



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE AGREGACIÓN DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
DISTINTAS ESPECIES ANALIZADO POR ELECTROFORESIS NATIVA EN GELES AZULES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
EDGAR JAVIER PÉREZ CASTAÑEDA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MÉXICO, D. F. OCTUBRE, 2013



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.

Of. No. PMDCB/969/2012

EDGAR JAVIER PÉREZ CASTAÑEDA
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 5 de Noviembre del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada “**Determinación del estado de agregación de la Triosafofato Isomerasa de distintas especies analizado por electroforesis nativa en geles azules**”, dirigida por el Dr. Ruy Pérez Montfort.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dr. Armando Gómez Puyou
VOCAL	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
VOCAL	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
VOCAL	Dr. Abraham Landa Piedra
SECRETARIO	Dr. Ismael Bustos Jaimes

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“**POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU**”
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de Noviembre de 2012.
EL COORDINADOR DE ENTIDAD


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

RRS*lgg



A LOS MIEMBROS DE
JURADO DE EXAMEN

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del(a) alumno (a) de Maestría en Ciencias Bioquímicas **EDGAR JAVIER PÉREZ CASTAÑEDA**, titulado:

"Determinación del estado de agregación de la Triosafosfato Isomerasa de distintas especies analizado por electroforesis nativa en geles azules"

ATENTAMENTE

DR. RUY PÉREZ MONTFORT
Tutor Académico



RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 201 en el edificio oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo No. 167823, por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del donativo No. IN221812.

Se reconoce la ayuda técnica prestada por la Bióloga Elizabeth Nallely Cabrera González en la realización del presente trabajo.

Se reconoce la asistencia técnica a la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo.

Se reconoce el apoyo de la Q.F.B. Beatriz Aguirre López.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Al Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, por brindarme la mejor educación técnica y académica.

A los investigadores y miembros del Honorable Jurado por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Diego González Halphen por la asesoría y las enseñanzas prestadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique García Hernández por las ideas y sugerencias brindadas durante la realización de este trabajo

Al Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort por permitir mi participación en la realización de este proyecto, dirigir mi trabajo y especialmente por fomentar mi formación profesional.

A la Dr. Yolanda Gómez y Gómez y a la Maestra María Esther Bautista Ramírez por su valiosa amistad y por su contribución en mi desarrollo estudiantil en el IPN.

A mis estimados amigos Paola, Jorge, Héctor y Mónica, gracias por sus consejos, su ayuda y por la diversión espontánea.

A mis amigos y compañeros: Alejandra, Beatriz, Itzhel, María Eugenia, Nallely, Paola, Paulette, Selma, Lucia, Andrea, Pablo, Alejandro, Carlos e Igor; con quienes ha sido un placer convivir y compartir días amenos en el instituto.

DEDICATORIAS

*Dedicado con amor a mis padres Silvia y Benjamín, son la base principal de toda mi vida,
gracias por su ejemplo de dedicación y fuerza de cada día*

*A mis abuelos Argelia y Salvador con todo mi cariño, gracias por su amor y porque siempre he
podido contar con ustedes*

A mis hermanos Eduardo y Miguel, gracias por los momentos felices y por su apoyo

Con mucho cariño a mis sobrinas Ximena y Alondra, por sus sonrisas y su alegría

Con amor a Dolores, por tu apoyo, tu compañía y por regalarme mucha felicidad

A mis primos Carlos, Karla, Miriam y Verónica con mucho afecto

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>iii</i>
1. Introducción	1
1.1. Proteínas	1
1.2. Agregación macromolecular	2
1.2.1. Efecto de volumen excluido	3
1.2.2. Consecuencias de la aglomeración macromolecular	3
1.3. Agregación de proteínas	4
1.3.1. Factores intracelulares en la agregación de proteínas	5
1.3.2. Agregación de proteínas y enfermedades neurodegenerativas	7
1.3.3. Péptido β -amiloide	8
1.3.4. Agregación de TIM dependiente del p β A en pacientes con Alzheimer	10
1.4. Triosafofato Isomerasa	10
1.4.1. Función metabólica	11
1.4.2. Características estructurales	12
1.4.3. Sitio activo y catálisis	14
1.5. Deficiencia de TIM	15
1.5.1. Mutaciones de la TIM y la deficiencia catalítica	16
1.5.2. Mutación E104D	17
1.6. Agregación de la TIM	17
2. Planteamiento del problema	19
3. Antecedentes	19
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
6. Estrategia experimental	22
7. Materiales y métodos	23
7.1. Sobreexpresión de las TIM	23
7.2. Ensayo de sobreexpresión	24

7.3. Purificación de la TIM	25
7.3.1. Método de purificación para HsTIM, HsTIM E104D, GITIM y TsTIM	25
7.3.2. Método de purificación para EhTIM, PFTIM y ScTIM	27
7.3.3. Método de purificación para LmTIM	29
7.3.4. Método de purificación para TbTIM y TcTIM	30
7.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS-(SDS-PAGE)	32
7.4.1. Preparación del gel de acrilamida	32
7.4.2. Preparación de las muestras	33
7.4.3. Separación electroforética	34
7.4.4. Tinción del gel	34
7.5. Electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida (BN-PAGE)	35
7.5.1. Preparación de las muestras	35
7.5.2. Preparación del gel de acrilamida con gradiente	36
7.5.3. Separación electroforética	37
7.5.4. Tinción	37
7.5.5. Determinación de la actividad específica de TIM	38
8. Resultados	39
8.1. Purificación de las TIMs	39
8.1.1. Análisis por SDS-PAGE	39
8.2. Características fisicoquímicas y actividad catalítica de las TIMs	40
8.3. Análisis bioinformático	41
8.3.1 Alineamientos de las secuencias de las TIMs	41
8.3.2. Alineamientos entre las secuencias de las regiones ATIMs con el p β A	42
8.4. Análisis por BN-PAGE	44
8.4.1. Controles de peso molecular	44
8.4.2. Perfiles de agregación y efecto de los detergentes en EhTIM, HsTIM, HsTIM E104D, GITIM, PFTIM y ScTIM	46
8.4.3. Perfiles de agregación de LmTIM, TbTIM, TcTIM y TsTIM	48
8.4.4. Análisis del efecto de dodecil sulfato de litio en los perfiles de agregación de HsTIM, HsTIM E104D, GITIM, LmTIM, ScTIM y PFTIM	49
8.5. Análisis por densitometría	52

8.6. Análisis de HsTIM por electroforesis en geles claros de poliacrilamida (CN-PAGE)	54
9. Discusión	55
9.1. Pureza e integridad de los dímeros de TIM	55
9.2. Alineamientos de las regiones ATIM y el p β A	55
9.3. Herramienta de cálculo	55
9.4. Perfiles de agregación y su clasificación	56
9.5. Grupo 1	56
9.6. Grupo 2	57
9.7. Efecto del punto isoelectrico	59
9.8. Análisis del estado de agregación en presencia de detergentes	60
9.9. Capacidad de agregación	61
10. Conclusiones	62
11. Perspectivas	63
11. Bibliografía	64
Anexos	

RESUMEN

Los agregados proteicos son agentes capaces de afectar la viabilidad celular, ya que su acumulación genera un efecto citotóxico. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por presentar agregados en depósitos extracelulares de fibras del péptido β -amiloide ($p\beta A$) y agregados de triosafosfato isomerasa (TIM) nitrada en residuos de tirosina. La TIM es una enzima glucolítica que cataliza la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), tiene un peso molecular de 27kDa y sólo el dímero es catalíticamente activo. Recientemente se reportó que mediante el análisis por electroforesis en geles azules (Coomassie) de acrilamida bajo condiciones nativas (BN PAGE) la TIM de humano (HsTIM) es capaz de formar complejos oligoméricos de 1000 a 1400 kDa, mientras que un análisis por densitometría y tinción con rojo Congo, demostró que la TIM de *E. coli* (EcTIM) tiene una región de 39 aminoácidos (región ATIM) capaz de formar agregados amiloides debido a su similitud con el $p\beta A$, lo cual sugiere que el tipo de agregación de estas TIMs podría estar definido por una región o un número mínimo de aminoácidos. Las principales preguntas por abordar fueron ¿Las TIMs de distintas especies forman agregados de alto peso molecular? de ser así ¿Cuáles son las características de estos agregados? Nuestro estudio corroboró los resultados obtenidos por Swamy *et al* (2009) en cuanto a la capacidad de HsTIM para generar agregados de alto peso molecular. Además se realizaron las purificaciones de una mutante de HsTIM y las TIMs de 8 organismos eucariontes para determinar sus perfiles de agregación por BN-PAGE. Las 10 TIMs se clasificaron en dos grupos: 1) Las que presentan agregados de un tamaño definido 2) Las que forman grupos de agregados de tamaño heterogéneo. Los agregados de cada TIM fueron disociados con una cantidad particular de dodecil sulfato de litio (LDS) y algunos eran más susceptibles que otros. No se observó disociación de los agregados en presencia de detergentes no iónicos. En el análisis bioinformático de las TIMs aun no se ha encontrado una correlación entre las características de los agregados (tamaño, número de agregados y susceptibilidad a detergentes) y los valores de similitud determinados por alineamientos entre cada TIM. La similitud entre las regiones ATIM y el $p\beta A$ va de 15 a 25%; sin embargo, estos resultados aun no brindan información clara que nos ayude a entender las características de los diferentes agregados determinados. Al comparar los perfiles de agregación de cada TIM y sus valores de punto isoeléctrico se sugiere que la carga parcial, de las proteínas con puntos isoeléctricos mayores a 7.0 (pH del análisis), modifica la migración generando agregados de distintos tamaños.

ABSTRACT

Protein aggregates have an impact on cellular viability, since their accumulation has a cytotoxic effect. In Alzheimer disease, beta-amyloid peptide ($p\beta A$) and triosephosphate isomerase (TIM) aggregates have been observed along with the nitrotyrosination of the latter. TIM is a glycolytic enzyme that catalyzes the isomerization of glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), has a molecular weight of 27kDa and is only catalytically active as a dimer. A recent study using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) showed that human TIM (HsTIM) forms aggregates ranging from 1000 to 1400kDa, whereas adsorption analysis of 39 amino acid-peptide aggregates from *E. coli* TIM (ATIM) to Congo red suggested an amyloid-like aggregation. The main questions of our work were: Could TIMs from different biological species be able to aggregate? If that was the case, what were the particular features of these aggregates? Our study verified the ability of HsTIM to form high molecular weight aggregates. In addition, we purified 9 TIMs: a mutant HsTIM (E104D) that is suspected to aggregate because of its poor dimerization capability and 8 wild-type TIMs from different eukaryotic organisms. We studied their aggregation states using BN-PAGE. TIM aggregates were classified in two groups: 1) Those showing aggregation with complexes of fixed sizes 2) Those showing aggregates of different sizes. Aggregates from each TIM were dissociated at particular concentrations of lithium dodecyl-sulfate, some of them being more sensitive to this reagent than others. Bioinformatic analysis of different TIMs has not found a correlation between certain aggregation features (size, stoichiometry or sensitivity to detergents) and the percentage similarity they have. The similarity between the ATIM regions of the TIMs we studied and $p\beta A$ ranges from 15 to 25%; however, these results show no clear information that could help us understand the features of the different aggregates observed in our studies. By comparing the aggregation state for each TIM with their respective isoelectric points (PI), it was noted that the partial charge of proteins with a PI greater than 7.0 (pH analysis) modifies the pattern of migration and aggregation and favors the generation of aggregates of different sizes.

ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AGES	Productos finales de glicosilación avanzada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATIM	Región homóloga de TIM con respecto al péptido β -Amiloide
BIS-TRIS	1,3-bis[tris(Hidroximetil)metilamino]propano
BN-PAGE	Electroforesis en geles azules nativos de acrilamida
CIEX	Cromatografía de intercambio iónico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EcTIM	Triosafosfato isomerasas de <i>E. coli</i>
EhTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>E. histolytica</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especie reactiva de oxígeno
IEX	Intercambio iónico
FAD	Dinucleótido de flavina adenina
GITIM	Triosafosfato isomerasa de <i>G. lamblia</i>
G3P	Gliceraldehído 3 fosfato
HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica
HsTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>H. sapiens</i>
IMAC	Cromatografía de afinidad por ion metálico
kDa	Kilo Daltones
LB	Luria-Bertani
LDS	Dodecil sulfato de litio
LmTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>L. mexicana</i>
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de de nicotinamida y adenina reducido
NNF	Nudos neurofibrilares
pATIM	Péptido ATIM
PfTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>P. falciparum</i>
PGA	Productos de glicosilación avanzada
p β A	Péptido β -amiloide
RMN	Resonancia magnetica nuclear
RPM	Revoluciones por minuto
rTEV	Enterocinasa del virus de tabaco
ScTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>S. cerevisiae</i>
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>T. brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>T. cruzi</i>
TIM	Triosafosfato isomerasa
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
TsTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>T. solium</i>
VC	Volumen de columna

INTRODUCCIÓN

PROTEÍNAS

Son incontables los eventos bioquímicos que las proteínas llevan a cabo en un organismo; éstas se encargan de conferir una estructura o soporte celular, asegurar la asimilación de nutrientes e incluso contribuir con el correcto funcionamiento de un tejido específico entre muchas otras funciones. En principio resulta impresionante que estas biomoléculas tengan capacidades tan extensas a partir de 20 aminoácidos disponibles, la clave está en el número infinito de secuencias posibles para un polipéptido de tamaño definido, donde la composición y el orden de estos elementos es la información necesaria para que las proteínas maduren hasta una estructura definida y funcional. Una proteína globular inicia su plegamiento desde el primer momento en que el polipéptido comienza a ser sintetizado, al inicio del plegamiento son los puentes de hidrógeno los que estabilizan su estructura secundaria incipiente y un colapso hidrofóbico el que dirige el proceso hasta que se obtiene una proteína nativa soportada energéticamente por interacciones débiles y en ocasiones puentes disulfuro. Una vez alcanzada la estructura nativa o terciaria, algunas proteínas actúan como monómeros o unidades solitarias, sin embargo, un considerable porcentaje son activas gracias a asociaciones intermoleculares con otra molécula compañera (dímeros) o incluso pueden formar parte de enormes maquinarias moleculares ensambladas (oligómeros) para cumplir una función común que solo puede lograr una estructura cuaternaria funcional. Es importante señalar que existen otras interacciones transitorias, asociaciones que tienen como objetivo la comunicación intermolecular, este es un campo de estudio conocido como interactoma, el cual ha ganado relevancia recientemente pues ha demostrado que estas asociaciones rigen muchos procesos biológicos. El panorama sugiere que la capacidad de interacción de una proteína es un factor inherente a sus residuos de cadena lateral, pues son ellos quienes interpretan y expresan de forma directa la información del ambiente intra e intercelular. Por otra parte, cuando las condiciones durante el plegamiento de una proteína no son adecuadas, surgen interacciones proteína-proteína que pueden generar la formación de agregados amorfos u ordenados, donde la

presencia de interacciones intermoleculares define el tipo de agregación. La agregación proteica es un fenómeno comúnmente asociado a un pobre plegamiento y como se ha observado en ciertas proteínas, existe un mecanismo de agregación con bases estructurales particulares al igual que en el proceso de plegamiento. Sumado a la capacidad de interacción proteína-proteína, la agregación de un oligómero es un fenómeno importante para la comprensión de estas moléculas tan versátiles, las proteínas.

AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR

Las principales funciones biológicas que cumplen las proteínas se llevan a cabo en el espacio intracelular, un ambiente que contiene una gran concentración (80-400 mg/mL) de macromoléculas (Rivas *et al.*, 2003), las cuales pueden estar presentes en solución o en grandes arreglos moleculares (citoesqueleto y fibras de actina), generando un volumen ocupado de más del 40 % (Figura 1). Debido a que ninguna de las macromoléculas puede estar presente a altas concentraciones, sino que en conjunto ocupan una fracción significativa del volumen del medio intracelular, este fenómeno se conoce como aglomeración macromolecular y es guiado principalmente por interacciones no específicas (Minton *et al.*, 1981).

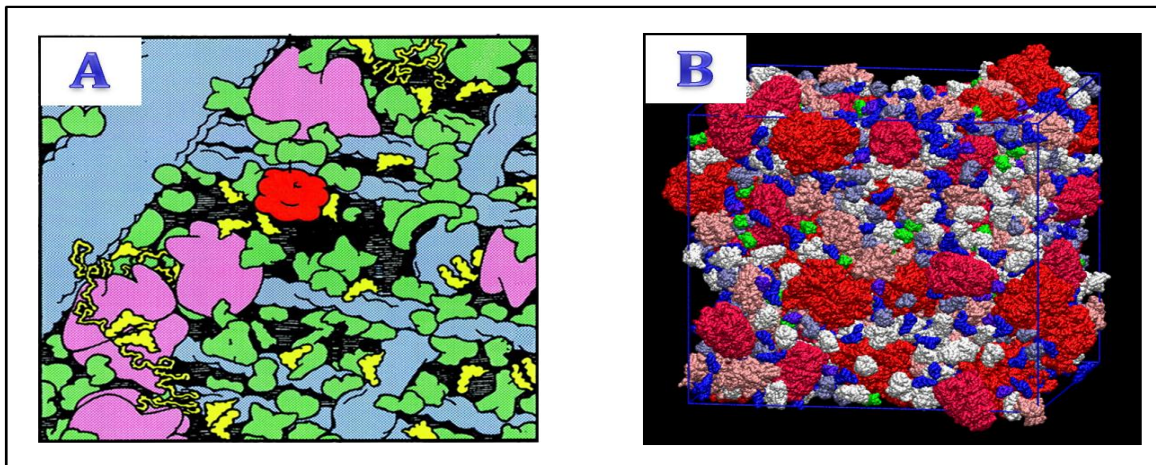


Figura 1. A) Esquema del citoplasma eucarionte, microtubulos y fibras de actina en azul, proteínas solubles en verde, ribosomas en rosa y especies de ácido ribonucleico (ARN) en amarillo (Tomado de Minton, 2001). B) Simulación por dinámica browniana de un ambiente intracelular en el citoplasma de *E. coli*, en la simulación se encuentran 15 macromoléculas diferentes a concentraciones fisiológicas (Tomado de Ando *et al.*, 2010)

Efecto de volumen excluido

La aglomeración macromolecular ocasiona una reducción del volumen del solvente disponible para otras macromoléculas. Este efecto de volumen excluido incrementa la concentración efectiva de las macromoléculas lo que altera las constantes de equilibrio y las constantes de disociación favoreciendo la asociación de proteínas y la formación de grandes complejos (Minton 2001; Zhou *et al.*, 2008). Estos efectos de aglomeración o hacinamiento macromolecular dependen de la masa, de la forma y de la concentración de la macromolécula involucrada, sin embargo, este efecto parece ser más fuerte cuando se trata de moléculas más grandes (Minton, 2001). El estudio de los efectos del volumen excluido indica, a lo que hidratación se refiere, que existe una pérdida o expulsión benéfica de moléculas de agua para formar interacciones transitorias y no específicas entre proteína-proteína, las cuales puede ser clave en procesos de oligomerización (Thirumalai *et al.*, 2003; Tarus *et al.*, 2005).

Consecuencias de la aglomeración macromolecular

La aglomeración macromolecular involucra un amplio campo de estudio en Bioquímica y Biología Celular. Por mencionar un ejemplo, el incremento en la fuerza de las interacciones entre proteína y el ácido desoxirribonucleico (ADN) producido por aglomeración, puede ser la llave a un mejor entendimiento en procesos como la transcripción y la replicación de ADN (Zimmerman *et al.*, 1987). La importancia del efecto de aglomeración en el plegamiento de proteínas es de particular interés en el campo de la biofísica, ya que dicho efecto de aglomeración puede acelerar el plegamiento, debido a que una proteína plegada es más compacta que una cadena polipeptídica desplegada, por lo tanto, ocupará un menor volumen (Van den Berg *et al.*, 2000). Por otro lado, la aglomeración puede reducir el rendimiento de proteínas plegadas correctamente al aumentar la agregación de otras (Ellis *et al.*, 2006).

AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS

Para ser funcionalmente activas la mayoría de las proteínas debe adoptar una estructura tridimensional definida, conocida como estructura nativa. El plegamiento inicia cuando las proteínas son sintetizadas en los ribosomas y pasan a través de intermediarios estructurales antes de alcanzar el estado nativo (Figura 2). Algunos intermediarios estructurales pueden ser no productivos, como es el caso de conformeros parcialmente plegados que son atrapados en un nivel de menor energía libre. Como las barreras de energía que separan el estado nativo del desplegado son usualmente pequeñas, incluso las proteínas nativas corren un riesgo permanente de desplegarse, especialmente bajo condiciones de estrés (Dobson, 2003). Cuando estos intermediarios exponen sus residuos hidrofóbicos al ambiente, la interacción con otra proteína desplegada es el primer paso en el fenómeno de coagregación con otras proteínas en condiciones semejantes generando agregados que la célula es capaz de degradar (Gidalevitz *et al.*, 2006).

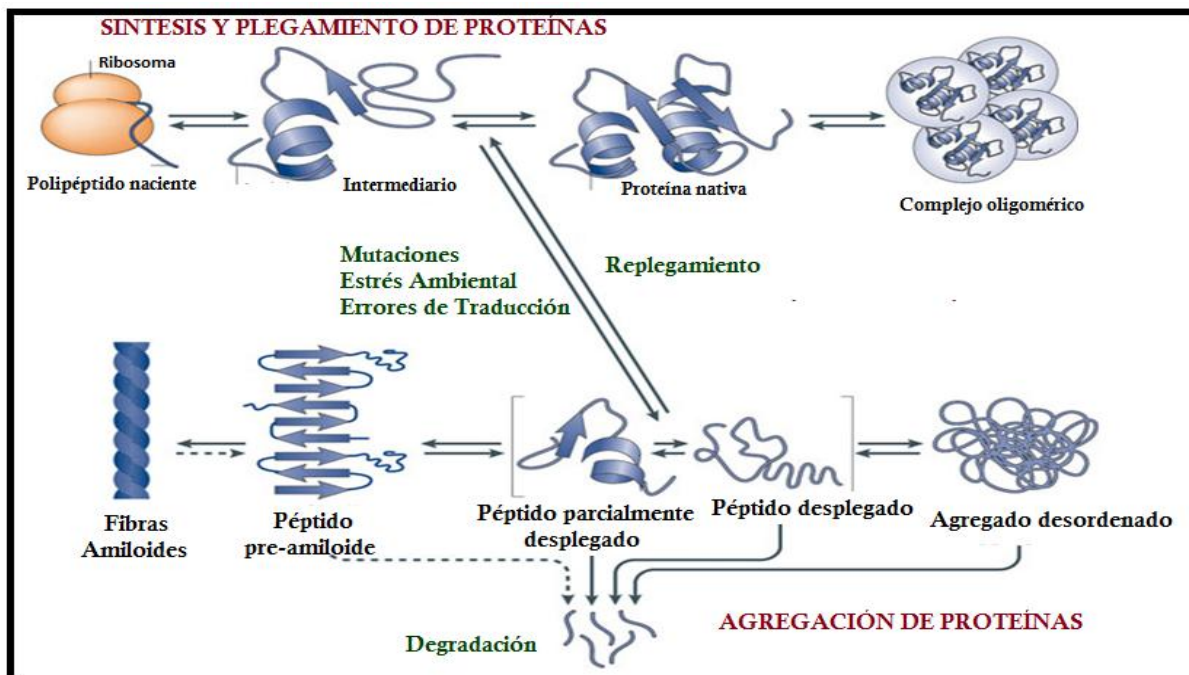


Figura 2. Esquema general de la agregación de proteínas (Modificado de Tyedmers *et al.*, 2010)

Por otro lado, la agregación también puede generar depósitos amiloides conformados por proteínas agregadas con un alto grado de orden conformacional. Estas estructuras identificadas como fibras presentan morfologías muy similares (longitud y diámetro) y un patrón de difracción característico conocido como “cross- β ”, por lo tanto la estructura molecular presenta un núcleo compuesto por hebras β cuyas hojas se extienden perpendicularmente desde la fibra amiloide (Sunde *et al.*, 1997).

Factores intracelulares en la agregación de proteínas

La célula cuenta con un “sistema de control de calidad”, el cual vigila el correcto plegamiento de las proteínas; este sistema puede adaptarse según la gravedad de los daños presentes en las proteínas que se pliegan incorrectamente debido a condiciones de estrés, gracias al ajuste de los niveles celulares de las chaperonas (replegamiento) y las proteasas (degradación) (Goldberg, 2003). Sin embargo, cuando la cantidad de proteínas plegadas incorrectamente excede la capacidad de replegamiento o degradación de la célula, los agregados proteicos se acumulan (Figura 2).

Existe un determinado número de condiciones internas y externas que actúan sobre la capacidad de acumulación de estos agregados, las cuales han sido identificadas y categorizadas en cuatro clases principales.

