutantes por cambios en la actividad catalítica observamos una transición monofásica (Figura 10.3.4) ya que no se presenta la meseta observada por los cambios en fluorescencia. En el sentido de la desnaturalización, la actividad catalítica decae entre 0.5-1.0 M GdnHCl para la mutante C14A y entre 0.3-0.75 M GdnHCl para la C126A; a esas mismas concentraciones de desnaturalizante se observa la recuperación de la actividad catalítica en los experimentos de repliegamiento. Esta transición coincide con la correspondiente transición seguida por IF y CEM, lo que indica que la especie dominante en esta meseta carece de actividad enzimática.

En el repliegamiento seguido por cambios en actividad catalítica, recuperamos una fracción de enzimas nativas similares a las obtenidas por fluorescencia (85% para C14A y 60% para la C126A).

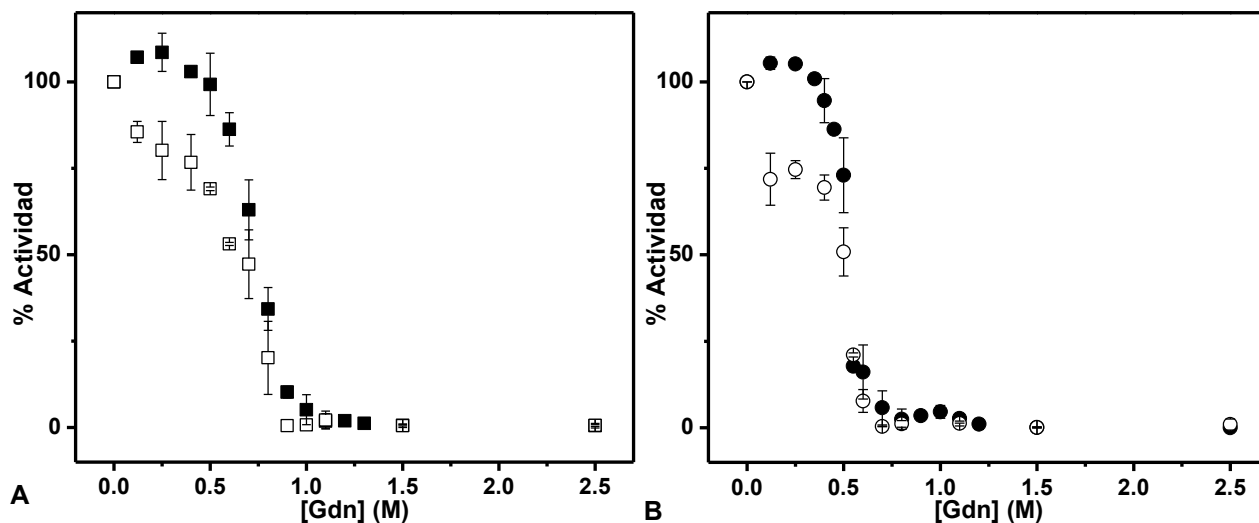


Figura 10.3.4. Perfiles de desplegamiento (figuras sólidas) y replegamiento (figuras vacías) para C14A (A) y C126A (B) como función de la concentración de GdnHCl, seguidos por actividad enzimática. Estos datos se obtuvieron a una concentración de enzima de 20  $\mu\text{g/ml}$  (0.74  $\mu\text{M}$ ) en buffer TED a pH 7.4 a una temperatura de 23  $^{\circ}\text{C}$ .

Para estudiar las características del intermediario de la meseta, realizamos perfiles de unión al 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS). El ANS permite distinguir intermediarios de las estructuras nativas y desnaturalizadas, ya que se une a regiones hidrofóbicas expuestas en la proteína, que tienden a estar enterradas e inaccesibles en la estructura nativa, pero su pequeño tamaño le permite difundir en caso de que la proteína carezca por completo de estructura. Al unirse a los bolsillos hidrofóbicos de intermediarios del tipo glóbulo fundido (molten globule), el ANS aumenta su fluorescencia, de igual forma que si estuviera en un solvente no polar. Mientras que la proteína nativa no une ANS, se observó un notable aumento de intensidad de fluorescencia a 500nm en la zona correspondiente a la meseta del perfil de replegamiento; entre 1-2.1 y 0.6-2.1 M de GdnHCl para la C14A y C126A respectivamente. La intensidad disminuye al desnaturalizarse por completo la enzima. Esta segunda transición presenta un desplazamiento de 0.5M GdnHCl hacia concentraciones mayores con respecto al perfil seguido por fluorescencia intrínseca (Figura 10.3.5). El inicio coincide con la aparición de la meseta, mientras que la segunda transición, en la cual disminuye nuevamente la fluorescencia, se recorre a mayores concentraciones de GdnHCl.

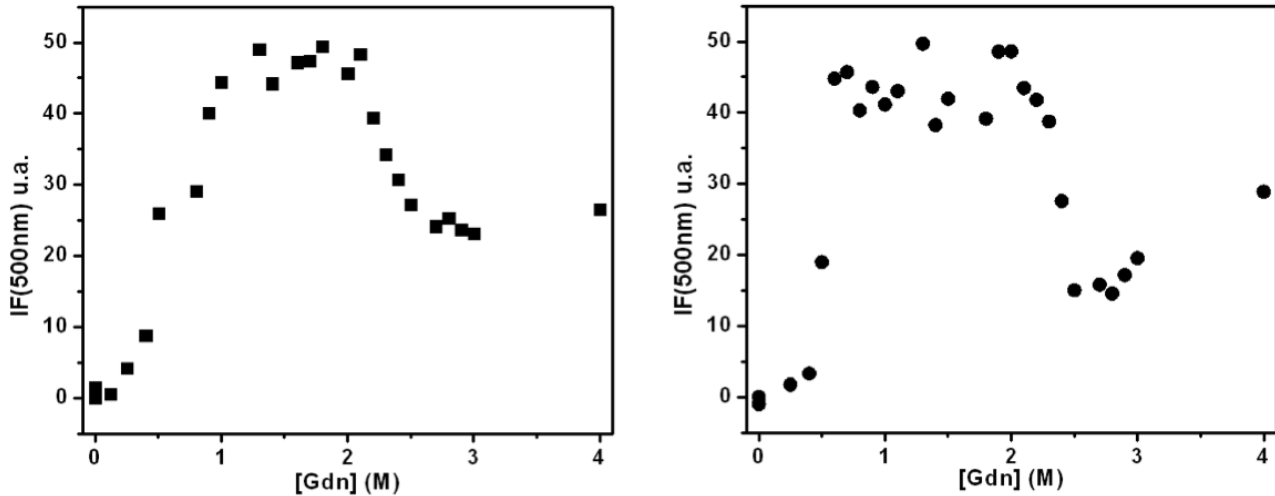


Figura 10.3.5. Unión de ANS.. A) Perfil de replegamiento seguido por ANS de la C14A (■). B) Perfil de replegamiento seguido por ANS de la C126A (●). Estos datos corresponden a una concentración de proteína de 20µg/ml, y las mediciones fueron realizadas a una temperatura de 23°C.

#### 10.4. Comparación con la WT

El protocolo para la obtención de datos fue llevado a cabo rigurosamente sobre los trabajos previos de Valeria Guzmán Luna (Guzmán, 2012), quien obtuvo la información correspondiente a la enzima silvestre, de modo que los datos obtenidos para las mutantes sean comparables con los obtenidos para la TbTIMWT.

En las mutantes es muy claro el desplazamiento de la primera transición a concentraciones menores de GdnHCl, reflejando una mayor sensibilidad a la desnaturalización por GdnHCl, lo que resulta en una meseta mayor para la C14A, y aún mayor para la C126A comparado con la WT; sin embargo la segunda transición, correspondiente a la desnaturalización, es aparentemente más parecida entre las mutantes y la enzima silvestre (Figura 10.4.1).

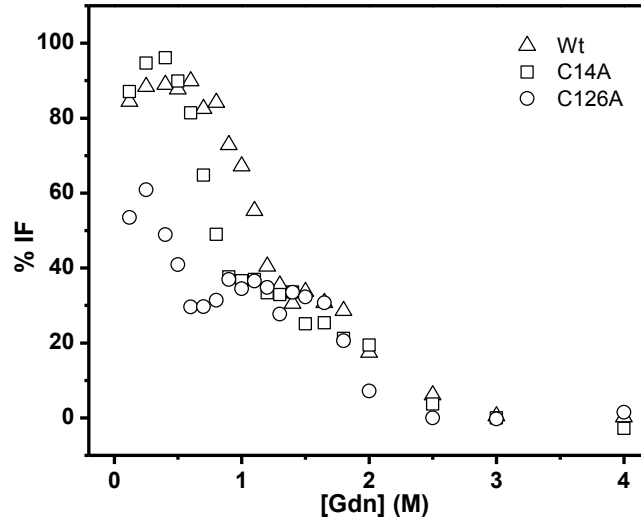


Figura 10.4.1. Perfil de replegamiento en GdnHCl seguido por emisión de fluorescencia intrínseca para WTTIM ( $\blacktriangle$ ) (Guzmán 2006), C14A ( $\blacksquare$ ) y C126A ( $\bullet$ ). Estos datos se obtuvieron a una concentración de proteína de  $20\mu\text{g/ml}$  ( $0.74\ \mu\text{M}$ ) en buffer TED a pH 7.4 a una temperatura de  $23^\circ\text{C}$ .

