



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“ESTUDIO DEL PLEGAMIENTO DE LA TRIOSA FOSFATO
ISOMERASA HUMANA”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A
Q. CAROLINA PERUSQUÍA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES
Instituto de Biotecnología, UNAM

DRA. MARCELA AYALA ACEVES
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Gloria Saab Rincón, en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante los estudios de maestría se recibió una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT.

La investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN211414 y de CONACyT CB-0154194.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Saab Rincón, quién me permitió ser parte del consorcio SOS, le debo la parte más significativa de lo que aprendí durante estos años de trabajo. Gracias, por su ayuda incondicional y las lecciones que necesité.

A Ing. Leticia Olvera Rodríguez, al Dr. Joel Osuna Quintero, al Biól. Filiberto Sánchez Lopez y al Dr. Humberto Flores Soto, por su apoyo técnico, atinadas observaciones y grandes consejos.

Al M. en C. Edson Norberto Cárcamo Noriega, por las grandes lecciones y el apoyo que siempre brindó. En verdad, no tengo palabras suficientes para expresar el agradecimiento que le guardo.

Al CONACyT y la UNAM por el apoyo económico brindado.

A los miembros del comité tutorial y a los miembros del jurado que con sus observaciones mejoraron y enriquecieron este trabajo.

A Ro, Tat, Emma, Getz, Alabasti, Yossef, Katy, Mary, Sonia, y a todos los compañeros del laboratorio 9, por compartir vivencias, consejos o grandes momentos de estrés y desestrés, gracias por brindarme su amistad, y hacer muy alegre la estancia en el IBt.

A los amigos que directa (Iris, Lizz, Nadia, Tona, Víctor, Diana, Joako) o indirectamente (Luis G, Pablo, Davo, Su, Manu, Ixnic, Nidia, Carloso) contribuyeron para que esta etapa tuviese un bonito final.

A la familia, siempre parte de mí, gracias.

Índice

Abstract	5
Resumen	6
Plegamiento de proteínas	7
Estabilidad conformacional de una proteína.....	10
Plegamiento de proteínas diméricas	15
Triosa fosfato isomerasa: estructura y actividad.....	18
Estudios del modelo de plegamiento de la TIM.....	22
Estudios de plegamiento HsTIM.....	23
Hipótesis	26
Objetivos	26
Desarrollo experimental	27
Metodología	27
Resultados y discusión	34
Sobre expresión y purificación de la triosa fosfato isomerasa humana.....	34
Estudios al equilibrio	38
Monitoreo de la estructura secundaria	42
Monitoreo de la estructura terciaria	44
Cambio en la estructura secundaria vs. Cambio en la estructura terciaria	49
Conclusiones	55
Perspectivas.....	56
Anexos.....	57
Anexo I. Disoluciones.....	57
Anexo II. Cinéticas de desnaturalización de la HsTIM (0.3 μ M).....	60
Anexo III. Curvas de desnaturalización de Urea.....	62
Anexo IV. Cálculo del ASA, archivos de salida	66
Anexo V. Secuencia de la HsTIM.....	70
Referencias.....	71

Abstract

Triose phosphate isomerase (TIM) is a glycolytic enzyme which rapidly interconverts dihydroxyacetone phosphate to D-glyceraldehyde phosphate. Its structure has been well characterized and it is formed by two identical subunits with a TIM barrel fold. Understanding the folding pathway of human triose phosphate isomerase will provide an important key to explain the presence of this protein in amyloid aggregates. TIM structure destabilizing modifications have been proposed as a possible cause of its aggregation. Albeit, TIM has not been directly implied in any amyloid-related disease, deep characterization of its folding mechanism is the first step to try to elucidate if this protein could have a potential to form amyloidogenic fibrils.

Previous studies of triose phosphate isomerase folding in different species —*Saccharomyces cerevisiae*, rabbit muscle, *Trypanosoma brucei* — show that the protein folding pathway is divergent. However, until now, the folding of human TIM has not been completely characterized. In the present study we carried out the thermodynamic study of the unfolding reaction using urea as denaturant agent, and found the presence of an expanded intermediate that preserves all the secondary structure. The presence of intermediates that expose hydrophobic residues could be the starting point of the aggregation phenomena.

Resumen

La triosa fosfato isomerasa (TIM) es la enzima que rápidamente interconvierte dihidroxiacetona fosfato en D-gliceraldehído-3-fosfato en la glucólisis, está formada por dos subunidades idénticas con un dominio de barril $(\beta/\alpha)_8$ o “barril TIM”. Es importante comprender cómo es el mecanismo de plegamiento de la TIM humana (HsTIM), ya que se han reportado patologías asociadas a una posible agregación de esta enzima. Aunque aún no existen evidencias de que la TIM esté involucrada directamente en procesos de agregación fibrilar, una caracterización detallada de su mecanismo de agregación es el primer paso para elucidar si esta proteína tiene la capacidad de formar fibras amiloidogénicas.

El estudio experimental del plegamiento de una proteína implica determinar la estabilidad conformacional (ΔG) de la misma, de este modo es posible determinar el mecanismo por el cual adquiere su conformación nativa. En el presente trabajo se estudió el mecanismo de plegamiento de la HsTIM utilizando técnicas sensibles a los cambios en la estructura secundaria (dicroísmo circular, CD) y terciaria (Fluorescencia intrínseca). Esto permitió determinar una ΔG_{denat} de $16.9 (\pm 1.45) \text{ Kcal mol}^{-1}$, y encontrar un intermediario en la desnaturalización química al equilibrio de la HsTIM.

Plegamiento de proteínas

Las proteínas son macromoléculas cuyos roles biológicos son muy diversos, cada una de las funciones que pueden realizar casi siempre están asociadas, tanto a sus superficies moleculares, como a su dinámica intrínseca, ambas características se forman mediante la reacción de plegamiento¹.

El plegamiento de las proteínas se define como la adquisición espontánea de la estructura nativa de la cadena polipeptídica, ya sea dentro de la célula durante la traducción, *in vivo*, o en disoluciones cuyas condiciones favorezcan el estado nativo, *in vitro*². La estructura tridimensional denominada estado nativo, es la conformación seleccionada entre un gran número de topologías posibles debe ser metaestable para permitir la actividad biológica³ que requiere de cambios conformacionales al menos alrededor del sitio activo.

Estudiar el plegamiento de proteínas es importante para comprender los principios que dictan la estabilización de la conformación tridimensional activa de una proteína. Además provee información sobre las variables estructurales que fueron seleccionadas en una proteína específica mantener su función, ya que los estudios termodinámicos y cinéticos de la reacción de plegamiento permiten determinar la presencia de intermediarios en el proceso, los cuales podrían ayudar a entender las fluctuaciones en la conformación del estado nativo así como el mecanismo de plegamiento⁴. Estos intermediarios pueden ser importantes en la regulación biológica de la función⁵, pero también se ha visto que pueden conducir a la agregación de la proteína, la cual está asociada a enfermedades conformacionales⁶, o enfermedades “del plegamiento” (llamadas así porque son causadas cuando las proteínas adquieren modificaciones en su estructura y adoptan conformaciones no nativas⁷).

El estado nativo de una proteína se estabiliza principalmente por interacciones débiles, no covalentes, a lo largo de toda la cadena polipeptídica, la mayoría de ellas independientes entre sí, pero aditivas. Debido a la presencia de esas interacciones se observa una alta cooperatividad en la desnaturalización de proteínas pequeñas⁵, es decir, cuando se desestabiliza una sección de la estructura, la red de interacciones comienza a romperse y promueve que toda la cadena polipeptídica se despliegue completamente. Cada una de las interacciones no covalentes depende de la naturaleza de los residuos de aminoácidos en la vecindad de la región donde existen, por eso la secuencia contiene la información que dicta el arreglo preferencial que adquiere la cadena polipeptídica de una proteína perfectamente plegada ⁸.

Desde 1973, después de que Anfinsen publicara sus resultados del replegamiento *in vitro* de la RNasa A desde condiciones desnaturalizantes (figura 1)⁹, el plegamiento de proteínas se ha visto como el proceso que favorece la adquisición de la conformación tridimensional correspondiente a un mínimo de energía libre bajo ciertas condiciones físicas de su entorno y que está dictado por la secuencia primaria de la proteína.

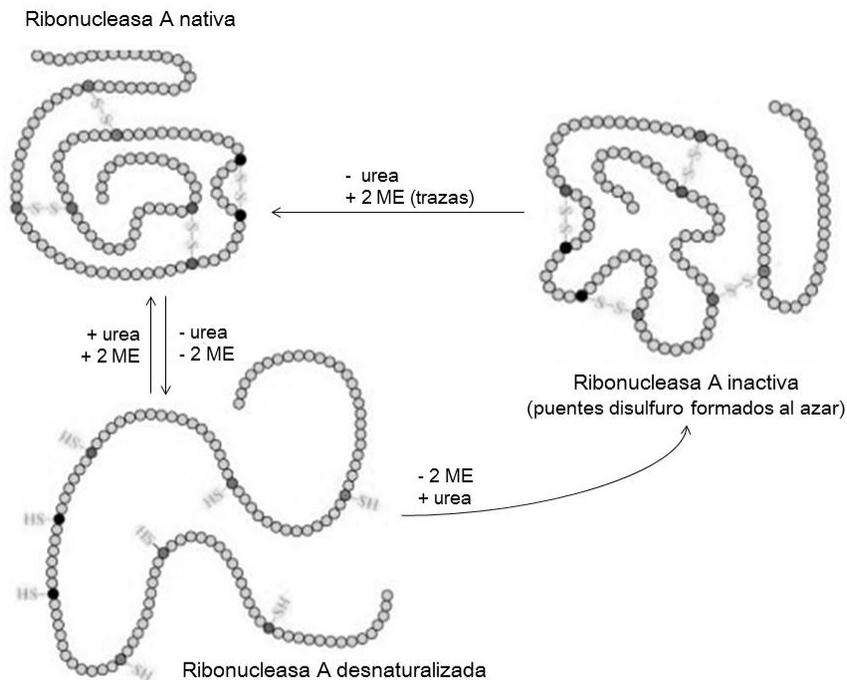


Figura 1. Experimento de la desnaturalización y re-naturalización de la ribonucleasa A (proteína de 124aa con 4 puentes disulfuro). Primero se desnaturalizó la proteína (usando urea y β -mercaptoetanol: 2ME), se observó la pérdida de la función, entonces se removieron los agentes desnaturalizantes, la ribonucleasa A se plegó espontáneamente y se volvió activa. Cuando sólo se remueve el 2 ME, los puentes disulfuro se forman al azar y la ribonucleasa es inactiva, si la proteína mal plegada se coloca en un ambiente donde no hay urea, rápidamente recupera su estructura y actividad original. Imagen modificada de la nota *Protein folding-I*, en el sitio del departamento de Química de la universidad de Maine, Orono.

El problema del plegamiento consiste en explicar cómo es que la ruta de plegamiento está codificada en una secuencia dada, y comenzó a ser relevante al considerar que, la gama de posibles topologías que una proteína puede adquirir es muy vasta, incluso en proteínas de bajo peso molecular, entonces si las células, evaluarán cada una de esas conformaciones probables al seleccionar una estructura funcional, el tiempo de vida del universo no sería suficiente para llevar a cabo la síntesis de una única proteína (Paradoja de Levinthal).^{10,11}

Al parecer, la energía asociada a una conformación dada, no es la principal variable que determina el plegamiento, sólo es un filtro director del proceso. En un ambiente biológico, el plegamiento nativo no necesariamente corresponde al estado de mínima energía, en muchos casos, es sólo un mínimo local¹². Aunado a esto, en algunos casos hay conformaciones metaestables que favorecen la adquisición de la estructura activa donde el proceso está controlado por factores cinéticos, más que por los termodinámicos¹⁰.

En contraste con lo que se observa *in vitro* (en donde la proteína se encuentra en condiciones de alta dilución que promueven el plegamiento de un solo tipo de molécula), dentro de la célula, el plegamiento ocurre simultáneamente a la biosíntesis de la proteína (evento cotraduccional), es un proceso ordenado espacialmente, favoreciendo ciertas interacciones respecto a otras, debido al ambiente intracelular, y hay un efecto significativo del amontonamiento de moléculas así como interacciones proteína-proteína (pueden alcanzar concentraciones desde 200 hasta 400 mg mL⁻¹)¹³. Además en la célula, se han seleccionado mecanismos de protección contra el mal plegamiento que involucran la participación de chaperonas moleculares¹⁴, controlan el arreglo tridimensional de la cadena polipeptídica naciente (chaperonas Hsp70, BiP y Hsc73 en eucariontes, DnaK en procariontes), y también tratan con proteínas de conformación aberrante para poder mantener su homeostasis (chaperonas GroEL/GroES, procariontes, chaperoninas Hsp60 y maquinaria de respuesta UPR).¹⁵

Estabilidad conformacional de una proteína

Es importante señalar que, a partir de este punto, se hablará únicamente acerca del plegamiento *in vitro*, ya que el modelo de estudio se diseñó para monitorear cambios de conformación de la proteína blanco aislada del ambiente celular. En este tipo de muestras el equilibrio dinámico involucrado durante el plegamiento está gobernado principalmente por los factores termodinámicos del estado nativo, N , y del estado desplegado, U , (cuando la proteína está completamente desnaturalizada).

El proceso de plegamiento se puede concebir como el resultado del balance de varios fenómenos que conducen a la formación de redes complejas de interacciones no covalentes, las cuales influyen en el arreglo estructural y que contribuyen al cambio del perfil energético de la cadena polipeptídica¹⁶. En la tabla I, se explica de manera general cómo contribuyen las interacciones débiles a la estabilidad termodinámica del estado nativo.

Tabla I. Variables de mayor influencia en el plegamiento de una proteína

Contribución	Descripción	Efecto en la cadena
Entropía conformacional	Disminución de los grados de libertad en la cadena polipeptídica: a medida que aumenta la población de moléculas plegadas, disminuyen los movimientos azarosos.	ΔS disminuye (Desfavorable)
Efecto hidrofóbico	Asociación entre grupos hidrofóbicos en las cadenas laterales de los residuos alifáticos y aromáticos. Esto causa la liberación de moléculas de agua que anteriormente estaban asociadas a los residuos expuestos, de modo que el factor entrópico del entorno (disolvente) aumenta conforme disminuye en el sistema (proteína).	ΔS (Favorable)
Puentes de hidrógeno (intramoleculares)	Se forman cuando se neutralizan dipolos de las cadenas laterales, entre aminoácidos polares.	
Interacciones electrostáticas	Puentes Salinos, cuando las cadenas laterales de aminoácidos cargados interactúan entre ellos neutralizándose parcialmente.	
Puentes disulfuro	Se oxidan los grupos sulfhidrilo de dos Cys proximales. Es uno de los factores que más influencia tiene en el plegamiento.	ΔH disminuye (Favorable)
Fuerzas de van der Waals	Promueven el empaquetamiento de la cadena poli peptídica, favorecen una unión débil entre grupos no cargados, pero que contribuye significativamente a la estabilidad conformacional.	