1. Defectos en la síntesis de proteínas: Errores de traducción que conducen a la incorrecta incorporación de aminoácidos y un deficiente montaje de complejos proteicos, que llevan a la acumulación de especies protéicas no asociadas correctamente y que promueven la agregación (Drummond *et al.*, 2008).

2. Estrés ambiental: Condiciones de estrés por alta temperatura y oxidación. Una temperatura superior al rango de crecimiento de una célula ocasiona la desnaturalización de las proteínas celulares. La desnaturalización de proteínas puede ser reversible, a diferencia del estrés oxidativo, el cual puede ocasionar cambios irreversibles en las proteínas por la acción de especies reactivas de oxígeno (ERO), incluyendo fragmentación

inducida del esqueleto polipeptídico y el reemplazo de las cadenas laterales de residuos específicos de aminoácidos por grupos carbonilos. Estos derivados pueden generarse por modificación oxidante directa en residuos de prolina, arginina, lisina y treonina o en reacciones de cisteína e histidina con compuestos carbonilos reactivos, que generan productos finales de glicosilación avanzada (PGA) (Nyström, 2005).

3. Envejecimiento celular: El estado de agregación ocurre a un ritmo lento, a medida que las células son más viejas. Se sugiere que hay una reducción en la capacidad de células adultas para eliminar proteínas parcialmente plegadas. También se ha sugerido una reducción general en la capacidad del control de calidad de las proteínas durante el envejecimiento celular como una razón de la aparición de la agregación a una edad tardía. Sin embargo, factores adicionales incluyen la formación de variaciones polimórficas en diferentes proteínas, que pueden afectar la capacidad de control de calidad de síntesis de proteínas en la células (Gidalevitz *et al.*, 2006).

4. Mutaciones: Las mutaciones tienden a incrementar la tendencia de las proteínas a permanecer en estados parcialmente desplegados, estas estructuras son susceptibles a interaccionar con otras y formar agregados, dando como resultado la deficiencia catalítica de una enzima o a su acumulación a concentraciones nocivas para la célula e incluso para un tejido. Por ejemplo, las variantes S y Z de α_1 -anti-tripsina presentan un aminoácido distinto capaz de ocasionar la ruptura de un puente salino y así liderar la interacción entre una de las hojas de esta proteína y el asa del centro reactivo de otra. Esta agregación resulta en la acumulación de esta enzima en el retículo endoplásmico y en determinado momento apoptosis. (Lomas *et al.*, 2004). Otras enfermedades conformacionales son la diabetes mellitus tipo II y los padecimientos neurodegenerativos, ambos caracterizados por la acumulación de alguna o varias proteínas parcialmente desplegadas ocasionando un incremento de estrés oxidativo. Tal es el caso de la proteína amilina, la cual se agrega en células β de pacientes con diabetes (Hayden *et al.*, 2005), por otro lado, las proteínas tau y el péptido β -amiloide (p β A) son capaces de formar depósitos intra y extracelulares en la enfermedad de Alzheimer, (Reynaud, 2010; Götz *et al.*, 2001)

Agregación de proteínas y enfermedades neurodegenerativas

La agregación de proteínas plegadas de forma incorrecta puede causar padecimientos graves, conocidos como enfermedades amiloideas. Este tipo de padecimientos puede presentarse de forma esporádica o por herencia. Independientemente del tipo de enfermedad el riesgo de adquirirla incrementa dramáticamente con la edad.

La enfermedad de Alzheimer está caracterizada por ocasionar muerte neuronal, formación de depósitos de fibras del péptido β -amiloide ($p\beta A$) y de nudos neurofibrilares (NNF). Al estudiar el mecanismo de la formación de fibras amiloideas y NNFs, se ha encontrado que la agregación del $p\beta A$ es principalmente extracelular, a diferencia de la formación de NNFs, la cual es intracelular. Además, la acumulación de $p\beta A$ ocurre primero (Götz *et al.*, 2001), lo cual sugiere una relación jerárquica entre $p\beta A$ y NNFs, cuyo mecanismo no es claro. Una visión ampliamente aceptada para explicar el por qué de estos procesos, es la existencia de un origen genético, por ejemplo, por mutaciones en las propias proteínas o en la regulación de sus metabolismos. En el caso de la proteína tau, las mutaciones en el gen no generan Alzheimer, pero son responsables de otros desórdenes neurodegenerativos conocidos como demencia frontotemporal y Parkinson. Al incrementar la expresión de la proteína tau, acompañada de cambios en el ambiente celular como la presencia de agentes que actúan como promotores de la agregación, se puede inducir la formación de nudos (figura 3).

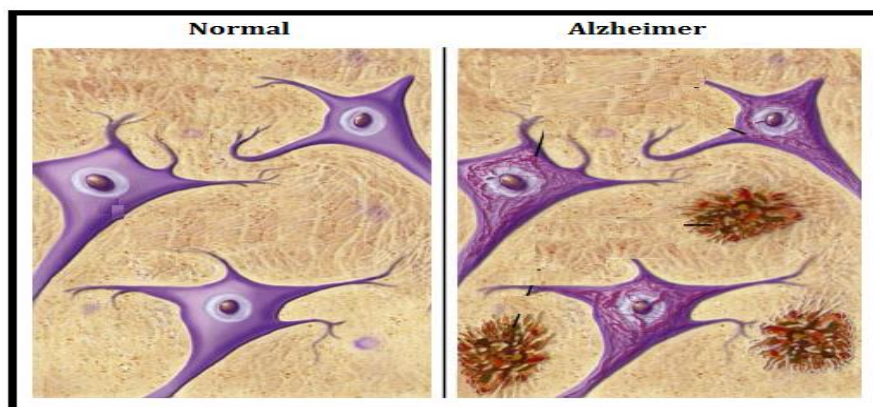


Figura 3. Esquema de comparación entre el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer e individuos sanos, se describen los depósitos ricos en péptido β -amiloide y NNFs (Tomado de <http://www.ahaf.org> - American Health Assistance Foundation)

Péptido β -Amiloide

El péptido β -amiloide se forma por la escisión secuencial del precursor proteico amiloide, una glicoproteína transmembranal con una función indeterminada, dando como resultado un péptido de 39 a 43 aminoácidos. El p β A es intrínsecamente no estructurado, lo que significa que en solución no adquiere una conformación terciaria definida, sino un conjunto de estructuras que dificultan su cristalización. Sólo la determinación estructural mediante resonancia magnética nuclear (RMN) ha conseguido dilucidar una estructura tridimensional tipo hélice α para el segmento de los primeros 28 aminoácidos (Talafofus *et al.*, 1994). A pesar de los esfuerzos por determinar la estructura tridimensional del extremo carboxilo, este estudio no ha sido posible mediante las técnicas de cristalización o de RMN, mientras que el modelado por similitud *in silico* se presentó como una alternativa para un grupo de investigadores. Ellos realizaron inicialmente una búsqueda de similitud con el péptido amiloide de 40 aminoácidos, y de esta búsqueda identificaron una similitud del 22% con la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Culex tarsalis* (un género de mosquito hematófago). Posteriormente realizaron un alineamiento múltiple del péptido amiloide con cinco secuencias de TIM de distintas especies (humano, pollo, tripanosomátido, levadura y *E. coli*) cuyos modelos atómicos ya eran conocidos. Con este análisis se encontraron 3 regiones dentro de la secuencia de la TIM que presentan una similitud del 8 hasta el 28%. La región de mayor similitud fue la del aminoácido (aa) 172 al 211 de *C. tarsalis*, pero, como esta TIM no ha sido cristalizada, se eligió la región del aminoácido 175 al 213 (región ATIM) de la TIM de *E. coli* (EcTIM), con una similitud del 20%, para realizar un alineamiento tridimensional con la estructura ya definida del péptido amiloide (figura 4). De esta manera, se determinó una estructura probable tipo hélice α -asa- hoja β para el péptido β amiloide. El estudio de modelado *in silico* y la considerable similitud que presenta el p β A con respecto a las distintas TIMs, despertó un gran interés por estudiar la capacidad de agregación del péptido ATIM (pATIM) de EcTIM. Al realizar un análisis turbidimétrico del proceso de agregación de este péptido, se demostró claramente su capacidad de agregación aunque en menor extensión que el p β A (figura 5A), para confirmar que se habían formado estructuras amiloides, se usó el colorante rojo congo, un marcador conocido por unirse a estructuras

tipo amiloides (figura 5B), revelando que los agregados del péptido ATIM de EcTIM estaban conformados por fibras tipo amiloide (Contreras *et al.*, 1999).

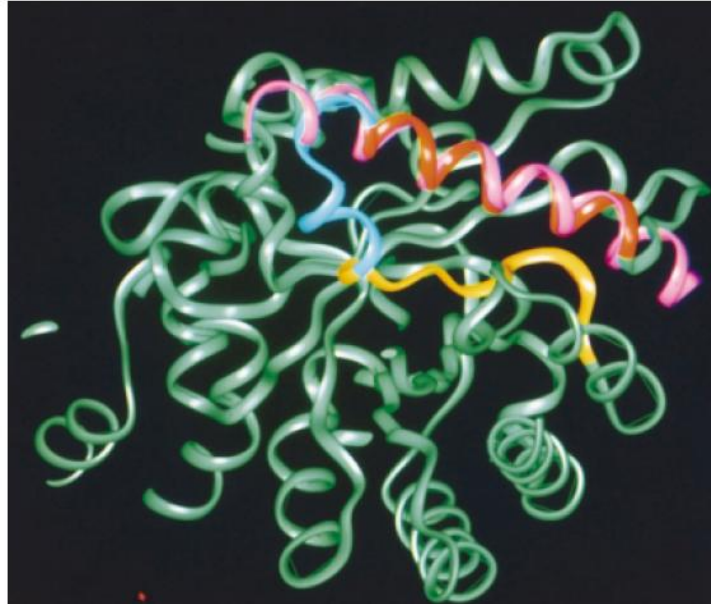


Figura 4. Comparación de la región ATIM de la EcTIM con el p β A (aa 1- 28) modelado por RMN. En rojo, azul y amarillo: hélice α , loop y hoja β de EcTIM respectivamente; en verde: el resto de la EcTIM; en rosa: el p β A (aa 1- 28) (Tomado de Contreras *et al.*, 1999)

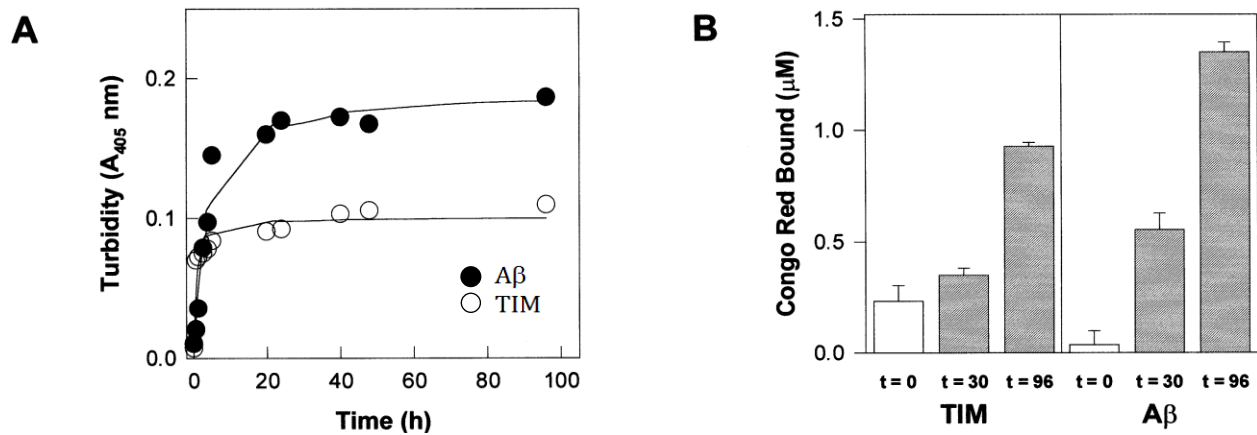


Figura 5. (A) Estudio de turbidez en función del tiempo a 405nm del p β A (97 μ M) y el pATIM de EcTIM (97 μ M) a pH 7.0 en PBS. (B) Ensayo de tinción con rojo Congo del p β A y el pATIM de EcTIM (Modificado de Contreras *et al.*, 1999)

Agregación de TIM dependiente del p β A en pacientes con Alzheimer

Las fibras del p β A ocasionan un estrés nitro-oxidativo característico en las neuronas de pacientes con Alzheimer, ya que el péptido amiloide es capaz de fijar iones metálicos como el Cu (I) y Fe (II) y reducirlos a Cu(II) y Fe (III), produciendo radicales hidroxilo y H₂O₂ (una molécula citotóxica) (Huang *et al.*, 1999; Cuajungco *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002). Por otro lado, las fibras amiloides ocasionan un daño severo de canales iónicos como el de Ca²⁺ (Mattson *et al.*, 1992), lo cual promueve la síntesis de óxido nítrico (ON) por la enzima ON sintasa, una enzima dependiente de calcio (Guix *et al.*, 2005). El ON puede reaccionar con otras moléculas como el anion superóxido (O₂⁻), para formar el anión peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula altamente reactiva capaz de nitrificar residuos de tirosina de varias proteínas. La TIM es una de las proteínas mas nitrificadas (en residuos de tirosina) y una de las que se han encontrado formando agregados en pacientes con Alzheimer (Coma *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2009).

TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

La TIM es una enzima clave para conseguir energía a través de la vía glucolítica. En la glucolisis la reacción entre la fructosa bifosfato aldolasa y su sustrato la fructosa 1,6-bifosfato genera gliceraldehido 3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), de estas dos triosafosfato únicamente el G3P es degradado a piruvato para obtener dos moléculas de ATP. Por otro lado el DHAP es isomerizado a G3P por la TIM (figura 6) para conseguir que otra molécula de G3P ingrese a la vía y así obtener 4 moléculas de ATP. Ya que la doble fosforilación de una molécula de glucosa requiere la inversión de dos moléculas de ATP en las primeras reacciones de la glucolisis, la ganancia neta es de dos de estas moléculas. (Nelson y Cox, 2005).



Figura 6. Reacción de isomerización de la TIM

Función metabólica

Además de la participación de la TIM en la glucólisis, esta enzima interviene en las siguientes vías metabólicas:

- Metabolismo de los ácidos grasos.

Aproximadamente el 95% de la energía biológicamente disponible de los triacilglicerolos almacenados en el tejido adiposo reside en sus tres ácidos grasos de cadena larga; la parte glicerol sólo contribuye en un 5%. El glicerol liberado por acción de la fosfolipasa es fosforilado por acción de la glicerolcina y el G3P resultante es oxidado a DHAP. La TIM convierte este compuesto en G3P en la reacción que da entrada al esqueleto carbonado a la glucólisis (Nelson y Cox, 2005).

- Vía de las pentosas fosfato

La razón por la que la vía de las pentosas fosfato y la glucólisis están estrechamente ligadas es por la glucosa 6-fosfato; ya que, si esta es oxidada a ribulosa 5-fosfato, puede entrar a la vía de las pentosas fosfato. Al inhibir la glucólisis a través de alteraciones en la actividad de TIM o de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, el flujo metabólico es redirigido a la vía de las pentosas fosfato (Grant, 2008).

- Lanzadera de glicerol 3-fosfato

En la membrana mitocondrial de mamíferos y levaduras existe una lanzadera de glicerol 3-fosfato, la cual transfiere equivalentes reductores que no pueden atravesar la membrana mitocondrial (Larsson *et al.*, 1998). La glicerol 3-fosfato deshidrogenasa-NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado) cambia una molécula de DHAP a una de G3P empleando NAD⁺ como equivalente reductor (Ansell *et al.*, 1997). En conjunto otra enzima, la glicerol fosfato deshidrogenasa FAD⁺ (dinucleótido de flavina y adenina), que está ubicada en la membrana interna en la mitocondria, convierte la molécula de G3P a DHAP. La acción coordinada de ambas enzimas, resulta en la transferencia de dos equivalentes reductores del G3P a la ubiquinona del complejo de fosforilación oxidativa. Al ser G3P y DHAP los sustratos de la TIM, la enzima regula el equilibrio de estos esqueletos carbonados para su aprovechamiento conveniente en ambos sistemas metabólicos.

Características estructurales

La TIM está conformada generalmente por dos subunidades, cada una compuesta, en general, de 250 residuos de aminoácidos por monómero (con una masa molecular de 27 000 Daltones aproximadamente). Estas dos subunidades son idénticas e interactúan cercanamente formando un homodímero en todas las especies excepto en organismos termófilos, en los cuales la enzima forma tetrámeros (Hernandez-Alcantara *et al.*, 2002). La TIM se puede clasificar de forma estructural en la familia de proteínas que presentan un dominio denominado barril (β/α)₈, en el que cada monómero consta de ocho hélices α que rodean a las ocho hebras β ensambladas gracias a sus respectivas asas de unión (figura 7).

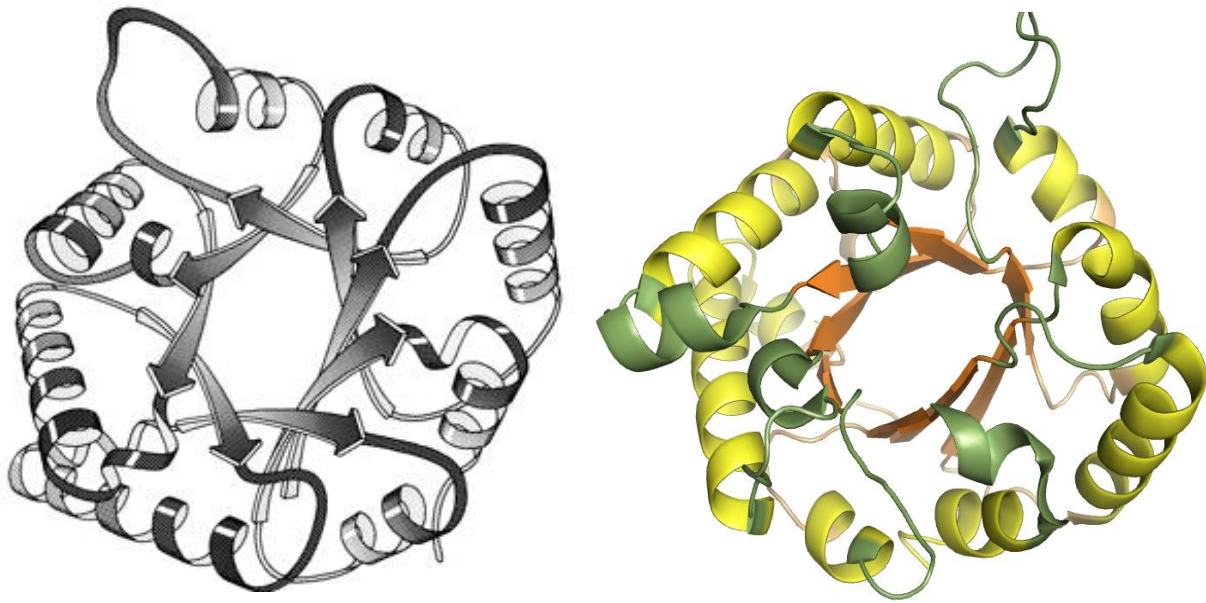


Figura 7. Diagrama del motivo barril $(\beta/\alpha)_8$ del monómero de la TIM. Diagrama esquemático TIM (izquierda) y modelo atómico (derecha), en este último se observa en el centro 8 hebras β (naranja) unidas a 8 hélices α (amarillo) por sus respectivas asas de unión (verdes (hebra \rightarrow hélice) y naranja claro (hélice \rightarrow hebra)).

La mayoría de los residuos que juegan un papel importante para el correcto plegamiento y funcionamiento del dímero (Figura 8) se encuentran distribuidos en las 8 asas. En el asa 1 se encuentran: la lisina 13, la cual es fundamental para el reconocimiento del sustrato y la cisteína 14 que une a la α hélice 1 con la hoja β 1, formando parte de la interfase de la proteína (además de encontrarse rodeada por la serina 71, glicina 72, glutamato 77, valina 78 y la serina 79 del asa 3 del otro monómero) estabilizando así el dímero. Dos residuos de la interfase: la valina 46 y la treonina 75 que se encuentran en las asas 2 y 3 respectivamente, mientras tanto que el asa 4 posee a la histidina 95, que forma parte del sitio catalítico, y, en el asa 6 se encuentra al glutamato 165, responsable de la transferencia de protones al sustrato (Wierenga *et al.*, 1991). El asa que más participa en la estabilización del dímero es la 3, la cual se extiende desde una subunidad hasta la otra.

Con excepción de los residuos del asa 3, sólo existe una secuencia conservada entre los residuos de la interfase. Un alineamiento de TIMs de dos especies distintas: *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*, reveló que sólo 30 de los 250 aminoácidos que componen al monómero se

encuentran estrictamente conservados, sin embargo, estas diferencias no parecen afectar sus propiedades catalíticas (Maldonado *et al.*, 1998).

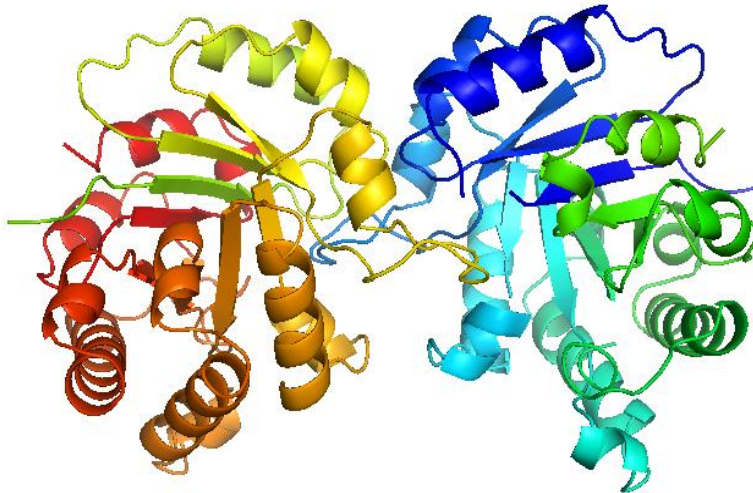


Figura 8. Homodímero de TIM, la interfase es el resultado de la interacción de 40 residuos de cada monómero.

Sitio activo y catálisis

Cada monómero posee un sitio activo con todos los residuos de aminoácidos relacionados con la catálisis, sin embargo, la enzima sólo es catalíticamente activa cuando ésta se encuentra en forma de dímero, no hay datos que indiquen cooperatividad catalítica ambos sitios activos (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002; Rodríguez-Almazan *et al.*, 2008). En humano, los residuos responsables de la actividad catalítica son: lisina en la posición 13, histidina en la posición 95 y ácido glutámico en la posición 165. Dada la variación en las secuencias de la enzima en distintas especies, el número exacto de estos residuos puede variar ligeramente. Para realizar la catálisis no se requiere de cofactor o ion metálico y tampoco se ha descrito algún mecanismo regulador de su actividad (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002; Wierenga *et al.*, 1991), por lo tanto, la TIM es un catalizador muy eficiente. La reacción catalítica de la TIM inicia con la extracción del protón del carbono 1 de la DHA por el ácido glutámico 165, mientras el grupo fosfato es resguardado por la lisina 13 y el grupo carbonilo es polarizado por la histidina 95, una vez extraído el protón, la carga negativa del carbonilo es estabilizada mediante un puente de hidrogeno con la misma histidina. La extracción del átomo de hidrogeno genera la formación del intermediario enediol a través

de 3 posibles rutas de transferencia hasta alcanzar la isomerización a G3P (Komives *et al.*, 1991; Pompliano *et al.*, 1990). El asa 6 también contribuye a la estructuración adecuada del sitio activo. La asociación del sustrato genera un gran cambio conformacional donde el asa 6 se mueve de 7 a 9 Å de un estado abierto a uno cerrado con respecto al sitio activo, de tal modo que el ácido glutámico 165 y la lisina 13 se encuentran más cerca del sustrato; una vez que el fosfato cercano a la lisina 13 es modificado, ocurre un nuevo cambio estructural, el asa 6 se retira y el sitio activo se abre para liberar el producto. La conformación cerrada impide que el intermediario fosfo-glicol hidroximato (enediolato) sea disociado y forme metilglioxal y fosfato inorgánico (Lolis *et al.*, 1990; Pompliano *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1994).

DEFICIENCIA DE TIM

Las enzimopatías glucolíticas son raras y poco frecuentes, las más estudiadas se han presentado en los eritrocitos de humanos, donde la deficiencia catalítica de alguna de las enzimas que participan en esta vía ocasiona la muerte masiva de células, produciendo una anemia hemolítica. Si la anemia es severa, ésta se presenta a una temprana edad; si la anemia es menos severa, puede presentarse a una edad más avanzada o ser un padecimiento asintomático. Cuando ocurre otra manifestación sistémica, es probable que ésta involucre el sistema neuromuscular (miopatías) o el sistema nervioso central (que en ocasiones puede implicar severo retraso mental) o ambos (Jameson, 1998). La TIM es la única enzima glucolítica cuya deficiencia está asociada a padecimientos neurodegenerativos (Eber *et al.*, 1991; Schneider, 2000; Ovádi *et al.*, 2004). Es frecuente encontrar señales de una glucolisis ineficiente (Hoyer *et al.*, 1988) y un agotamiento energético de ATP (Keil *et al.*, 2004) como dos características particulares en la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, estudios clínicos han descrito a la deficiencia de TIM como un padecimiento conformacional neurodegenerativo (Orosz, *et al.*, 2009) que se genera por una pobre dimerización del homodímero de TIM, como el efecto de ciertas mutaciones encontradas en un grupo de pacientes con deficiencia de TIM.