Las diferencias en la primera transición se pueden observar aún mejor siguiendo los cambios en la actividad enzimática (Figura 10.4.2). En la mutante C14A, la fracción de enzima nativa replegada es igual que en la enzima silvestre, alrededor del 90%, mientras que la mutante C126A alcanza un 60%.

La reversibilidad parcial de la mutante C126A puede deberse a agregación, ya que hemos observado que al aumentar las concentraciones de proteína, el replegamiento se reduce drásticamente y las muestras presentan turbidez.

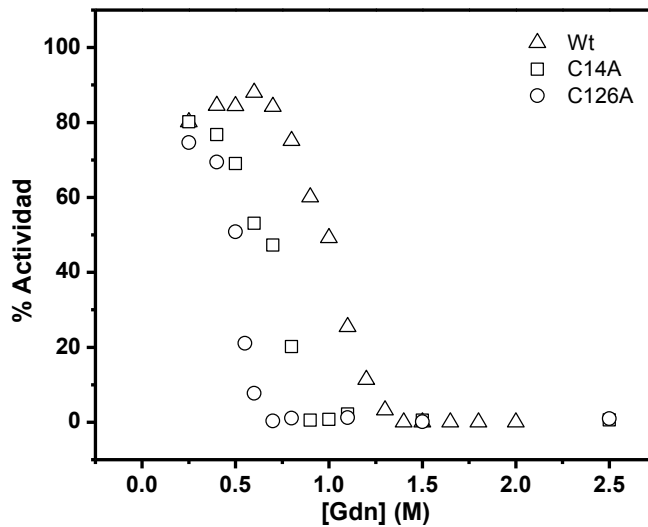
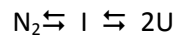


Figura 10.4.2. Perfil de replegamiento en GdnHCl seguido por actividad enzimática en el sentido de la formación de DHAP para WTTIM ( $\triangle$ ) (Guzmán 2006), C14A ( $\square$ ) y C126A ( $\circ$ ). Datos obtenidos a una concentración de proteína de  $20\mu\text{g/ml}$  ( $0.74\ \mu\text{M}$ ) en buffer TED a pH 7.4 a una temperatura de  $23^\circ\text{C}$ .

A pesar del desplazamiento de las transiciones, el comportamiento del perfil de desplegamiento y replegamiento de las mutantes C14A y C126A es consistente con el descrito para la enzima silvestre, en donde el plegamiento al dímero nativo ( $N_2$ ) desde los monómeros desnaturalizados (2U), presenta un intermediario (I) termodinámicamente estable a concentraciones medias de desnaturalizante a través del siguiente mecanismo:



(Mecanismo 1)

### ***10.5. Definiendo el mecanismo***

El siguiente paso entonces fue un estudio de la dependencia de la concentración de proteína en las transiciones, para determinar la molecularidad del intermediario. Para el caso de una proteína dimérica que presenta una curva de desplegamiento bifásica, las transiciones se deben ajustar a un mecanismo general de tres estados al equilibrio; el cual involucra al dímero nativo ( $N_2$ ), los monómeros desplegados (U) y un intermediario que puede ser monomérico (I) o dimérico ( $I_2$ ). La manera de distinguir entre estos dos intermediarios depende de cuál de las dos transiciones depende de la concentración de proteína. Si la primera transición es bimolecular, está ocurriendo la disociación entre subunidades y el intermediario es monomérico (I). Si la segunda transición es dependiente de la concentración de proteína, la disociación entre subunidades solo ocurre después de que un intermediario dimérico ( $I_2$ ) se ha formado.

Se estudió la dependencia de la concentración de proteína de la primera transición desde  $N \rightarrow I$ . Las enzimas nativas se incubaron a concentraciones de GdnHCl entre 0 y 1.5M a dos concentraciones de proteína: 20 y 200  $\mu\text{g/ml}$ . Al comparar las dos curvas observamos que las transiciones se dan a la misma concentración de desnaturalizante y no se observan cambios en la  $C_{1/2}$  ni en la cooperatividad de la transición (datos no mostrados). Esto es consistente con un paso independiente de la concentración, es decir uno en el cual la molecularidad no se ve afectada.

La dependencia de la concentración de proteína en la segunda transición, que comprende la pendiente entre el intermediario y el estado desnaturalizado, se estudió partiendo del estado desnaturalizado hacia el

intermediario D→I. Las enzimas se incubaron en 6 M de GdnHCl y se diluyeron a concentraciones entre 3 y 1.3 M. La desnaturalización se realizó como en todos los casos a 1 mg/ml de proteína y se procedió a diluir hasta 20 y 200 µg/ml para cada uno de los puntos.

A diferencia de lo observado en la primera transición, la segunda presentó un desplazamiento de la  $C_{1/2}$  hacia mayores concentraciones de desnaturalizante al aumentar la concentración de proteína de 20 a 200 µg/ml (Figura 10.5.3).

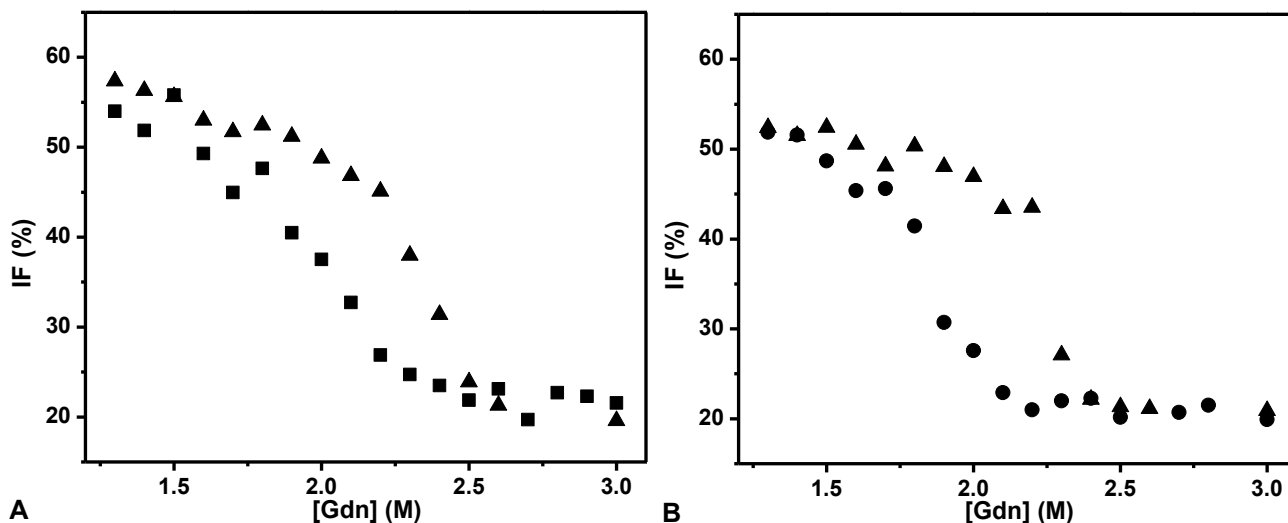


Figura 10.5.3. Dependencia de la concentración de la segunda transición. (A) Replegamiento de C14A desde 6M GdnHCl a dos concentraciones de proteína, 20µg/ml (■) y a 200µg/ml (▲). (B) Replegamiento de C126A desde 6M GdnHCl a 20µg/ml (●) y 200µg/ml (▲). Estos experimentos se realizaron en Buffer TED a un pH de 7.4 y una temperatura de 23°C.

Esta dependencia de la concentración de proteína es indicativa de un proceso de oligomerización, y aunada a la evidencia de la independencia de la concentración de proteína para la primera transición, nos permite postular al intermediario como una especie dimérica no nativa: carece de actividad catalítica, el espectro del intermediario se encuentra con el máximo de emisión de fluorescencia desplazado 13nm hacia longitudes de onda mayores con respecto a la conformación nativa, y la intensidad de fluorescencia se ve disminuida por la mitad (figura 10.3.1).

### *Reversibilidad del intermediario*

Cuando las mutantes se incubaron a 1.5 M GdnHCl (1mg/ml de proteína), desde N→I o desde D→I y posteriormente se diluyeron para llevar desde I→N, se observó que se perdía la capacidad de replegarse directamente a la estructura nativa.