Comprender el plegamiento de proteínas involucra determinar la relación entre la energía de las interacciones débiles, la conformación y la dinámica colectiva de la(s) cadena(s) polipeptídica(s) que gobierna la topología de la proteína¹⁷.

Es importante no confundir el concepto de estabilidad conformacional con la estabilidad química, el cual se refiere a la resistencia a experimentar cambios en la

estructura covalente¹, los cuales usualmente ocurren bajo condiciones extremas. Por otro lado, la estabilidad conformacional, se refiere a la facilidad (o dificultad) a sufrir cambios en la estructura tridimensional de la proteína; ésta se considera como un indicador de qué tan estable es un patrón de plegamiento con respecto a la cadena en un estado totalmente azaroso⁴.

La estabilidad conformacional de una proteína es la energía que se requiere para adquirir la estructura nativa, también puede entenderse como la suma de la energía necesaria para romper todas las interacciones intramoleculares en la cadena polipeptídica (ΔH) y de la disminución de sus microestados posibles (ΔS , eso ocurre cuando los enrollamientos al azar de la cadena polipeptídica se convierten en zonas con un arreglo espacial ordenado)¹⁸. Para definirla matemáticamente hay que considerar una muestra con la proteína de interés. En esa muestra cada población de moléculas idénticas tiene una constante de equilibrio (K_f) que gobierna la fracción de moléculas que están plegadas (χ_f) con respecto a las que están desplegadas (χ_u),

$$K_f = \frac{\chi_f}{\chi_u} \quad (I)$$

La energía libre (ΔG_f) asociada a la variación de las poblaciones desplegada y plegada, es denominada: estabilidad conformacional de la proteína y se relaciona con la constante de equilibrio a través de la siguiente ecuación.

$$\Delta G_f = -RT \ln K_f \quad (II)$$

El plegamiento de proteínas es un proceso complejo que no sólo es controlado por factores termodinámicos, sino también por factores cinéticos, los cuales están relacionados, dado que la proporción de las moléculas que están plegadas con respecto a las que están desplegadas en un momento dado ($t = x$) depende de la velocidad a la cual se interconvierte una población en la otra, después de cierto tiempo llegará el momento en que dicha proporción se mantenga constante, es entonces cuando la muestra ha alcanzado el equilibrio, esto es:

$$K_f = \frac{[X_f]_{\infty}}{[X_u]_{\infty}} = \frac{k_N}{k_U} \quad (\text{III})$$

Donde k_N y k_U son las constantes cinéticas para la reacción de plegamiento y para la reacción de desplegado ($U \leftrightarrow N$), respectivamente, cuyas velocidades están dadas por:

$$\frac{d[U]}{dt} = k_U[N] - k_N[U] \quad (\text{IV})$$

$$\frac{d[N]}{dt} = k_N[U] - k_U[N] \quad (\text{V})$$

Una proteína cuya cadena polipeptídica fluctúa rápidamente entre N y U , tiene mayor probabilidad de quedarse atrapada en conformaciones que la lleven a una ruta ineficiente de plegamiento. Cuando este proceso es irreversible ocasiona la pérdida de la función. En otras palabras, para cierto periodo de tiempo se inactivará una fracción más grande de dicha proteína que la fracción de otra proteína con la misma estabilidad conformacional pero cuya cinética de desplegado sea más lenta¹.

Es común que en el equilibrio, el estado nativo y el estado desplegado de proteínas pequeñas, sólo se puedan detectar, tanto la conformación plegada como la conformación desplegada ($N \leftrightarrow U$), es decir, la reacción es altamente cooperativa y en el punto medio de la transición sólo existe una mezcla con la misma proporción de cada especie. Pero en otros casos, se observan conformaciones intermedias que se acumulan conforme las condiciones de la disolución se vuelven más desestabilizantes.

El número de especies que se detectarán depende del paisaje de plegamiento, éste es la suma todas las contribuciones energéticas que aportan las interacciones inter e intramoleculares para cierta conformación¹², las contribuciones de contactos no nativos pueden ocasionar “estados de colapso”, mínimos energéticos locales, es por ello que las condiciones de dilución, como el pH o la fuerza iónica, y los perturbadores, presión o un agente caotrópico, inducen cambios específicos en una molécula de proteína, entonces es común observar

que un desnaturalizante químico (urea, por ejemplo) no revela los mismos intermediarios que algún otro agente (como la temperatura).^{1,5}

En el caso de proteínas que muestran intermediarios, el equilibrio global entre N y U, se puede dividir en los equilibrios parciales entre las diferentes especies. Cada transición es gobernada por una constante de equilibrio, y a su vez por una diferencia de energía libre⁵. En la figura 2, se muestra el escenario más simple para un equilibrio de más de dos estados, en el cual sólo se observa la acumulación de un intermediario, la transición puede verse como la reacción sucesiva: $U \leftrightarrow I \leftrightarrow N$.

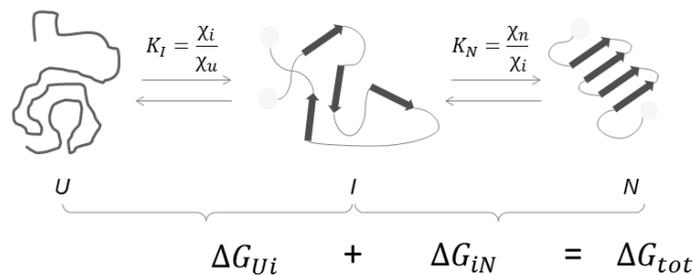


Figura 2. Esquema del mecanismo de plegamiento de tres estados para una proteína monomérica. Se observan dos transiciones, la primera del estado desplegado, U, al intermediario (I), y la segunda del intermediario al estado nativo (N).

La identificación de estos intermediarios es útil en la elucidación del mecanismo que una proteína sigue para llegar al estado nativo, en el supuesto de que ese intermediario sea necesario en la vía de plegamiento y no una especie que se acumula cuando algunas moléculas se desvían de la ruta productiva de plegamiento.

Plegamiento de proteínas diméricas

Cuando una proteína está constituida por más de una cadena polipeptídica el mecanismo de plegamiento implica, no sólo la adquisición de la estructura terciaria, sino también la asociación de las cadenas en la estructura cuaternaria¹⁹.

Los efectos de la agrupación de varias subunidades entre sí, se manifiestan de maneras muy complejas²⁰, que en conjunto proveen pistas sobre la presión de selección que promovió la oligomerización como ventaja evolutiva: así se generan nuevas combinaciones estructurales de aminoácidos y novedosas funciones a partir de genes más pequeños. Un ejemplo de esto es la presencia de sitios activos en la interface de asociación, ya que se ha visto que las interfaces evolucionan más rápido que la aparición de nuevos plegamientos²¹.

El plegamiento de proteínas con estructura cuaternaria comúnmente presenta una marcada dependencia de interacciones proteína—proteína, así que, el equilibrio de la asociación resulta de muchos eventos estocásticos de asociación y disociación. Por lo anterior, el equilibrio es dependiente de la concentración de la proteína⁶. Más adelante se muestra cómo es que la estequiometría del equilibrio químico para la formación de los dímeros no es 1:1, sino 1:2; esta dependencia en el equilibrio del cambio de molecularidad, ocasiona que los parámetros termodinámicos presenten una dependencia sobre la concentración de proteína.²¹

Sin embargo, existen casos reportados, desde homodímeros hasta partículas virales, que presentan desviaciones a la ley de acción de masas. Esto se debe a que la energía de activación para el intercambio de subunidades es alta, entonces, el ensamble muestra poblaciones heterogéneas de larga duración (escalas de tiempo biológicamente relevantes)⁶.

De nuevo, el escenario más sencillo que puede presentar el mecanismo de plegamiento de una proteína dimérica es la transición reversible de dos estados,

donde la desnaturalización y la disociación, del dímero nativo (N_2) en los monómeros desplegados (U), son eventos concertados:



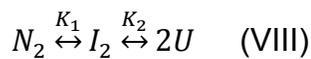
K es la constante de equilibrio para la desnaturalización, evidentemente la molecularidad de la transición se ve afectada por el número de subunidades que constituyen la proteína en el estado desnaturalizado, entonces K se define como:

$$K = \frac{[U]^2}{[N_2]} = \frac{2\chi_u^2 P_{tot}}{(1-\chi_u)} \quad (\text{VII})$$

Donde χ_u es la fracción de proteína que está desnaturalizada, y P_{tot} es la concentración total de monómeros ($P_{tot} = 2[N_2] + [U]$); por lo tanto, las fracciones de N_2 y de U dependen no sólo de la constante de equilibrio, sino también de P_{tot} .

Transiciones más complejas, involucran la formación de intermediarios. En el modelo de tres estados para proteínas diméricas, además de presentarse dos transiciones, también hay dos posibilidades: que el único intermediario detectado sea una especie dimérica o que sea una especie de naturaleza monomérica.^{21,22}

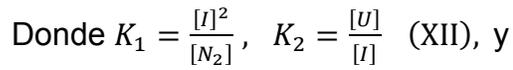
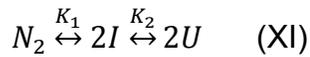
Cuando el dímero se desnaturaliza y presenta un intermediario dimérico, la primera transición que va de N_2 al intermediario dimérico (I_2) es independiente de la concentración de proteína, mientras que la segunda, que va de I_2 al estado desplegado, va a depender de la concentración de proteína.¹



$$\text{Donde } K_1 = \frac{[I_2]}{[N_2]}, \quad K_2 = \frac{[U]^2}{[I_2]} \quad (\text{IX}),$$

$$P_{tot} = 2[N_2] + 2[I_2] + [U] \quad (\text{X}).$$

En el segundo caso, cuando el intermediario es de naturaleza monomérica, la primera transición, entre N_2 y el intermediario (I), es dependiente de la concentración de proteína, y la segunda transición, de I a U , es independiente de la concentración de proteína.¹



$$P_{tot} = 2[N_2] + [I] + [U] \quad (\text{XIII}).$$

En ambos mecanismos (figura 3), los parámetros termodinámicos, ΔG , se asocian a cada transición, el valor total es la suma de los valores correspondientes en cada estadio.

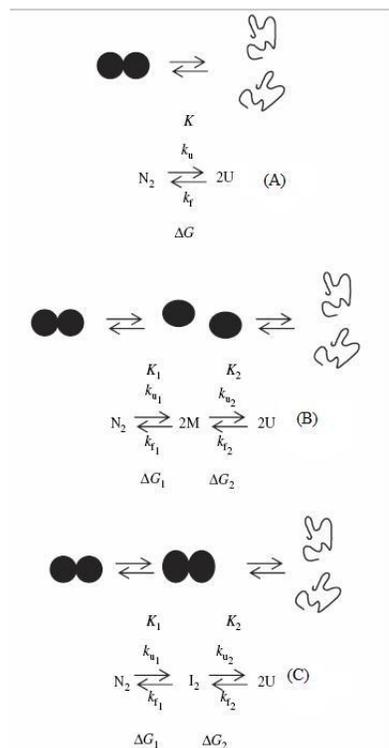


Figura 3. Mecanismos de plegamiento en proteínas diméricas. (A) Transición de dos estados, (B) transición de tres estados con intermediarios monoméricos, (C) transición de tres estados con un intermediario dimérico. Tomado de Rumfeldt et al. 2008

Triosa fosfato isomerasa: estructura y actividad

La triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1, TIM o TPI) es una proteína homodimérica no alostérica que participa en la glucólisis (figura 4). Sus sustratos y productos están vinculados con el metabolismo de lípidos, con la vía de las pentosas, y con la gluconeogénesis.²³

Esta enzima, cataliza estereoespecíficamente la reacción de interconversión de α -dihidroxiacetona fosfato, DHAP, en D-gliceraldehído-3-fosfato, D-GAP²⁴ (figura 5). Cada una de sus subunidades contiene alrededor de 250 aa, cuyo arreglo tridimensional consiste en 8 unidades consecutivas de hebra β —asa—hélice α , que se pliegan, de tal modo que, las hojas beta (numeradas $\beta 1$, $\beta 2$, ..., $\beta 8$ a partir del extremo amino) forman un barril β de ocho hebras, en el centro de la estructura, rodeado por las ocho hélices subsecuentes (denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2$, ..., $\alpha 8$ iniciando desde el extremo amino) al exterior; las asas que los conectan son denominadas como asas $\beta\alpha$ (conectan las hebras β con las hélices α) y asas $\alpha\beta$ (conectan las hélices alfa con las hebras beta)^{25,26}.

El motivo de plegamiento de la TIM, es conocido como “barril (β/α)₈ o barril TIM”, es el que se presenta más frecuentemente en las proteínas con estructura conocida hasta ahora.²⁵⁻²⁷ La mayoría son enzimas, hay pocas excepciones, una de las cuales es la concanavalina B. Proteínas con el plegamiento de barril (β/α)₈ están presentes dentro de 5 de los 6 tipos generales de actividades catalíticas de acuerdo con el esquema de clasificación de la *Enzymatic Commission* (IUPAC-

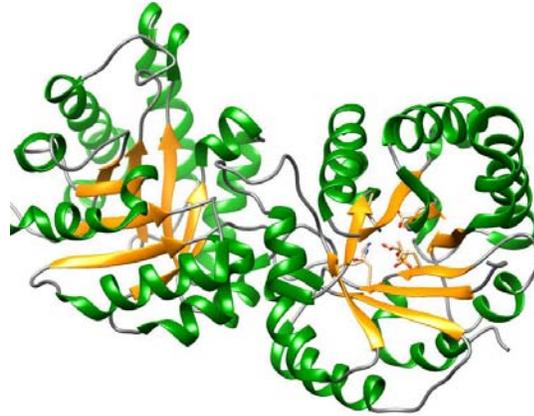


Figura 4. Estructura cristalográfica de la triosa fosfato isomerasa de humano (1HTI en el PDB), en el sitio activo de la subunidad 2 está inmovilizado el análogo del sustrato 2-fosfoglicolato (2-PG).

Figura 5. Isomerización que cataliza la triosa fosfato isomerasa.

IUBMB). Esto correlaciona con el hecho de que una gran proporción de las reacciones enzimáticas presentes en rutas metabólicas importantes, como la glucólisis o la biosíntesis de triptófano, sean catalizadas por barriles $(\beta/\alpha)_8$ ²⁸.