Mutaciones de la TIM y la deficiencia catalítica

Al estudiar las deficiencias de TIM, se observó que las mutaciones no están restringidas a un dominio ó región específica de la enzima. Los residuos mutados que están acoplados con el sitio de unión al sustrato manifestaron un decremento en la actividad, mientras que aquellos que interactúan con la interfase del dímero mostraron una inestabilidad molecular de la TIM ante el efecto de temperatura (Orosz, *et al.*, 2009).

Las mutantes: Cys41Tyr, Gly72Ala, Ile170Val, Val231Met y Phe240Leu fueron sugeridas como aquellas que podían interactuar con el sitio activo (Schneider, 2000). Por otro lado, las mutantes Cys41Tyr, Ala62Asp, Gly72Ala, Glu104Asp y Val231Met se propusieron como aquellas que podrían tener influencia sobre la interfase del dímero. Las mutantes Glu104Asp y Gly72Ala presentaron una gran inestabilidad y un decremento de la actividad. En cambio, las mutaciones de Cys41Tyr y Val231Met presentaron una influencia notable sobre el sitio activo y la interfase. No hay estudios reportados para el caso de Ala62Asp. Los estudios de termolabilidad en las mutantes Phe240Leu e ILE170Val (Orosz *et al.*, 2001) y Gly122Arg (Perry, *et al.*, 1992) no sugirieron que hubiera efecto sobre la interfase del dímero, pero sí una moderada reducción en la actividad de TIM. Estas últimas mutantes no generan síntomas neurológicos, pero sí aumentan la termolabilidad del dímero (Orosz *et al.* 2009). A partir de estas observaciones se sugirió que las mutaciones estructurales de los residuos de interfase juegan un papel más importante que las del sitio catalítico en las manifestaciones clínicas en la deficiencia de TIM (Orosz *et al.* 2009). La influencia negativa observada en la actividad catalítica de la enzima, en pacientes con deficiencia de TIM, no parece ser la consecuencia fatal de este padecimiento, si la estructura cuaternaria de la proteína es estable, ya que, a pesar de la baja actividad de TIM detectada en los pacientes, la catálisis enzimática es suficiente para asegurar un flujo glucolítico normal (Oláh *et al.*, 2005 y Schuster *et al.*, 1995). Sin embargo, cabe señalar que el equilibrio entre G3P y DHAP no se alcanza en los eritrocitos con TIM mutantes, lo cual genera una elevada concentración de DHAP en todos los casos (Oláh *et al.*, 2005) y, muy probablemente, la formación de agregados proteicos tóxicos en el tejido cerebral (Orosz *et al.*, 2009).

Mutación E104D

La mutación más frecuente de TIM, y la que presenta los síntomas más severos, está en la posición 104 (Figura 9), la cual involucra un cambio conservativo de ácido glutámico por ácido aspártico. La enzima con esta mutación exhibe una actividad catalítica normal, pero presenta una dimerización deficiente, baja termoestabilidad y monomeriza bajo condiciones en las cuales la proteína nativa mantiene su forma dimérica (Rodríguez *et al.*, 2008). Al analizar la estructura de los dímeros de TIM, se observa que el residuo en la posición 104 es parte de una cavidad interna, que posee una red conservada de moléculas de agua, que conecta ambas subunidades. Al estudiar la estructura cristalográfica de la mutante E104D, se observa una interrupción de los contactos que hay entre los aminoácidos de la cadena lateral en la cavidad, lo cual ocasiona una perturbación de la red de aguas, debilitando la unión de los dos monómeros (Rodríguez-Almazan *et al.*, 2008).

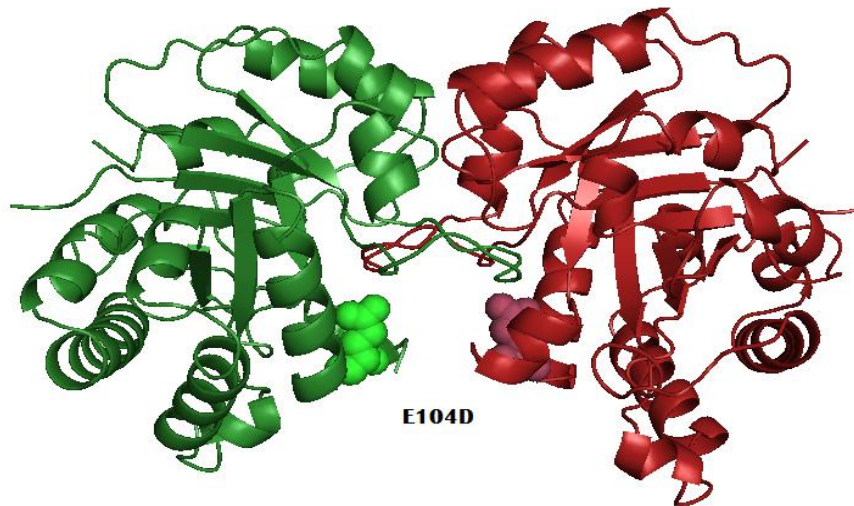


Figura 9. TIM de humano, en esferas (verde y lila) se observa el amino ácido en la posición 104.

AGREGACIÓN DE LA TIM

Como se ha revisado en secciones anteriores, resulta muy interesante que en pacientes con Alzheimer se han encontrado depósitos de agregados de TIMs nitrificadas (Guix *et al.*, 2009). Además, está el hecho de que existe una similitud considerable entre el péptido

amiloide y una región específica en varias secuencias de TIM, resaltando el fragmento 175 – 213 de la TIM de *E. coli* y su capacidad por formar fibras tipo amiloides. Por otra parte, en pacientes con deficiencia de TIM la enzima ejerce una actividad catalítica defectuosa debido a un plegamiento incorrecto de las enzimas mutantes, siendo la “capacidad para agregarse” la principal razón de estos efectos negativos. Estos antecedentes permiten plantear un panorama general en el que 1) las variantes puntuales de TIM son proclives a monomerizar y a su vez el péptido parcialmente desplegado es capaz de interactuar con otras proteínas mediante un mecanismo estructural que actualmente no ha sido dilucidado, 2) la acumulación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) se acumulan y afectan la integridad del tejido y 3) la agregación de TIM esta correlacionada con una mayor expresión de la oxido nítrico sintasa, el aumento de poderosas especies como el peroxinitrito y la presencia del péptido β -amiloide (figura 10) (Orosz et al., 2009; Guix et al., 2009).

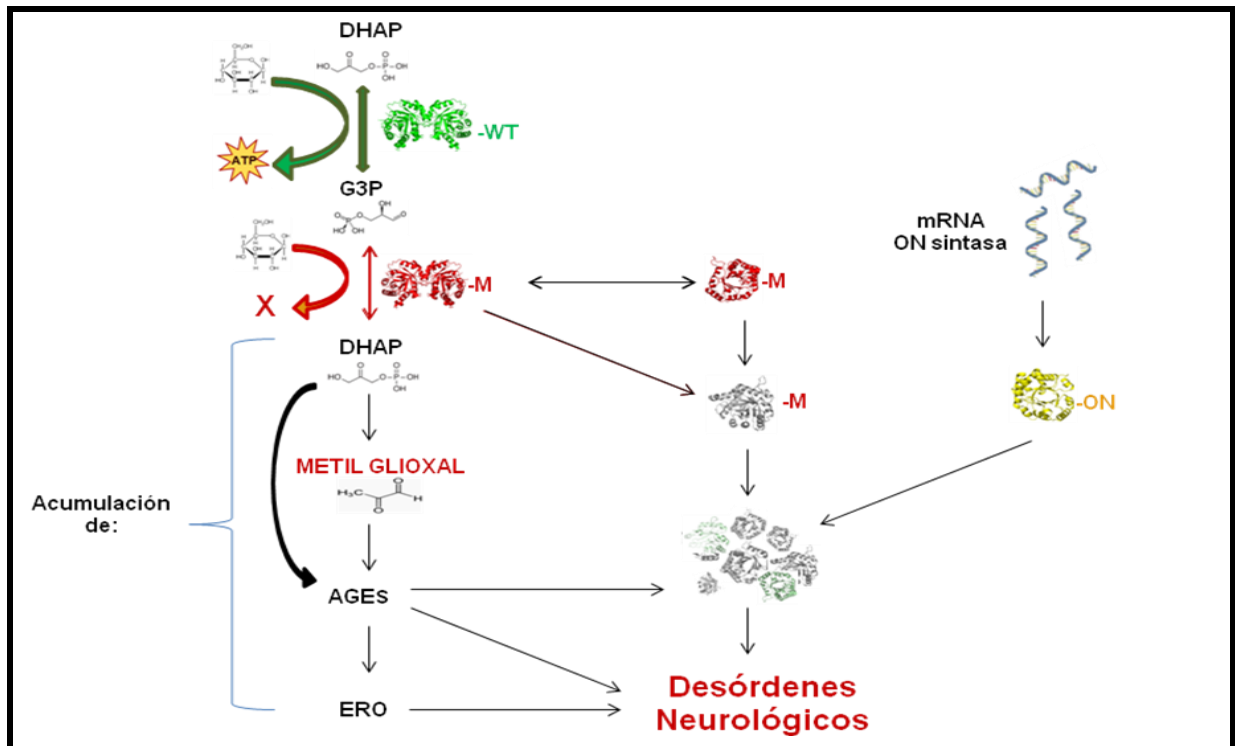


Figura 10. Esquema de la agregación de proteínas por deficiencia de TIM (Modificado de Orosz et al., 2009) AGEs (productos de glicosilación avanzada).

Por otra parte, al estudiar por inmunoreactividad la presencia del p β A en paredes vasculares del hipocampo de cerdos recién nacidos, se han identificado, con los mismos anticuerpos anti-p β A, a agregados de la TIM de *Sus crofa*, la cual, en una región de su secuencia en el extremo amino terminal, comparte una similitud del 23% con el p β A. Esto sugiere su acumulación por agregación tipo amiloide (Kusaka *et al.*, 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TIM es una proteína que está presente en todos los organismos y una de las más estudiadas. Actualmente se cuenta con información sobre su filogenia, mecanismo catalítico, estructura tridimensional, biofísica de su estabilidad y su mecanismo de plegamiento, sin embargo, no hay un conocimiento claro sobre su capacidad para formar agregados oligoméricos. Recientemente se han detectado agregados de TIM en pacientes con Alzheimer, en tejido de hipocampo de *S. scrofa domesticus* y en ratones transgénicos capaces de expresar la proteína precursora amiloide. Estos estudios han demostrado que los agregados de TIM son dependientes de la presencia del p β A. Por otro lado, se sugiere que estas TIMs se agregan en estructuras tipo amiloide debido a su similitud con el p β A, lo cual fue demostrado para un péptido de 40aa de EcTIM. Por lo tanto, el estudio de los agregados de distintas especies de TIM y sus características, ampliaría el conocimiento sobre la agregación de esta proteína y su influencia en enfermedades conformacionales como Alzheimer y la Deficiencia de TIM.

ANTECEDENTES

Recientemente se reportó que la TIM de humano (HsTIM) es capaz de formar complejos oligoméricos con un peso molecular aparente de 1 a 1.4 Mega Daltones. Esto significaría que la HsTIM es capaz de formar complejos oligoméricos de alto peso molecular. Estos complejos son estables, ya que resisten la acción de ciertos detergentes como Tritón X-100,

Brij y saponina; sin embargo, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1% los agregados se disocian (figura 11). Los análisis reportados fueron realizados utilizando la técnica de electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida (BN-PAGE) (Swamy *et al.*, 2009).

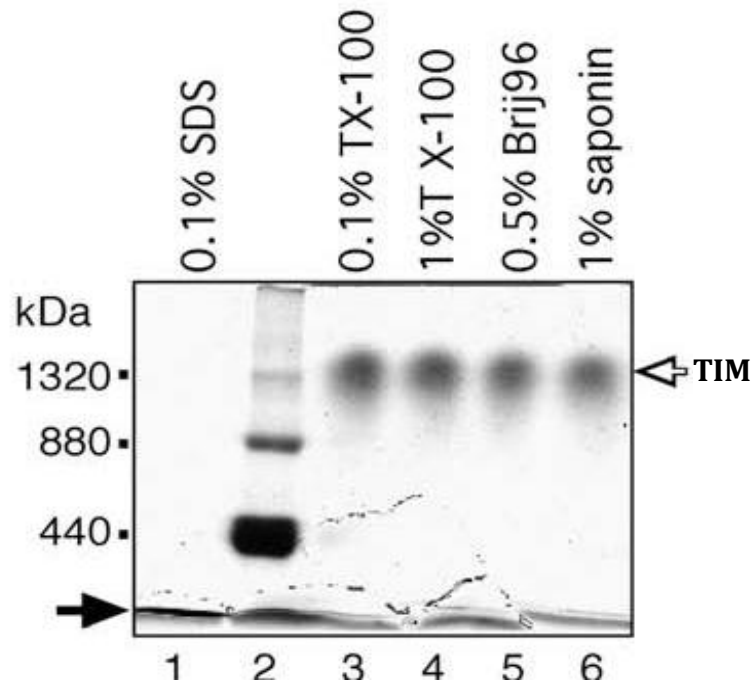


Figura 11. Análisis de TIM recombinante por BN-PAGE. En 1, HsTIM + SDS 0.1%; 2, control de peso molecular ferritina; 3, HsTIM + Tritón X 100 0.1%; 4, HsTIM + Tritón X 100 1%; 5, HsTIM + Brij 96 0.5%, 6, HsTIM + Saponina 1%. El análisis se realizó en un gel de acrilamida con un gradiente de 4-9% (Modificado de Swamy *et al.*, 2009).

La electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida es una técnica que puede brindar información valiosa acerca de la capacidad de agregación de la TIM de humano y otras especies, además de poder ayudar a analizar su estabilidad frente la acción de detergentes iónicos (SDS) y no iónicos (Triton X-100, dodecil- β D-maltosido y digitonina).

HIPÓTESIS

La TIM de humano mutante E104D y las TIMs nativas de otras especies presentan conformaciones oligoméricas de alto peso molecular con distintas características mediante el análisis por BN-PAGE.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar los perfiles de agregación de HsTIM, su mutante E104D y las de otras especies: *Entamoeba histolytica* (Eh), *Giardia lamblia* (Gl), *Leishmania mexicana* (Lm), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Taenia solium* (Ts), *Trypanosoma brucei* (Tb) y *Trypanosoma cruzi* (Tc), por BN-PAGE.

Objetivos particulares:

- Expresar y purificar las enzimas recombinantes de HsTIM, HsTIM E104D, EhTIM, GlTIM, LmTIM, PfTIM, ScTIM, TsTIM, TbTIM y TcTIM.
- Estandarizar la técnica BN-PAGE para el análisis de las distintas TIMs.
- Caracterizar cada una de las TIMs purificadas con base en su perfil electroforético.
- Evaluar la estabilidad de los agregados formados por cada una de las enzimas ante el efecto de detergentes no iónicos y cambios de temperatura

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se presenta la estrategia con las técnicas necesarias para obtener, preparar y analizar las proteínas recombinantes.

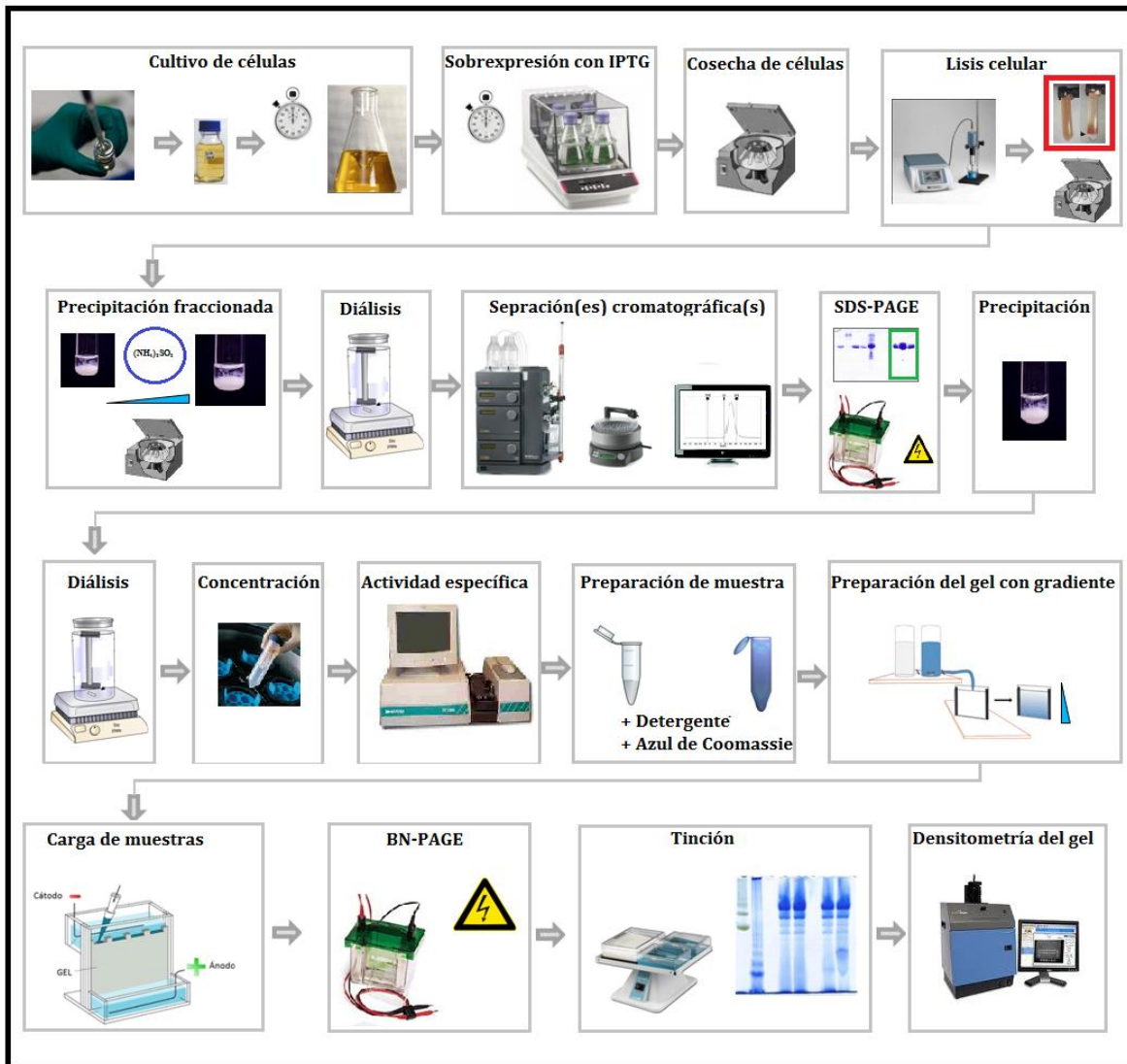


Figura 12. Esquema de la estrategia experimental para la sobreexpresión, purificación, análisis de actividad, determinación del perfil de agregación y el análisis por densitometría de los geles para cada TIM. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida con SDS.

MATERIALES Y MÉTODOS

SOBREEXPRESION DE LA TIM

Para el presente trabajo se realizó la sobreexpresión de nueve TIMs silvestres de distintas especies y una mutante de humano. Todas las proteínas fueron clonadas en células competentes de *E. coli* DH5 α y sobreexpresadas en células de *E. coli* BL21 DE3 pLys S mediante distintos plásmidos (p. ej. pET-3, pRSET y pKK). El inductor usado para la sobreexpresión de todas las TIMs fue isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo de lactosa. A continuación se describe un protocolo general para la sobreexpresión de las TIMs recombinantes (figura 13) a partir de las células transformadas y almacenadas en glicerol al 8% a -70 °C.

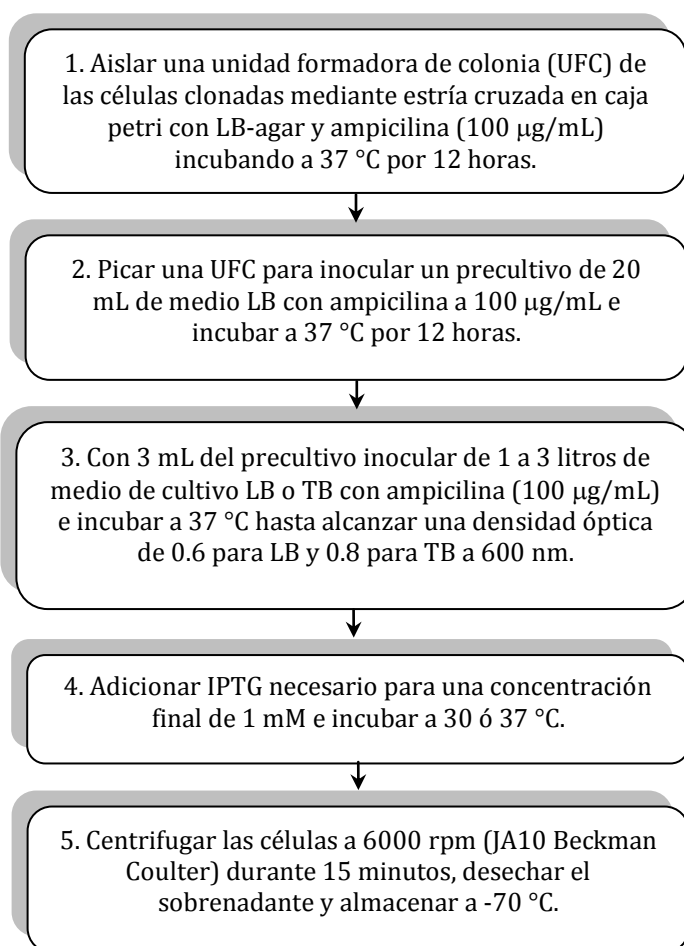


Figura 13. Método de sobreexpresión

ENSAYO DE SOBREPRESIÓN

Estos experimentos (figura 14) fueron realizados con el fin de determinar el tiempo y la temperatura óptima para la sobreexpresión de algunas TIMs.

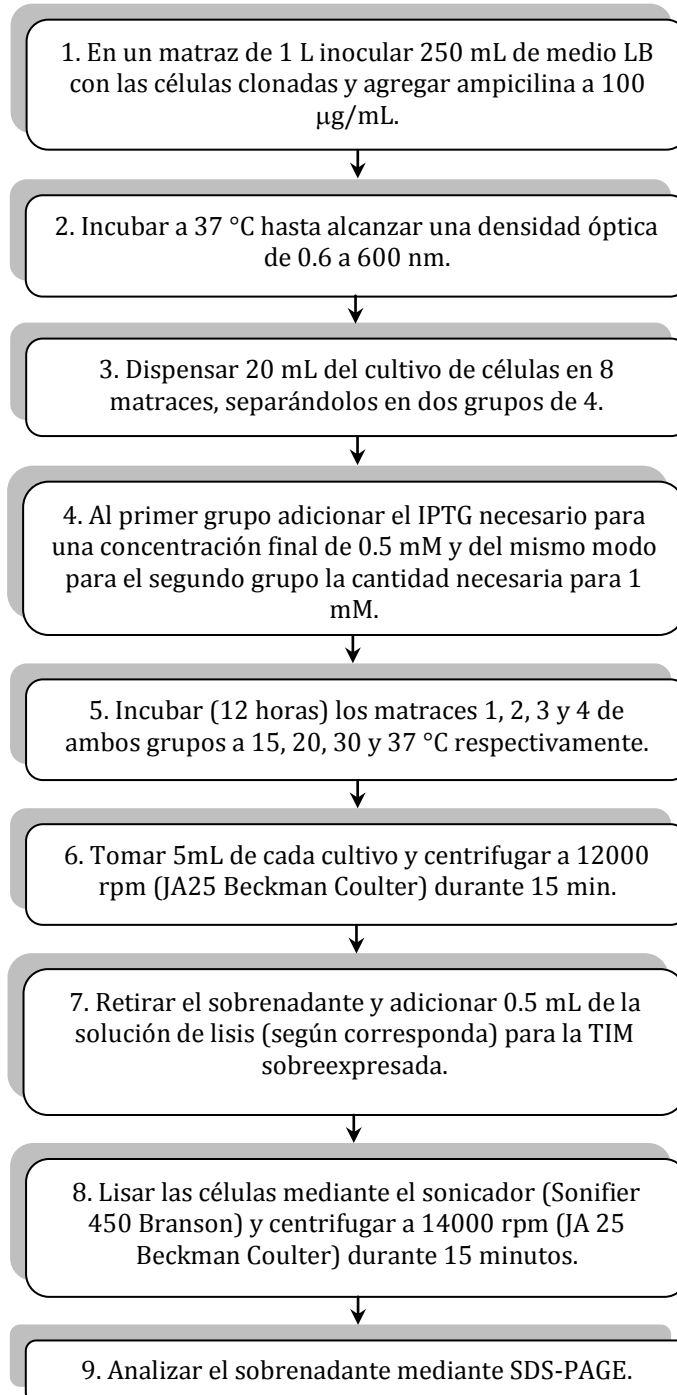


Figura 14. Método para el estudio del perfil de sobreexpresión de la TIM

PURIFICACION DE LA TIM

Para la purificación de todas las TIMs se emplearon diferentes técnicas cromatográficas debido a las diferentes características de las construcciones de las TIMs recombinantes. Todas las purificaciones se realizaron con un equipo ÄKTA purifier (GE Life Sciences) y con 6 tipos de resinas cromatográficas. A partir de la secuencia de aminoácidos de las TIMs, se obtuvieron algunos parámetros fisicoquímicos con ayuda del programa "ProtParam" disponible en el servidor ExPasy proteomic server (<http://www.expasy.ch/tools/>).