Al diluir el intermediario a concentraciones entre 0.12 y 1.3M de GdnHCl, manteniendo en cada caso una concentración final de proteína de 20µg/ml, encontramos que la actividad catalítica no se recupera y que la intensidad de fluorescencia disminuye con respecto a la del intermediario a 1.5 M. El CEM se mantiene entre 341 y 339nm, que es un valor más parecido al intermediario (336nm) que al nativo o al desnaturizado, que presentan valores de 320 y 350nm respectivamente. El cambio observado en la intensidad de fluorescencia podría ser resultado de un proceso de agregación del intermediario cuando se incubaba a altas concentraciones de proteína. Este resultado sugiere una fuga en la vía de plegamiento, mediante la cual la estructura del intermediario adquiere ciertos cambios que lo llevan a una estructura susceptible a agregación y que no puede replegarse a la estructura nativa al diluir el desnaturizante. Cabe aclarar que los experimentos de desnaturización y renaturalización al equilibrio se hicieron a una concentración de proteína mucho menor, por lo que podemos suponer que la agregación fue mínima a las distintas concentraciones del desnaturizante.

### *Visualizando las poblaciones*

Si interpretamos la curva observada al seguir el plegamiento por cambios en la actividad enzimática como el comportamiento de la población con estructura nativa, podemos visualizar la fracción molar de las distintas poblaciones a lo largo de la vía de plegamiento: Nativo (N), Intermediario dimérico ( $I_2$  o  $D^*$ ) y Desnaturizado (U). El perfil del intermediario se puede obtener restando a los valores de IF normalizados la fracción de actividad (Figura 10.5.4, color azul), es decir, a la curva que muestra tanto el comportamiento de la población nativa como el de la población del intermediario. De esta manera se obtiene una campana (Figura 10.5.4 color rojo) que puede ser normalizada nuevamente, bajo la suposición que en las concentraciones de GdnHCl correspondientes a la meseta observada por fluorescencia, la proteína se encuentra enteramente en el estado I. Ya que no se encontró un segundo intermediario, la fracción desplegada puede obtenerse como la fracción restante (Figura 10.5.4, color verde).



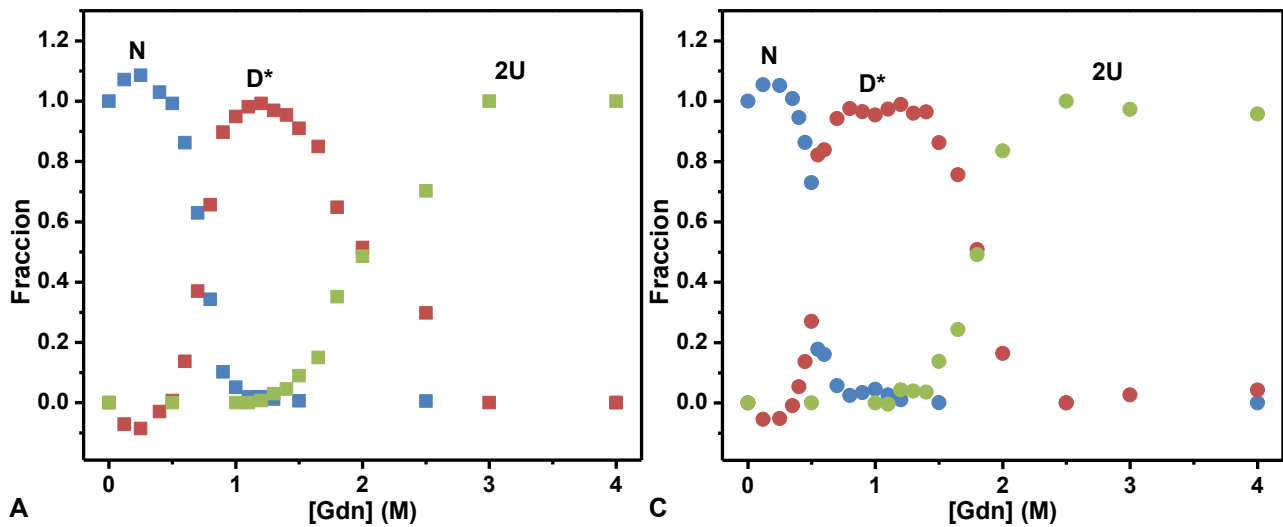
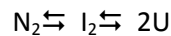


Figura 10.5.4. Poblaciones que conforman el perfil de desplegamiento completo para las mutantes C14A (A) y C126A (B). La fracción nativa (N en azul) fue obtenida mediante las curvas seguidas por actividad enzimática, la fracción del intermediario (D\* en rojo) fue obtenida mediante la normalización de los datos de fluorescencia intrínseca al cual se le restó la fracción nativa, y la fracción desnaturalizada (2U en verde) fue obtenida como el resto de la proteína total. Todos los perfiles corresponden a una concentración de proteína de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

## 10.6. Ecuaciones y Ajustes

Una vez descritas las distintas especies que participan en el mecanismo ( $N_2$ ,  $I_2$  y  $2U$ ), que son las mismas que se encuentran en la enzima silvestre, los datos se ajustaron a un modelo de tres estados bajo el siguiente mecanismo:



(Mecanismo 2)

El modelo, basado en la ecuación 2 para un modelo de tres estados que incluye un intermediario dimérico es el siguiente (modificado de Santoro y Bolen, 1988):

$$y = (Y_U + m_U x)F_U + 2PtF_U 2e^{-\frac{\Delta G_A}{RT}} (Y_I + m_I x + [Y_N + m_N x]e^{-\frac{\Delta G_F}{RT}})$$

Ecuación 7

Donde la fracción desnaturalizada ( $F_U$ ) se relaciona con las constantes de equilibrio conformacional según la ecuación 8, y el  $\Delta G$  para cada transición se relaciona con la pendiente de las transiciones de asociación y plegamiento ( $m_A$  y  $m_F$ ) y su correspondiente  $C_{1/2}$  según las ecuaciones 9 y 10, donde es dependiente de la concentración de proteína en el caso de la transición entre I e N (ecuación 9), pero independiente en el caso entre U e I (ecuación 10).

$$F_U = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8K_A Pt(1 + K_F)}}{4K_A Pt(1 + K_F)}$$

Ecuación 8

$$\Delta G_A = RT \ln(Pt) + m_A(x - C_{\frac{1}{2}A})$$

Ecuación 9

$$\Delta G_F = m_F(x - C_{\frac{1}{2}F})$$

Ecuación 10

Donde  $y$  es la señal normalizada registrada por CEM, IF y actividad,  $Y_U$ ,  $Y_I$  e  $Y_N$  es la fracción de la señal que corresponde a los estados desnaturalizado, intermediario y nativo correspondientemente;  $m_U$ ,  $m_I$  e  $m_N$  la pendiente de la dependencia de la señal de cada estado en la concentración de desnaturalizante,  $x$  la concentración de desnaturalizante,  $Pt$  la concentración total de proteína (en monómeros),  $R$  es la constante de los gases,  $T$  la temperatura a la que se realizaron los experimentos,  $K_A$  y  $K_F$  constantes de equilibrio conformacional de las transiciones entre U e I y entre I e N respectivamente;  $\Delta G_A$  es el cambio en energía libre entre los estados U e I y  $\Delta G_F$  entre los estados I e N;  $m_A$  y  $m_F$  corresponden a las pendientes de las transiciones correspondientes y por último  $C_{1/2}$  es la concentración de desnaturalizante a la cual se encuentra la mitad de la transición.

El ajuste completo refleja muy cercanamente el comportamiento de los perfiles de IF (Figura 10.6.1) y CEM (Figura 10.6.2), con una  $R^2$  mayor a 0.99 para todos los ajustes presentados a continuación, a excepción del ajuste al replegamiento parcial de la C126A seguido por IF (Figura 10.6.1, panel D).