En todos los barriles $(\beta/\alpha)_8$, el sitio activo se encuentra topológicamente en la misma región: hacia el extremo carboxilo de las hebras β y al extremo amino de las hélices α , así, el sitio está conformado por las ocho asas $\beta\alpha$ (1-8). En los ortólogos de TIM los residuos del sitio activo están altamente conservados y son: Asn11 y Lys13 en el asa 1, la His95 del asa 4, y el Glu67 en el asa 6 (figura 6).^{26,27}

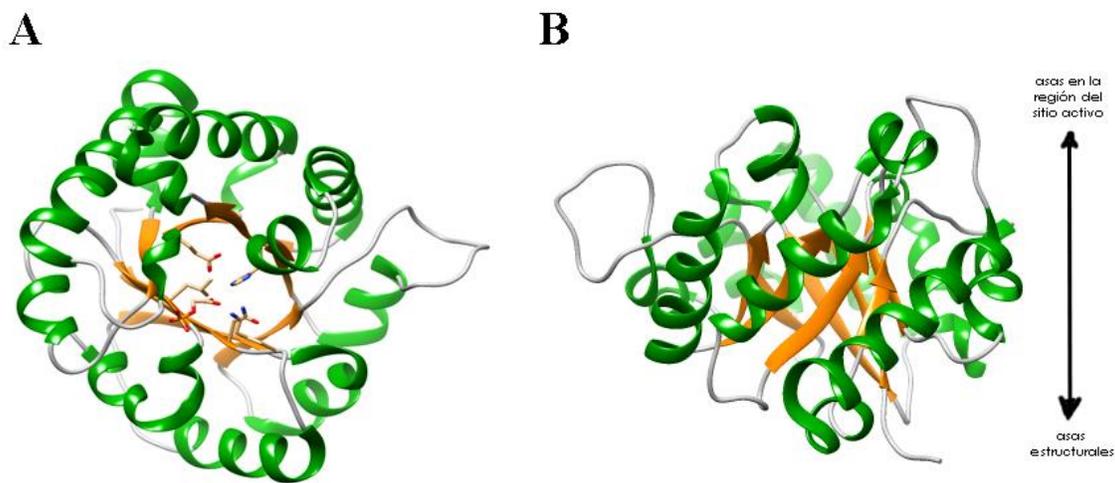


Figura 6. Plegamiento del barril $(\beta/\alpha)_8$, o barril TIM (PDB 1HTI). (A) Vista sitio activo (lado carboxilo), se indican los residuos catalíticos. (B) Vista lateral del barril.

El mecanismo de reacción involucra la formación de intermediarios enediolato²⁹, que fácilmente pueden sufrir la eliminación del grupo fosfato (figura 7). Esta reacción se promueve por el sobrelape de los orbitales π de los carbonos C1, C2 y C3 del sustrato, esto hace evidente que el papel de la enzima es crucial en la reacción: la eliminación prematura del grupo fosfato se previene mediante la formación de puentes de hidrógeno con las asas de la proteína. Por ende, los residuos clave en el sitio activo de la TIM son, en primer lugar, la base que extrae el ión hidrógeno (Glu67), en segundo lugar, la especie que estabiliza el oxianión generado (His95), y el último factor clave es la exclusión del solvente, promovido por el movimiento del asa β - α 6²⁷.

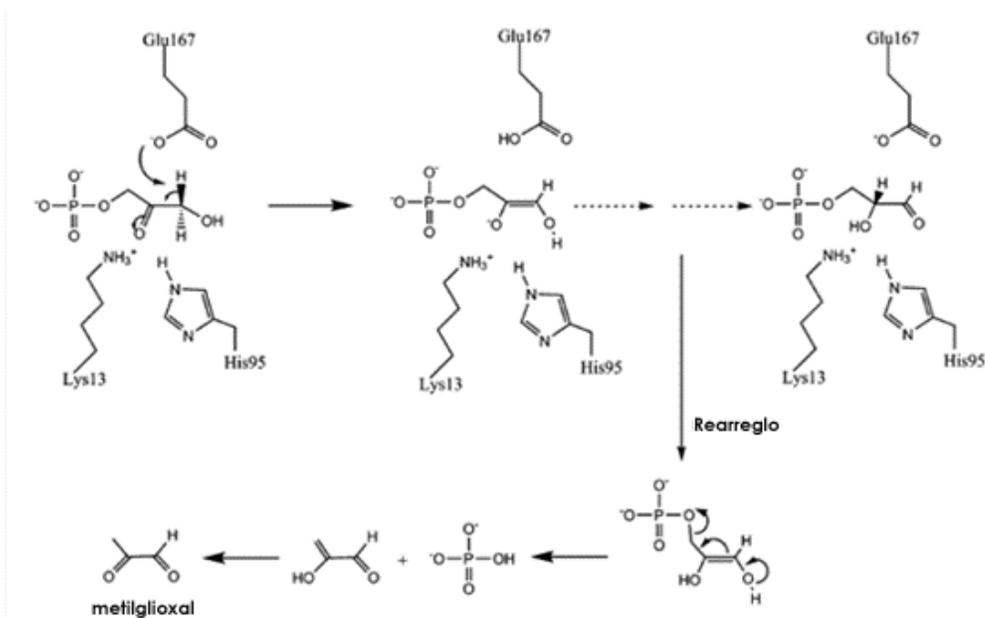


Figura 7. Mecanismo de la reacción catalizada por la TIM. Se muestra el movimiento estéreo-específico del ión hidrógeno catalizado por la TIM en la DHAP, también se muestra cómo ocurre la eliminación del grupo fosfato en la reacción no catalizada. Modificado del trabajo de Wierenga et al. 2010.

La TIM es ampliamente reconocida como un catalizador biológico altamente eficiente: hace que la reacción se lleve a cabo entre 10^8 y 10^9 veces más rápido de lo que ocurriría en una disolución sin enzima²⁷. Se dice que la velocidad de conversión del D-GAP a DHAP está limitada principalmente por la difusión del sustrato al sitio activo²⁹, ya que su número de recambio (k_{cat}/K_m) en esa dirección, $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (tabla II²⁷) es cercano a los valores calculados ($10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para reacciones bimoleculares en disolución contraladas únicamente por difusión³⁰. Quizá el plegamiento TIM, contribuya para lograr esta alta eficiencia, y por lo tanto, que este plegamiento sea tan común en la naturaleza: el dominio de barril (β/α)₈ está representado en aproximadamente el 10% de las estructuras conocidas³¹.

Tabla II. Parámetros Cinéticos de la TIM

Variante	Dirección de la Reacción	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})
Gg ^a	DHAP→D-GAP	1.2	500
	D-GAP→DHAP	0.25	5000
Sc ^b	DHAP→D-GAP	2.3	750
	D-GAP→DHAP	1.5	8700

a TIM de músculo de pollo, *Gallus gallus domesticus*.²⁷

b TIM de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.⁴⁹

El proceso de dimerización de la TIM se ve favorecido, debido a la baja estabilidad que presentan los monómeros^{29,31} y a que la asociación contribuye a optimizar la geometría del sitio activo.³²

Estudios del modelo de plegamiento de la TIM

Por ser una enzima que participa en la glucólisis, la TIM es una enzima universal que está codificada en la mayoría de los seres vivos.²⁷ Su sitio activo se encuentra cerca de la interface de dimerización²⁶, entonces contrastar los mecanismos de plegamiento en diferentes variantes puede ayudar a saber cuáles son los factores que favorecieron la selección de la dimerización en esta proteína.

La triosa fosfato isomerasa es un blanco importante para el desarrollo de drogas antiparasitarias, que se han basado en la diferencia de estabilidad conformacional del dímero de la TIM humana con respecto a la del parásito. Se han reportado algunos compuestos derivados de plantas que actúan específicamente sobre la TIM del parásito.³³

Simulaciones del plegamiento de la TIM muestran que éste es iniciado por la formación de pequeños núcleos que se conjuntan para formar una estructura estable, formada por hebras β y hélices α que se combinan para generar una conformación cerrada donde las hélices se exponen al solvente y el interior hidrofóbico donde se agrupan las hebras β . El ensamble final de la molécula se da por la apertura de un intermediario de 6 miembros al que se incorporan las últimas dos hebras β .³⁴

El modelo de desnaturalización comúnmente aceptado para la TIM involucra la disociación no covalente de los monómeros como primer paso³⁵. Hasta ahora se han reportado análisis experimentales de la estabilidad conformacional de la TIM proveniente de varias especies, tales como *Trypanosoma brucei*³¹, *Saccharomyces cerevisiae*³⁶, *Oryctolagus cuniculus* (conejo)³⁷, *Plasmodium falciparum*³⁸, por mencionar algunas^{39,40,41}, así como de mutantes monoméricas de éstas³². En la tabla III se muestran los valores de estabilidad conformacional calculados a partir de la desnaturalización química de la TIM de algunas especies.

Tabla III. Estabilidades conformacionales reportadas para distintas TIM

Variante	Modelo	ΔG (Kcal mol ⁻¹)	Identidad*	Agente Caotrópico
OcTIM	2 estados	33.6 (\pm 1.1)	98%	GdnCl
TbTIM	4 estados	14.7 (\pm 3.1)	54%	GdnCl
TcTIM	4 estados	25.2 (\pm 0.5)	52%	GdnCl
BsTIM	3 estados	24.2	42%	Urea
LmTIM	2 estados	19.7	51%	GdnCl
GgTIM	2 estados	9.8	90%	GdnCl
ScTIM	3 estados	16.6 (\pm 0.7)	53%	GdnCl

*% de Identidad de secuencias respecto a la HsTIM

Las transiciones conformacionales de la TIM de *Plasmodium falciparum* (PfTIM), inducidas por cloruro de guanidino (GdnCl), revelaron la presencia de un intermediario monomérico completamente desnaturalizado, sugiriendo que el ensamble de las subunidades en la TIM es crítico para mantener la estabilidad de la proteína³⁸. En 2004, el grupo de Smith, realizó estudios de espectrometría de masas para evaluar la desnaturalización química de la triosa fosfato isomerasa de músculo de conejo (OcTIM, por *Oryctolagus cuniculus*)³⁷, utilizando cloruro de GdnCl. A partir de un ensayo preliminar al equilibrio calcularon una estabilidad conformacional de 33.6 (\pm 1.1) Kcal mol⁻¹ para un ajuste a un modelo de dos estados, en este trabajo Pan y Smith sólo pudieron detectar intermediarios transitorios cuando realizaron cinéticas de plegamiento. Ambos resultados son muy diferentes entre sí, parece ser que pese a que el dominio de dimerización se conserva entre diferentes especies, tanto los mecanismos de plegamiento como valores de estabilidad conformacional varían mucho (de 15 a 34 Kcal mol⁻¹, tabla III).

Estudios de plegamiento HsTIM

Los estudios previos del plegamiento de la triosa fosfato isomerasa de diferentes especies parecen indicar que el mecanismo de plegamiento de esta enzima es divergente. Pero, hasta ahora, el plegamiento de la triosa fosfato isomerasa humana (HsTIM) no ha sido caracterizado completamente.

En 1996 Mainfroid y colaboradores modificaron por mutagénesis sitio dirigida la interface de dimerización de la triosa fosfato isomerasa humana; con el objeto

de identificar los contactos que son cruciales en la dimerización y estabilidad de la dicha enzima. Produjeron mutantes sustituyendo la metionina 14 y la arginina 98 por glutamina, M14Q y R98Q respectivamente, ambos residuos están altamente conservados ya que forman interacciones con en el asa 3 en la interface de la TIM; analizaron la influencia de esos cambios en la formación de la estructura cuaternaria, de la actividad enzimática y de la estabilidad de cada una con respecto a la enzima silvestre. Bajo las condiciones experimentales que propusieron (TRIS-acetato 50mM, pH 8 a 25 °C), la desnaturalización química de la triosa fosfato isomerasa humana ocurre mediante un proceso concertado, dependiente de la concentración de proteína, con una estabilidad conformacional de $19.3 (\pm 0.4) \text{ Kcal mol}^{-1}$.⁴² Este mecanismo de plegamiento al equilibrio es idéntico al reportado por Smith y colaboradores, pero aunque la HsTIM se despliega mediante un mecanismo de dos estados, como la OcTIM, el valor calculado de estabilidad conformacional es mucho más bajo (tabla III).

Para determinar si en la desnaturalización de cierta proteína blanco están involucrados intermediarios, o si se trata de un evento concertado es necesario contrastar los resultados obtenidos por técnicas complementarias utilizando el mismo método para desplegarla⁹. Es importante señalar que Manfroid y colaboradores en su trabajo, para calcular el valor de estabilidad conformacional monitorearon la desnaturalización térmica de la HsTIM únicamente mediante fluorescencia intrínseca, y los cambios de estructura en desnaturalización química (urea) se evaluaron por dicroísmo circular (CD).⁴³ En este trabajo se llevará a cabo la desnaturalización al equilibrio de la HsTIM y los cambios en la conformación se seguirán tanto por CD como por fluorescencia intrínseca, para poder evaluar la presencia de intermediarios al equilibrio.

En el grupo de investigación se tiene interés en estudiar el mal plegamiento de la triosa fosfato isomerasa humana, con el objeto de determinar si esta enzima es un agente amiloidogénico, o si únicamente está involucrada en procesos de coagregación; las regiones con estructura de hojas β en la HsTIM tienen un predominio de residuos hidrofóbicos (posibles núcleos "cross beta"⁴⁴). Por lo tanto,

conocer el mecanismo de plegamiento de la TIM es el primer punto clave que aportará valiosa información para comprender las patologías con las cuales se ha asociado la posible agregación de la TIM: una de ellas es la deficiencia de la TIM²³ (causada por modificaciones⁴⁵ y mutaciones puntuales⁴⁶, que desestabilizan la estructura promoviendo su agregación); también hay evidencias sobre la presencia de la TIM (nitrada en las tirosinas 164 y 208) en placas amiloides de pacientes que murieron con Alzheimer.⁴⁷

Las proteínas no son entidades estáticas, su estructura se encuentra fluctuando continuamente entre diferentes conformaciones y mientras menos estable sea, la frecuencia con la que transite a estados total o parcialmente desplegados, será mayor, aumentando con esto la probabilidad de acumular intermediarios que puedan dar lugar a agregación³. Así el proceso de agregación está íntimamente relacionado con la estabilidad de proteínas: cuando las proteínas quedan atrapadas irreversiblemente en conformaciones mal plegadas ocasionan la formación de agregados muy estables, los cuales pueden ser amorfos o fibrilares. Los agregados fibrilares (tienen una estructura altamente ordenada donde el enlace peptídico adquiere una conformación donde hojas β están entrecruzadas de manera perpendicular al eje de la fibra), están asociados a enfermedades degenerativas como la diabetes mellitus tipo II, el mal de Parkinson o el Alzheimer.⁴⁴

Hipótesis

La dimerización de la HsTIM está acoplada al plegamiento de la proteína, por lo que debe seguir un modelo de 2 estados, sin la acumulación de intermediarios.