Método de purificación para HsTIM, HsTIM E104D, GITIM y TsTIM

Estas TIMs fueron previamente clonadas en el vector pET y pRSET el cual cuenta con un sitio de fusión en el extremo carboxilo de la TIM con un péptido de 6 histidinas. Esta etiqueta de hexahistidinas presenta una gran afinidad por el ion níquel debido a la capacidad de este aminoácido por coordinar iones metálicos divalentes, por lo que fueron purificadas con una resina de cromatografía de afinidad por ion metálico (IMAC) de sefarosa-níquel y aplicando un gradiente de 50 a 500 mM de imidazol. La columna fue una HisTrap FF 5 mL con tamaño de partícula de 90 µm.

Una vez purificada, la TIM se digiere para eliminar el péptido de poli-histidina fusionado. Esto se logra gracias a que contiene el sitio de corte AspAspAspLys, que reconoce la proteasa enterocinasa del virus del mosaico del tabaco (rTEV). Para el presente trabajo la proteasa rTEV también fue purificada mediante cromatografía de afinidad (figura 15). La TsTIM fue la única TIM que no pudo ser digerida, ya que no presenta el sitio de corte para rTEV.

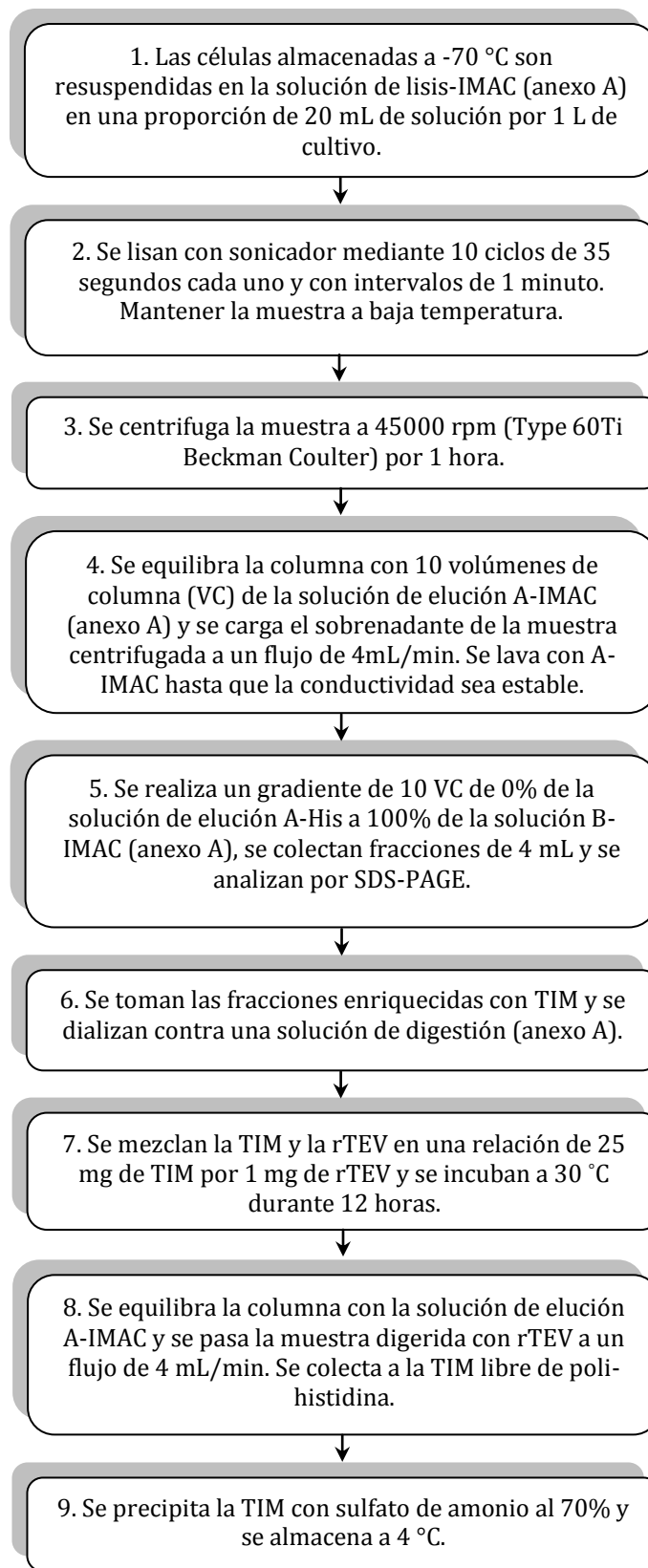


Figura 15. Purificación por cromatografía de afinidad. (Modificado de Rodríguez-Almazán et al., 2008; Jiménez et al., 2000)

Método de purificación para EhTIM, PftTIM y ScTIM

Para la purificación de estas proteínas se realizaron precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio (figura 16) con el fin de reducir el número de proteínas no deseadas.

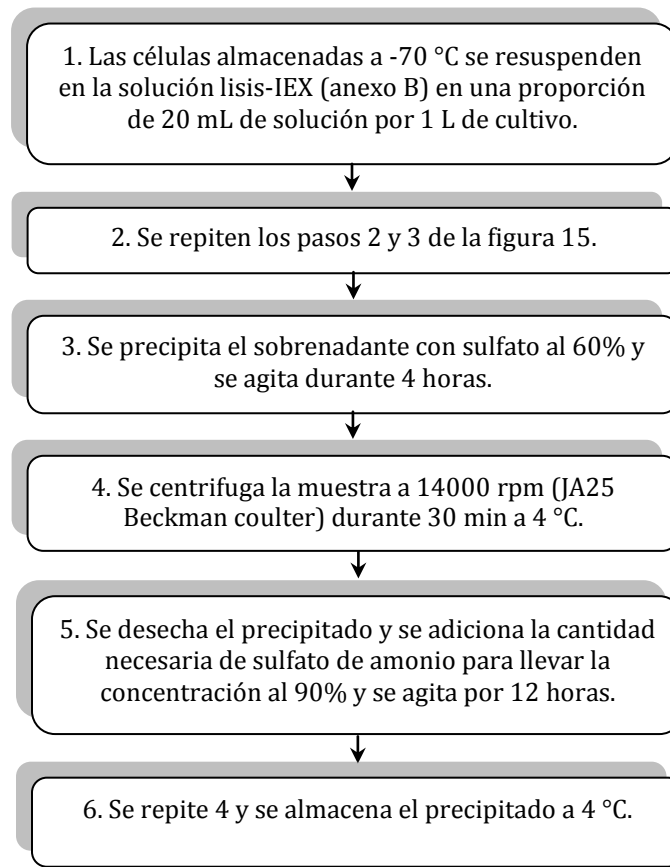


Figura 16. Preparación de muestra mediante precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio (Landa et al., 1997; Velanker et al., 1997; Vázquez-Contreras et al., 2000)

Una vez realizada la precipitación fraccionada se realizaron dos separaciones cromatográficas: la primera fue cromatografía de intercambio inico (IEX) (figura 17) con una columna Source 15Q con una matriz de poliestireno que contiene un ligando de amonio cuaternario y la segunda una cromatografía de exclusión molecular (SEC) (figura 18) con una columna Sephacryl S-300 HR, columna: XK 16/70 (GE lifesciences) matriz de dextran y N-metil bisacrilamida con un tamaño de partícula promedio de 25 a 75 μm

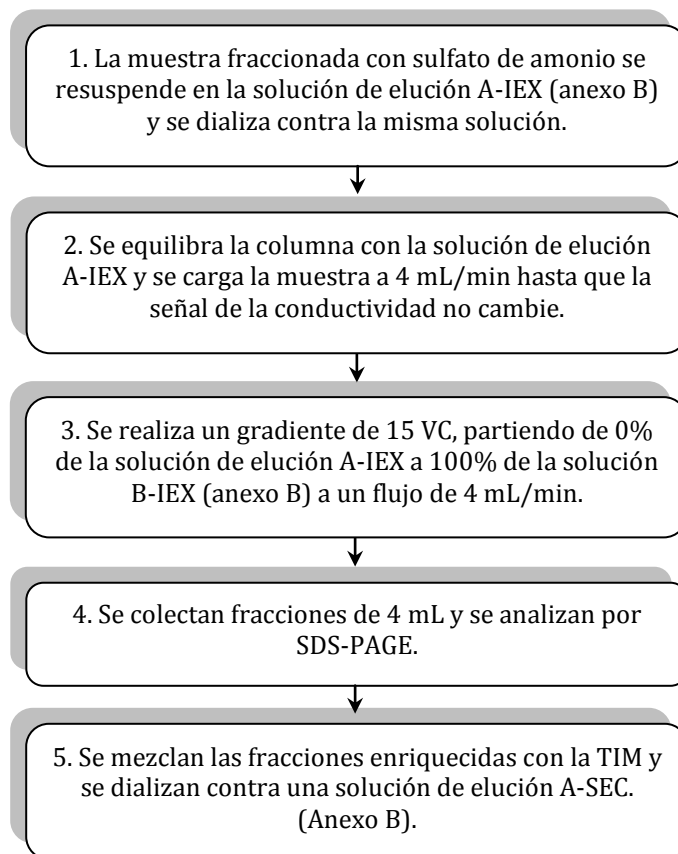
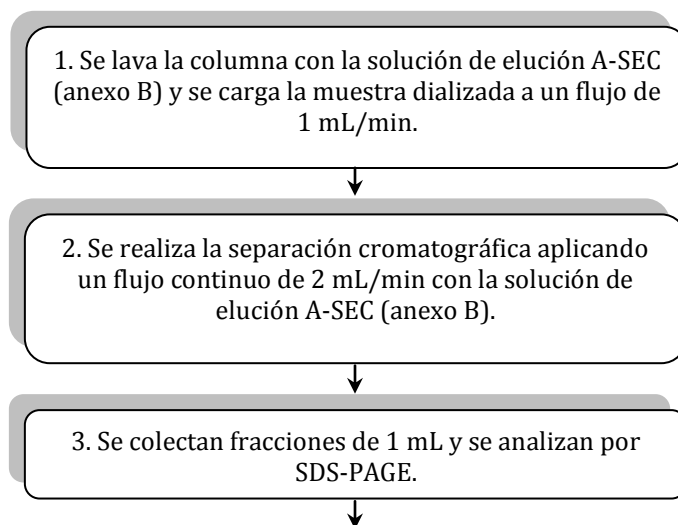


Figura 17. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico fuerte (modificado de: Landa et al., 1997; Velanker et al., 1997; Vázquez-Contreras et al., 2000)



4. Se mezclan las fracciones enriquecidas y se precipitan con sulfato de amonio al 70%. Se centrifuga a 14000 rpm (JA25 Beckman Coulter) y se guarda el precipitado a 4 °C.

Figura 18. Purificación por cromatografía en gel. (Modificado de: Landa et al., 1997; Velanker et al., 1997; Vázquez-Contreras et al., 2000)

Método de purificación para LmTIM

Antes de realizar la separación cromatográfica de esta proteína la muestra fue fraccionada adicionando sulfato de amonio y centrifugando (figura 19) para eliminar otras proteínas. Posteriormente se realizó una separación cromatográfica IEX con una resina DEAE Sephacel compuesta por perlas de celulosa (figura 20).

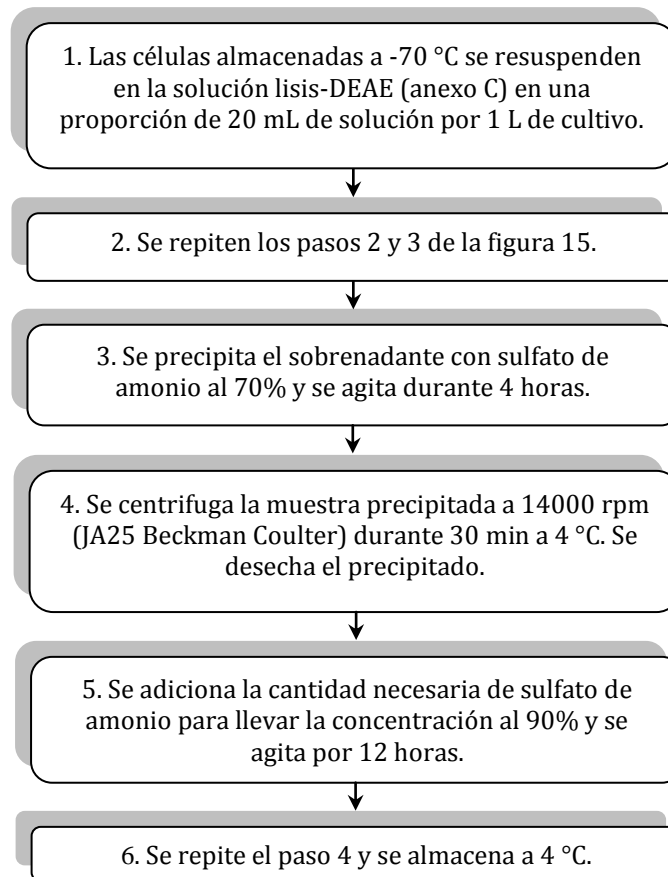


Figura 19. Preparación de muestra mediante precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio (Kohl et al., 1993)

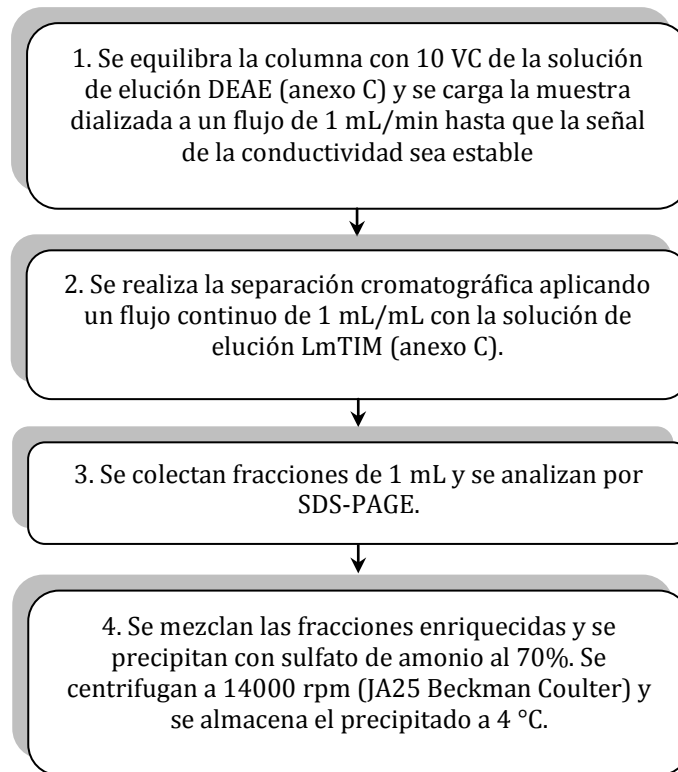


Figura 20. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico débil (Kohl *et al.*, 1993)

Método de purificación de TbTIM y TcTIM

Las proteínas se purificaron mediante dos separaciones cromatográficas (figuras 21 y 22). La primera fue una cromatografía IEX mediante una resina SP-Sepharose con una base de perlas de agarosa entrecruzadas con un diámetro promedio de 45 a 165 μm y la segunda una cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna empacada con Butyl Toyopearl 650M.

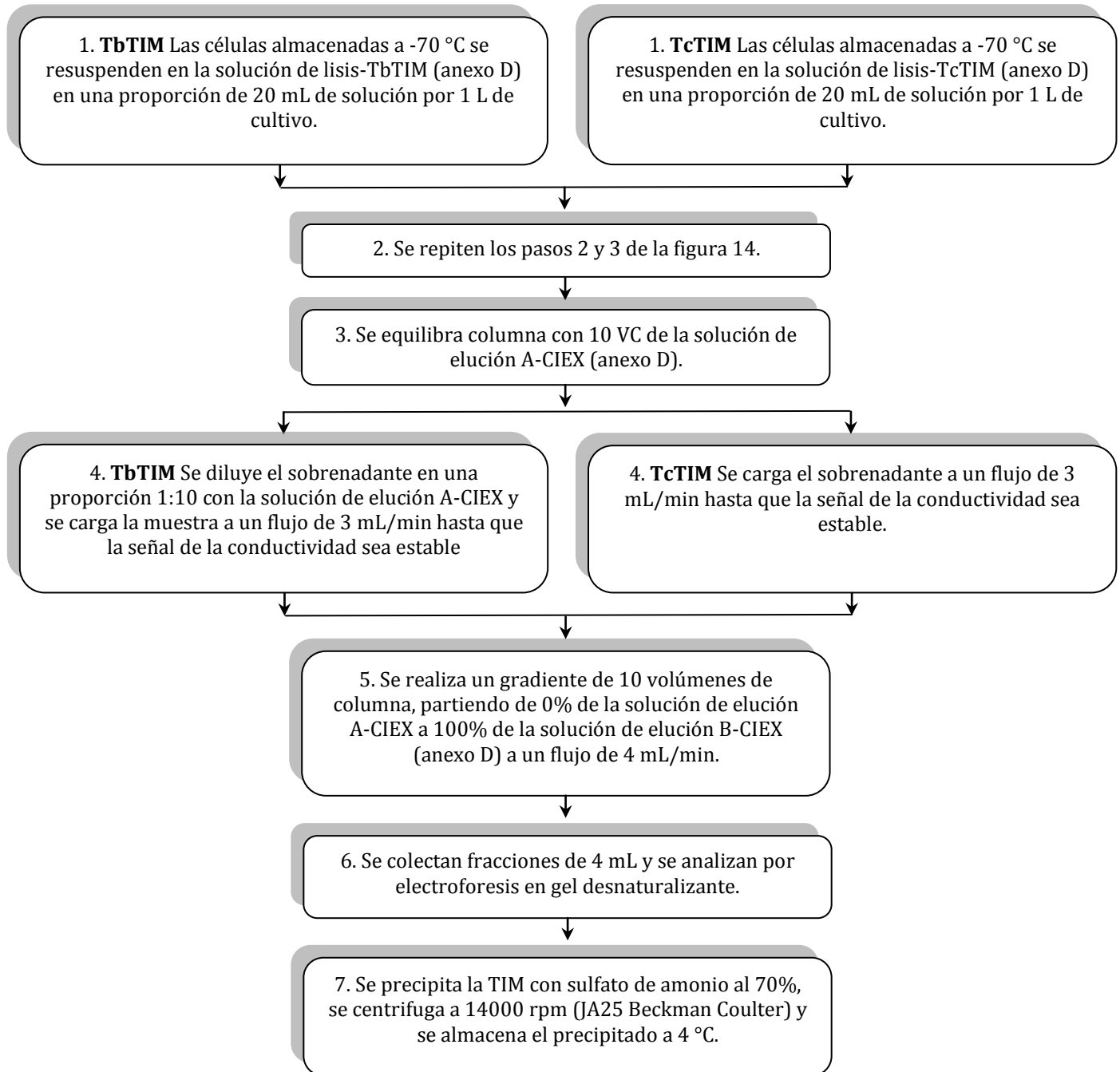


Figura 21. Purificación por cromatografía de intercambio catiónico (Borchert et al., 1993; Ostoa-Saloma et al., 1997)

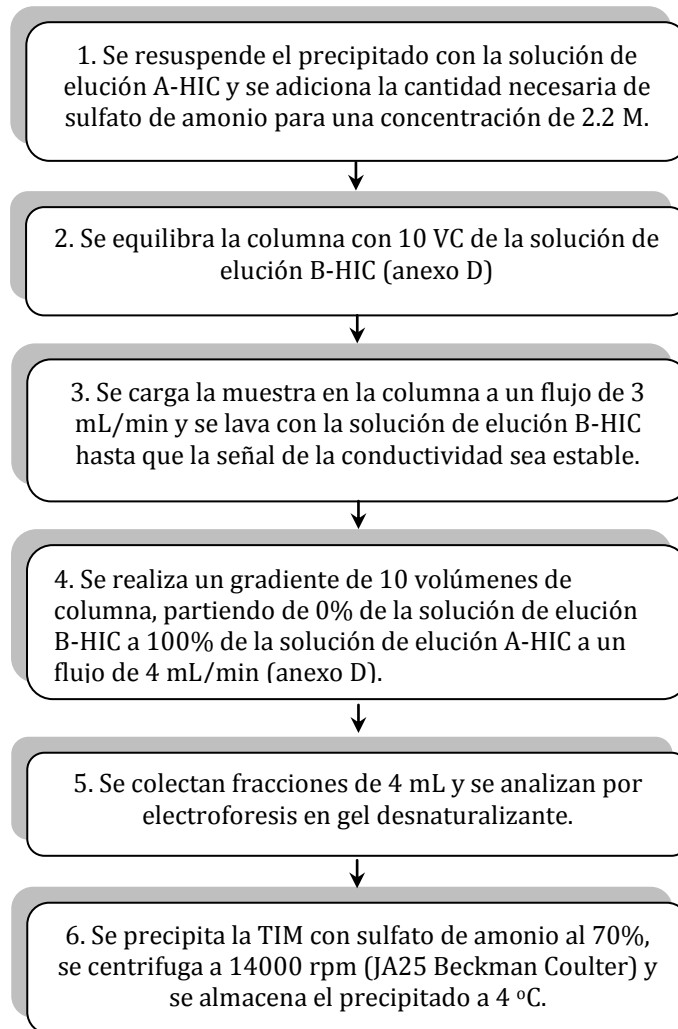


Figura 22. Purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (Borchert et al., 1993; Ostoa-Saloma et al., 1997)

ANÁLISIS POR SDS-PAGE

Preparación del gel de acrilamida

Las diferentes etapas de purificación de las TIMs se monitorearon mediante SDS-PAGE. La metodología para este análisis es la descrita por Von Jagow y Schägger (1994) "A practical guide to membrane protein purification". La preparación de los geles (figura 23) se realizó con los instrumentos del kit MINIPROTEAN (BIORAD).

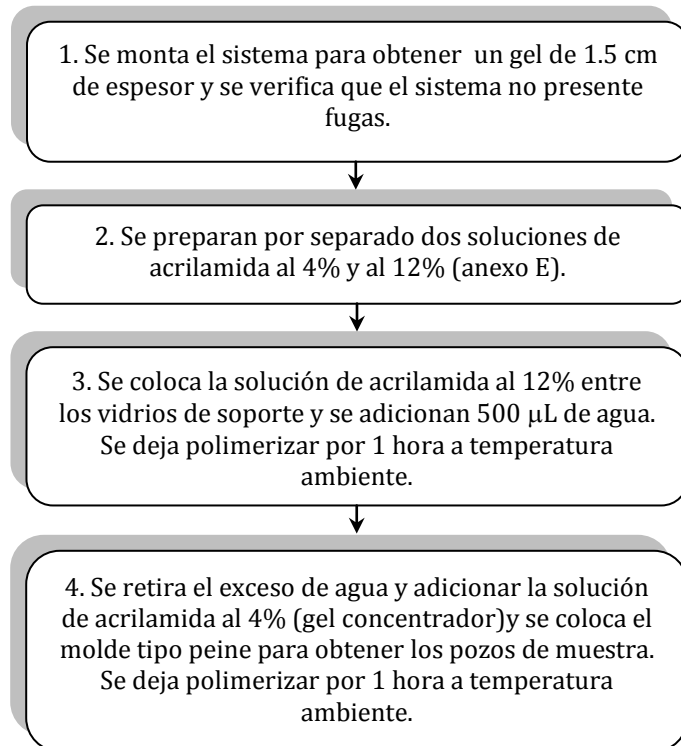


Figura 23. Preparación de los geles de SDS-PAGE.

Preparación de las muestras

Para realizar el análisis por SDS-PAGE, las muestras preparadas (figura 24) tenían una concentración de, al menos, 1 mg/mL. Por tal motivo, para cada análisis se colocaron en cada pozo 10 o 30 µg de proteína total en un volumen de 10 o 30 µL.