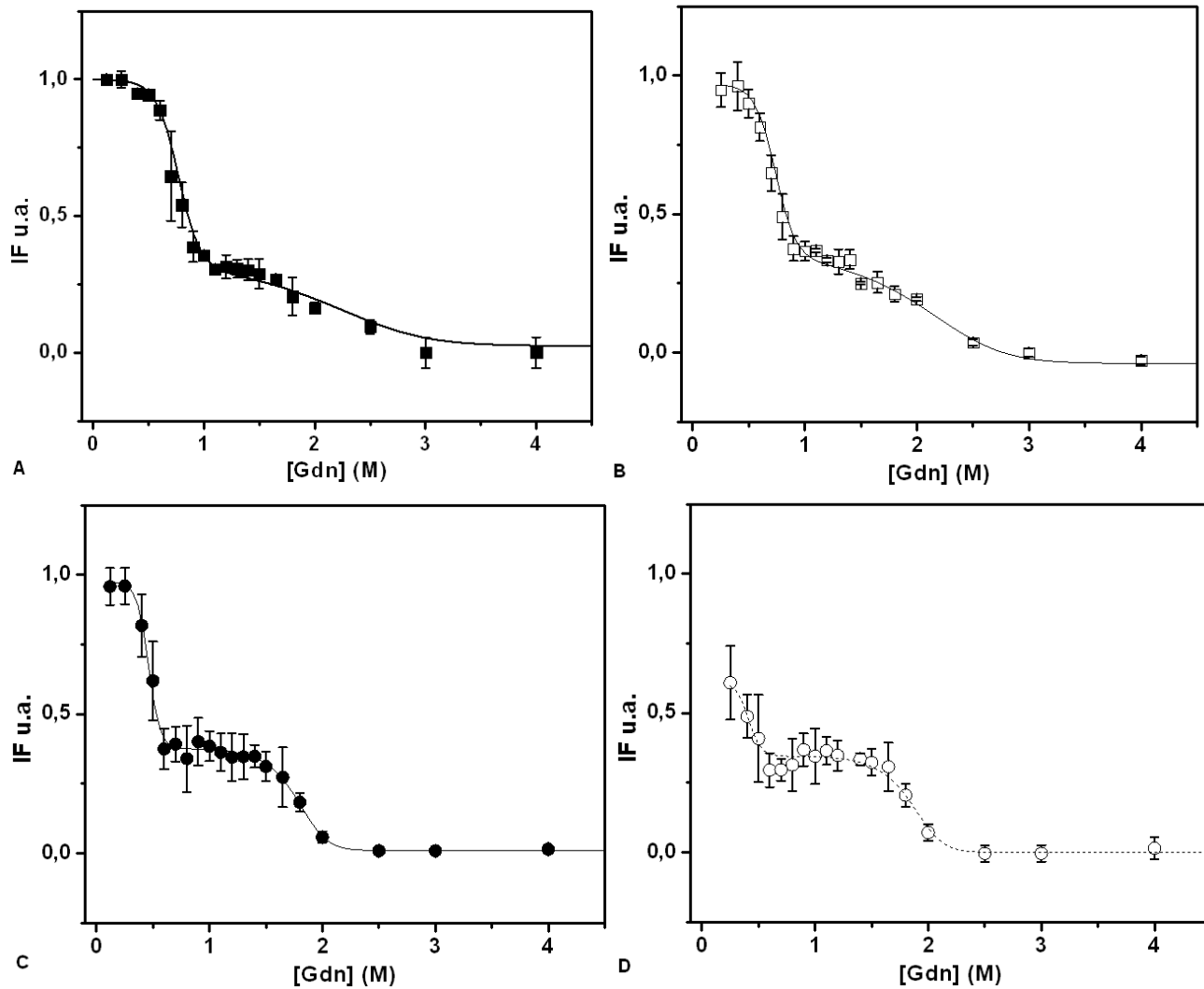


Figura 10.6.1: Ajuste completo a los datos de emisión de fluorescencia intrínseca a 20 $\mu$ g/ml. A) Desplegamiento de C14A. B) Replegamiento de C14A. C) Desplegamiento de C126A. D) Replegamiento de C126A. Las series indican los puntos experimentales con su error correspondiente, mientras que la línea corresponde a su ajuste a la ecuación 8.

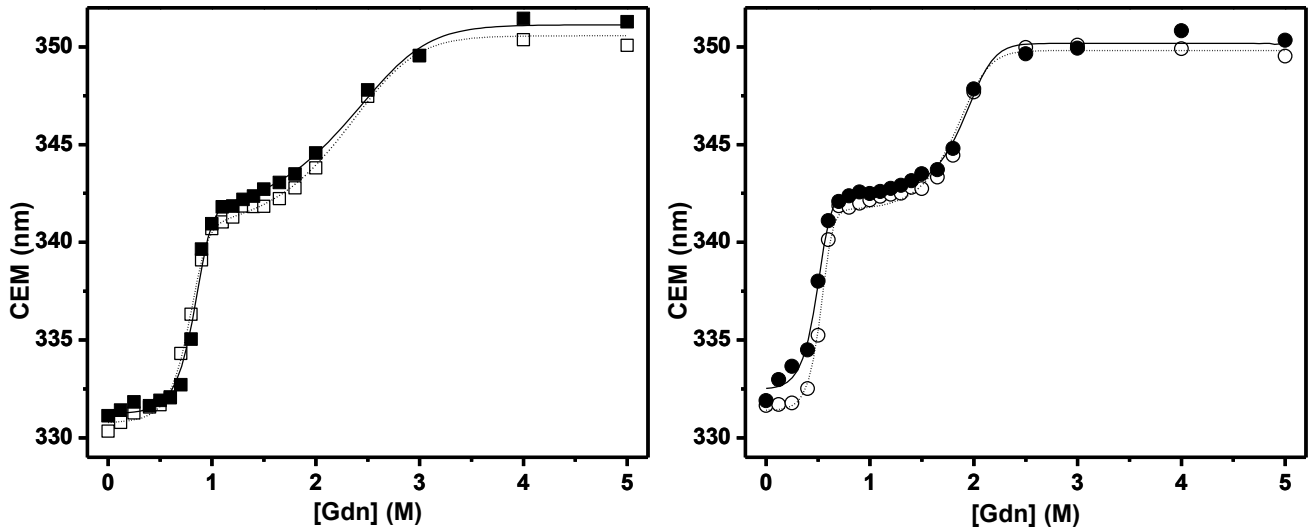


Figura 10.6.2: Ajuste completo a los datos de CEM al mecanismo 2. A) C14A. B) C126A. Los puntos y líneas sólidas corresponden a los datos de desnaturalización y su ajuste correspondiente, los puntos vacíos y líneas punteadas corresponden a los datos y ajustes de replegamiento. Los ajustes corresponden a la ecuación 8.

La misma ecuación se utilizó para ajustar los datos de actividad, asignando 0 al valor de la señal del intermediario ( $Y_i = 0$ ). El modelo reflejó cercanamente el comportamiento de los datos y arrojó valores similares a los obtenidos al ajustar los valores obtenidos por cambios en fluorescencia. Sin embargo, el replegamiento de la C126A no pudo ser ajustado por este modelo ya que presenta una reactivación parcial.

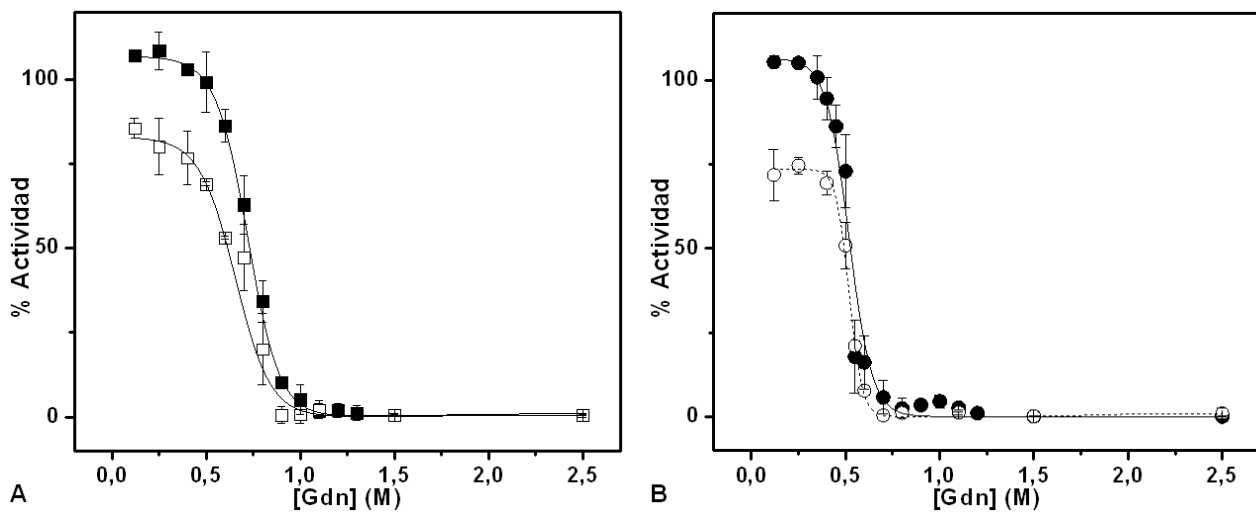


Figura 10.6.3. Transiciones normalizadas de plegamiento (figuras sólidas) y replegamiento (figuras vacías) para las mutantes C14A (A) y C126A (B) seguidas por actividad catalítica a una concentración de enzima de  $20\mu\text{g}/\text{mL}$  y  $23^\circ\text{C}$ . La línea indica el ajuste al mecanismo 2.