Objetivos

General

Determinar el mecanismo de plegamiento de la Triosa fosfato isomerasa de humano.

Particulares

Expresar y purificar la HsTIM.

Realizar el análisis conformacional de la proteína, mediante dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca.

Detectar la presencia de intermediarios estables y/o transitorios que se formen durante la reacción de desplegamiento de la HsTIM.

Desarrollo experimental

Para cubrir los objetivos del proyecto de investigación se propuso una estrategia experimental que involucra tres etapas principales; primero, la sobre expresión y purificación de la triosa fosfato isomerasa humana recombinante. El siguiente paso corresponde a los ensayos de plegamiento, donde se pudo evaluar la pérdida de la estructura secundaria y terciaria en la desnaturalización así como determinar la energía libre asociada a la transición en cada caso. La última etapa corresponde al análisis de los datos, en la cual se compararon los resultados obtenidos en las series de diluciones a diferentes concentraciones de proteína como en las series monitoreadas tanto por Fluorescencia intrínseca como por CD.

Metodología

(I) Purificación del plásmido

El plásmido con el gen de la HsTIM, proporcionado por el Dr. Armando Gómez-Puyou: en el inicio de la secuencia (extremo amino) de la triosa fosfato isomerasa humana se adicionaron una bandera de seis histidinas y el sitio de reconocimiento de la proteasa del virus *Tobacco etch* (TEV-proteasa), esta construcción estaba subclonada en un vector pET-28a (Novagen).

El plásmido se purificó siguiendo el protocolo de ROCHE® según las indicaciones del manual “High Pure Plasmid Insolation Kit”. Y se mandó secuenciar utilizando los oligos T7 para asegurar que no contuviera mutaciones.

(II) Sobre expresión de la HsTIM recombinante

El plásmido purificado, se introdujo por electroporación en células competentes *E. coli* ER2566, se seleccionaron las colonias viables en LB sólido con ampicilina ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para sobreexpresar la proteína recombinante, se crecieron pre-cultivos (medio LB) de células transformadas, que se escalaron a medio mínimo con ampicilina a 1L, en la mayoría de los casos, o en un reactor 10L, incubando a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Excella E25). Las composiciones de los medios están indicadas en el Anexo I (a y b). Se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DU@730 para monitorear la densidad óptica de los cultivos (D.O.) a 600 nm. Una vez alcanzada una D.O. 0.4-0.6, se indujo la sobre expresión con IPTG (1 mM) y se continuó la incubación toda la noche a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

(III) Purificación de la HsTIM

Se obtuvieron los botones de células por centrifugación (Beckman J2-21) 30 min a 5000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez verificado el perfil de sobre expresión mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE 15%), las células se lisaron por sonicación (6 ciclos 3×1 min, 0.5 s on/off 90% amplitud) utilizando el amortiguador A (ver Anexo I-c). El extracto proteico se clarificó por centrifugación (equipo Sorvall ST 46R de Thermo Scientific) durante 20 min a 13000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Debido a que intracelularmente el polifosfato y el fósforo inorgánico son especies amortiguadoras del pH⁴⁸, y para mantener las mismas condiciones bajo las cuales se está evaluando el proceso de agregación de la HsTIM, se utilizó PBS para purificar la proteína y para realizar los ensayos de plegamiento.

La HsTIM se purificó del extracto celular mediante cromatografía de afinidad, utilizando matriz de sefarosa NTA-Ni (II). Se realizó un gradiente con amortiguador B, eluyendo en la fracción con 300 mM de imidazol. En algunos casos se utilizó un FPLC Äkta de Amersham, en otros casos la purificación se llevó a cabo mediante una columna en un soporte, controlando el flujo

usando una bomba peristáltica. El imidazol se removió por diálisis contra amortiguador A (4 °C) utilizando membranas de nitrocelulosa con tamaño de corte de 10 kDa.

(IV) Digestión de la fusión de histidinas

Para cortar la fusión de histidinas en el extremo amino terminal, se utilizó TEV-proteasa recombinante la cual también contenía fusionada una etiqueta de 6 histidinas. Esta enzima se sobre expresó y purificó previamente (concentración final de aproximadamente 0.1807 mg mL⁻¹ en 50 % glicerol, para cuantificarla se utilizó un coeficiente de extinción molar, ϵ , de 32290 M⁻¹ cm⁻¹). La mezcla de digestión contenía 60 µg de proteasa por cada mg de HsTIM estimado por absorbancia a 280 nm (se usó el coeficiente de extinción molar, ϵ , de 33640 M⁻¹ cm⁻¹, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Olis Cary-14). La reacción de corte se llevó a cabo a 4 °C (toda la noche).

Una vez digerida la HsTIM recombinante, se purificó de la mezcla de reacción, mediante una segunda cromatografía de afinidad. En este caso, la fracción no afín a la matriz de NTA-Ni es la proteína sin la fusión de histidinas, permaneciendo en la columna tanto la proteasa como la HsTIM que no haya sido digerida.

(V) Precipitación con sulfato de amonio

Después de purificar cada lote de HsTIM producido, ésta se concentró por “salting out”, se utilizó (NH₄)₂SO₄ anhidro finamente triturado, el cual se añadió hasta alcanzar 80 % de saturación a 4 °C (los cálculos se realizaron utilizando el algoritmo disponible en el servidor de ©EncorBiotechnology Inc., 2012).

La suspensión de proteína en sulfato de amonio se centrifugó a 11000 rpm durante 20 min a 4 °C y el pellet se resuspendió en un volumen adecuado para garantizar una concentración de al menos 10 mg mL⁻¹. Una vez precipitada la proteína, se almacenó a 4 °C.

(VI) Pruebas de actividad enzimática

La actividad específica de cada lote de HsTIM sobre expresada se determinó según el método de Plaut y Knowles⁴⁹, el cual se basa en la reacción acoplada de la α -Glicerofosfato deshidrogenasa, α -GDH⁵⁰, (para observar cantidades de cada reactivo ver el anexo I-d).

Primero se determinó la actividad enzimática de la enzima, para ello, se siguió la reacción a partir de la disminución de la absorbancia a 340 nm del NADH con respecto al tiempo (espectrofotómetro Olis Cary-14). Se calculó el consumo de sustrato mediante la siguiente relación:

$$[\text{NADH}] (\mu\text{M}) = \left| \frac{A_{340}}{\epsilon_{\text{NADH}}(\text{M}^{-1})} \right| \left| \frac{1 \times 10^6 \mu\text{M}}{1\text{M}} \right|$$

Donde ϵ , es el coeficiente de extinción molar del NADH, $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; se usaron celdas de cuarzo cuya longitud de paso óptico fue de 1 cm.

Se determinó la velocidad inicial a partir de la disminución de la pendiente en la absorbancia del cofactor (340 nm) con respecto al tiempo.

Después de cuantificar la proteína utilizada, se determinó la actividad específica, de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Actividad enzimática (U mL}^{-1}\text{)}}{[\text{HsTIM}] (\text{mg mL}^{-1})}$$

Donde $1\text{U} = \mu\text{M}_{\text{sustrato}} \text{ min}^{-1}$, se consideró el volumen total de la mezcla de reacción antes de usarlo como valor de actividad enzimática.

(VII) Pruebas de desnaturalización química

Después de eliminar gradualmente el sulfato de amonio y antes de realizar los ensayos de plegamiento, la proteína se volvió a dializar contra 4 cambios de 1 L de PBS filtrado y desgasificado, el cual tenía una menor concentración de fosfatos (las composiciones se indican en el Anexo I-c). El primer cambio

contenía ditioneitol (DTT, 1 mM) como agente reductor, en los cambios subsecuentes se adicionó 1 mM de 2-ME (β -mercapto etanol), en lugar del DTT.

Las muestras de cada curva de plegamiento se prepararon utilizando PBS y un stock 10 M de urea. Las muestras a leer, ya sea por fluorescencia (espectrofluorómetro LS50B, Perkin Elmer) o por CD (espectro polarímetro J-710, marca Jasco), se prepararon del mismo modo: primero se medía el volumen correspondiente de urea, después el amortiguador, a cada dilución se añadió una cantidad constante de HsTIM, utilizando una jeringa Hamilton. Posteriormente, las muestras se incubaron a 25 °C durante 24 h.

Primero se tomaron muestras de HsTIM (concentración final 0.01 mg mL⁻¹, 0.3 μ M), que rápidamente se mezclaron con las diluciones de urea, correspondientes para tener una concentración final de 3, 4.5 y 5 M en un volumen final (V_T) de 1 mL, y se leyó el decaimiento de la emisión de fluorescencia a 335 nm, obtenida al excitar a 295 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Previo al análisis de los datos obtenidos en cada serie de diluciones medida por fluorescencia, se determinó el centro de masa espectral (COM) a partir de la intensidad de la emisión (I_λ) obtenida a diferentes longitudes de onda: $COM = \sum \lambda I_\lambda / \sum I_\lambda$

Para realizar el análisis de cada serie de diluciones, monitoreadas por CD y por fluorescencia intrínseca, se ajustaron los datos obtenidos a un modelo de decaimiento tanto monoexponencial como biexponencial, utilizando el software SAVUKA 6.2.25. Esto con el objeto de estimar el tiempo de incubación de las muestras para determinar las condiciones al equilibrio.

Las pruebas de replegamiento se realizaron partiendo de una dilución incubada por 2 h que contenía 700 μ L de urea [10 M] y 300 μ L de proteína, que se diluyó en amortiguador con el volumen de urea adecuado para garantizar determinado valor de la concentración final tanto de urea como de HsTIM.

El ajuste de los datos espectroscópicos colectados se llevó a cabo utilizando el software especializado SAVUKA 6.2.25, para calcular los valores de la energía libre de la desnaturalización a diferentes concentraciones de urea.

Para presentar los datos y poder comparar ensayos independientes, los valores de elipticidad, en el caso de los ensayos de CD, y los valores de los centros de masa espectrales, de los ensayos de fluorescencia, se normalizaron calculando la fracción de proteína desnaturalizada con respecto a la proteína en estado nativo (se considera como 100 % las señales a 9 M de urea), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f_{(U/N)} = \frac{Y_{obs} - (m_N * [urea] + b_N)}{(m_U * [urea] + b_U) - (m_N * [urea] + b_N)}$$

Donde, Y_{obs} es la señal considerada (centro de masa, o elipticidad), m_N es la pendiente de la línea base del estado nativo y b_N es el intercepto, m_U es la pendiente de la línea base del estado desplegado y b_U es su intercepto.

Debido a la ley de acción de masas, para una proteína dimérica la transición de desplegamiento se mueve a concentraciones más altas de agente desnaturalizante al aumentar la concentración del monómero. Para proteínas diméricas la dependencia de la concentración puede ser evaluada mediante el punto medio de la transición (C_M), donde $F_{app} = 0.5$. C_M se calculó mediante la siguiente relación:

$$C_M = \frac{\Delta G + RT \ln[P_{total}]}{m}$$

Donde ΔG , es la energía asociada a la transición ($Kcal\ mol^{-1}$), y m , es la pendiente de la zona de transición ($Kcal\ mol^{-1}\ M^{-1}$), C_M tiene unidades de concentración del agente desnaturalizante. De acuerdo a lo indicado por Gloss (2009).⁵¹

(VIII) Cálculos del área de la superficie accesible al disolvente (ASA) de los residuos aromáticos de la HsTIM.

Se realizó el cálculo del área accesible al solvente (ASA), después de ubicar la posición de los triptófanos en la secuencia y en los elementos de estructura secundaria, mediante el programa en línea desarrollado por Mark Gerstein y colaboradores⁵², para el cálculo de superficies. El porcentaje indicado en la tabla VIII se obtuvo usando la suma de los valores correspondientes para cada residuo de triptófano y la superficie expuesta para toda la proteína (Anexo VI).

Resultados y discusión

Sobre expresión y purificación de la triosa fosfato isomerasa humana

El plásmido utilizado para sobre expresar la HsTIM se diseñó y produjo por el grupo del Dr. Gómez-Puyou del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Éste contiene la secuencia (codones optimizados para *E. coli*) del gen de la HsTIM, con una fusión de 6 histidinas y el sitio de corte de la TEV-proteasa en el extremo amino terminal; el gen está flanqueado por los sitios *NdeI* y *BamHI* en un vector de clonación pET-3a.

La secuencia que se muestra en el Anexo V, se obtuvo al secuenciar el plásmido purificado, utilizando los oligos T7. Ésta corresponde a la secuencia del gen de la triosa fosfato isomerasa (TPI1, *gene ID 7167*, según la base de datos genbank), después de inicio se encuentra la adición de la fusión de histidinas, también están presentes los sitios de reconocimiento y de corte de la TEV proteasa, lo cual genera dos cambios al inicio de la secuencia de proteína después de realizar el corte con la proteasa: la adición de un residuo de glicina y el cambio de la metionina inicial por una histidina (figura 8).



Figura 8. Cambios en la secuencia de la HsTIM. La secuencia de la enzima silvestre inicia con los aminoácidos: MAPSR.

La proteína recombinante se sobre expresó, en varios lotes mediante un sistema de inducción por IPTG. En cada lote la proteína purificada se precipitó en sulfato de amonio y se almacenó a 4 °C, hasta reunir una buena cantidad (al menos 15 mg mL⁻¹). Se puede decir que la sobre expresión de la HsTIM fue exitosa mediante el sistema elegido debido a que la banda de mayor intensidad

observada al llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida (15 %) bajo condiciones desnaturalizantes del lisado total de las células inducidas correspondiente al peso molecular de los monómeros de la TIM (figura9). Así mismo, la electroforesis de las fracciones de proteína clarificada del extracto total (figura 9A) y de la proteína digerida (figura 9B) muestran que la HsTIM fue purificada adecuadamente, el porcentaje de pureza obtenido iba del 96 al 99.9%.