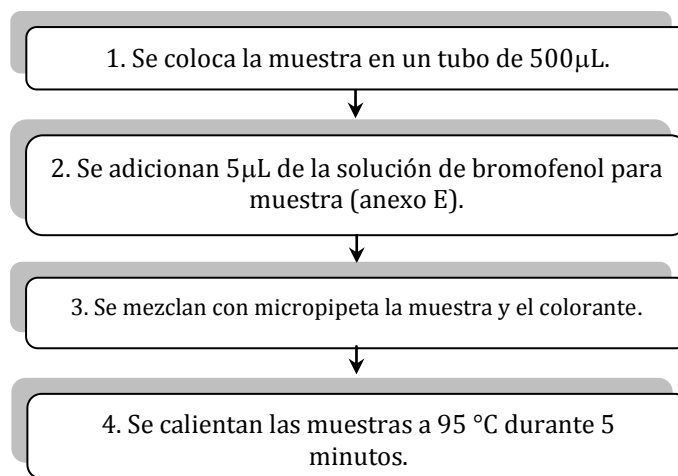


Figura 24. Preparación de las muestras

Separación electroforética (SDS-PAGE)

La separación electroforética (figura 25) se realizó a temperatura ambiente y monitoreando la migración del frente electroforético.

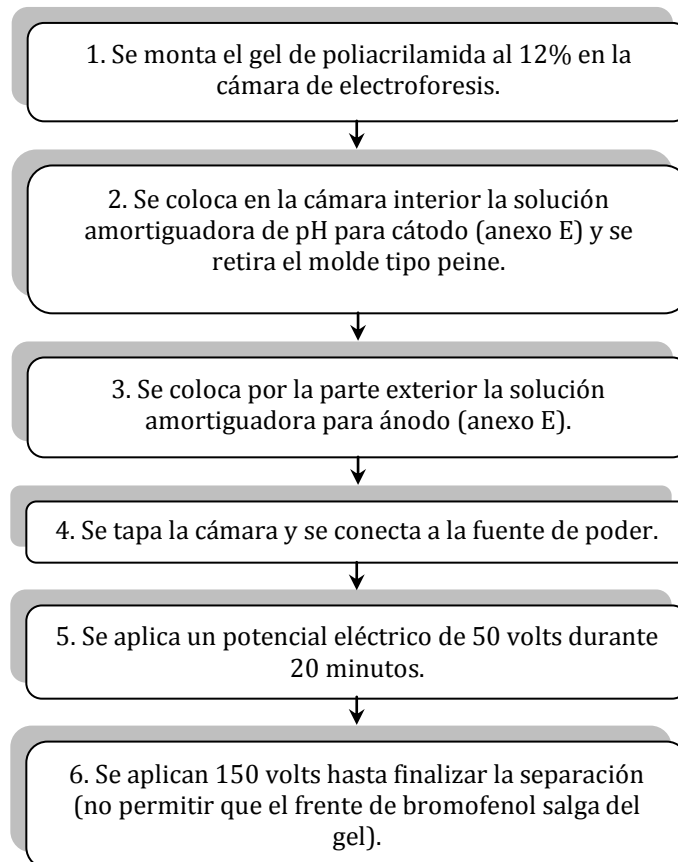
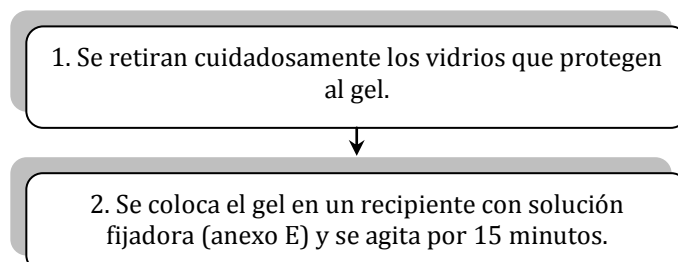


Figura 25. Separación electroforética SDS-PAGE.

Tinción del gel

Al terminar la separación de las muestras, las bandas resueltas en el gel fueron reveladas (figura 26) mediante la tinción con azul de Coomassie G-250. Los geles se analizaron por densitometría.



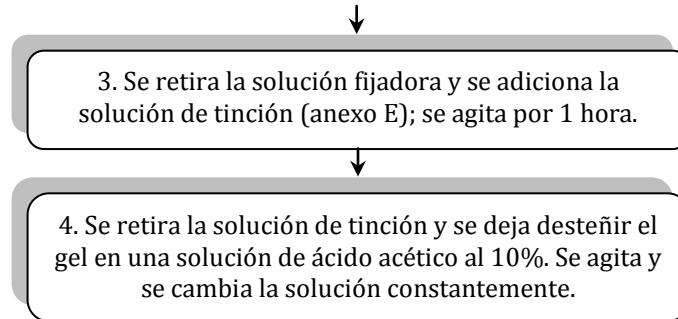


Figura 26. Tinción del gel de acrilamida

ANÁLISIS POR BN-PAGE

El método de análisis se estableció en base a lo descrito por Von Jagow y Schägger (1994).

Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas en condiciones de baja temperatura (figura 27).

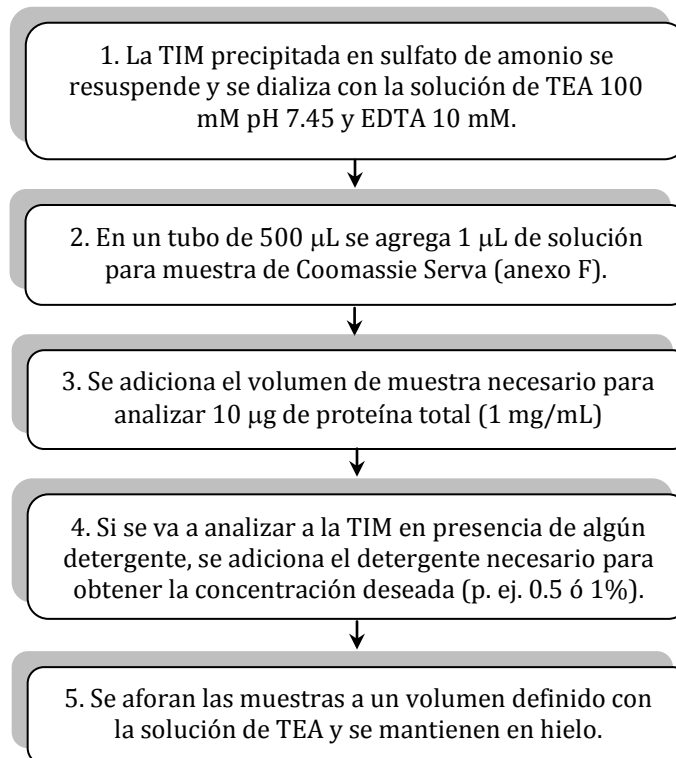


Figura 27. Preparación de las muestras

Preparación del gel de acrilamida con gradiente

Los geles empleados para la separación electroforética bajo condiciones nativas, se prepararon con un gradiente de bis-acrilamida del 4 a 12% y del 4 al 15% (figura 28). Los vidrios empleados para los geles nativos fueron los diseñados para la cámara MINIPROTEAN (BIORAD)

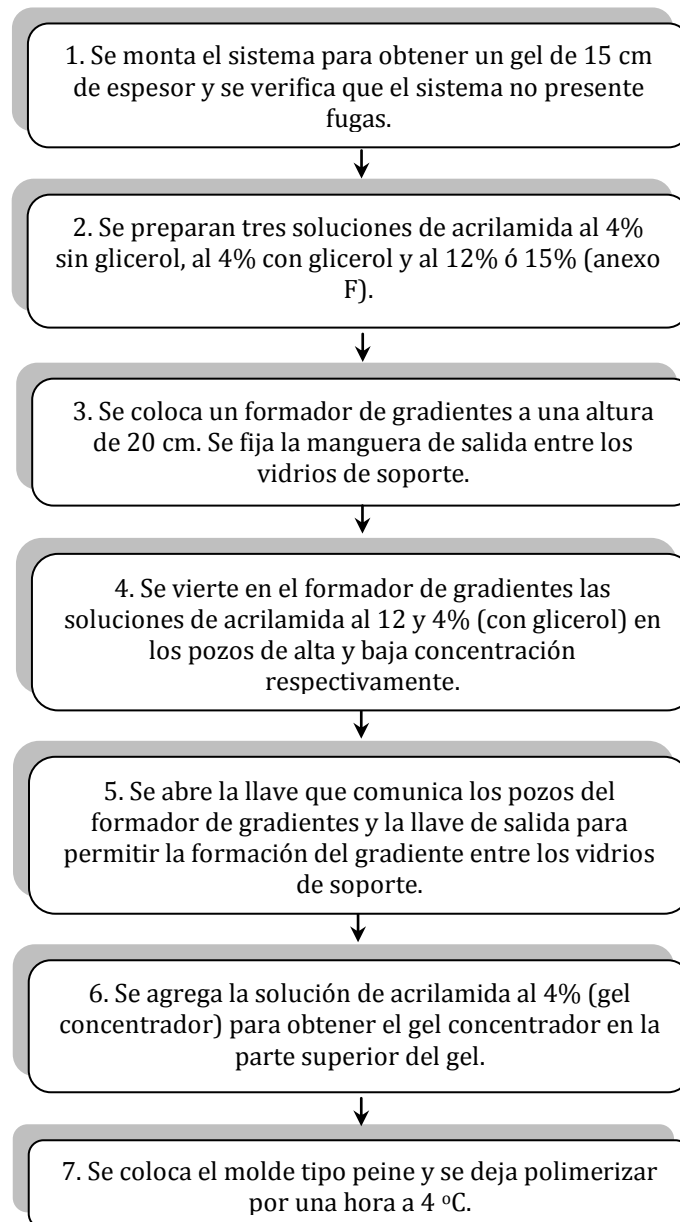


Figura 28. Preparación del gel de poliacrilamida con gradiente

Separación electroforética (BN-PAGE)

La separación electroforética (figura 29) se realizó en cuarto frío (6 °C) y monitoreando la migración del frente electroforético.

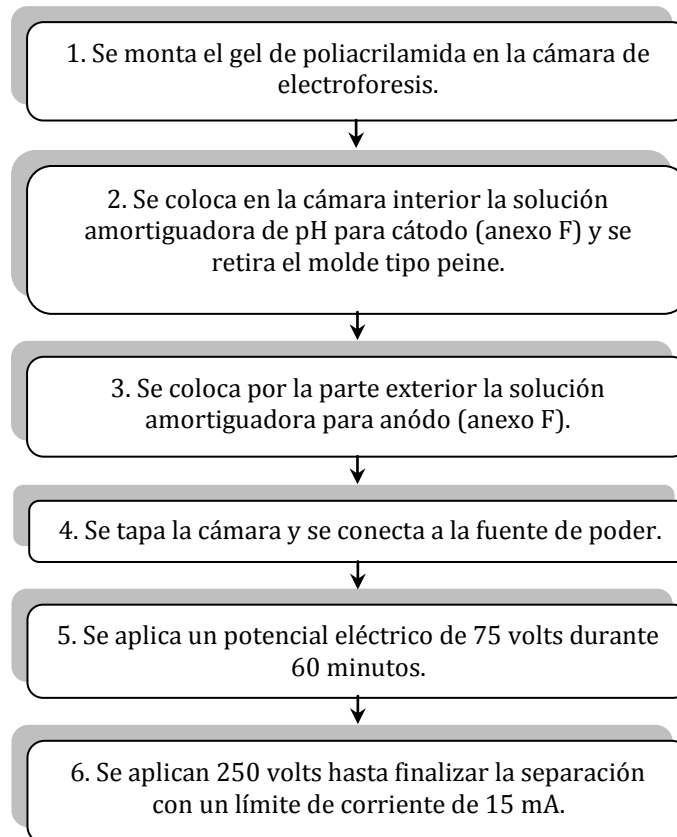


Figura 29. Separación electroforética BN-PAGE.

Tinción

La técnica de tinción fue la misma que en el caso de los geles obtenidos por SDS-PAGE (figura 26).

Determinación de la actividad específica de TIM

La integridad de las TIMs se confirmó determinando la actividad específica de cada TIM purificada al medir a 25 °C la conversión de G3P a DHAP mediante la enzima acoplada α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α GDH). La oxidación de NADH fue monitoreada a 340nm. La mezcla de reacción fue trietanolamina (TEA) 100 mM pH 7.4, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM, gliceraldehido 3-fosfato (G3P), NADH 0.2 mM y 20 mg/mL de α -GDH (García-Torres *et al.*, 2011). La reacción se inició con la adición de 5 ng/mL de la TIM en la mezcla de reacción con un volumen final de 1 mL.

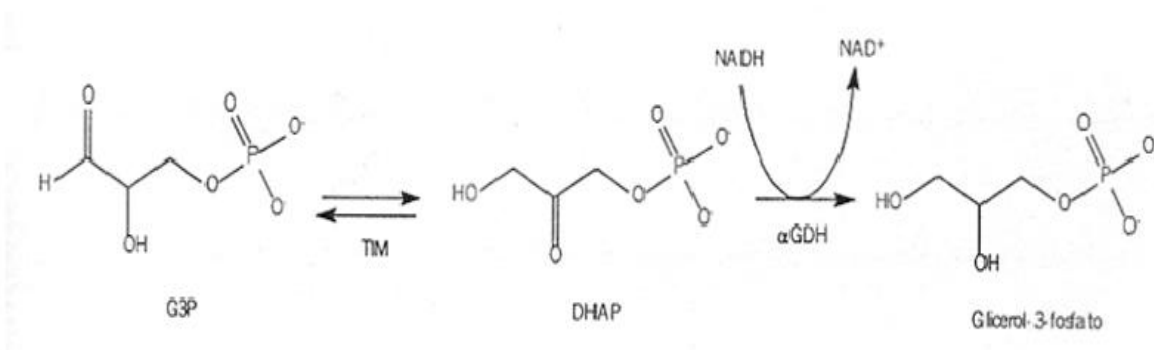


Figura 30. Reacción acoplada para medir la actividad de TIM.

RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LAS TIMs

Análisis por SDS-PAGE

Cada una de las TIMs se sobreexpresó y se purificó de acuerdo a la metodología descrita, obteniendo un rendimiento de 5 a 30 mg de proteína por litro de cultivo. Los ensayos de sobreexpresión realizados (no presentados en esta tesis) demostraron que la sobreexpresión de las TIMs recombinantes se logra cuando las células en presencia de IPTG se incuban a una temperatura de 30 ó 37 °C durante 12 horas. Las 10 TIMs purificadas se analizaron por SDS-PAGE y en todas se observó la presencia del monómero. El peso estimado fue de 27 kDa para todas excepto para TsTIM cuyo peso molecular estimado fue de 28 kDa debido a la etiqueta de hexahistidinas no cortada (figura 31).

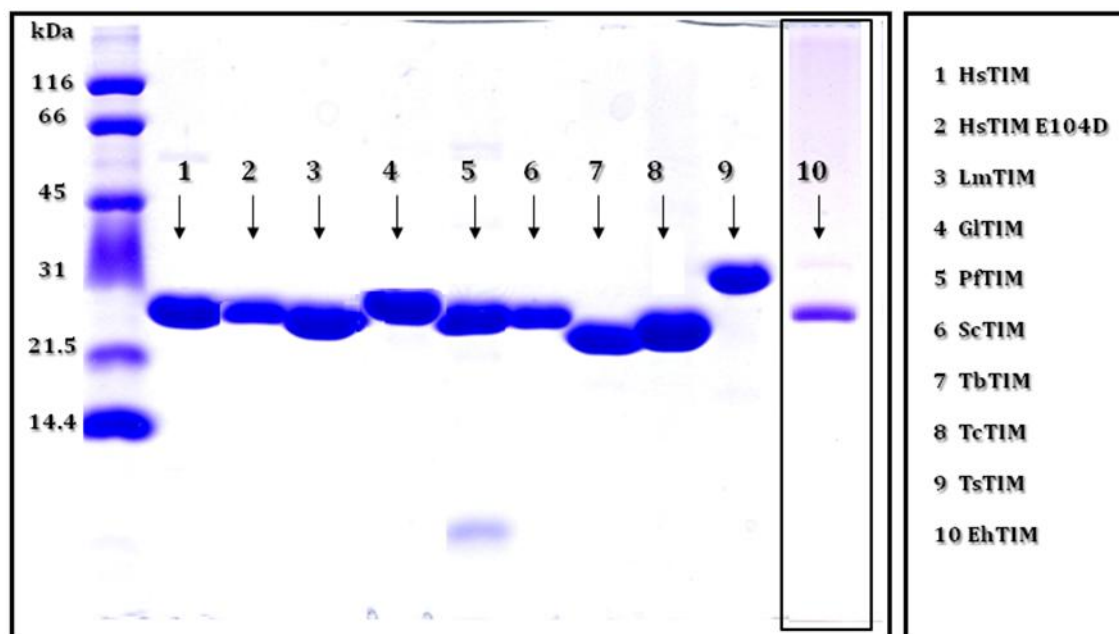


Figura 31. SDS PAGE de las TIMs purificadas mediante diferentes técnicas cromatográficas. Carril con EhTIM (10) determinado en otro gel.

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LAS TIMs

La actividad catalítica de las TIMs se determinó indirectamente por la reacción acoplada con la enzima α -glicerol 3 fosfato deshidrogenasa y la oxidación de NADH. También se infirieron algunos parámetros fisicoquímicos de las TIMs purificadas empleando el software disponible en la dirección de internet: <http://web.expasy.org/protparam>; los datos obtenidos se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y actividades específicas (5 mM de sustrato) de las TIMs purificadas.

Organismo	NÚMERO DE AA	PESO MOLECULAR (kDa)	PUNTO ISOELÉCTRICO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$)
<i>Entamoeba histolytica</i>	261	27.930	5.89	2721
<i>Giardia lamblia</i>	257	27.850	7.01	4084
<i>Homo sapiens</i>	249	26.670	6.45	3908
<i>Homo sapiens E104D</i>	249	26.650	6.44	2968
<i>Leishmania mexicana</i>	251	27.170	8.28	4125
<i>Plasmodium falciparum</i>	248	27.930	6.01	568
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	248	26.790	5.74	3429
<i>Taenia solium</i>	250	27.160	6.6	3920
<i>Trypanosoma brucei</i>	250	26.820	9.08	1922
<i>Trypanosoma cruzi</i>	251	27.320	8.64	2775

La composición de las TIMs va de 248 aa para PfTIM y ScTIM, hasta 261 aminoácidos para EhTIM, mientras que los valores de punto isoeléctrico van de 5.74 para ScTIM a 9.08 para TbTIM. Todas las TIMs presentaron actividad catalítica una vez purificadas, aunque la PfTIM presentó la actividad específica más baja (568 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), lo cual se comprobó en dos lotes distintos.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Alineamientos de las secuencias de las TIMs y las regiones ATIMs

Las secuencias de las 9 TIMs fueron alineadas usando el software Clustal W disponible en la dirección de internet: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (HsTIM E104D no se alineó ya que sólo es una mutación puntual); los porcentajes de similitud entre las secuencias de TIM se muestran en la tabla 2 (sección superior izquierda), mientras que en la misma tabla se observan los alineamientos entre las regiones ATIM de las 9 especies (sección inferior derecha). Las TIMs que comparten mayor similitud son las de los tripanosomátidos (mayores a 68%), mientras que las TIMs de *P. falciparum* y *S. cerevisiae* son las secuencias menos similares (40%). La TIM de *E. coli* cuenta con una región del aa 175 al 213 (con una estructural tipo hélice α , giro y hoja β) con una similitud del 20% con respecto a la secuencia del p β A. Ya que esta región es capaz de formar fibras amiloides (Contreras et al., 1999), realizamos los alineamientos entre las regiones ATIM de cada especie para determinar si existe una correlación entre similitud y estado de agregación. Para definir la región ATIM de cada proteína, se realizó un alineamiento múltiple (datos no mostrados) con la región ATIM de *E. coli* y las secuencias completas de las 9 TIMs. Entre los alineamientos de las regiones ATIM, las de mayor similitud también son las de los tripanosomátidos (mayores a 75%), además, *E. histolytica*, *H. sapiens* y *L. mexicana* comparten una considerable similitud (65%), por otro lado, las de menor similitud son las regiones ATIM de *S. cerevisiae* y *T. solium* (40%) y las de *S. cerevisiae* y *E. histolytica* (43%) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de similitud entre las secuencias de las TIMs de *E. histolytica* (EhTIM), *G. lamblia* (GITIM), *H. sapiens* (HsTIM), *L. mexicana* (LmTIM), *P. falciparum* (PfTIM), *S. cerevisiae* (ScTIM), *T. solium* (TsTIM), *T. brucei* (TbTIM) y *T. cruzi* (TcTIM).

TIMs	TbTIM	LmTIM	HsTIM	TsTIM	GITIM	ScTIM	EhTIM	PfTIM		
TcTIM	73%	68%	50%	48%	45%	45%	44%	41%		
PfTIM	41%	44%	42%	41%	43%	40%	43%		75%	LmTIM
EhTIM	42%	51%	48%	47%	43%	42%		60%	58%	HsTIM
ScTIM	49%	45%	52%	50%	47%		58%	58%	55%	TsTIM
GITIM	45%	46%	44%	48%		50%	55%	58%	50%	GITIM
TsTIM	46%	45%	59%		48%	40%	45%	50%	58%	ScTIM
HsTIM	51%	49%		43%	53%	55%	65%	65%	58%	EhTIM
LmTIM	69%		55%	53%	48%	55%	53%	60%	55%	PfTIM
		58%	53%	53%	55%	63%	63%	75%	78%	TcTIM
		PfTIM	EhTIM	ScTIM	GITIM	TsTIM	HsTIM	LmTIM	TbTIM	ATIMs

40-44% 45-49% 50-54%

55-59% 60-64% 65-78%

Alineamientos entre las secuencias de las regiones ATIMs con el p β A

Por otro lado se realizaron alineamientos entre el p β A y cada una de las regiones análogas de las TIMs purificadas (figura 32) con el fin de determinar su porcentaje de similitud. Por ejemplo, la región ATIM de ScTIM se encuentra entre los aminoácidos 171 al 210, mientras que para EhTIM se ubica del aminoácido 181 al 220. Las similitudes oscilan entre el 15 y el 25%, siendo las más bajas las de *Saccharomyces cerevisiae* y *T. brucei* y la más alta la de *Giardia lamblia*.






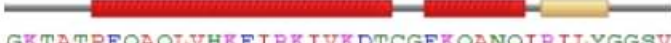
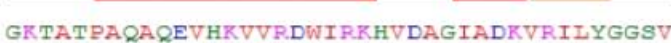
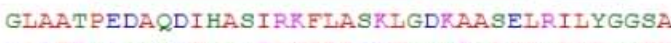
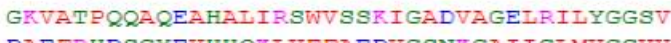
Espece	Alineamiento	Región	Similitud
GlTIM	 <p>GlTIM GVVATPEQAEEVHVGLRRKWFVFAEKVCAEQAQHIRIYGGSA pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * . : . * : : * * .</p>	177-216	25%
LmTIM	 <p>LmTIM GKVATPEQAQEVHLLLRKRVSENIPTDVAALRILYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	174-213	23%
EhTIM	 <p>EhTIM GKTATPDQAQEVHQYIRKWMTENISKEVAEATRIQYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	181-220	20%
TcTIM	 <p>TcTIM GKVATPQQAQEVHELLRRVRSKLGADIAAQLRILYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	175-214	20%
HsTIM	 <p>HsTIM GKTATPQQAQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	173-212	18%
PfTIM	 <p>PfTIM GKTATPEQAQLVHKEIRKIVKDTGCEKQANQIRILYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	172-211	18%
TsTIM	 <p>TsTIM GKTATPAQAQEVHKVVRDWRKRVVDAGIADKVRILYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	174-213	18%
ScTIM	 <p>ScTIM GLAATPEDAQDIHASIRKFLASKLGDKAASELRILYGGSA pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	171-210	15%
TbTIM	 <p>TbTIM GKVATPQQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSV pBA DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV * * * . : * * * : : * * : : * * *</p>	174-213	15%

Figura 32. Alineamientos del pBA con cada una de las regiones ATIMs de las 9 especies de TIM estudiadas en el presente trabajo. La estructura secundaria es representada con rojo para las hélices y beige para las hebras.

ANÁLISIS POR BN-PAGE

Controles de peso molecular

Para hacer una estimación confiable del peso molecular de los agregados oligoméricos formados por las TIMs purificadas, se determinó el perfil de la ferritina y la albúmina, dos proteínas comúnmente empleadas como estándares de referencia para BN-PAGE. La ferritina (440 kDa) y la albúmina bovina (66 kDa) presentaron un perfil electroforético con un rango útil de 66 a 1 320kDa en una mezcla de ambas proteínas (figura 33). En algunos gels, también se analizaron los complejos mitocondriales de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) como referencia.