Al observar valores muy cercanos para la transición en ambos sentidos para la mutante C14A, se realizaron ajustes globales de desnaturalización/replegamiento en todas sus modalidades (gráficas de actividad, IF y CEM). Esto es que se juntaron los perfiles de replegamiento y de desnaturalización y el ajuste se realizó al conjunto completo de los datos. Los valores obtenidos por este medio son muy parecidos a los que arrojan los ajustes independientes, de hecho se encuentran dentro de las desviaciones correspondientes, de modo que se utilizaron para los cálculos de los parámetros termodinámicos. Sin embargo, para la C126A la transición de replegamiento de I a N<sub>2</sub> no es reversible, entonces solo se ajustaron los datos de fluorescencia (IF y CEM) de la segunda transición (I a 2U) que es reversible y coincidente.

Tabla 10.6.1. Valores de cambio de energía libre de Gibbs de plegamiento entre la estructura nativa y el intermediario ( $\Delta G_F$ ), pendiente de esta primera transición ( $m_F$ ), cambio en energía libre de Gibbs de plegamiento entre el intermediario y el estado nativo ( $\Delta G_A$ ) y pendiente de esta segunda transición ( $m_A$ ), cada uno con su desviación estándar. Los datos fueron obtenidos a partir del ajuste de la ecuación 7 a los datos crudos (incluyendo plegamiento y desplegamiento en un ajuste global) de cada técnica.

		$\Delta G_F$ (kcal/mol)	$m_F$ (kcal/molM)		$\Delta G_A$ (kcal/mol)	$m_A$ (kcal/molM)	
C14A	IF	-4.894 ± 0.031	6.367 ± 0.335		-12.614 ± 0.571	2.079 ± 0.312	
	CEM	-5.069 ± 0.461	6.243 ± 0.596		-13.095 ± 0.346	2.018 ± 0.169	
	Activ	-4.679 ± 0.350	6.691 ± 0.491				
C126A	IF				-19.940 ± 0.252	6.462 ± 0.055	
	CEM				-20.412 ± 0.156	6.409 ± 0.056	

Las constantes de equilibrio en sistemas donde existen pasos de asociación intermoleculares son afectadas por la concentración de enzima. Por esto para el caso de dímeros, la  $C_{1/2}$  (la concentración de desnaturalizante en el punto medio de la transición) se obtiene a partir del  $\Delta G$  y la pendiente de la transición según la ecuación 9, que se puede expresar de esta manera:

$$C_{1/2A} = \frac{R T \ln Pt - \Delta G_A}{m_A}$$

Ecuación 11

Para la transición U $\leftrightarrow$ I, donde R es la constante de los gases, T es 23°C, Pt es la concentración de proteína en función de los monómeros a la cual se llevó a cabo el experimento (7.5E<sup>-7</sup>M = 20µg/ml), ΔG<sub>A</sub> el cambio en energía libre de Gibbs y m<sub>A</sub> la pendiente de la transición que se estudia.

Pero para casos donde no existe un cambio de molecularidad, como es la transición I $\leftrightarrow$ N, dónde sólo sucede un reacomodo de la estructura, utilizamos la siguiente ecuación, despejada de la ecuación 10:

$$C_{1/2F} = \frac{-\Delta G_F}{m_F}$$

Ecuación 12

Donde el ΔG<sub>F</sub> es el cambio en energía libre de Gibbs entre las dos estructuras (en este caso entre I e N) y m<sub>F</sub> la pendiente de la transición.

Utilizando estas dos fórmulas sobre el promedio para cada mutante de los parámetros obtenidos para cada técnica, que se presentan en la tabla 10.6.1, se obtuvieron las concentraciones medias de desnaturante para cada transición, utilizando la ecuación 12 para el plegamiento entre el intermediario y la estructura nativa y la ecuación 11 para la transición entre el estado desnaturado y el intermediario.

Tabla 10.6.2. Valores de Energía libre de Gibbs (ΔG), pendiente (m) y concentración media de desnaturante de la transición (C<sub>1/2</sub>) para el plegamiento hasta el intermediario (ΔG<sub>A</sub>, m<sub>A</sub> y C<sub>1/2A</sub>[a 20µg/ml]) y para el plegamiento hasta la estructura nativa (ΔG<sub>F</sub>, m<sub>F</sub> y C<sub>1/2F</sub>) para las mutantes C14A y C126A y la proteína silvestre (WT).

	ΔG <sub>F</sub> (kcal/mol)		m <sub>F</sub> (kcal/molM)		C <sub>1/2F</sub> (M)	ΔG <sub>A</sub> (kcal/mol)		m <sub>A</sub> (kcal/molM)		C <sub>1/2A</sub> (M)
C14A	-4.88	± 0.2	6.43	± 0.4	0.76	-12.84	± 0.4	2.04	± 0.2	2.2
C126A						-20.1	± 0.2	6.4	± 0.05	1.8
WT*	-6.02	± 0.5	5.7	± 0.6	1.05	-12.3	± 0.4	2.08	± 0.2	1.9

(\* Los valores para la enzima silvestre fueron otorgados por Guzmán Luna)

Una vez obtenidos los valores de los parámetros termodinámicos (Tabla 10.6.1) se compararon entre sí y con los obtenidos para la WT y se obtuvo el cambio en la energía libre de Gibbs, según la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{WT}$$

Ecuación 13

Adicionalmente se obtuvo la diferencia de los valores de la  $C_{1/2}$  entre las mutantes y la enzima silvestre para las dos transiciones.

Tabla 10.0.3. Valores de cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) y concentración media de desnaturizante a 20 $\mu\text{g/ml}$  ( $\Delta C_{1/2}$ ) para el plegamiento entre el intermediario y el estado nativo (F) y para la transición entre el estado desnaturizado y el intermediario (A). Estos valores fueron obtenidos mediante el uso de la Ec. 5 sobre los datos de la tabla 10.6.2.

	$\Delta\Delta G_F$ (kcal/mol)	$\Delta C_{1/2F}$ (M)	$\Delta\Delta G_A$ (kcal/mol)	$\Delta C_{1/2A}$ (M)
C14A	$1.14 \pm 0.4$	0.29	$-0.54 \pm 0.4$	-0.3
C126A			$-7.8 \pm 0.2$	0.07

## 10.7. Simulaciones

Basándose tanto en las ecuaciones previamente expuestas como en los valores obtenidos experimentalmente, los resultados se pueden presentar a modo de simulaciones de las tres poblaciones (N, I e U) como función de la concentración de desnaturizante dada una temperatura y concentración de proteína. Los perfiles obtenidos de este modo (figura 10.6.4), muestran un gran parecido a los perfiles obtenidos a partir de los datos experimentales (figura 10.5.4), lo que refuerza la capacidad del ajuste de reflejar los sucesos experimentales y por lo tanto su validez.

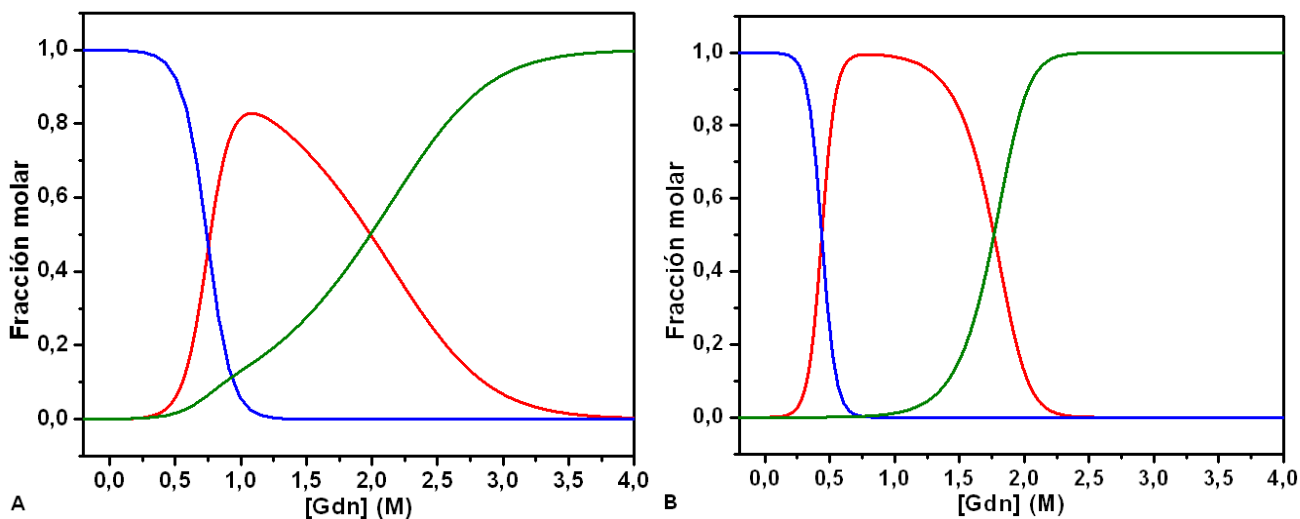


Figura 10.6.4. Fracciones de las poblaciones del dímero nativo (azul), intermediario (rojo) y desnaturalizado (verde) como función de la concentración de GdnHCl, basados en los parámetros obtenidos por los ajustes al mecanismo 2 de todos los datos (Tabla 10.6.1) y usando la ecuación 8, a una concentración de 20µg/ml.