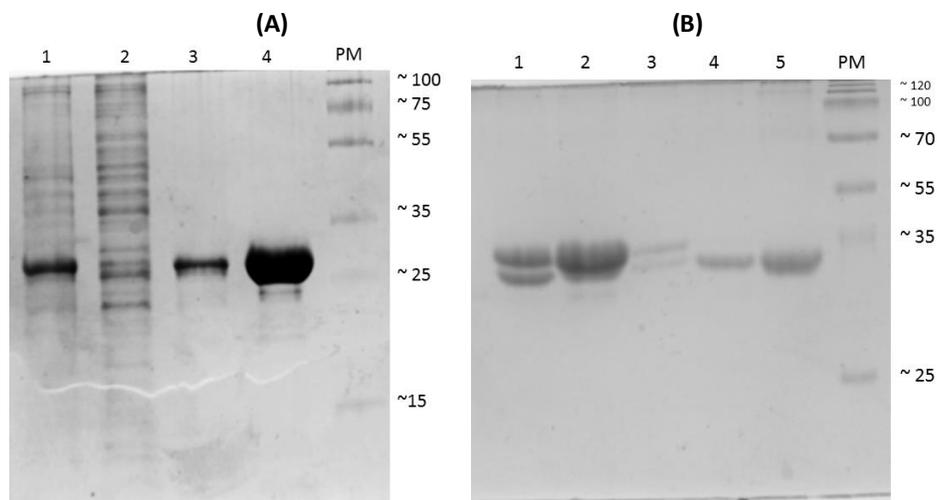


Figura 9. Proceso de purificación de la HsTIM sobre expresada. (A) Purificación de HsTIM, a partir del extracto total, 1-fracción soluble del lisado total, 2-fracción no afín a la columna NTA-Ni(II), 3-elución a 300 mM de imidazol, 4-fracción obtenida a 500 mM de imidazol. (B) Fracciones obtenidas al purificar la mezcla de digestión de la fusión de histidinas, 1-TEV proteasa, 2-HsTIM antes de digerir, 3-elución a 300 mM de imidazol, 4- proteína obtenida a 50 mM de imidazol, 5-fracción no afín a la columna NTA-Ni(II).

Los mayores rendimientos de HsTIM se obtuvieron al purificar proteína sobre expresada en un fermentador de 10 L con agitación y aireación continua, obteniéndose hasta 12.5 mg de proteína purificada por cada 5 g de pellet, en dicha ronda la proteína aislada de la mezcla de proteólisis (V_T de 59.5 mL) tenía una concentración de 0.77 mg mL^{-1} . Es importante señalar que no toda la HsTIM utilizada provenía de la producción en el fermentador, se recurrió a dicha estrategia, para ahorrar el tiempo de sobre expresión antes de cada ronda de purificación.

Caracterización de la proteína recombinante.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante la absorción UV de proteína, aplicando la ley de Lambert-Beer; para el cálculo de la concentración de cada muestra de proteína se utilizó el coeficiente de extinción molar determinado experimentalmente mediante el método de Eldelhoc, por Pace y colaboradores para la OcTIM ($\epsilon = 33640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁵³, debido a que este valor no varía mucho del valor calculado a partir de la secuencia de la HsTIM por medio del servidor de ExPASy ($33700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

El espectro de absorción en el UV de la HsTIM (figura 10) también fue útil para evaluar la integridad estructural de la proteína: cuando la proteína está agregada se observa una pendiente pronunciada en la línea base del espectro (320 a 350 nm). Sin embargo, éste por sí solo, no es prueba suficiente para concluir que la HsTIM recombinante obtenida se encontraba en el estado nativo. Por lo que, antes de realizar los ensayos de plegamiento, en primer lugar se evaluó la integridad de la estructura secundaria, observando el espectro de CD en el ultravioleta lejano de una alícuota de HsTIM después de purificar y concentrar, en la figura 10-II se muestra un ejemplo representativo de los espectros obtenidos. Se determinó el

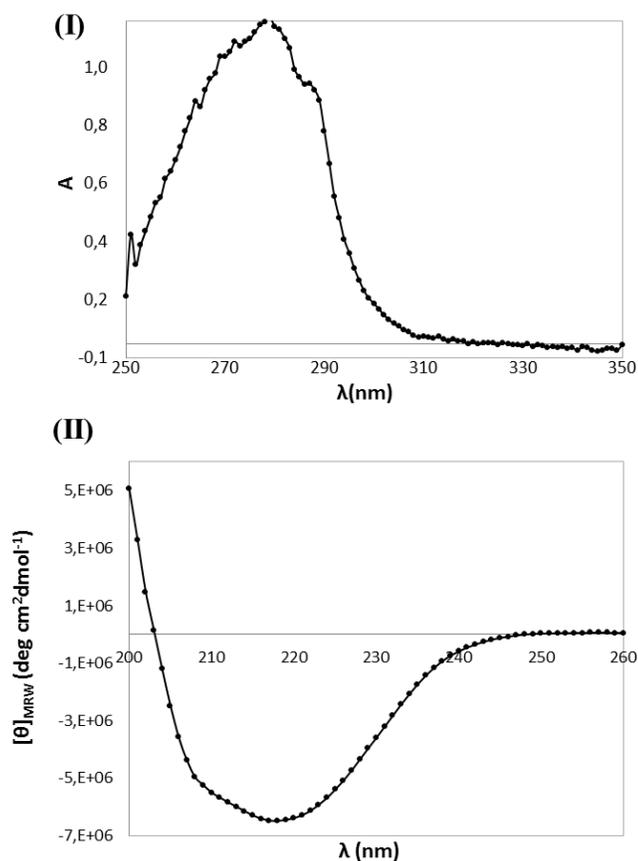


Figura 10. Espectros de la HsTIM (I) Espectro de absorción en el UV. Para cuantificar se tomó el valor a 280 nm corregido utilizando el valor extrapolado de la línea base del espectro a 280 nm. (II) Espectro de CD en el ultravioleta lejano, la muestra de HsTIM tenía una concentración de 1.15 mg mL^{-1} .

porcentaje de estructura secundaria utilizando el software K2D2, desarrollado por Pérez-Iratxeta y Andrade-Navarro (2008)⁴², obteniéndose que hay 50.5% de hélices α , 15.5% de hebras β , 16.0% de asas y 17.9% de arreglos al azar, los cuales son valores idénticos a los reportados para distintas variantes de la TIM (*Plasmodium falciparum*, de levadura y de humano).^{50,54,55}

Dado que la dimerización juega un papel importante en la actividad y estabilidad de la HsTIM^{32,56}, antes de realizar los ensayos de plegamiento, se determinó la actividad específica de la HsTIM, según el método de Plaut y Knowles⁴⁹, evaluando el consumo del cofactor (NADH) en la reacción acoplada de la α -Glicerofosfato deshidrogenasa (α -GDH), que es 1:1 respecto al consumo de sustrato de la TIM, D-GAP⁵⁰. Se obtuvo una actividad específica de 7998 (± 456) U mg^{-1} , que está dentro del mismo orden de magnitud que el reportado por Orosz y colaboradores para la triosa fosfato isomerasa humana recombinante, el valor que ellos determinaron fue de 8000 U mg^{-1} .⁵⁵

Estudios al equilibrio

(a) Determinación del tiempo de incubación

Para determinar el tiempo que tardaría nuestra variante en alcanzar el equilibrio, bajo las condiciones propuestas, los primeros ensayos de desplegamiento estuvieron enfocados a determinar el tiempo que requería la enzima en dar una señal constante a diferentes concentraciones de urea. Se eligieron los valores 3.0, 4.5 y 5.0 M debido a que en la zona de transición la reacción de plegamiento es más lenta.

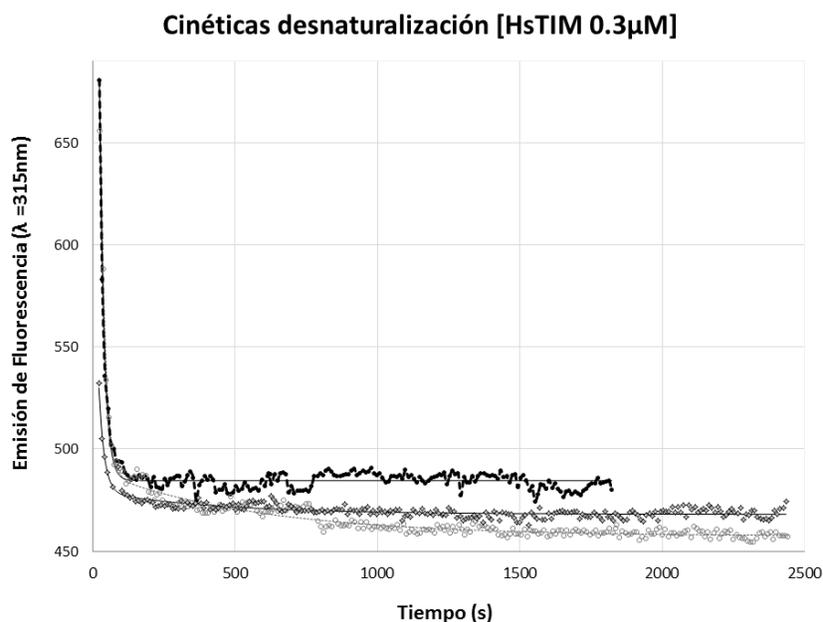


Figura 11. Cinéticas de desnaturalización. Se muestran las 3 cinéticas de desnaturalización que se realizaron: a 3 M (circunferencias gris claro, línea punteada), a 4.5 M (círculos negros, línea continua) y a 5 M (circunferencias gris oscuro, línea continua) de urea.

En la figura 11, se muestra la disminución de la emisión de fluorescencia a 335 nm, al parecer se observó una señal constante después de 40 min de reacción, para verificarlo se llevó a cabo el ajuste de los datos a modelos de decaimiento mono y biexponenciales, de acuerdo al cálculo, el tiempo que tarda la HsTIM en alcanzar la fase lenta va de 78 min a 95 min (Anexo III). Multiplicando el

valor de vida media de la reacción por 10 para asegurar que se haya alcanzado el equilibrio, nos da un tiempo de aproximadamente 15 h. Por lo que, se consideró que un día de incubación a 25 °C sería suficiente para que las muestras alcancen el equilibrio.

Cuando se desea evaluar la presencia de intermediarios transitorios en la ruta de plegamiento de una proteína se deben realizar experimentos de cinética de plegamiento. Los tres ensayos anteriores estuvieron enfocados a determinar el tiempo que serían incubadas las muestras de cada dilución de urea, para garantizar las condiciones de equilibrio. Sin embargo, vale la pena resaltar que en dos de los tres casos, el cambio observado se tuvo que ajustar a la suma de dos exponenciales, lo cual sugiere más de una transición. Es posible que exista una mezcla de dos poblaciones con una velocidad de desplegamiento diferente o que se estén detectando etapas secuenciales en la desnaturalización. La evidencia para discernir entre ambas posibilidades puede ser obtenida mediante un estudio de cinética más completo donde se incluyan experimentos de “doublé jump”⁵⁷, en los que se estudia el efecto del tiempo sobre la amplitud de cada una de las fases cinéticas observadas. Este tipo de estudios están fuera del alcance de la presente tesis.

(b) Comprobación de la reversibilidad de la reacción de plegamiento

Toda vez que se pretende determinar la estabilidad termodinámica de una proteína, primero es necesario demostrar que la reacción que va del estado desnaturalizado al estado nativo es reversible. Para determinar si la desnaturalización química de la HsTIM es un proceso reversible o no, se compararon las señales de CD para dos series de diluciones. En la primera, las muestras con proteína en estado nativo se equilibraron en el amortiguador con el volumen correspondiente de una disolución concentrada de urea (7 M), se tomaron alícuotas que se diluyeron para alcanzar las diferentes concentraciones del desnaturalizante estudiadas, abarcando las regiones pre transición y post transición; así la reacción comienza del estado desplegado. En una segunda muestra, la proteína 10 veces más concentrada que en el caso anterior, se lleva a

la concentración más baja de urea que permite garantizar que la proteína se encuentra desnaturalizada, y en este caso la reacción comienza en el estado nativo. Ambas series se dejan equilibrar para que gradualmente recuperen su estructura secundaria, después se compara la señal de cada grupo de muestras.

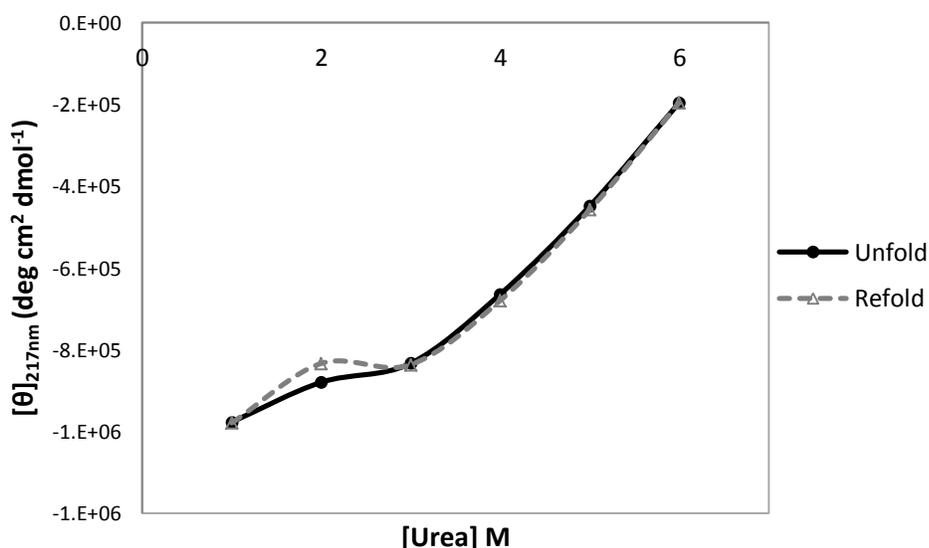


Figura 12. Gráfico del ensayo de replegamiento. Se comparó el cambio en la elipticidad molar para las muestras desnaturalizadas (unfold) y para las muestras renaturalizadas (refold), con respecto a la concentración de urea. Cada muestra contenía una concentración constante de HsTIM ($5.7 \mu\text{M} = 0.3 \text{ mg mL}^{-1}$).

Al desnaturalizar a la enzima en 7 M de urea, también se perdió la actividad enzimática, después de diluir la urea y de incubar las muestras durante 24h, también se observó la recuperación de hasta el 90% de la actividad enzimática. En el gráfico mostrado en la figura 12 se observa el cambio en la elipticidad molar de cada serie con respecto a la concentración de urea. El solapamiento entre los puntos de desnaturalización y renaturalización, permite concluir que, bajo nuestras condiciones, el proceso es reversible. Cuando se llevan a cabo ensayos de plegamiento al equilibrio es importante corroborar que la transición $N \leftrightarrow U$, sea reversible, de otro modo bajo esas condiciones en la disolución sólo habrá una población predominante, N o U, en lugar de una combinación de ambas poblaciones recambiándose constantemente (equilibrio químico).

En 2007, González y Nájera⁵⁸, evaluaron el plegamiento de la TIM humana, en ese trabajo muestran los ensayos de renaturalización química que llevaron a cabo usando urea y cloruro de guanidino (GdnCl), monitorearon tanto los cambios en la fluorescencia intrínseca como en la actividad enzimática. A diferencia de nuestros resultados, cuando realizaron el replegamiento a 25 °C siempre observaron una histéresis, sin importar el agente desnaturizante usado, ni el tiempo de incubación (24, 48 o 72 h), por ello realizaron los experimentos restantes a 37 °C. Esta diferencia con los resultados que se obtuvieron al evaluar la reversibilidad del proceso puede deberse a que las condiciones de plegamiento utilizadas en ambos casos fueron distintas. Las pruebas de plegamiento en el presente trabajo fueron realizadas en un amortiguador de fosfatos [20 mM] pH 7.5 con 0.5 mM de EDTA y 70 µL de 2-ME, por otro lado, los ensayos de González y Nájera, se llevaron a cabo en un amortiguador de Trietanolamina [100 mM] pH 7.4, con 10 mM de EDTA y 1 mM de DTT, además de que la variante que ellos utilizaron corresponde a la secuencia de la enzima silvestre.