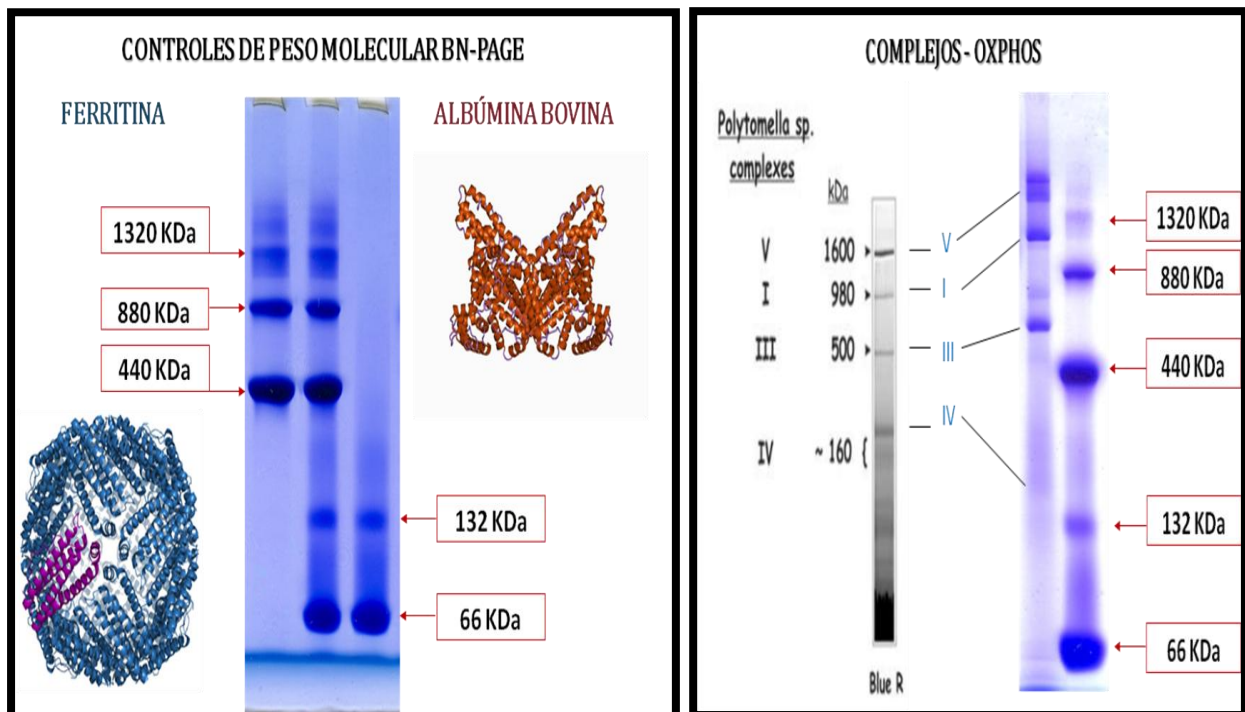


Figura 33. (Izquierda) Perfil de ferritina y albumina bovina. (Derecha) Perfil reportado de los complejos mitocondriales de *Polytomella sp* (Ariane Atteia et al., 2003) y el mismo perfil obtenido en un gel donde también se analizó la mezcla de ferritina y albúmina bovina.

Los geles teñidos se analizaron con el software DigiDocRT para determinar la migración relativa de las bandas observadas en los controles de peso molecular (Tabla 3). Al realizar una regresión lineal entre el logaritmo del peso molecular (PM) y la movilidad relativa (RF) de las bandas observadas en el gel tuvo una buena correlación: $R^2 = 0.9977$ (Tabla 3 y figura 34).

Tabla 3. Valores de peso molecular de los controles y su movilidad relativa

PM (KDa)	Log(PM)	MOVILIDAD (mm)	MOVILIDAD RELATIVA
1320	3.12	84	0.29
880	2.94	113	0.40
440	2.64	153	0.53
132	2.12	217	0.76
66	1.82	266	0.93
Frente del azul de coomassie:		286	

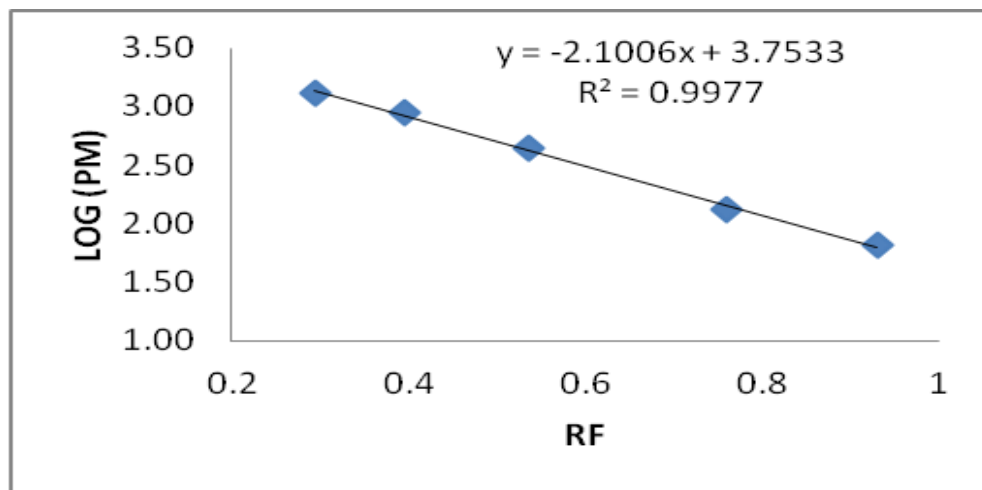


Figura 34. Curva de calibración de ferritina y albumina bovina

A partir de la curva generada con los controles: ferritina y albumina corridos en cada gel, se realizó la estimación del peso molecular de los distintos agregados de TIM.

Perfiles de agregación y efecto de los detergentes en EhTIM, HsTIM, HsTIM E104D, GlTIM, PftTIM y ScTIM

Los agregados de las TIMs se analizaron en presencia y en ausencia de los detergentes no iónicos: dodecil maltósido, digitonina y Tritón X 100. En la figura 35 se presentan los perfiles de agregación de 6 TIMs.

Al realizar el análisis con 100µg de EhTIM se observó la formación de un grupo característico de agregados de hasta 8 dímeros de TIM (434 kDa) y al menos dos grupos más de agregados de 6 y 3 dímeros.

Para HsTIM, el perfil electroforético presenta cuatro grupos oligoméricos de 5 a 15 dímeros de TIM, donde el agregado de 917 kDa (aproximadamente) es el más abundante (mayor intensidad de banda). El gel de la HsTIM E104D presenta un perfil de agregación muy similar al de la enzima silvestre; al estimar el peso de la banda principal se determina la presencia de un agregado con 15 dímeros. Además, al igual que la TIM silvestre, hay tres grupos de menor peso molecular, produciéndose el menor por la asociación de 5 dímeros.

La GlTIM presenta un patrón barrido con una abundante cantidad de proteína, por lo que se concluye que forma muchas combinaciones de agregados.

En el caso de ScTIM los agregados van de los 5 a 12 monómeros y el grupo principal está conformado por 4 dímeros, los cuales corresponden a un peso molecular de 220 kDa aproximadamente.

La PftTIM tiene un perfil muy similar al de *S. cerevisiae*, y su grupo principal tiene un peso molecular de 210 kDa que corresponden a un grupo de agregados de 4 dímeros. Como se observa en la figura 35, el perfil de agregación de las 6 TIMs no cambia en presencia de dodecil maltósido, digitonina o Tritón X-100 a concentraciones de 0.5 y 1%.

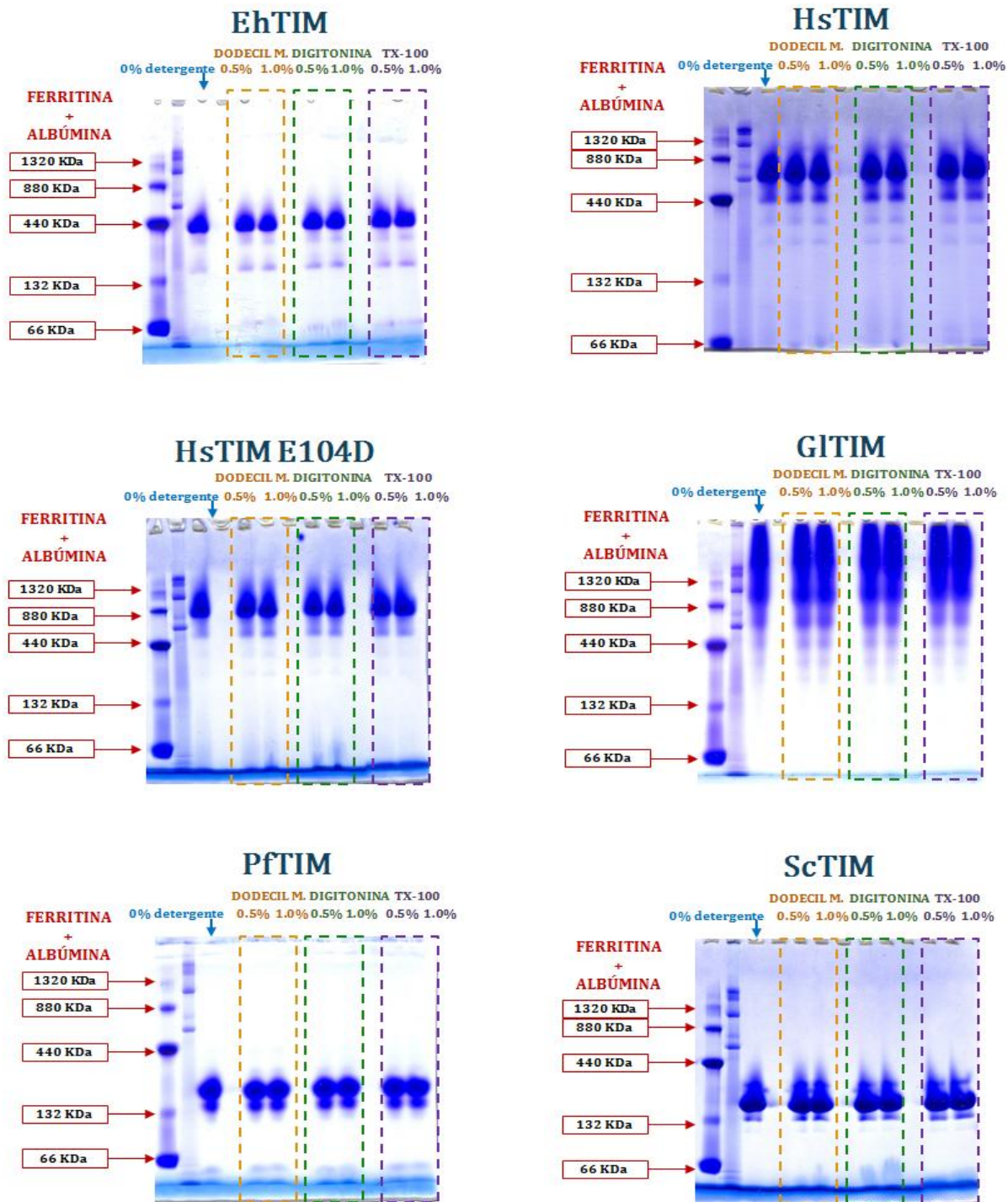


Figura 35. BN-PAGE de los perfiles de agregación de las 6 TIMs (100 μ g de proteína), control de ferritina y albumina (75 μ g cada una) y perfiles de agregación en presencia de detergentes no iónicos. El gradiente de acrilamida en los geles fue de 4 al 12%.

Estas 6 TIMs también fueron analizadas en presencia de SDS al 0.5 y 1% (figura 36). Los agregados de HsTIM, HsTIM E104D y GITIM son sensibles al efecto del SDS, y, por otro lado, los agregados de EhTIM, PftIM y ScTIM, presentan cierta resistencia a la acción de este detergente.

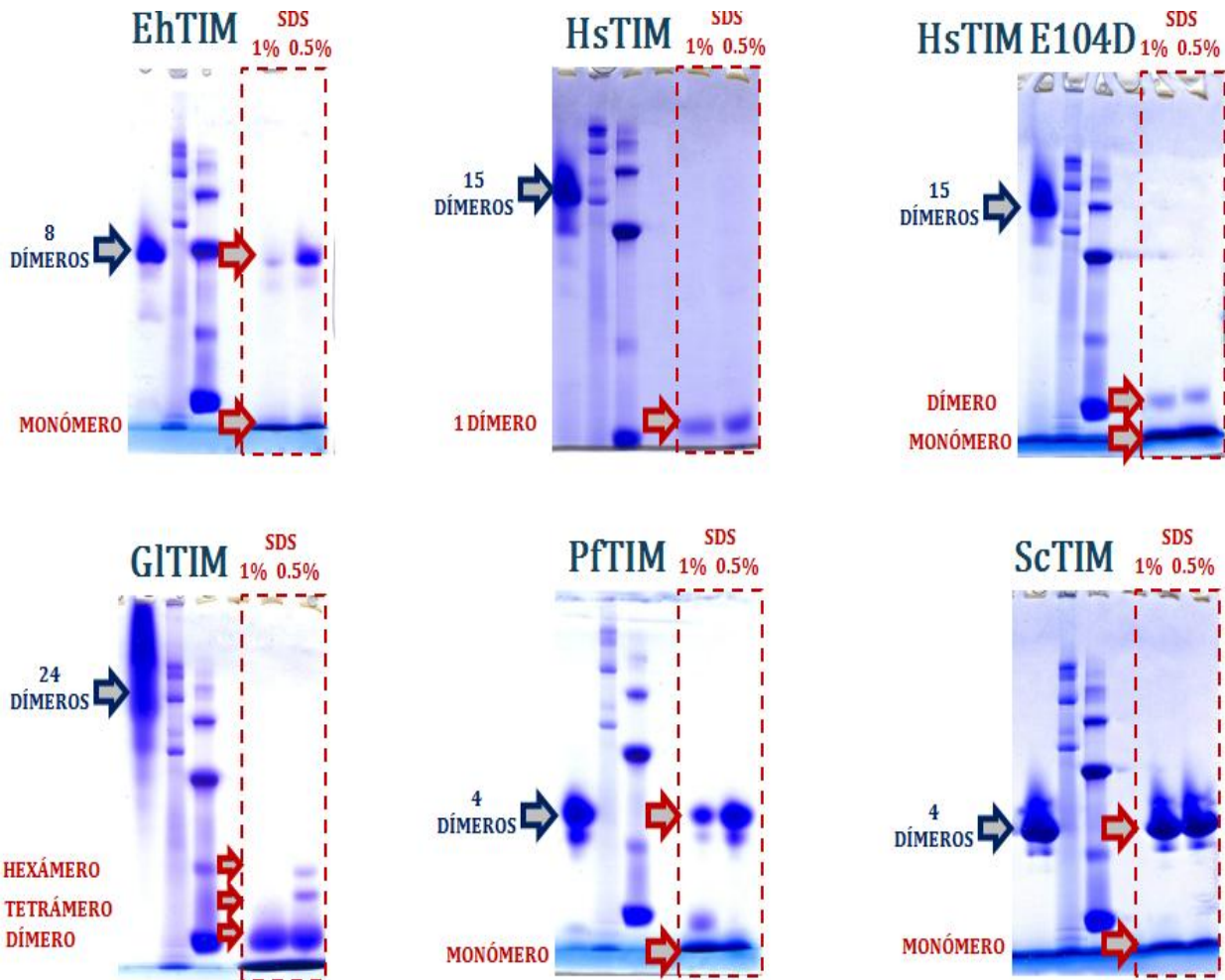


Figura 36. BN-PAGE de los perfiles de agregación de las 6 TIMs (100 μ g de proteína) y perfiles de agregación en presencia de SDS. El gradiente de acrilamida en los geles fue de 4 al 12%.

Perfiles de agregación de LmTIM, TbTIM, TcTIM y TsTIM

Las proteínas TbTIM y TcTIM no presentan un perfil de agregación con bandas definidas y, al realizar la separación electroforética, forman agregados insolubles que no entran al gel cuando se analizan 75 μ g de proteína total, posteriormente se repitió el análisis con 10 μ g

de proteína para conseguir disminuir la cantidad de agregados que no entra al gel. Los perfiles que se logran observar en los geles muestran un barrido con una amplia cantidad de agregados de alto peso molecular. En el caso de LmTIM y TsTIM, estas proteínas sí logran entrar al gel y se estima un peso molecular promedio de 150 y 220 kDa de sus agregados respectivamente (figura 37).

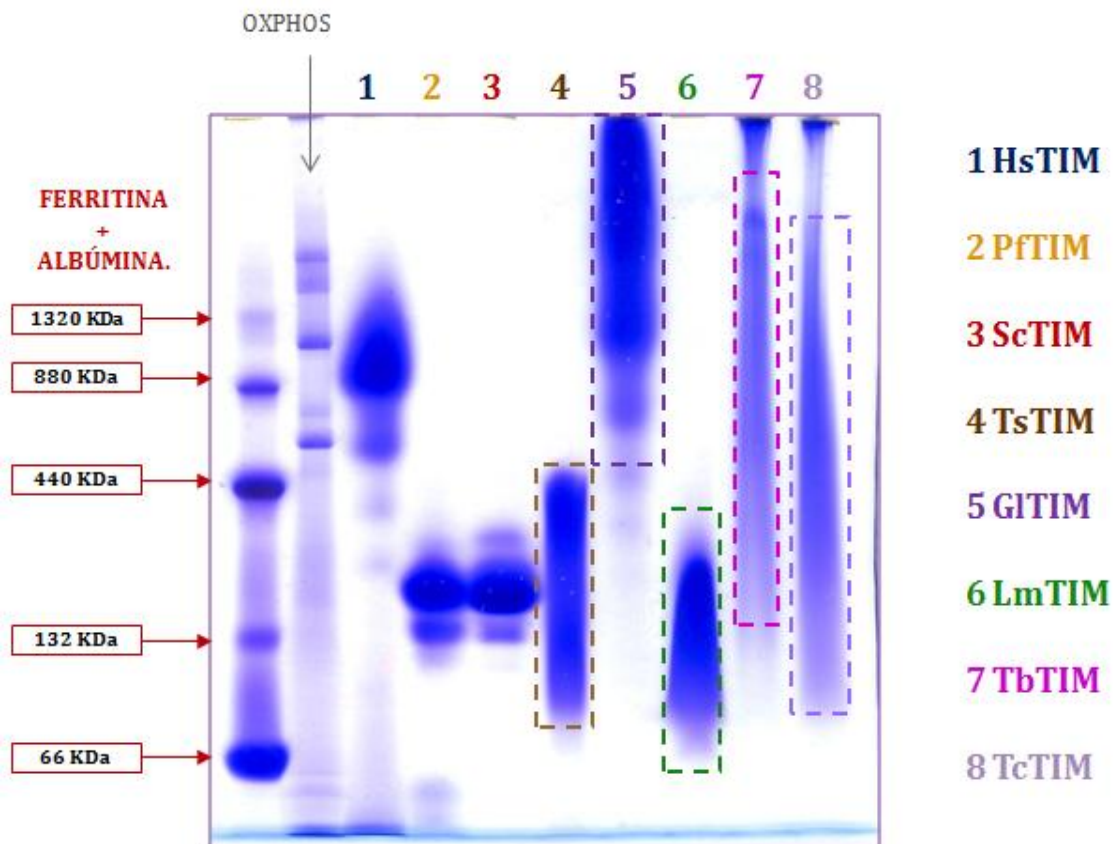


Figura 37. BN-PAGE de los perfiles de agregación de 3 TIMs con agregados de tamaño definido y 5 TIMs que forman agregados de tamaño heterogéneo (75µg de proteína). Gradiente de acrilamida en los geles de 4 al 12%

Análisis del efecto de dodecil sulfato de litio (LDS) en los perfiles de agregación de HsTIM, HsTIM E104D, GITIM, LmTIM, ScTIM y PfTIM

Para conocer un nivel de susceptibilidad al SDS de cada uno de los principales agregados de las distintas TIMs, proseguimos a identificar la concentración de detergente necesaria para disociar el 50% del agregado (Cm). Sin embargo, no lo pudimos utilizar en nuestras condiciones de análisis, debido a que, a bajas temperaturas el SDS se precipita. Por lo tanto,

se realizaron los experimentos empleando LDS el cual también es un surfactante aniónico capaz de disociar agregados oligoméricos y que no se precipita a bajas temperaturas. En cada uno de los geles se puso la TIM a analizar (reduciéndose a 10µg de proteína por carril) y se fueron adicionando cantidades crecientes de LDS (figuras 38 y 39).

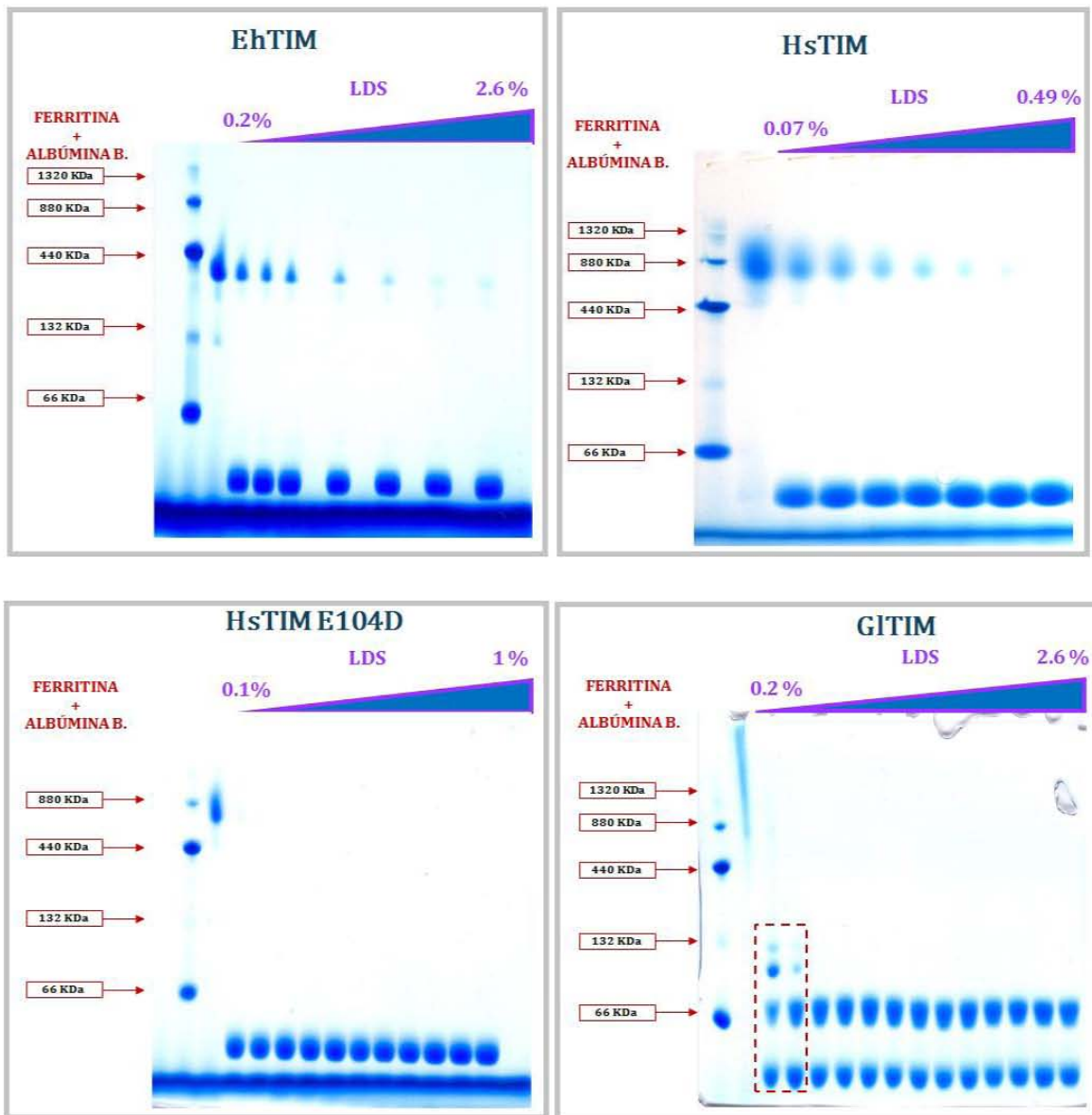


Figura 38. BN-PAGE de los perfiles de agregación de 4 TIMs (10µg de proteína) y perfiles de agregación en presencia de distintas concentraciones de LDS. Incrementos del %LDS: para EhTIM de 0.2%, para HsTIM de 0.07%, para HsTIME104D de 0.1% y para GITIM de 0.2%. En el gel donde se analizó EhTIM, en los carriles 6, 8, 10, 12 y 14 no se adicionó muestra. El gradiente de acrilamida en los geles fue de 4 al 15%