Adicionalmente, las simulaciones pueden utilizarse al estudiar el efecto de la concentración de proteína en las transiciones. Coincidente con lo observado en los experimentos, la simulación (Figura 10.6.5) plantea un desplazamiento notable de la segunda transición hacia concentraciones mayores de desnaturalizante al aumentar la concentración de la proteína 10 veces (que fue lo realizado en los experimentos de dependencia de concentración en la figura 10.5.3), mientras que la primera transición no presenta un desplazamiento, debido a que corresponde únicamente al reacomodo del dímero y no de un evento de oligomerización (de nuevo en consistencia con nuestros resultados).

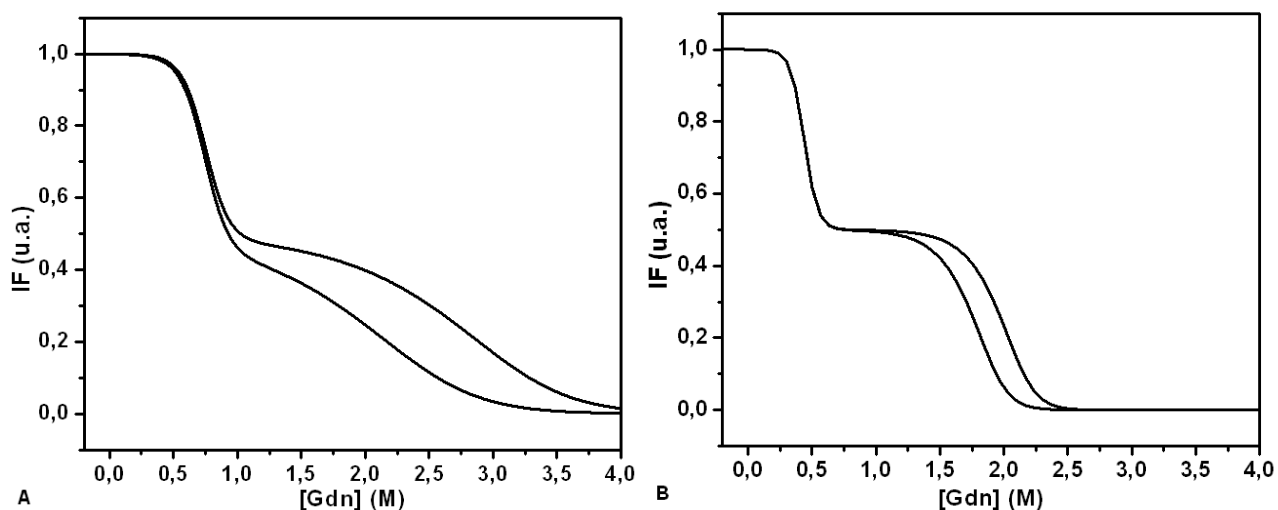


Figura 10.6.5. Dependencia de la concentración de proteína en la simulación completa de la ecuación 8 a partir de los promedios de los valores de  $\Delta G_F$ ,  $m_F$ ,  $\Delta G_A$  y  $m_A$  obtenidos por los ajustes a los datos de IF, CEM y actividad para desnaturalización y replegamiento de C14A. En la primera línea se muestra la simulación a 20µg/ml de proteína y la línea desplazada a la derecha presenta la simulación a 200µg/ml.

## 11. Discusión

Una medida de qué tan importante es un aminoácido específico en una proteína es su grado de conservación entre secuencias de distintas especies. Durante la evolución, ciertas posiciones en una secuencia cambian más rápido que otras y en general se ha encontrado que un residuo funcional y estructuralmente importante tiende a ser conservado (Petsko y Ringe 2004). Los residuos catalíticos de la TIM, Glu167, His95 y Lys12, se



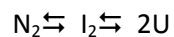
encuentran estrictamente conservados a través de la evolución, por esto, no es muy sorprendente encontrar que la mutación de cada uno de estos residuos por separado produce una disminución en la eficiencia catalítica de hasta 4000 veces (Lodi 1994). La cisteína 126 es otro de los 11 residuos estrictamente conservados de la TIM, se localiza hacia el interior del barril y forma parte de la pared que conforma el sitio activo. Mutaciones en esta posición por Ala y Ser en la TIM de levadura disminuyen su estabilidad en 5 y 9 Kcal/mol, respectivamente (González-Mondragón et al 2006). En la TIM de *P. falciparum* la sustitución de este residuo produce alteraciones en la actividad y estabilidad de la interface del dímero (Samanta et al 2011). El residuo en la posición 14 de la TIM no es conservado, sin embargo, se localiza en la región de la interface entre subunidades, rodeado por los residuos del asa interdigitante del monómero complementario. En plantas y parásitos patógenos, como *Trypanosoma brucei*, esta posición la ocupa un residuo de cisteína. Un estudio previo, en el que se hizo una mutagénesis exhaustiva de la Cys14 de la TbTIM se encontró que solo un número limitado de mutantes (4/19) presentaron actividades parecidas a la enzima silvestre (Hernández-Alcántara et al 2002). Adicionalmente la modificación de la Cys14 por derivatización química produce alteraciones estructurales que inducen pérdida de actividad y agregación. Todo esto indica que tanto la C126, conservada y la C14 de la interfase contribuyen al mantenimiento catalítico y estructural de la TbTIM. Para determinar la aportación de estos residuos en la estabilidad termodinámica de la TbTIM, en este trabajo se caracterizaron las transiciones al equilibrio del plegamiento de las mutantes C14A y C126A y se obtuvieron los parámetros termodinámicos asociados a este proceso.

Al mutar las cisteínas 14 y 126 por alanina obtenemos proteínas con estructura y actividad catalítica, similares a la TbTIM, que se pueden purificar mediante el mismo protocolo que la enzima silvestre. Las enzimas resultantes, presentan un patrón de plegamiento en GdnHCl similar al de la enzima silvestre, en el que tanto la variación de las curvas a distintas concentraciones de GdnHCl, siguiendo distintas técnicas (actividad catalítica, unión a ANS, IF y CEM) y la forma bifásica de los perfiles obtenidos mediante IF y CEM, confirman la existencia de un intermediario de plegamiento. En ambas mutantes las transiciones desde el estado nativo al intermediario ( $N_2 \rightarrow I_2$ ) están desplazadas a menores concentraciones de GdnHCl, mientras que las transiciones desde el intermediario al estado desnaturalizado ( $I_2 \rightarrow D$ ) son similares entre la enzima silvestre y las mutantes de cisteína.

Una diferencia importante entre la C14A y la C126A se observa en la reversibilidad del proceso de desnaturalización. En el caso de la C14A el porcentaje de renaturalización que se alcanza es del 90%, similar a la TbTIM silvestre, además esta mutante exhibe transiciones de desnaturalización y renaturalización que se superponen, indicativo de un proceso en equilibrio. Por otro lado, la mutante C126A muestra un replegamiento parcial desde el intermediario al estado nativo alcanzando solo un 50-60% de reversibilidad.

Es importante mencionar que en la TbTIM silvestre se presenta una ligera histéresis entre las transiciones de desplegamiento y replegamiento (Guzmán-Luna). Esta histéresis es posiblemente reflejo de una cinética lenta del desplegamiento en la WT, y su ausencia en la mutante C14A podría estar hablando de una reducción en la barrera de energía libre que separa al intermediario del estado nativo que le permite llegar a un equilibrio con mayor rapidez.

Los estudios de la molecularidad del intermediario demostraron que la transición hacia el estado nativo (entre 0.5 y 1.0 M para C14A y 0.3 – 0.6 M para C126A) es independiente de la concentración de proteína, mientras que la que resulta hacia el estado desnaturalizado (entre 1.5 y 3 M para C14A y entre 1.5 y 2 M para C126A), presenta una clara dependencia a la concentración de proteína (Figura 10.5.3), sugiriendo que entre el estado desnaturalizado y el intermediario se presenta un cambio de molecularidad, lo que sugiere que el intermediario es dimérico. Con estos resultados proponemos que el plegamiento de las mutantes de TbTIM, C14A y C126A es consistente con el siguiente mecanismo:



$N_2$ (dímero nativo)  $\rightleftharpoons$   $I_2$ (dímero no nativo)  $\rightleftharpoons$  2U (monómeros desplegados).