Con el objeto de comparar el cambio tanto de la estructura secundaria como de la estructura terciaria de la HsTIM, después de comprobar la reversibilidad del proceso, se prepararon series de diluciones con concentración variable de urea para evaluar el cambio de conformación de la triosa fosfato isomerasa humana durante la desnaturización química al equilibrio, cada serie de experimentos se realizó por duplicado y contenían una concentración constante de HsTIM y se leyeron a 25°C, dado que al desnaturizar la proteína se observan diferencias significativas en las señales de fluorescencia intrínseca y de CD (figura 13).

Toda vez que se desea evaluar la presencia de intermediarios estables en la ruta de plegamiento de una proteína, es importante comparar los resultados obtenidos al monitorear los cambios de conformación mediante técnicas complementarias bajo las mismas condiciones, ya que son sensibles a diferentes propiedades: el CD, detecta cambios en la estructura secundaria y la fluorescencia intrínseca, en la estructura terciaria.

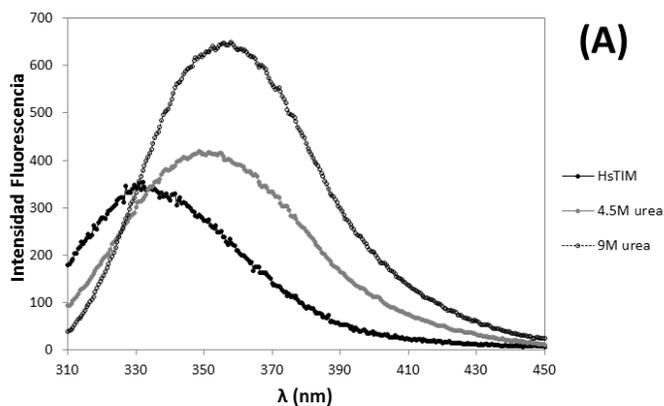
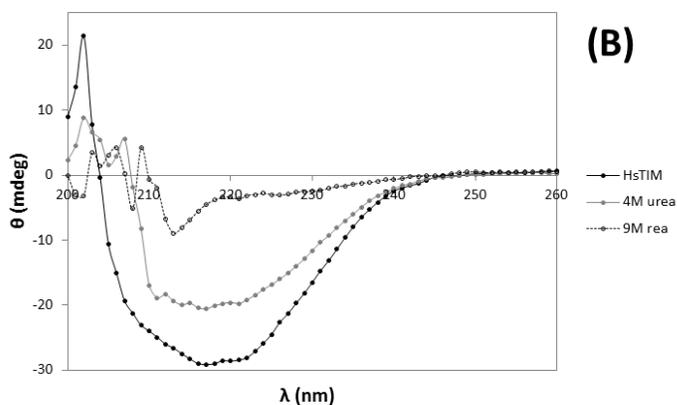


Figura 13. Cambio en la señal de los espectros de HsTIM con respecto al aumento de la concentración de urea. Fluorescencia intrínseca (A) y en el espectro CD (B).



Monitoreo de la estructura secundaria

Debido a que TIM es una proteína dimérica, se planteó evaluar el efecto de la concentración de proteína sobre la estabilidad termodinámica de la proteína (25 °C). Para ello se realizaron curvas de desplegamiento, con 0.3 mg mL^{-1} ($5.7 \text{ } \mu\text{M}$) y 0.09 mg mL^{-1} ($1.8 \text{ } \mu\text{M}$) de HsTIM. Las concentraciones utilizadas marcan los límites (inferior en el caso de CD y superior en el caso de FI) con que se puede trabajar: a cantidades más bajas de proteína, su señal es más difícil de detectar, y para utilizar concentraciones mayores a 0.3 mg mL^{-1} de HsTIM, era necesario poner a dializar la proteína a una concentración muy alta y se observó que parte importante de ella se agregaba durante la diálisis (a 4 °C).

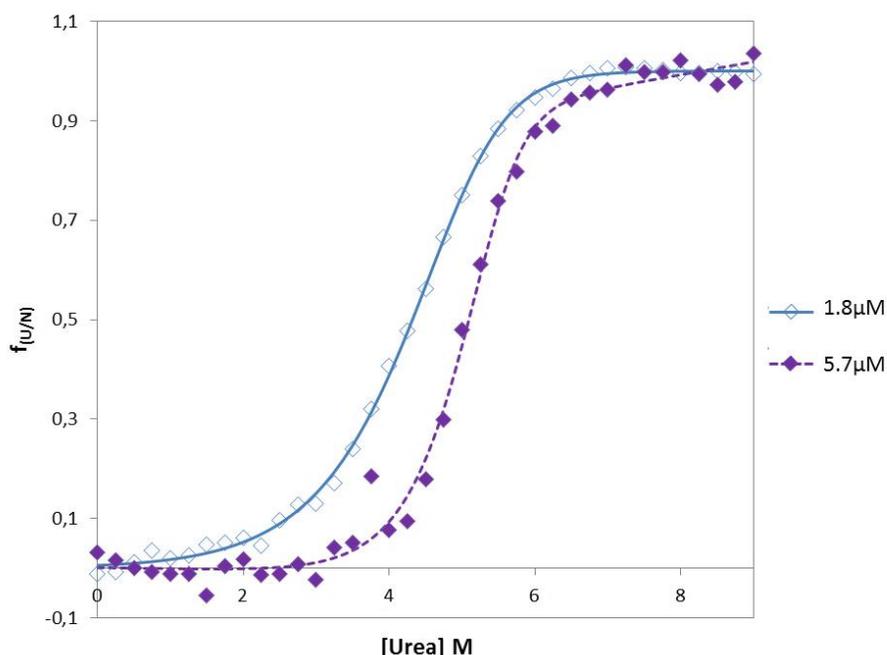


Figura 14. Curvas de desnaturalización por urea de la HsTIM. Se muestran los ensayos de CD realizados utilizando diferentes concentraciones de proteína.

Tabla IV. Parámetros termodinámicos calculados a partir de la pérdida de la estructura secundaria en la desnaturalización.

[HsTIM] μM	Modelo	ΔG (Kcal mol ⁻¹)	m (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_M [M]
1.8	2 estados	14.8 (±1.8)	1.5 (±0.3)	4.6 (±2.1)
5.7	2 estados	17.5 (±1.1)	2.1 (±0.2)	4.9 (±1.2)

Como se esperaba, dado que se trabajó con una proteína dimérica, los datos obtenidos por CD muestran que la desnaturalización de la HsTIM es un evento dependiente de la concentración de proteína: al aumentar la concentración de proteína en los ensayos de plegamiento también aumenta la concentración media de urea (tabla IV) lo cual correlaciona con los valores calculados de energía libre asociada a la transición que se incrementa con respecto al aumento de la concentración de proteína. Así mismo se observa que la cooperatividad del evento se incrementa con la concentración de proteína (tabla IV, figura 14). Tanto los

datos, como el ajuste de los mismos, sugieren que la transición del estado nativo al estado desplegado es un evento concertado, lo que indicaría que la dimerización se encuentra acoplada a la reacción de plegamiento.

La HsTIM es menos estable que la variante de Mainfroid y colaboradores,^{32,43} la cual tenía una estabilidad conformacional de $19.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para una concentración de 0.1 mg mL^{-1} (aproximadamente $1.8 \text{ }\mu\text{M}$), en el presente trabajo el valor calculado correspondiente a dicha concentración de proteína es de $14.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Esto puede deberse a que el pH y composición de las diluciones utilizadas en ambos casos son distintas: Mainfroid y colaboradores utilizaron un amortiguador de Tris-acetato [50 mM] pH 8.0, para los ensayos realizados en este trabajo se utilizó un amortiguador de fosfatos [10 mM] pH 7.5, pero el patrón de desnaturalización acorde a un modelo de dos estados es idéntico en ambos casos. Para otras especies también se observa que diferentes condiciones de dilución influyen en el valor de energía libre calculado, por ejemplo, en 2001 Pan y colaboradores, al evaluar la desnaturalización química de la TIM del músculo conejo, calcularon una estabilidad conformacional más alta ($33.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$) del valor que calcularon Rietveld y Ferreira (17 Kcal mol^{-1}) para la misma variante, en ambos casos utilizaron cloruro de guanidino como agente desnaturalizante, sin embargo, tanto la fuerza iónica como el pH de sendas series de diluciones fue distinta^{37,48}.

Al comparar los valores obtenidos para la HsTIM con respecto a los reportados para variantes de especies, que tienen un menor grado de identidad, se puede concluir que esta enzima presenta una baja estabilidad conformacional, cuya magnitud es similar al reportado para las TIM de levadura y de *Trypanosoma brucei* (tabla III).^{31,36}

Monitoreo de la estructura terciaria

Si la desnaturalización química de nuestra variante, HsTIM, es un proceso concertado, la pérdida de la estructura, secundaria y terciaria, así como la disociación de los monómeros deben ocurrir simultáneamente; para obtener esa

evidencia, se procedió a analizar el cambio de la estructura terciaria con respecto al aumento de la concentración de urea.

Entonces, se realizaron series de diluciones a cuatro diferentes concentraciones (desde 0.3 hasta 5.7 μM) de HsTIM y se evaluó el cambio en el perfil de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína.

En la tabla V, se muestran los valores de energía libre y de m calculados en cada caso, así como los valores de la concentración media de agente desnaturizante. Debido a los datos de cada serie se ajustaron mejor a un modelo de dos estados que a los modelos de tres estados, se puede concluir que en la desnaturalización de la HsTIM la pérdida de la estructura terciaria es un evento concertado.

Tabla V. Parámetros termodinámicos calculados para el ajuste de los datos de fluorescencia

[HsTIM] μM	Modelo	ΔG (Kcal mol ⁻¹)	m (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_m (M)
0.3	2 estados	14.2 (± 1.4)	1.7 (± 0.3)	3.1 (± 1.5)
0.6	2 estados	13.6 (± 0.9)	1.4 (± 0.2)	3.6 (± 1.1)
1.8	2 estados	12.1 (± 0.6)	1.0 (± 0.1)	4.2 (± 0.7)
5.7	2 estados	12.9 (± 0.4)	1.5 (± 0.09)	3.8 (± 0.5)

En la figura 15, se muestran las gráficas de cada serie de diluciones de HsTIM leídas por fluorescencia. Los valores de estabilidad conformacional caen dentro del mismo intervalo (12-14 Kcal mol⁻¹, tabla V) independientemente de la concentración de proteína utilizada en cada serie, del mismo modo, los valores de m parecen ser constantes, con excepción de la curva que se realizó a 1.8 μM de proteína (los valores de m se mantienen entre 1.4 y 1.7 Kcal mol⁻¹ M⁻¹, tabla V). Esto es diferente tanto del comportamiento esperado en proteínas oligoméricas, según la ley de acción de masas, como de los resultados obtenidos para la desnaturalización monitoreada por CD.

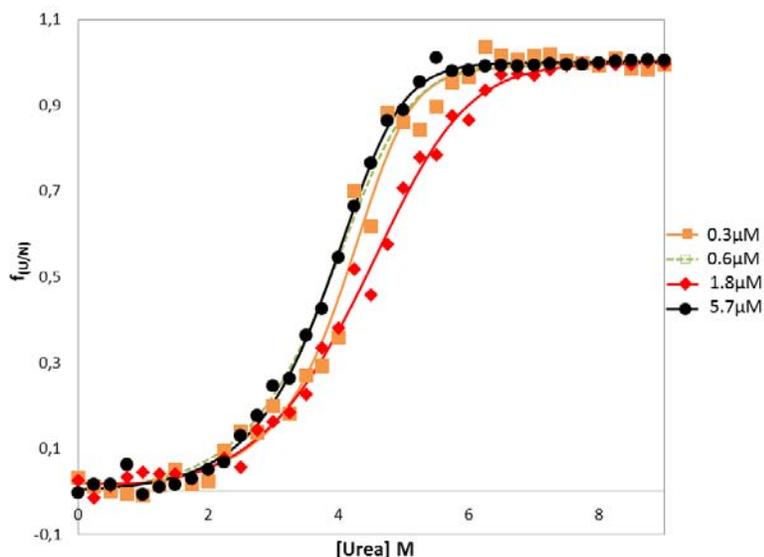


Figura 15. Curvas de desnaturalización por urea de la HsTIM. Se muestran los ensayos de fluorescencia realizados utilizando diferentes concentraciones de proteína.

Al evaluar la cinética de plegamiento de la TIM de músculo de conejo utilizando como agente desnaturalizante cloruro de guanidino, Rietveld y Ferreira (1998), también observaron desviación de la ley de acción de masas asociaron esta situación al hecho de que la energía de activación para el intercambio de subunidades es alta, entonces, el ensamble muestra poblaciones heterogéneas en rangos de tiempo biológicamente relevantes⁴⁸. La interface de dimerización de la TIM es la región más larga de la secuencia y está estabilizada por interacciones más fuertes que en el resto de la molécula²⁷; Mainfroid y colaboradores determinaron, experimental y teóricamente, que la contribución de la asociación de subunidades ($\Delta G_{\text{asociación}}$) en la de desnaturalización de la HsTIM representa casi un 74 % de la energía involucrada en el proceso (14 Kcal mol^{-1} el total era de 19 Kcal mol^{-1})⁴³, esto correlaciona con el hecho de que en este trabajo la pérdida de la estructura secundaria no esté acoplada a la separación de los monómeros. En nuestro caso, se suma el hecho de que en el medio de la proteína hay fosfatos (la disolución amortiguadora fue PBS), y la TIM une a los iones fosfato en el sitio

activo (residuos), que está en la interface de ambas subunidades, entonces este pudo haber sido un factor que favoreció el predominio de la especie dimérica.