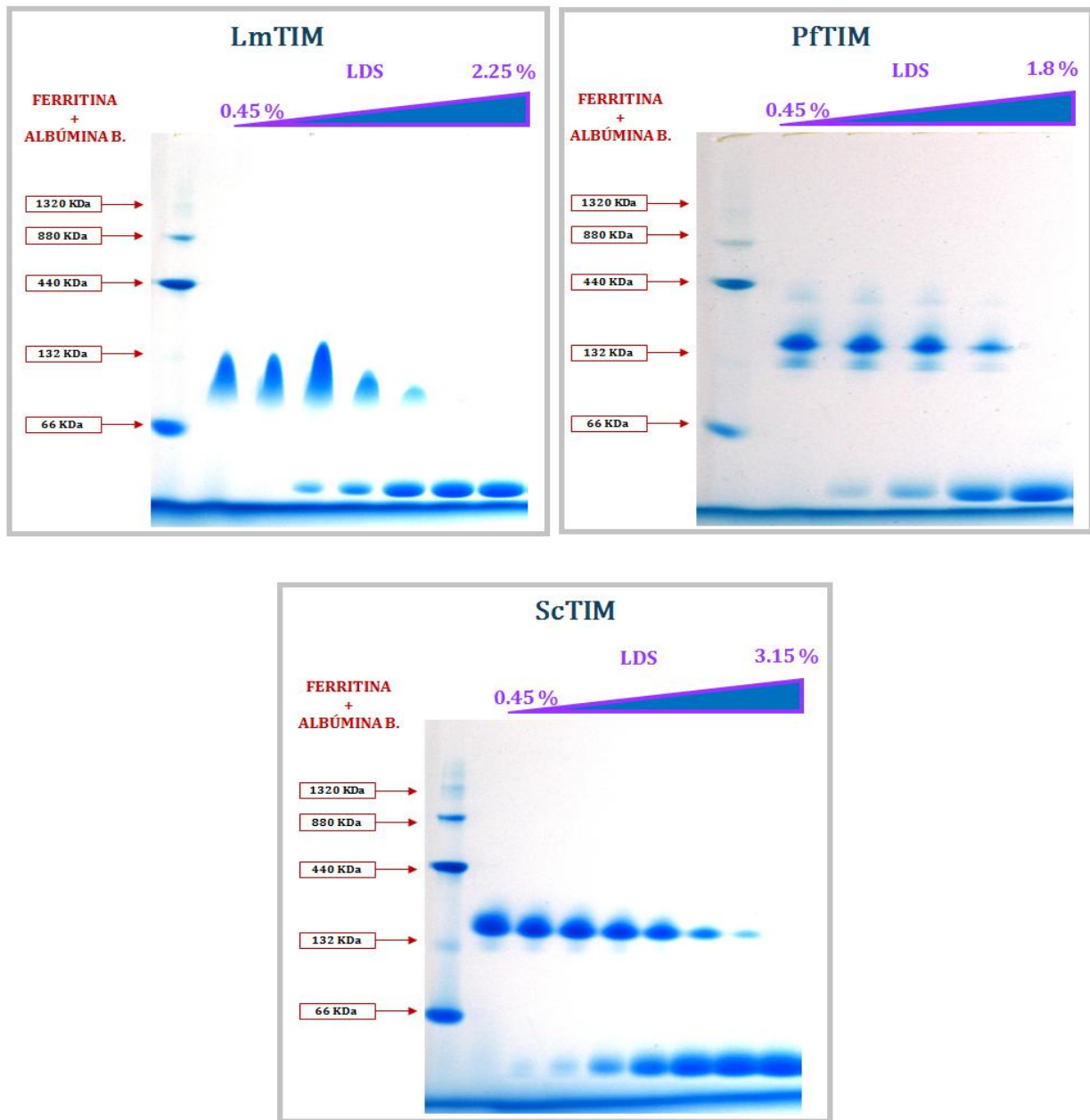


Figura 39. BN-PAGE de los perfiles de agregación de 3 TIMs (10 μ g de proteína) y perfiles de agregación en presencia de distintas concentraciones de LDS. Incrementos de %LDS: en todos los gels se adicionó en incrementos de 0.45%. El carril 4 del gel donde se analizó LmTIM fue descartado debido a un error de pipeteo. El gradiente de acrilamida en los gels fue de 4 al 15%

El efecto del LDS en las TIMs de *T. brucei* y *T. cruzi* también fue analizado (figura 40), los agregados de estas TIMs se disocian completamente con apenas 0.2% de LDS presente en la muestra.

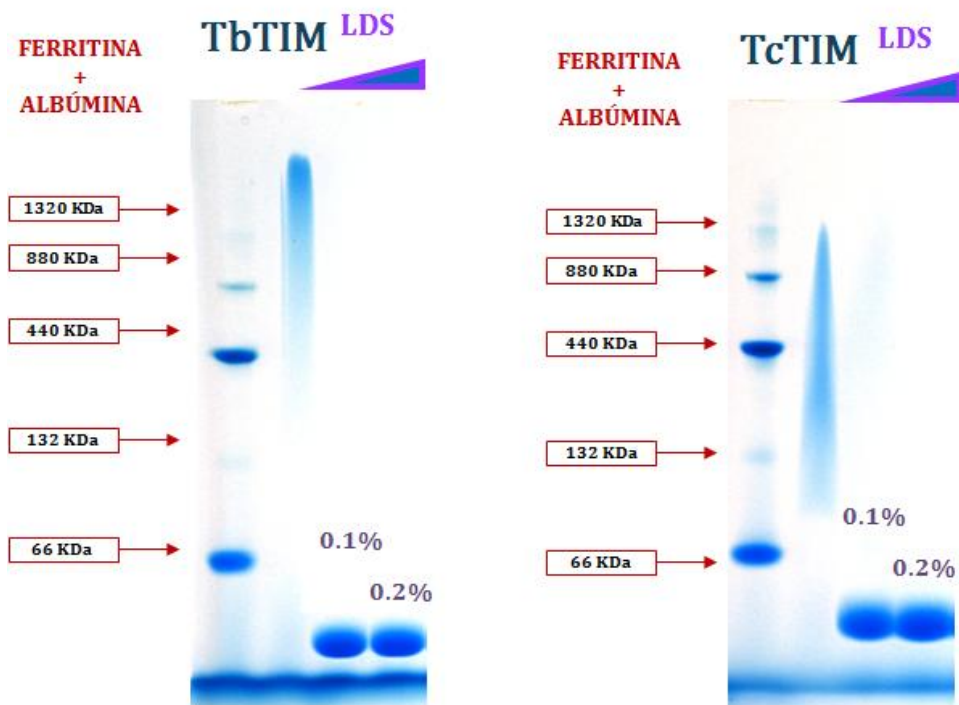


Figura 40. Gel de BN-PAGE de los perfiles de agregación de TbTIM y TcTIM (10 μ g de proteína) en presencia de LDS al 0.1 y 0.2%. El gradiente de acrilamida en los geles fue de 4 al 15%

ANÁLISIS POR DENSITOMETRÍA

Una vez realizado el análisis por BN-PAGE del perfil de agregación a distintas concentraciones de LDS en EhTIM, HsTIM, LmTIM, PftTIM y ScTIM, los geles se analizaron por densitometría para construir gráficos de disociación de los agregados (de oligómero a monómero) contra la cantidad de LDS presente en la muestra (figura 41). Cabe señalar que este análisis no se realizó para GlTIM por que el LDS no puede disociar el dímero, el agregado de HsTIM E104D (figura 38) se disocia con 0.1% de LDS, y que TbTIM, TcTIM y TsTIM no presentan una banda definida (figura 40).

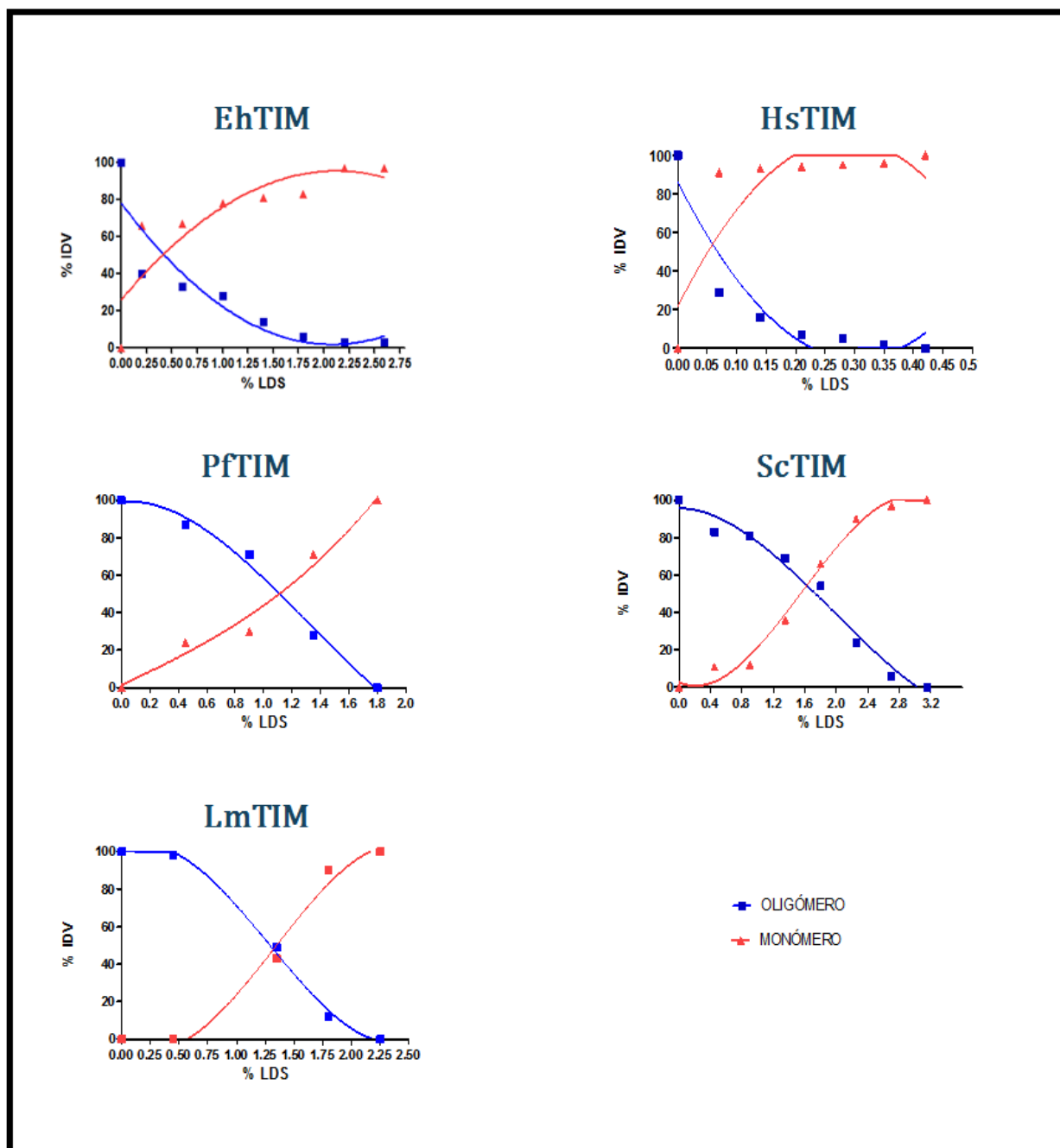


Figura 41. Curvas de disociación por acción del LDS (Se grafica el porcentaje del valor de densitometría integrada (%IDV) de cada banda en el gel contra la concentración de LDS

A partir de las curvas de la figura anterior se determinó la concentración de LDS para disociar la mitad del agregado principal y los valores se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de *C_m*, peso molecular y número de monómeros de cada agregado de TIM

TIM	<i>C_m</i>	Peso molecular (kDa)	Monómeros
HsTIM	0.05	868	32
EhTIM	0.4	400	15
PfTIM	1.1	210	8
LmTIM	1.3	138	5
ScTIM	1.6	220	8

ANÁLISIS DE HsTIM POR CN-PAGE

Como control y, para demostrar que los agregados no son un artefacto experimental de algún paso de las técnicas electroforéticas utilizadas, se analizó el perfil de agregación de la TIM de humano mediante la técnica de electroforesis en gel claro bajo condiciones nativas (figura 42). Los resultados muestran que el mismo perfil de agregación ocurre en ausencia de azul de Coomassie.

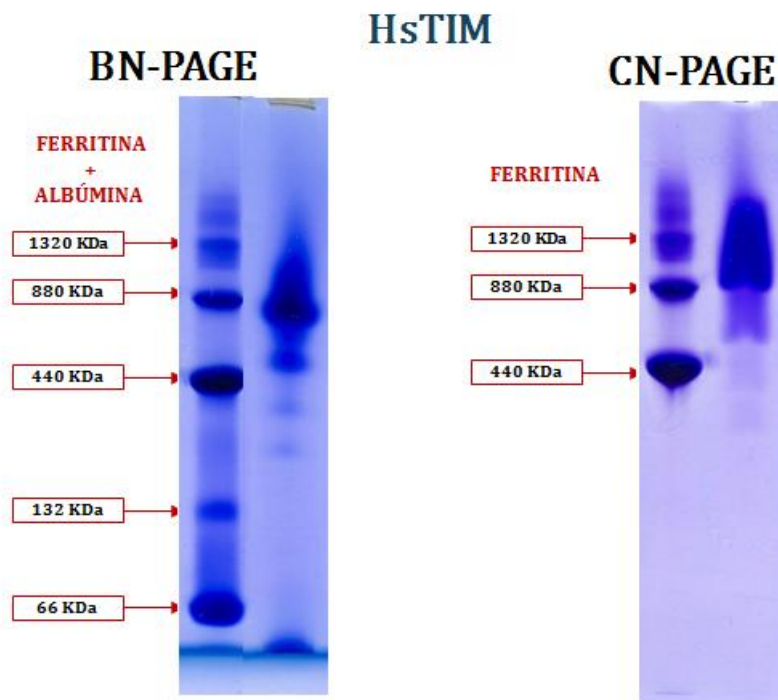


Figura 42. Comparación del perfil de agregación de HsTIM (75 µg de proteína) por BN-PAGE y CN-PAGE

DISCUSIÓN

Pureza e integridad de los dímeros de TIM

En este trabajo hemos identificado la capacidad para formar agregados proteicos *in vitro* a partir de diversas TIM puras, solubles y con un plegamiento funcional. La agregación es un proceso consecuente a la interacción proteína-proteína, que podría verse afectado por la presencia de otras proteínas en solución, por ello se estandarizaron los métodos de purificación para obtener las 10 TIMs con una pureza suficiente (figura 31) para analizarlas por BN-PAGE. Todas las TIMs presentaron actividad catalítica con valores que oscilan entre 568 y 4125 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$ (Tabla 1), esto indica que el tratamiento de la muestra durante la purificación no afectó a los dímeros de TIM, los cuales mantuvieron un plegamiento funcional.

Alineamientos de las regiones ATIM y el p β A

Estudios anteriores de la región ATIM de *E. coli* han demostrado que este péptido es capaz de formar agregados tipo amiloides debido a su similitud con el p β A. Para identificar la similitud entre las regiones ATIMs y el p β A, se realizaron alineamientos del p β A y las regiones ATIMs. Los porcentajes de similitud van de 15 a 25% (figura 32). A pesar de que la similitud entre el β A y las regiones ATIMs de 4 TIMs es de al menos 20% (GltTIM: 25%, LmTIM: 22%, EhTIM y TcTIM: 20%), éstas no presentan agregados con características similares, al igual que las de menor similitud. Por lo tanto aun no es posible establecer el papel de la región ATIM en los perfiles de agregación observados por BN-PAGE.

Herramienta de cálculo

No obstante que la proteína purificada tiene actividad, indicando una correcta dimerización, era posible que ésta se plegara en conformaciones de mayor tamaño que el dímero, por lo

que se realizaron corridas de BN-PAGE para separar y caracterizar las proteínas de acuerdo a su peso molecular en un plegamiento nativo. El perfil de ferritina y albumina de suero bovino, empleadas como estándares, nos permitió estimar el peso molecular de cualquier agregado en un intervalo de 66 a 1320 kDa (figura 33) en geles con gradiente de acrilamida del 4 al 12 y del 4 al 15%. También comprobamos que el uso de azul de Coomassie durante la separación en BN-PAGE no es un factor que promueva la agregación de HsTIM, ya que al analizar a esta proteína por CN-PAGE, está migra en el gel en forma de agregado (figura 42) tal y como se observa en los geles de BN-PAGE, por lo tanto la carga del azul de Coomassie no promueve su agregación.

Perfiles de agregación y su clasificación

El análisis por BN-PAGE mostró que, sin excepción, todas las TIMs generan agregados oligoméricos más grandes que el dímero. El estado de agregación de las TIMs analizadas se dividió en dos grupos dependiendo del tipo de perfil. Grupo 1: los que se conforman de agregados con un tamaño definido (HsTIM, HsTIM E104D, EhTIM, PftIM y ScTIM). Grupo 2: los que presentan una población de agregados de tamaño heterogéneo (GlTIM, LmTIM, TbTim, TcTIM y TsTIM).

Grupo 1

En los perfiles de agregación del grupo 1 se observaron agregados con el tamaño correspondiente a 13, 15, y 8 dímeros en HsTIM E104D, HsTIM y EhTIM respectivamente, además de un agregado de 4 dímeros en PftIM y ScTIM (figura 35). Sin embargo, estos agregados no estaban compuestos por el 100% de la proteína analizada (100 μ g), ya que se observaron otros agregados que corresponden a 9, 6 y 5 dímeros para HsTIM y su mutante, 6 dímeros para EhTIM, así como 6 y 3 dímeros para PftIM y ScTIM (figura 35). Al analizar 10 μ g de estas TIMs más LDS (figura 38 y 39), algunos de los grupos de agregados minoritarios se detectan en menor proporción (ScTIM y EhTIM) o incluso desaparecen dejando que los dímeros formen únicamente el agregado principal (HsTIM y su mutante), cabe señalar que sólo PftIM conservó sus poblaciones de agregados minoritarios. Esto

sugiere que la estabilidad de ciertos agregados está limitada por la cantidad de proteína presente, lo cual nos lleva a preguntarnos: ¿la formación y estabilidad de algunos agregados es influenciada por la concentración de proteína analizada?, si puede ser así ¿En que TIMs y porqué? Es una pregunta que aún no podemos responder.

El perfil de agregación para HsTIM E104D fue muy similar al de la proteína nativa, sin embargo, el agregado principal es ligeramente más grande, al parecer la mutación puntual en el residuo 104, además de afectar la interfase del dímero de TIM y hacerlo menos termoestable (Rodríguez-Almazan *et al.*, 2008), también aumentó ligeramente la capacidad de interacción entre los dímeros de HsTIM.

La gran similitud entre los perfiles de agregación de PfTIM y ScTIM fue un resultado inesperado, ya que las secuencias de estas TIMs presentan la menor similitud de 40% entre ellas (tabla 2). Esto resulta muy interesante pues el alineamiento de las secuencias de HsTIM y ScTIM muestra una similitud de 52% (tabla 2), sin embargo los agregados de estas enzimas son de tamaños muy diferentes. Lo anterior parece indicar que el estado de agregación de cada TIM está dirigido por una región o un número mínimo de aminoácidos presentes en sus secuencias.

Grupo 2

Con respecto al grupo de agregados heterogéneos, TcTIM y TbTIM presentan un perfil con poblaciones de agregados de tamaños similares: TbTIM genera agregados que van de 8 hasta 30 dímeros, mientras que TcTIM de 4 a 25 dímeros. La similitud en los perfiles seguramente es resultado del 72% de similitud entre sus secuencias (Maldonado *et al.*, 1998), además de que estas especies están estrechamente ligadas filogenéticamente. TbTIM y TcTIM presentaron agregados insolubles que no migraron en el gel de acrilamida cuando se analizaron 100µg de proteína, a diferencia del análisis con 10µg de enzima (figura 40), lo cual confirma que existe una influencia directa de la concentración de la proteína en el proceso de agregación para estas TIMs. Por otro lado, los perfiles de agregación de estas dos TIMs probablemente están influenciados por el valor de sus puntos isoeléctricos: 9.08 y

8.64 para TbTIM y TcTIM respectivamente (tabla 1). Ambos valores son superiores al pH de 7.0 de la solución de separación electroforética y al pH del gel, por lo tanto, es probable que bajo estas condiciones la carga eléctrica (parcialmente positiva) de las proteínas modifique la migración de los agregados.

L. mexicana comparte un ancestro común con *T. brucei* y *T. cruzi*, además su TIM tiene una similitud de 68% con TcTIM y 69% con TbTIM y también presenta un punto isoeléctrico alto (8.28) (tabla 1), por lo tanto fue razonable que LmTIM haya presentado un perfil similar a TbTIM y TcTIM. A diferencia de TbTIM y TcTIM, LmTIM no formó agregados insolubles al analizar una mayor cantidad de proteína y el intervalo de tamaño es más definido con agregados de menor tamaño (1 a 4 dímeros).

La TIM de *T. solium* presentó agregados conformados por 2 a 8 dímeros. *T. solium* es un organismo distanciado filogenéticamente de los tripanosomátidos, sin embargo su estado de agregación es muy similar al de *L. mexicana* con quien comparte un 45% de similitud en su secuencia. El punto isoeléctrico de TsTIM es de 6.6 y con la presencia de la etiqueta de hexahistidinas sube a 7.0 aproximadamente.

En el análisis de GlTIM se observó en el gel teñido con azul de Coomassie que la cantidad de colorante fijado era mayor que en otros geles donde se analizaron otras TIMs con la misma cantidad de proteína (figura 35). Por lo tanto, la muestra se cuantificó nuevamente y se analizó en otros geles, obteniéndose el mismo resultado. Una explicación probable para este resultado es la agregación de Langmuir: el azul de Coomassie G-250 se agrega por efecto de campos micro-electrostáticos presentes en algunas proteínas (Gao *et al.*, Journal of Analytical Chemistry, 2002), independientemente de este fenómeno, fue posible identificar el perfil de agregación. GlTIM presentó agregados que van de 6 a 30 ó hasta 40 dímeros (figura 34). Al analizar 10 μ g de GlTIM los agregados se conformaron con al menos 12 dímeros.

Efecto del punto isoeléctrico

Al analizar los perfiles de las TIMs que forman cada grupo, se puede observar que incluso hay ciertos grados de agregación, por ejemplo, en el grupo 1 se determinaron agregados de 9, 6 y 5 dímeros de HsTIM y otros de 4 y 3 dímeros de PftTIM, mientras que en el grupo 2 hubo agregados con tamaños de 8 a 30 dímeros de TbTIM y de grupos de 2 a 8 dímeros de TsTIM. Al comparar los perfiles y los puntos isoeléctricos de todas las TIMs, observamos que la tendencia a presentar una menor población de agregados está relacionada con el valor del punto isoeléctrico de la TIM analizada (figura 43). Probablemente todas las TIMs son capaces de formar un agregado de forma preferencial, sin embargo el punto isoeléctrico de las proteína podría afectar la migración electroforética de este agregado mayoritario, provocando la formación de una serie de agregados de distinto tamaño.