Este intermediario presenta una reducción de aproximadamente 50% de los contactos terciarios presentes en la estructura nativa a juzgar por la reducción de la intensidad de fluorescencia, a la mitad de la observada en la estructura nativa. Además, es capaz de unir fuertemente al ANS, a diferencia de las estructuras nativa y desnaturalizada, lo que indica que presenta una exposición de regiones hidrofóbicas características de intermediarios con una estructura terciaria expandida. Un fenómeno interesante del estudio de este intermediario es el aparente desplazamiento de la transición de disociación, que se presenta a concentraciones mayores de GdnHCl en el perfil seguido por ANS. Este desplazamiento aparente del equilibrio entre el intermediario y la conformación desplegada es probablemente debido al efecto del mismo ANS, que unido al intermediario lo estabiliza termodinámicamente, debido a la identidad de ligando con la que participa el ANS en este ensayo, favoreciendo el mantenimiento de la conformación parcialmente plegada. Este fenómeno ya ha sido visto anteriormente, con el ANS estabilizando e incluso induciendo intermediarios de tipo “molten globule” (Ali et al 1999).

La reversibilidad de la desnaturalización de la mutante C14A, en las condiciones estudiadas, fue suficiente para obtener los parámetros termodinámicos que rigen tanto la transición de asociación ( $U \leftrightarrow I_2$ ) como la de plegamiento desde el intermediario hacia la conformación nativa ( $I_2 \leftrightarrow N$ ). Para la obtención de los parámetros

se asume una relación lineal en la transición que se extrapola a cero concentración de desnaturalizante, y tanto la pendiente de la transición como la  $C_{1/2}$  a la que se lleva a cabo describen la estabilidad de la proteína.

Cuando comparamos los valores de  $\Delta G$  de las transiciones independientes (Tabla 10.6.2) podemos observar que el cambio de energía en el paso de asociación, es decir, entre el intermediario y el estado desnaturalizado, es mayor. Este valor corresponde a aproximadamente tres veces el cambio de energía libre entre los estados intermediario y nativo, lo que nos lleva a decir que una gran parte de la estabilidad de la estructura nativa en la TbTIM corresponde a la asociación del dímero, mientras que una parte menor al plegamiento posterior. Estos resultados son consistentes con los datos reportados para el plegamiento de las TIMs de otras especies. A pesar de que las transiciones de desplegamiento de las distintas especies son muy diversas, se ha encontrado que en general los valores del  $\Delta G$  de asociación son siempre mayores que los del  $\Delta G$  de plegamiento, siendo la asociación entre subunidades, el factor que contribuye en mayor medida a la estabilidad total de las TIMs (Peimbert et al 2008).

La comparación del cambio en el  $\Delta G$  total no indicó cambios muy grandes en la estabilidad de las mutantes con respecto a la TbTIM silvestre (Tabla 10.0.3). En el caso de la C14A el cambio en energía, negativo para la transición de asociación, es ligeramente mayor, mientras que el correspondiente a la transición de plegamiento es positivo y en consecuencia desestabilizante. Estas diferencias en energía se compensan y dan una diferencia en el  $\Delta\Delta G_T$  de 0.6 kcal/mol. En la mutante C126A se favorece la presencia de un intermediario termodinámicamente más estable que el de la enzima silvestre ( $\Delta\Delta G_A$  de -7.9 kcal/mol), comprometiendo severamente el plegamiento hacia la conformación nativa. La diferencia en energía de la transición de asociación es incluso mayor a la diferencia en la energía total del plegamiento de la enzima silvestre ( $\Delta\Delta G_T = -1.70$  kcal/mol). Este gran cambio debe reflejar diferencias sutiles, que no son evidentes espectroscópicamente, ya que el intermediario presenta valores de IF y CEM muy similares a los del intermediario de la enzima nativa.

Un resultado que se debe discutir es el de la reversibilidad del plegamiento a partir del intermediario. Mencionamos previamente que en la TbTIM silvestre y la mutante C14A se puede obtener una buena reversibilidad de la desnaturalización a partir del estado completamente desnaturalizado, sin embargo, cuando se parte del intermediario, se observa una pérdida de reversibilidad hacia el estado nativo. Esto hace suponer que el intermediario no es estable y que con el tiempo su estructura da lugar a un estado de agregación, que reduce severamente la reversibilidad de la desnaturalización. La sustitución de la cisteína 126 disminuye la estabilidad del estado nativo, como consecuencia de que el intermediario, estable termodinámicamente, tiene una conformación que resulta en un aumento en la formación del estado agregado.

Estos resultados indican que la Cys 126 en la TbTIM es un residuo importante que permite a la enzima silvestre alcanzar su forma nativa y funcional; la presencia de la C126 está relacionada con un plegamiento completo y eficiente, y su ausencia estabiliza significativamente al intermediario, provoca la reversibilidad parcial del plegamiento y una tendencia mayor hacia la agregación. En cambio, la diferencia en la energía libre de Gibbs entre el intermediario y el estado desnaturalizado para la mutante C14, se encuentra dentro del rango de error del valor para el mismo proceso en la enzima silvestre. Esto resulta sorprendente y un poco inesperado, ya que al formar parte de la interfase entre los monómeros, paso importante en la formación del intermediario, esperaríamos que su reemplazo provocara mayores cambios en la estabilidad del intermediario que los observados en la mutante C126A, que se encuentra al interior del monómero. Como se mencionó, la C126 es un aminoácido estrictamente conservado, la mutación por alanina no modifica significativamente su actividad catalítica, sin embargo su estabilidad conformacional se ve seriamente afectada, razón por la cual este residuo en la TIM se ha mantenido a lo largo de la evolución.

En el *Trypanosoma brucei*, la triosafosfato isomerasa encuentra su localización final en el interior de los glicosomas, organelos particulares de los kinetoplastos, que almacenan grandes cantidades de enzimas glicolíticas para aumentar la eficiencia de la glicólisis. Esto permite que *T. brucei* utilice únicamente la glucólisis como fuente de energía cuando se encuentra en el torrente sanguíneo del huésped. La TIM de *Trypanosoma brucei* al igual que el resto de las enzimas glucolíticas son sintetizadas en el núcleo y tienen que transportarse al interior del glicosoma. La mayoría de las enzimas presentan una secuencia señal que dirige la translocación y el plegamiento de la proteína al interior del organelo. La TIM no tiene esta señal, en su lugar presenta una secuencia interna que se ha visto, translocar proteínas reporteras al interior del glicosoma (Galland et al 2010). En el caso de la TbTIM, esta secuencia se encuentra enterrada en la proteína plegada. Para que se reconozca la secuencia señal y pueda realizarse la translocación, se deben primero exponer los residuos involucrados, ya que no se encuentran accesibles en la estructura nativa, y aquí es posible que el intermediario de plegamiento juegue un papel importante. Este intermediario, descrito como reducido en su estructura terciaria y con regiones hidrofóbicas expuestas al solvente, podría ser una de las estructuras transitorias que permite la interacción del interior de la proteína con los elementos responsables de su translocación (Gúzman 2012).

## 12. Conclusiones

En el trabajo actual se estudió la importancia de las cisteínas en la estabilidad y plegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*. Para esto se estudió el plegamiento de las mutantes sencillas de las cisteínas 14 y 126 por alanina. Ambas mutantes siguen el mismo mecanismo de plegamiento que la enzima silvestre (Guzmán 2012) que es mediante un intermediario dimérico.

Al mutar la cisteína 14 o la 126 se obtienen transiciones de plegamiento y desplegamiento sobreponibles, indicadores de un proceso al equilibrio, a diferencia de las enzimas con ambas cisteínas, que presentan una marcada histéresis, sin embargo, la reducción en la recuperación de la estructura nativa en el caso de la enzima C126A, indica una pérdida de la proteína a un estado de agregación, impidiendo la aplicación de los tratamientos matemáticos para la obtención de parámetros termodinámicos que son aplicables en la mutante C14A y en la proteína silvestre.

Se encontró que la mutación de la C14 desestabiliza la estructura nativa en 1.15 kcal/mol. Esta diferencia está entre los valores esperados para la diferencia de hidrofobicidad y tamaño de los aminoácidos intercambiados. Adicionalmente se observó que la sustitución de la cisteína 126 provoca un intermediario de plegamiento con una conformación termodinámicamente más estable que el presente en la enzima silvestre. Este aumento en la estabilidad del intermediario (-7.89 kcal/mol) es probablemente la causa de la disminución del replegamiento de la mutante C126A, ya que la vía presenta una fuga hacia un estado mayor de agregación que se origina a partir del intermediario.