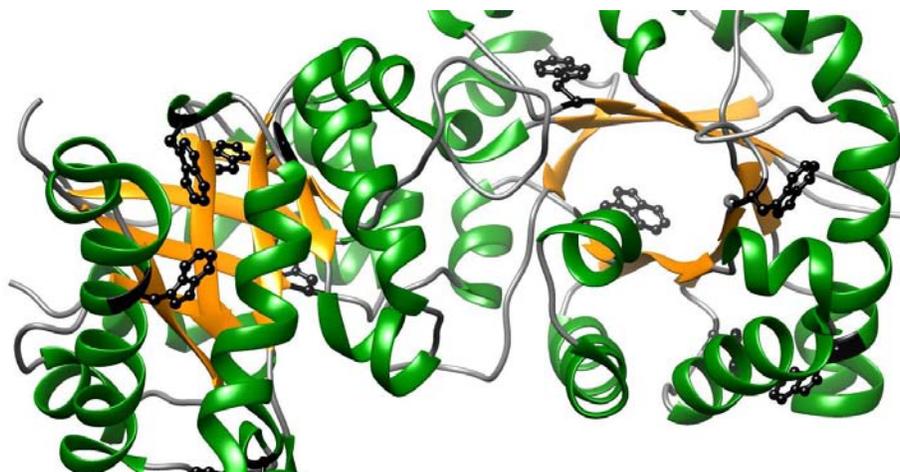


Figura 16. Localización de los residuos de triptófano en la triosa fosfato isomerasa humana, se muestran las cadenas laterales en negro, se observa que ninguno de ellos está en la interface.

Sin embargo, el hecho de que en los ensayos de fluorescencia intrínseca de triptófano (W) no se detectó la disociación de los monómeros de la HsTIM, puede deberse a que dichos residuos no se encuentran en la interfase de dimerización, de modo que al aumentar la concentración de urea en el medio, el cambio de señal corresponde sólo a la exposición de los fluoróforos. Para corroborar la premisa anterior, se realizó el cálculo del ASA (“accessible Surface área”) correspondiente a cada residuo de W en el estado nativo; ambas cadenas polipeptídicas de la triosa fosfato isomerasa humana tienen cinco residuos de W, los cuales se encuentran en las posiciones 12, 90, 157, 168 y 191 (figura 16). Los bajos porcentajes de ASA muestran que dichos residuos se encuentran en el interior de la proteína (tabla VI y figura 17), lo cual es consistente con lo observado en los espectros de fluorescencia para cada titulación con urea: a bajas concentraciones de urea la excitación a una longitud de onda de 295 nm, genera un máximo de emisión a 331 nm (figura 13-a), lo cual sugiere que los W se encuentran en un ambiente relativamente hidrofóbico⁵⁹; en altas concentraciones de urea, el máximo de emisión se desplaza a 358 nm (figura 13-a), como normalmente se observa para los residuos de W expuestos⁵⁹.

Tabla VI. Triptófanos en la HsTIM

Posición	Estructura secundaria	ASA (\AA^2)	%
12	$\beta\alpha$ -1	0.45	0.005
90	β 4	22.42	0.251
157	$\alpha\beta$ -5	32.02	0.333
168	$\beta\alpha$ -6	49.06	0.304
191	α 6	27.22	0.259

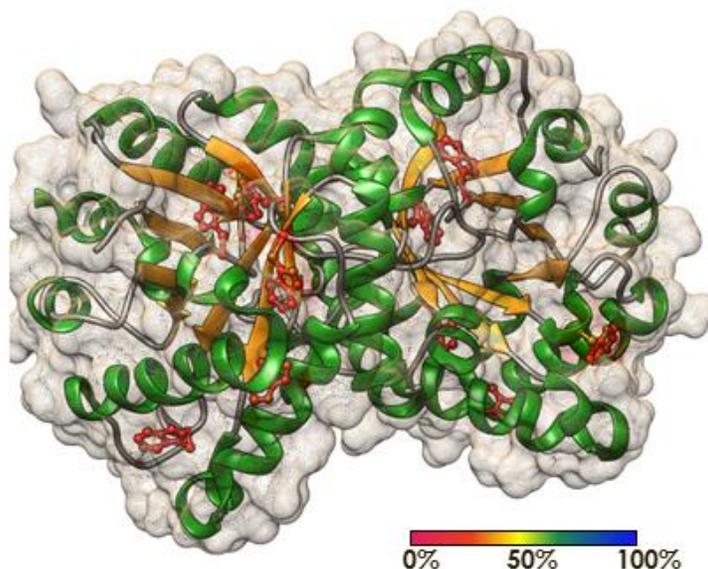


Figura 17. Imagen generada mediante el análisis del ASA realizado para los W en la estructura de la HsTIM utilizando los paquetes del software especializado UCSF Chimera (NIGMS P41-GM103311). La cadena lateral de cada W se encuentra señalada, el color rojizo fue resultado del cálculo: las regiones más expuestas se indican en tonos que van de violeta a azul y las regiones que están menos accesibles al solvente se indican en tonos que van de naranja a rojo. Esto tiene correlación con los valores indicados en la tabla VIII.

El hecho de que no haya una dependencia en la concentración de proteína en el cambio de estructura terciaria sugiere que durante el plegamiento de la HsTIM, el empaquetamiento de los residuos aromáticos ocurre después de que las subunidades se ensamblaron. Entonces en la reacción de desplegamiento, primero hay una expansión de la estructura que disminuye los contactos en la estructura terciaria y permite la entrada de agua, cambiando el ambiente en que se encuentran los residuos aromáticos. Conforme la expansión continúa, eventualmente se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen a la estructura provocando la disociación y desplegamiento de las subunidades.

Cambio en la estructura secundaria vs. Cambio en la estructura terciaria

Para determinar la presencia del intermediario se procedió a evaluar los datos obtenidos al monitorear el cambio de estructura secundaria y de estructura terciaria para las series con concentraciones idénticas de proteína (figuras 18 y 19).

Los cambios de conformación de la HsTIM al desnaturalizarla con urea indican que la estructura terciaria se pierde de manera menos cooperativa que la estructura secundaria. Y que, a altas concentraciones de proteína la estructura secundaria es más resistente a la concentración de urea que la estructura terciaria.

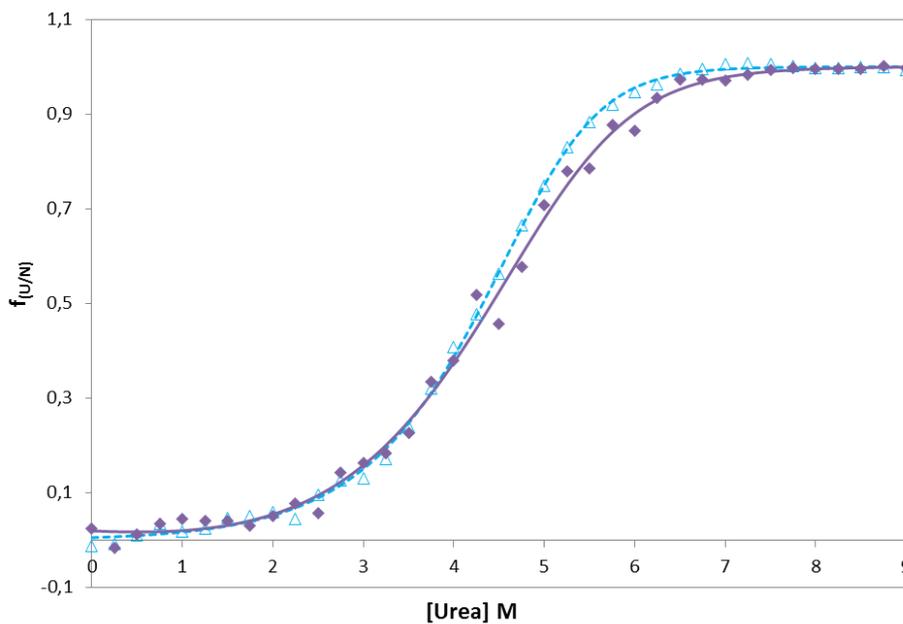


Figura 18. Sobre posición de las curvas de desnaturalización de FI (rombos morados, línea continua) y de CD (triángulos azules vacíos, línea punteada) a 1.8 μM de HsTIM.

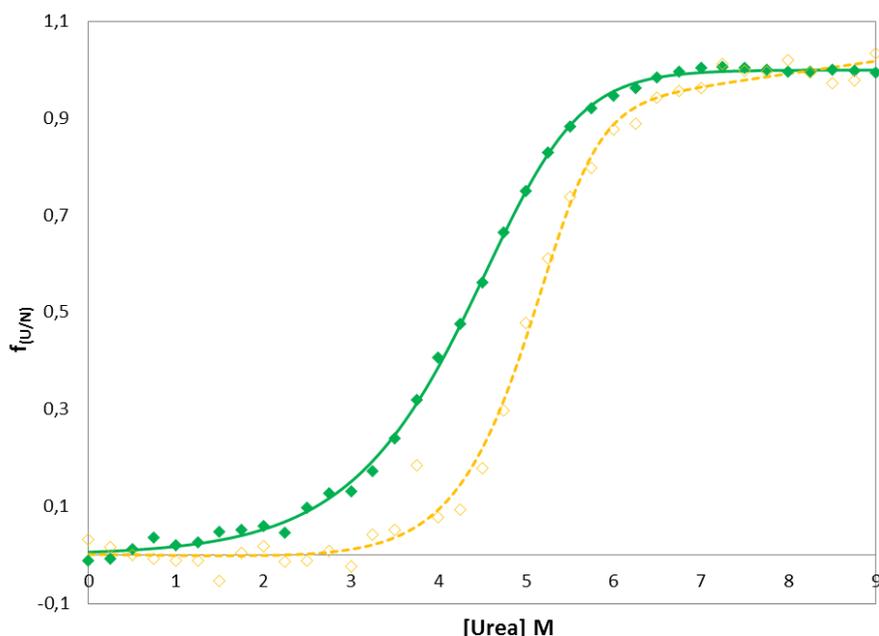


Figura 19. Sobre posición de las curvas de desnaturalización de FI (rombos verdes línea continua) y de CD (rombos vacíos línea punteada amarilla) a 5.7 μM de HsTIM.

El hecho de que la estructura terciaria de la cadena polipeptídica en la HsTIM no se pierda de manera simultánea a la estructura secundaria, indica la presencia de un intermediario, en el que probablemente las ocho hélices α y las ocho hebras β se conservan estructuradas aun cuando el plegamiento barril $(\beta/\alpha)_8$ se haya desestabilizado. También se observa la presencia de un intermediario en la desnaturalización térmica de la TIM humana, realizada por Benítez y Rojo (1997), quienes, monitorearon el cambio de estructura de la triosa fosfato isomerasa humana, por fluorescencia intrínseca y por dicroísmo circular: la estructura terciaria se pierde a menor temperatura que la estructura secundaria ⁶⁰.

Entonces para llevar a cabo el cálculo de la energía libre asociada a todo el proceso es necesario ajustar tanto los datos de CD como los de fluorescencia intrínseca a un modelo de más de dos estados. Por esta razón, se procedió a realizar un análisis global para la desnaturalización de la HsTIM utilizando los datos obtenidos para las series de desnaturalización a 1.8 μM y a 5.7 μM de proteína, donde se consideró que la pérdida de la estructura terciaria corresponde

a una primera etapa (unimolecular, dado que la fluorescencia intrínseca de triptófano fue independiente de la concentración de proteína), y que, tanto la pérdida de la estructura secundaria como la disociación de las subunidades ocurren simultáneamente en un segundo paso.

Tabla VII. Valores calculados para cada transición de la desnaturalización de la HsTIM, al realizar el análisis global de los datos obtenidos.

[HsTIM] μM	Serie	Parámetro	Valor	Desviación estándar
1.8	CD	ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	3.805	0.446
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	0.922	0.126
		ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	13.052	1.621
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	1.259	0.265
		z	0.266	0.257
	FI	ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	3.805	0.446
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	0.922	0.126
		ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	13.052	1.621
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	1.259	0.265
		z	0.242	0.268
5.7	CD	ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	3.805	0.446
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	0.922	0.126
		ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	13.052	1.621
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	1.259	0.265
		z	0.112	0.198
	FI	ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	3.805	0.446
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	0.922	0.126
		ΔG_{ni} (Kcal mol ⁻¹)	13.052	1.621
		m_{ni} (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	1.259	0.265
		z	1.000	0.128

Las cuatro series de diluciones (figuras 18 y 19), se ajustaron muy bien al modelo de tres estados propuesto (tabla VII), el cual involucra la presencia de un intermediario dimérico, se obtuvieron los mismos valores para los ensayos a cada concentración de HsTIM (1.8 y 5.7 μM). De manera que la reacción de desplegamiento de la triosa fosfato isomerasa sería la siguiente:

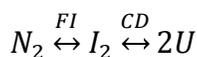


Tabla VII. Valores calculados para cada transición de la desnaturalización de la HsTIM, al realizar el análisis global de los datos obtenidos.

Etapas	Técnica	ΔG (Kcal mol ⁻¹)	m (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)
$N_2 \leftrightarrow I_2$	FI	3.8 (± 0.45)	0.9 (± 0.12)
$I_2 \leftrightarrow 2U$	CD	13.1 (± 1.62)	1.3 (± 0.27)

Dado que la energía libre asociada a la desnaturalización de la proteína puede ser vista como la suma de las energías libres para cada etapa, la estabilidad conformacional de la HsTIM bajo nuestras condiciones experimentales es de $16.9 (\pm 1.45) \text{ Kcal mol}^{-1}$. Pese a que dicho valor está entre los 3 valores más bajos de estabilidad conformacional respecto a los obtenidos para variantes de otras especies (tabla III), está dentro del intervalo para proteínas diméricas.²²

Aunque la HsTIM y la ScTIM presentan una identidad de secuencias del 53% (tabla III) el valor de estabilidad conformacional que se determinó en el presente trabajo es muy parecido al reportado para la TIM de levadura por Nájera y colaboradores (2003), quienes determinaron una estabilidad conformacional de $16.6 (\pm 0.7) \text{ Kcal mol}^{-1}$, pero aunque en ese caso la ruta de plegamiento también es de tres estados, bajo sus condiciones observaron un intermediario monomérico expandido.³⁶

Es interesante que TIM sea un dímero en todas las especies cuya estructura es conocida (o incluso tetramero en algunos termófilos). Los sitios activos funcionan de manera independiente, aunque algunas mutantes en las que se han desfavorecido las interacciones que mantienen a la interface han resultado inactivas²⁷. Sin embargo, a través de evolución dirigida ha sido posible rescatar la actividad en una variante monomérica de la TIM de *Trypanosoma brucei*⁵⁹, lo que sugiere que la actividad no es la característica que ejerce una presión de selección para mantener estas proteínas como dímeros.

En general, la dimerización, es un mecanismo a través del cual las proteínas aumentan su estabilidad. Es interesante resaltar que al inducir cambios estructurales utilizando agentes desnaturalizantes en TIM de otras especies, la asociación de las subunidades juega un papel importante en la reacción de plegamiento, en el caso de la TIM de humano observamos que la dimerización es parte importante incluso del inicio del plegamiento, lo que puede compensar la menor estabilidad que parece tener comparada con las TIM de otras especies, esto también tiene correlación el supuesto de que el intermediario estabilizado bajo las condiciones propuestas sea un dímero, pese a que sea más común

encontrar intermediarios monoméricos en otras especies por ejemplo en TIM de *Trypanosoma brucei*⁶¹ y en TIM de *Oryctolagus cuniculus*.³⁷

Los resultados sugieren que la interface de dimerización es resistente a altas concentraciones de urea para después romperse, entonces, el intermediario del plegamiento al equilibrio debería ser un dímero con los elementos de estructura secundaria formados en el cual los contactos que mantienen la estructura tridimensional son débiles, permitiendo el acceso del solvente (figura 20). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo no aportan información suficiente sobre las propiedades estructurales de la población detectada.