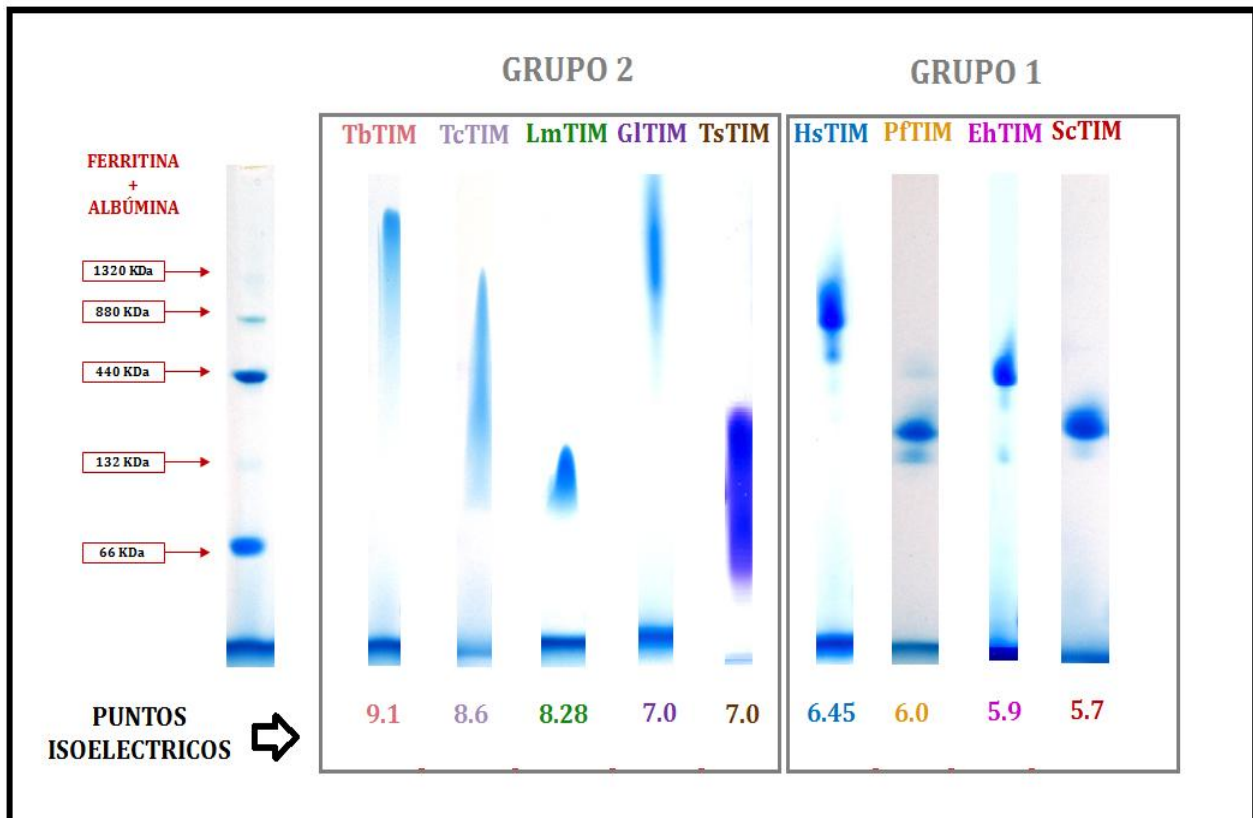


Figura 43. Comparación de los perfiles de migración y el punto isoeléctrico (tabla 1) de cada TIM. Para TsTIM se analizó 100 μ g de proteína y en todos los demás 10 μ g. La TsTIM fusionada a la etiqueta de hexahistidinas presenta un punto isoeléctrico teórico de 7.0

Análisis del estado de agregación en presencia de detergentes

Los agregados de 6 TIMs (EhTIM, GlTIM, HsTIM, HsTIM E104D, PftTIM y ScTIM) se analizaron en presencia de los detergentes no iónicos: Tritón X-100, digitonina y dodecil maltósido. Estos detergentes se emplean usualmente para solubilizar proteínas de membrana debido a la gran cantidad de residuos hidrofóbicos que presentan en su superficie. Los agregados de TIM no se disociaron por ningún detergente no iónico. Lo anterior apoya la idea de que los agregados están conformados por dímeros de TIM, ya que, si fueran monómeros, probablemente, estarían agregados por efecto hidrofóbico y los detergentes como la digitonina podrían estabilizar al monómero en solución y disociar el agregado. Otro detergente empleado para analizar las mismas 6 TIMs fue SDS. Con este surfactante aniónico se observó que los agregados de EhTIM, PftTIM y ScTIM presentan más resistencia al efecto desnaturizante del SDS, mientras que HsTIM y GlTIM se disocian a monómero y dímero respectivamente con sólo 0.5% de SDS. Además, debido a que la separación por BN-PAGE debe realizarse a una temperatura de 6°C y el SDS precipita a temperaturas menores a 8°C se analizó la susceptibilidad de los agregados en presencia de dodecil sulfato de litio (LDS), otro detergente aniónico que no precipita a bajas temperaturas (figura 38 y 39). Las curvas de disociación de los agregados y aparición del monómero fueron determinadas para 7 TIMs (EhTIM, GlTIM, HsTIM, HsTIM E104D, LmTIM, PftTIM y ScTIM), a partir de los gráficos se calculó el valor de C_m de cada agregado de TIM. Los valores de C_m demuestran que los agregados que se componían de al menos 8 dímeros. Como EhTIM y HsTIM tienen valores de C_m menores a 0.6%, esto también se extiende a GlTIM y HsTIM E104D, las cuales se disocian a 0.5% de LDS, y a TbTIM y TcTIM, ya que se disocian completamente con LDS al 0.2% (figura 37 y 39). Por otro lado las TIMs cuyos agregados se componen por 4 dímeros o menos (LmTIM, PftTIM y ScTIM) presentan valores de C_m mayores a 1% (LmTIM: 1.6%; PftTIM: 1.1% y ScTIM: 1.6%), lo cual parece indicar que entre más pesado es el agregado, es menos resistente a la desnaturización por surfactantes aniónicos. Los agregados observados en el gel podrían ser dinámicos y/o poco estructurados, por lo que conservar una estequiometría mas grande debe ser más complicado para las biomoléculas.

HsTIM y su mutante presentaron el mismo perfil de agregación. Los resultados demuestran que la TIM mutante fue más susceptible a la disociación con LDS, ya que sólo se requiere 0.2% del detergente para disociar todos los agregados, mientras que para la TIM nativa se requiere 0.5% del detergente. Resultó muy interesante que una mutación puntual que modifica la estabilidad de la interfase de TIM (Rodríguez-Almazan *et al.*, 2007) haya sido capaz de aumentar la susceptibilidad a la disociación de los agregados de HsTIM. Probablemente la estabilidad de algunos agregados en presencia de LDS depende de los residuos que estabilizan la interfase del dímero. Por lo tanto, una pregunta interesante es: ¿Existen mutaciones puntuales en la interfase que puedan modificar la disociación de los agregados en presencia de LDS? De ser así, podríamos entender mejor los agregados de TIM.

Capacidad de agregación

Por lo general la agregación de una proteína globular ocurre cuando las condiciones de un sistema favorecen las interacciones intermoleculares hidrofóbicas, en nuestra investigación siempre mantuvimos las condiciones adecuadas para el análisis por BN-PAGE de proteínas nativas y activas, una variable considerable fue la adición de azul de coomassie, este colorante se asocia a las proteínas para brindar una carga negativa y así permitir su migración dentro del gel de acrilamida, además de esta característica, no se reportado que este colorante genere interacciones proteína-proteína, por lo tanto es probable que los agregados de las TIMs observados en nuestro trabajo sean por la capacidad de oligomerización de las TIMs favorecida por la considerable concentración de las proteínas en el análisis *in vitro*.

CONCLUSIONES

- ✓ Las 10 TIMs analizadas son capaces de formar diferentes agregados de alto peso molecular *in vitro* bajo condiciones nativas.
- ✓ El azul de Coomassie no es un factor que promueva la agregación de las TIMs.
- ✓ Los agregados no están formados por interacción hidrofóbica, ya que los detergentes no iónicos (n-dodecil β -maltosido, digitonina y Tritón X-100) no son capaces de disolver los observados en EhTIM, GITIM, HsTIM, HsTIM E104D, PFTIM y ScTIM.
- ✓ Los perfiles de agregación de las TIMs con puntos isoeléctricos iguales o mayores al pH del análisis (pH 7.0) parecen ser influenciados por la carga parcial positiva de la proteína, generando grupos de agregados de tamaño heterogéneo.
- ✓ Los agregados de las TIMs de *S. cerevisiae* y *P. falciparum* presentan agregados del mismo tamaño a pesar de presentar la menor similitud en sus secuencias (40%).
- ✓ La susceptibilidad a la disociación con LDS aumenta en los agregados de mayor tamaño. Las TIMs de *G. lamblia*, *H. sapiens*, *H. sapiens mutante*, *T. brucei*, *T. cruzi* y *E. histolytica*, presentan agregados conformados por, al menos, 8 dímeros. Estos agregados tienen valores de Cm menores a 0.1% de LDS (excepto EhTIM 0.4%), a diferencia de los agregados de las TIMs de *S. cerevisiae*, *P. falciparum* y *L. mexicana*, (conformados por 4 y 2 dímeros) que presentan valores de Cm mayores 1% de LDS.
- ✓ La TIM de humano y su mutante E104D presentan un perfil de agregación ligeramente distinto. Los agregados de la mutante son más grandes y más susceptibles a la disociación por LDS. Al parecer la interfase del dímero juega un papel importante en la estabilidad de estos agregados.

PERSPECTIVAS

- Determinar si las TIMs de distintas especies pueden formar agregados como los observados en este trabajo, mediante microscopia, dispersión dinámica de luz, tinción con rojo congo y tioflavina T.
- Determinar la actividad catalítica *in situ* de los agregados observados en los geles de acrilamida.
- Estudiar las características de los agregados de las TIMs mencionadas mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC), tinción con tioflavina T y Dispersión Dinámica de Luz (DLS).
- Estudiar los posibles residuos o regiones promotoras de la agregación en TIM mediante técnicas bioinformáticas.
- Estudiar los estados de agregación de las TIMs mutantes causantes de la deficiencia de TIM.

BIBLIOGRAFÍA

- Ando T., Skolnick J. (2010) Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate *in vivo* macromolecular motion. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107; (43):18457-18462.
- Ansell R., Granath K., Hohmann S., Thevelein J. M., Adler L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The European Molecular Biology Organization Journal* 16; (9):2179-2187.
- Atteia A., van Lis R., Wetterskog D., Gutiérrez-Cirlos E., Ongay-Larios L., Franzén L., González-Halphen D. (2003) Structure, organization and expression of the genes encoding mitochondrial cytochrome c(1) and the Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular genetics and genomics* 268; (5):637-644
- Borchert T., Pratt K, Zeelen J., Callens M., Noble M., Opperdoes F., Michels P., Wierenga R. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *European Journal of Biochemistry* 211; (3):703-810.
- Coma M., Guix F., Uribealago I., Espuña G., Solé M., Andreu D., Muñoz F. (2005) Lack of oestrogen protection in amyloid-mediated endothelial damage due to protein nitrotyrosination. *Brain* 128; (7):1613-1621.
- Contreras C. F., Canales M. A., Alvarez A., De Ferrari G. V., Inestrosa N. C. (1999) Molecular modeling of the amyloid-beta-peptide using the homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid *in vitro*. *Protein Engineering* 12; (11):959-966.
- Cuajungco M., Fagét K., Huang X., Tanzi R, Bush A. (2000) Metal chelation as a potential therapy for Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920; 292-304.
- Dobson C. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426; (6968):884-890.

- Drummond D., Wilke C. (2008) Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution. *Cell* 134; (2):341-352.
- Eber S., Pekrun A., Bardosi A., Gahr M., Krietsch W., Krüger J., Matthei R., Schröter W. (1991) Triosephosphate isomerase deficiency: haemolytic anaemia, myopathy with altered mitochondria and mental retardation due to a new variant with accelerated enzyme catabolism and diminished specific activity. *European Journal of Pediatrics* 150; (11):761-766
- Ellis R., Minton A. (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biological Chemistry* 387; (5):485-497.
- García-Torres I., Cabrera N., Torres-Larios A., Rodríguez-Bolaños M., Díaz-Mazariegos S., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. (2011) Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *Plos One* 6; (4):e18791.
- Gao H., Jun J., Yu Lin. (2002) Langmuir aggregation of coomassie brill blue on protein and determination of protein by MPASC. *Journal of Analytical Chemistry* 57; (8):694-700.
- Gidalevitz T., Ben-Zvi A., Ho K., Brignull H., Morimoto R. (2006) Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* 311; (5766):1471-1474.
- Goldberg A. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426; (6968): 895-899.
- Götz J., Chen F., Van Dorpe J., Nitsch R. (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by A beta 42 fibrils. *Science* 293; (5534):1491-1495.
- Guix F., III-Raga G, Bravo R., Nakaya T., De Fabritiis G., Coma M., Miscione G., Villà-Freixa J., Suzuki T., Fernández-Busquets X., Valverde M., De Strooper B., Muñoz F. (2009) Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain* 132; (5):1333-1345.
- Guix F., Uribealago I., Coma M., Muñoz F. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* 76; (2):126-152.

- Grant C. (2008) Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of Biology* 7; (1):1.
- Hayden M., Tyagi S., Kerklo M., Nicolls M. (2005) Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *Journal of the pancreas* 6; (4):287-302.
- Hernández-Alcántara G., Garza-Ramos G., Hernández G., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 41; (13):4230-4238.
- Hoyer S., Oesterreich K., Wagner O. (1988) Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type? *Journal of Neurology* 235; (3):143-148.
- Huang X., Atwood C., Hartshorn M., Multhaup G., Goldstein L., Scarpa R., Cuajungco M., Gray D., Lim J., Moir R., Tanzi R., Bush A. (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38; (24):7609-7616.
- Jameson J. (1998) *Principles of Molecular Medicine*. Humana Press 1^a Edición; 197-200.
- Jiménez L., Vibanco-Pérez N., Navarro L., Landa A. (2000) Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia Solium*. *International Journal for Parasitology* 30; (9):1007-1012.
- Keil U., Bonert A., Marques C., Scherping I., Weyermann J., Strosznajder J., Müller-Spahn F., Haass C., Czech C., Pradier L., Müller W., Eckert A. (2004) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279; (48):50310-50320.
- Kohl L., Callens M., Wierenga R., Opperdoes F., Michels P. (1994) Triose-phosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *European Journal of Biochemistry* 220; (2):331-338.

- Komives E., Chang L., Lolis E., Tilton R., Petsko G., Knowles J. (1991) Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95. *Biochemistry* 30; (12):3011-3019
- Kusaka T., Ueno M., Miki T., Kanenishi K., Nagai Y., Huang C., Okamoto Y., Ogawa T., Onodera M., Itoh S., Akiguchi I., Sakamoto H., (2007) Accumulation of triosephosphate isomerase, with sequence homology to Beta amyloid peptides, in vessel walls of the newborn piglet hippocampus. *Microscopy Research and Technique* 70; (7):648–655.
- Landa A., Rojo-Domínguez A., Jiménez L., Fernández-Velasco D. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *European Journal of Biochemistry*. 247; (1):348-355.
- Larsson C., Pålman I., Ansell R., Rigoulet M., Adler L., Gustafsson L. (1998) The importance of glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14; (4):347-357.
- Lolis E., Alber T., Davenport R., Rose D., Hartman F., Petsko G. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* 29; (28):6609-6618.
- Lomas D., Parfrey H. (2004) Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 59; (6):529-535.
- Maldonado E., Soriano-García M., Moreno A., Cabrera N., Garza-Ramos G., de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology* 283; (1):193-203.
- Mattson M., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I., Rydel R. (1992) Beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 12; (2):376-389.
- Minton A., Wilf J. (1981) Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 20; (17): 4821-4826.

- Minton A. (2001) The Influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *The Journal of Biological Chemistry* 276; (14):10577–10580.
- Muñoz F., Opazo C., Gil-Gómez G., Tapia G., Fernández V., Valverde M., Inestrosa N. (2002) Vitamin E but not 17beta-estradiol protects against vascular toxicity induced by beta-amyloid wild type and the Dutch amyloid variant. *The Journal of Neuroscience* 22; (8):3081-3089.
- Nelson D., Cox M. (2005) *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4^a edición. México: Ediciones Omega.
- Nyström T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The European Molecular Biology Organization* 24; (7):1311-1317.
- Oláh J., Orosz F., Puskás L., Hackler L. Jr., Horányi M., Polgár L., Hollán S., Ovádi J. (2005) Triosephosphate isomerase deficiency: consequences of an inherited mutation at mRNA, protein and metabolic levels. *Biochemistry Journal* 392; (3):675-683.
- Orosz F., Oláh J., Alvarez M., Keseru G., Szabó B., Wágner G., Kovári Z., Horányi M., Baróti K., Martial J., Hollán S., Ovádi J. (2001) Distinct behavior of mutant triosephosphate isomerase in hemolysate and in isolated form: molecular basis of enzyme deficiency. *Blood* 98; (10):3106-3112.
- Orosz F., Oláh J., Ovádi J. (2009) Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochimica et Biophysica acta* 1792; (12):1168-1174.
- Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfot R. (1997) Cloning, expression and characterization of triosephosphate isomerasa from *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry* 244; (3):700-705.
- Ovádi J., Orosz F., Hollán S. (2004) Functional aspects of cellular microcompartmentation in the development of neurodegeneration: mutation induced aberrant protein-protein associations. *Molecular and Cellular Biochemistry* 256–257; (1-2):83-93.

- Pompliano D., Peyman A., Knowles J. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: Definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29; (13):3186-3194.
- Perry B., Mohrenweiser H. (1992) Human triosephosphate isomerase: substitution of Arg for Gly at position 122 in a thermolabile electromorph variant, TPI-Manchester. *Human Genetics* 88; (6):634-638.
- Reynaud E. (2010) Protein misfolding and degenerative diseases. *Nature Education* 3; (9):28.
- Rivas G., Ferrone F., Herzfeld J. (2004) Life in a crowded world. *European Molecular Biology Organization Report* 5; (1):23-27.
- Rodríguez-Almazan C., Arreola R., Rodríguez-Larrea D., Aguirre-López B., de Gómez-Puyou M., Pérez-Montfort R., Costas M., Gómez-Puyou A., Torres-Larios A. (2008) Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *The Journal of Biological Chemistry* 283; (34):23254-23263.
- Schneider A. (2000) Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Haematology* 13; (1):119-140.
- Schuster R., Holzhütter H. (1995) Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. Applications to enzyme deficiencies of red cells. *European Journal of Biochemistry* 229; (2):403-418.
- Swamy M., Molnar E., Bock T., Bausch-Fluck D., Wollscheid B., Schamel W. (2009) Detection of protein complex interactions via a Blue Native-PAGE retardation assay. *Analytical Biochemistry* 392; (2):177-179.
- Sunde M., Blake C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* 50; 123-159.
- Talafous J., Marcinowski k., Klopman G., Zagorski M. (1994) Solution structure of residues 1-28 of the amyloid beta-peptide. *Biochemistry* 33; (25):7788-7796.

- Tarus B., Straub J., Thirumalai D. (2005) Probing the initial stage of aggregation of the A β ₁₀₋₃₅-protein: assessing the propensity for peptide dimerization. *Journal of Molecular Biology* 345; (5):1141-1156
- Thirumalai D., Klimov D., Dima R. (2003) Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Current Opinion in Structural Biology* 13; (2):146-159.
- Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11; (11):777-788.
- Van den Berg B., Wain R., Dobson C., Ellis R. (2000) Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *The European Molecular Biology Organization Journal* 19; (15):3870-3875.
- Vázquez-Contreras E. Zubillaga R., Mendoza-Hernández G., Costas M., Fernández A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein and Peptide Letters* 7; (1):57-64.
- Velanker S., Ray S., Gokhale R., Suma S., Balaram H., Balaram P., Murthy M. (1997) Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 5; (6):751-761.
- Von Jagow G., Schägger H. (1994) A practical guide to membrane protein purification. California USA: Elsevier Science; 81-100.
- Wierenga R., Noble M., Postma J., Groendijk H., Kalk K., Hol W., Opperdoes F. (1991) The crystal structure of the "open" and the "closed" conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 10; (1):33-49.
- Zimmerman S., Harrison B. (1987) Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: An adaptive effect. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 84; 1871-1875.
- Zhang Z., Surgio S., Komives E., Liu K., Knowles J., Petsko G., Ringe D. (1994) Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase-

phosphoglycolhydroxamate complex at 1.8-Å resolution. *Biochemistry* 33; (10):2830-2837.

- Zhou H., Rivas G., Minton A. (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annual Review of Biophysics*; (37):375-397.

ANEXO A

Soluciones empleadas en los métodos de purificación de HsTIM, HsTIM E104D, GITIM y TsTIM

S. lisis IMAC

Fosfato de sodio monobásico 50 mM pH 8.0, Cloruro de sodio 300 mM e Imidazol 10 mM

S. elución A-IMAC

Fosfato de sodio monobásico 50 mM pH 8.0, Cloruro de sodio 300 mM e Imidazol 50 mM

S. elución B-IMAC

Fosfato de sodio monobásico 50 mM pH 8.0, Cloruro de sodio 300 mM e Imidazol 500 mM

S. de digestión

TRIS 50 mM pH 8.0, EDTA 0.5 mM y DL Ditiotretitol 1 mM

ANEXO B

Soluciones empleadas en los métodos de purificación de EhTIM, PftTIM y SctTIM

➤ Soluciones para la purificación de EhTIM y SctTIM

- S. de lisis IEX

TRIS 20 mM pH 8.0, Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 0.2 mM

- S. de elución A-IEX

Trietanolamina 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM y DL Ditiotretitol 1 mL

- S. de elución B-IEX

Trietanolamina 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, DL Ditiotretitol 1 mL y Cloruro de sodio 100 mM

- S. de elución A-SEC

Es la misma que la solución de elución A-IEX: Trietanolamina 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM y DL Ditiotretitol 1 mL

➤ Soluciones para la purificación de PftTIM

- S. de lisis IEX

TRIS 100 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM

- S. de elución A-IEX

TRIS 20 mM pH 8.0

- S. de elución B-IEX

TRIS 20 mM pH 8.0 y Cloruro de sodio 500 mM

ANEXO C

Soluciones empleadas en los métodos de purificación de LmTIM

- S. de lisis DEAE

Trietanolamina 100 mM pH 8.0, DL Ditiotreitól 1 mM, Azida de sodio 1 mM y Fluoruro de metil-fenil-sulfonilo 1 mM

- S. de elución DEAE

Trietanolamina 25 mM pH 8.0, DL Ditiotreitól 1 mM y EDTA 1 mM

ANEXO D

Soluciones empleadas en los métodos de purificación de TbTIM y TcTIM

- Solución de Lisis **TbTIM**

MES 100 mM pH 6.3, DL Ditioneitol 1 mM, Fluoruro de metil-fenil-sulfonilo 0.2 mM, EDTA 0.5 mM y Cloruro de Sodio 300 mM

- Solución de Lisis **TcTIM**

MES 100 mM pH 6.3, DL Ditioneitol 1 mM, Fluoruro de metil-fenil-sulfonilo 0.2 mM y EDTA 0.5mM

- Solución de elución A-CIEX

MES 50 mM pH 6.3

- Solución de elución B-CIEX

MES 50 mM pH 6.3 y Cloruro de Sodio 500 mM

- Solución de elución A-HIC

Trietanolamina 100 mM pH 7.4 y EDTA 1 mM

- Solución de elución B-HIC

Trietanolamina 100 mM pH 7.4, EDTA 1 mM y Sulfato de amonio 2.2 M

ANEXO E

Soluciones utilizadas en el análisis por SDS-PAGE

- Solución de acrilamida 4%

0.4 mL de una solución de acrilamida (30%)-Bis(1%)

0.75 mL de una solución de TRIS 3 M pH 8.45 y SDS al 3% (HCl)

0.025 mL de una solución de persulfato de amonio al 10%

1.85 mL de agua desionizada

0.005 mL de TEMED

- Solución de acrilamida 12%

3 mL de una solución de acrilamida (30%)-Bis(1%)

3.5 mL de una solución de TRIS 3 M pH 8.45 y SDS al 3% (HCl)

1 mL de una solución de glicerol al 80% (v/v)

0.025 mL de una solución de persulfato de amonio al 10%

0.005 mL de TEMED

- Solución de bromofenol para muestra

TRIS-HCl 150 mM pH 7.0, SDS al 12%, Mercapto etanol al 6%, Glicerol al 30%, Serva blue G
0.05%

- Solución amortiguadora de pH para cátodo

TRIS 1 M pH 8.25, TRICINA 1 M y SDS 1%

- Solución amortiguadora de pH para ánodo

TRIS 1 M pH 8.9

- Solución de tinción

Serva blue G 250 a 0.025% y ácido acético al 10%

ANEXO F

Soluciones utilizadas en el análisis por BN-PAGE

- Solución para muestra con Coomassie Serva blue

Disolver azul de coomassie Serva G al 5% en 1 mL de una solución de ácido amino-caproico 750 mM y BIS-TRIS 50 mM

- Solución de acrilamida 4% (sin glicerol)

0.25 mL de una solución de acrilamida (48.5%)-Bis(1.5%)

1 mL de una solución de Ácido amino-caproico 1.5 M pH 7.0 y BIS-TRIS 150 mM

0.01 mL de una solución de persulfato de amonio al 10%

1.72 mL de agua desionizada

0.005 mL de TEMED

- Solución de acrilamida 4%

0.37 mL de una solución de acrilamida (48.5%)-Bis(1.5%)

1.5 mL de una solución de Ácido amino-caproico 1.5 M pH 7.0 y BIS-TRIS 150 mM

0.32 mL de una solución de glicerol al 80% (v/v)

0.025 mL de una solución de persulfato de amonio al 10%

2.28 mL de agua desionizada

0.005 mL de TEMED

- Solución de acrilamida 12%

1.11 mL de una solución de acrilamida (48.5%)-Bis(1.5%)

1.5 mL de una solución de Ácido amino-caproico 1.5 M pH 7.0 y BIS-TRIS 150 mM

1.28 mL de una solución de glicerol al 80% (v/v)

0.025 mL de una solución de persulfato de amonio al 10%

0.586 mL de agua desionizada

0.005 mL de TEMED

- Solución de acrilamida 15%

1.39 mL de una solución de acrilamida (45%)-Bis(1.5%)

1.5 mL de una solución de TRIS 3M pH 8.45 y SDS al 3% (HCl)

1.28 mL de una solución de glicerol al 80% (v/v)

0.025 mL de una solución de persulfato de amonio al 10%

0.31 mL de agua desionizada

0.005 mL de TEMED

- Solución amortiguadora de pH para cátodo

Tricina 50 mM, BIS-TRIS 15 mM y azul de Coomassie 0.02%

- Solución amortiguadora de pH para ánodo

BIS-TRIS 50 mM pH 7.0 (HCl)