Pareciera ser que en caso de la TbTIM, la C126A tiene un papel mayor que el de estabilizar la catálisis, como ha sido reportado para las TIMs de otras especies, y la función que se esboza en este trabajo es la de evitar la agregación de la proteína, en especial a altas concentraciones, función muy importante en el ambiente biológico del *Trypanosomabrucei*, que se presenta altas concentraciones de esta enzima en los glicosomas.

## 13. Referencias

1. Ali V, Prakash K, Kulkarni S, Ahmad A, Madhusudan KP y Bhakuni V. (1999) 8-Anilino-1-naphthalene Sulfonic Acid (ANS) Induces Folding of Acid Unfolded Cytochrome c to Molten Globule State as a Result of Electrostatic Interactions. *Biochemistry*, 38 (41), pp 13635–13642.
2. Åqvist J y Fothergill M. (1996) Computer Simulation of the Triosephosphatelsomerase Catalyzed Reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 271 (17), pp 10010–10016
3. Blacklow SC, Raines RT, Lim WA, Zamore PD y Knowles JR, (1988) Triosephosphate Isomerase Catalysis Is Diffusion Controlled. *Biochemistry*, 27, pp 1158-1167.
4. Borst P. (1986) How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes). *Biochimica et Biophysica Acta*, 866, pp179-203
5. Chánez-Cárdenas M E, Fernández-Velasco D. A., Vázquez-Contreras E., Coria R, Saab-Rincón G y Pérez-Montfort R. (2002) Unfolding of Triosephosphatelsomerase from *Trypanosomabrucei*: Identification of Intermediates and Insight into the Denaturation Pathway Using Tryptophan Mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(2), pp117-129
6. Chánez-Cárdenas ME, Pérez-Hernández G, Sánchez-Rebollar BG, Costas M, Vázquez-Contreras E. (2005) Reversible equilibrium unfolding of triosephosphateisomerase from *Trypanosomacruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*, 44, pp10883-10892.
7. Creighton TE. (1993) *Proteins: Structures and molecular properties*. Nueva York, EUA. WH Freeman & co.
8. Di Nardo AA, Larson SM y Davidson AR. (2003) The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core. *Journal of Molecular Biology*. 333 (3), pp 641-655.
9. Díaz AJ. (2005) Estudio del efecto cinético producido por el reemplazo de una cisteína evolutivamente conservada en la triosafosfatoisomerasa de *Trypanosomabrucei*. Tesis de licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
10. Fairlamb AH y Opperdoes F.R (1986) *Carbohydrate metabolism in African trypanosomes with special reference to the glycosome in Carbohydrate metabolism in cultured cells*. Ed. MJ Morgan, NY, Plenum press, pp 183-224.
11. Galland N, Demeure F, Hannaert V, Verplaetse E, Vertommen D, van der smissen P, Courtoy PJ y Michels PAM. (2007) Characterization of the role of the receptors PEX5 y PEX7 in the import of proteins into glycosomes of *Trypanosomabrucei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, pp521-535
12. Galland N, de Walque S, Voncken FGJ, Verlinde CLMJ, Michels PAM (2010). An internal sequence targets *Trypanosomabrucei* triosephosphateisomerase to glycosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 171 (1), pp 45-49.
13. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena M, Ostoa-Saloma P, Pérez-Montfort R y Gómez-Puyou A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: Triosephosphateisomerase from *Trypanosomabrucei*, *Trypanosomacruzi* and *Leishmaniamexicana*. *European Journal of Biochemistry*, 253 (3), pp 684–691.

14. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A and Perez-Montfort R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action — studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*, 2 (12), pp 847-855.
15. González-Mondragón EG. (2004) Papel del residuo conservado Cys126 en la catálisis y estabilidad de la triosafosfatoisomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de doctorado en Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
16. Guzmán V. (2006) Tesis de licenciatura: Participación de las cisteínas en la estabilidad y estructura de la triosafosfatoisomerasa de *Trypanosoma brucei*. Tesis de licenciatura en Investigación Biomédica Básica, UNAM, Facultad de Medicina.
17. Hart D, Baudhuin P, Opperdoes FR y de Duve C. (1987) Biogenesis of the glycosome in *Trypanosoma brucei*: the synthesis, translocation and turnover of glycosomal polypeptides. *European Molecular Biology Organization Journal*, 6, pp1403-1411
18. Hart DT, Baudhuin P, Opperdoes FR y de Duve C. (1987) Biogenesis of the glycosome in *Trypanosoma brucei*: the synthesis, translocation and turnover of glycosomal polypeptides. *European Molecular Biology Organization Journal*, 6, 1403–1411.
19. Helfert S, Estevez A.M, Bakker B, Michels PAM y Clayton C. (2001) Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*, *Biochem J*, 357, pp117-125
20. Hernández-Alcántara G, Garza-Ramos G, Mendoza G, Gómez-Puyou A y Pérez-Montfort R. (2002) Catalysis and Stability of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with Different Residues at Position 14 of the Dimer Interface. Characterization of a Catalytically Competent Monomeric Enzyme. *Biochemistry*, 41 (13), pp 4230–4238
21. Jahn T y Radford S (2005) The Yin and Yang of protein folding. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272, pp5962-5970
22. Kyte J y Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157 (1), 105–132.
23. Lodi PJ, Chang LC, Knowles JR y Komives EA. (1994) Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of Lys-12. *Biochemistry* 33, 2809-2814.
24. Lolis E, Alber T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC y Petsko GA. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, 29 (28), pp 6609–6618
25. Myers JK, Pace CN y Scholtz JM. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Science*, 4 (10), pp 2138–2148.
26. Pan H, Raza AS y Smith DL. (2004) Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, 336, pp1251- 1263.
27. Petsko G.A, y Ringer D. *Protein Structure and Function*. Chapter 4. From Sequence to Function. New Science Press. pp 195
28. Peimbert M, Domínguez-Ramírez L, Tellez LA, Blancas L y Fernández-Velasco D.A. Triosephosphate isomerase. *Advances in protein physical chemistry*. 2008; 193-217.
29. Samanta M, Banerjee M, Murthy MR, Balaram H, Balaram P. (2011) Probing the role of the fully conserved Cys126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis: distal effects on dimer stability. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 278 1932-43.
30. Santoro, M.M. y Bolen, D.W. (1988) Unfolding free energy changes determined by linear extrapolation method. 1. Unfolding of Phenylmethanesulfonyl- $\alpha$ -Chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27, pp 8063-8068.

31. Sommer J.M., Cheng Q, Keller G.A y Wang C.C. (1992) In vivo import of firefly luciferase into the glycosomes of *Trypanosomabrucei* and mutational analysis of the C. terminal targeting signal. *Molecular Biology of the Cell*, 3(7), pp 749–759.
32. Swinkels BW, Gibson WC, Osinga KA, Kramer R, Veeneman GH, van Boom JH y Borst P. (1986) Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphateisomerase of *Trypanosomabrucei*. *European Molecular Biology Organization Journal*, 5 (6), pp 1291–1298.
33. Vajda S, Weng Z, Rosenfeld R y DeLisi C; (1994) Effect of conformational flexibility and solvation on receptor ligand binding free energies. *Biochemistry*, 33, pp13977
34. van den Bosch H, Schutgens RB WAnders RJ y Tager JM. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annual Review of Biochemistry*, 61, pp 157-197
35. Vázquez-Contreras E, Zubillaga R, Mendoza-Hernández G, Costas M y Fernández-Velasco DA. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphateisomerase: A monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein & Peptide Letter*, 7, pp57-64.
36. Visser N y Opperdoes FR. (1980) Glycolysis in *Trypanosomabrucei*. *Eur J. Biochem.* 103, 623-632.
37. Voet D, Voet JG. (1990) *Biochemistry*. New York: J Wiley. Pp 1223.
38. Weng Z y DeLisi C (2001) Amino Acid Substitutions: Effects on Protein Stability. *Encyclopedia of life sciences*. pp 1-8.
39. Weng Z, Vajda S y DeLisi C (1996) Rigid body docking with semi empirical free energy functions. *Protein science*, 5, pp614-626
40. Wickner W y Schekman R. (2005) Protein translocation across biological membranes. *Science*, 310, pp1452-1456
41. Wierenga RK, Noble MEM y Davenport RC. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphateisomerase. *Journal of Molecular Biology*, 224 (4), pp 1115-1126.
42. Wierenga RK, Noble MEM, Postma JPM, Groendijk H, Kalk KH, Hol WGJ y Opperdoes FR. (1991) The crystal structure of the “open” and the “closed” conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphateisomerase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 10 (1), pp 33–49.
43. Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PAM, Lambeir AM y Wierenga RK. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmanial triosephosphateisomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Engineering*, 12 (3), pp243-250.