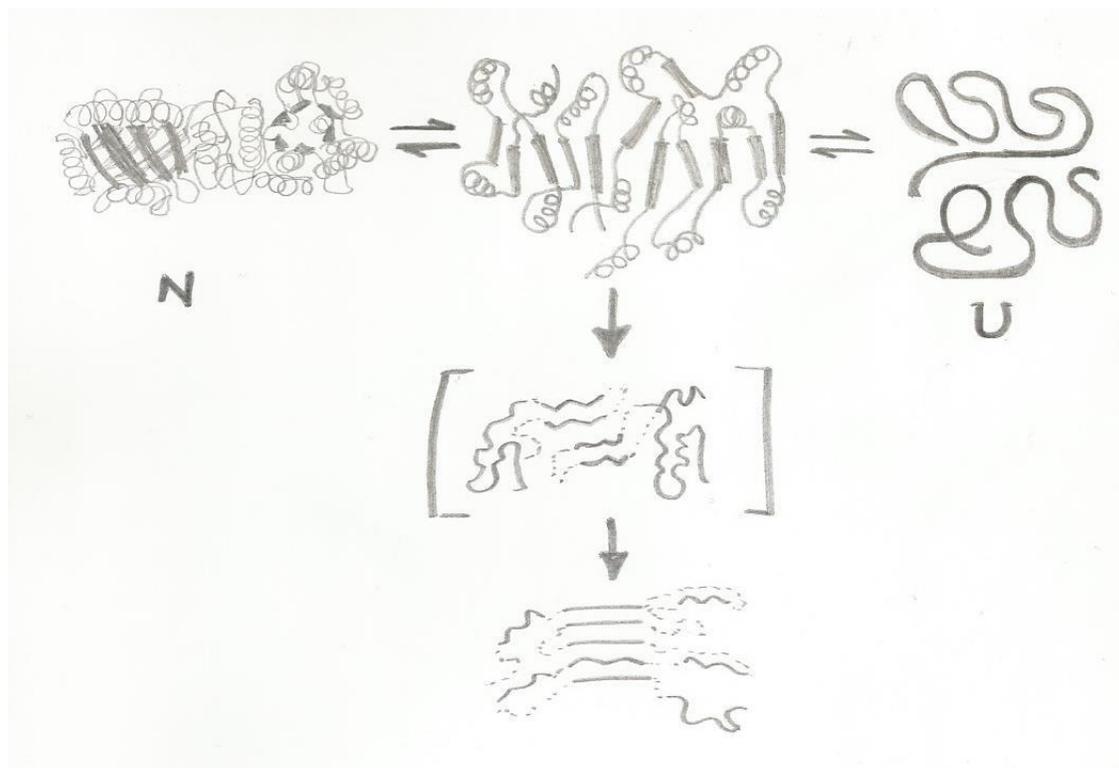


Figura 20. Posible ruta de plegamiento de la HsTIM. Se indica la vía que podrían seguir los núcleos de agregación, si el intermediario poseyera las características estructurales inferidas a partir de los resultados obtenidos.

Los intermediarios de tipo *glóbulo fundido*, mantienen elementos de la estructura secundaria del estado nativo, así como posiciones aproximadas en el espacio, pero su arreglo tridimensional es irregular, debido a que las asas tienen mayor movilidad y a que el empaquetamiento de las cadenas laterales es más pobre que en el estado nativo⁶². El intermediario que se consiguió observar bajo nuestras condiciones de desnaturalización podría tener una conformación que promueva la asociación entre las hojas β (en el estado nativo se encontraban protegidas por las hélices α) de diferentes moléculas de proteína originando núcleos de agregación. De acuerdo a diversos estudios reportados hasta el momento, proteínas que están parcialmente plegadas, con estructura secundaria significativamente intacta, e intermediarios tipo glóbulo fundido, están involucradas en los procesos de agregación fibrilar.^{44,63,64} Para saber si las suposiciones mencionadas anteriormente son ciertas es necesario realizar la caracterización estructural de la población predominante en disoluciones de HsTIM en el intervalo de 3.5 a 5 M de urea.

Conclusiones

La desnaturalización química al equilibrio de la triosa fosfato isomerasa humana es un evento reversible para el cual se determinó una estabilidad conformacional de $16.9 (\pm 1.45) \text{ Kcal mol}^{-1}$, que es relativamente bajo, respecto a los valores reportados para otras variantes y para otras especies, esto parece corroborar el supuesto de que la TIM humana *in vitro* es más propensa a agregarse que la de otras especies.

Evaluar los cambios de conformación, en la estructura terciaria (mediante fluorescencia) y en la estructura secundaria (mediante CD), involucrados en la desnaturalización al equilibrio por urea de la HsTIM, permitió concluir que, pese a que tanto la adquisición de la estructura secundaria como la terciaria ocurren mediante transiciones concertadas, no son eventos simultáneos en el plegamiento de la HsTIM. Entonces el plegamiento *in vitro* de la triosa fosfato isomerasa humana bajo las condiciones propuestas involucra la formación de al menos un intermediario. Este hallazgo provee indicios sobre el proceso de agregación fibrilar que puede sufrir esta proteína, ya que, las moléculas que enriquecen las poblaciones del intermediario, parecen poseer los elementos de estructura secundaria, y debido a que las interacciones intramoleculares que estabilizan la estructura terciaria no son lo suficientemente fuertes, las hebras beta podrían asociarse.

Perspectivas

Sería interesante caracterizar el intermediario involucrado, primero determinando sus dimensiones mediante cromatografía de exclusión molecular, y mediante estudios estructurales de mayor resolución (RMN) se puede demostrar si el intermediario observado en la desnaturalización al equilibrio es de tipo glóbulo fundido.

Es necesario realizar estudio cinético completo de la reacción de plegamiento-desplegamiento. En el cual: se evalué la reacción en tiempos muy cortos (stopped-flow) así como intervalos de tiempo mayor (mezclado manual), se realicen cinéticas de replegamiento y también evaluar las cinéticas a diferentes concentraciones de proteína.

Por último, la baja energía libre calculada para la desnaturalización de la HsTIM, podría deberse a que en el inicio de su secuencia tiene dos residuos distintos (His y Gly) a la proteína nativa, y que éstos se encuentren afectando la red de interacciones intramoleculares que dan forma al arreglo tridimensional de las cadenas poli peptídicas. Para demostrar si lo anterior es cierto, hay que comparar los resultados de los experimentos al equilibrio de la proteína nativa con los obtenidos en el presente trabajo. La subclonación del cDNA de la triosa fosfato isomerasa humana con los codones optimizados para *E. coli* en el vector pTYB1, fue elegida para sobre expresar y purificar la proteína nativa utilizando un sistema mediado por inteína, eliminando así los cambios al inicio de la secuencia. Aún no se ha obtenido el plásmido de HsTIM con la fusión de inteína.

Anexos

Anexo I. Disoluciones

(a) Ampicilina

Se prepararon varias alícuotas de 1mL, pesando 3g que se aforaron a 15mL, para que estuviesen a una concentración de 200mg/mL. A cada medio, LB (tanto sólido como líquido) y medio mínimo, se añadió el volumen adecuado de estas disoluciones para que el antibiótico estuviese a una concentración final de $200\mu\text{g mL}^{-1}$.

(b) Medios

LB

En caso de ser sólido al medio LB se le agregó agar para tener una concentración final del 1.5% (p/v). Para un litro:

20g Triptona

5g de extracto de levadura

10g de NaCl

Medio Mínimo

En cada caso se añadió glucosa como fuente de carbono al 20%, se añadió el volumen adecuado para alcanzar una concentración final de 0.4g/L. Para un litro:

100mL de stock (10X) de sales M9

1mL de vitamina B1 [3.8mM]

1mL MgSO_4 [1M]

0.1mL CaCl_2 [50mM]

300 μL cas-aminoácidos [20%]

Donde, cada litro de Stock Sales M9 (10X) contiene:

5g de NaCl

30g de KH_2PO_4

60g de Na_2HPO_4

10g de NH_4Cl

SOC

Para un litro:

20g de triptona

5g de extracto de levadura

2mL NaCl [5M]

2.5mL KCl [1M]

10mL MgCl_2 [1M]

10mL MgSO_4 [1M]

20mL Glucosa [1M]

(c) Amortiguadores

La primer disolución amortiguadora que se utilizó (amortiguador A), era de fosfatos [20mM] a pH 7.5 y tenía NaCl [150mM] para regular la fuerza iónica. En este amortiguador se realizó la lisis y clarificación del extracto proteico.

El amortiguador B, tenía idéntica composición al amortiguador A, con 500mM de imidazol, ésta disolución se utilizó para generar los gradientes a 50 y 300mM de imidazol durante el proceso de purificación.

Los ensayos de plegamiento se llevaron a cabo en un amortiguador de fosfatos [10mM], pH 8.0 con 0.5mM de EDTA. El agente desnaturizante se encontraba disuelto en un amortiguador de la misma composición.

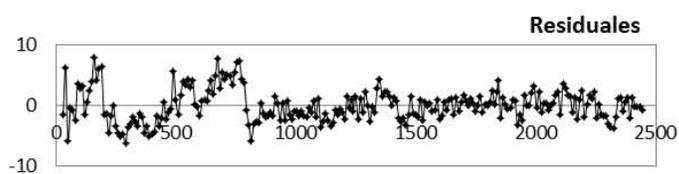
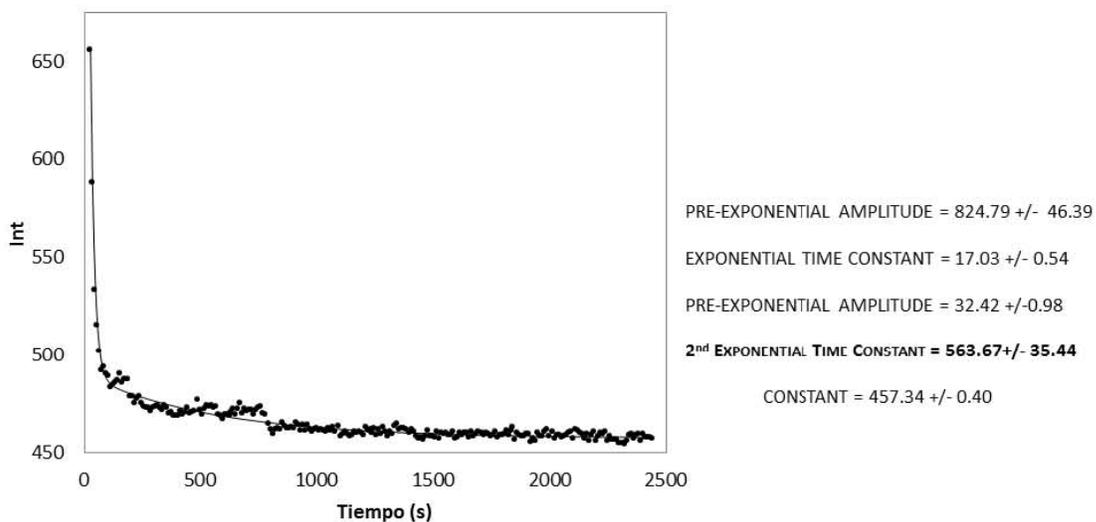
Los amortiguadores de diálisis también fueron de fosfatos [10mM] con EDTA, pH 8.0, pero también se adicionaron 70 μL de 2-ME y sólo el primer recambio contenía DTT (concentración final de 1 μM).

(d) Mezcla de reacción para las pruebas de actividad enzimática

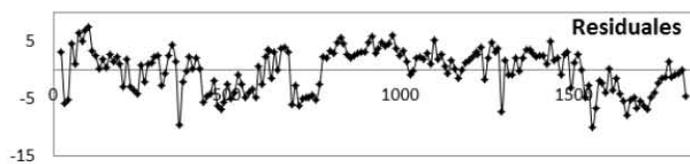
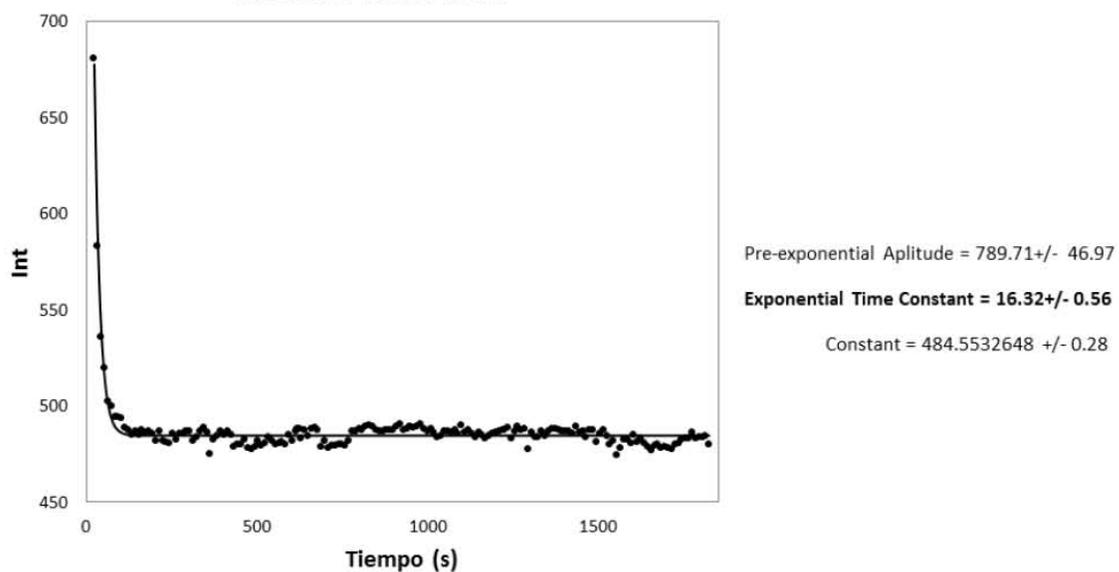
Cada ensayo contenía: 30µL de NADH, 20µL α-GDH, 19µL Na₂AsO₄, 50µL GAP, 20µL HsTIM en 780µL de amortiguador A. En algunos casos se disminuyó el volumen de NADH, para que la lectura inicial (y línea base del ensayo de actividad estuviese en el rango de 1.1 a 1.5 unidades de absorbancia).

Anexo II. Cinéticas de desnaturalización de la HsTIM (0.3 μ M)

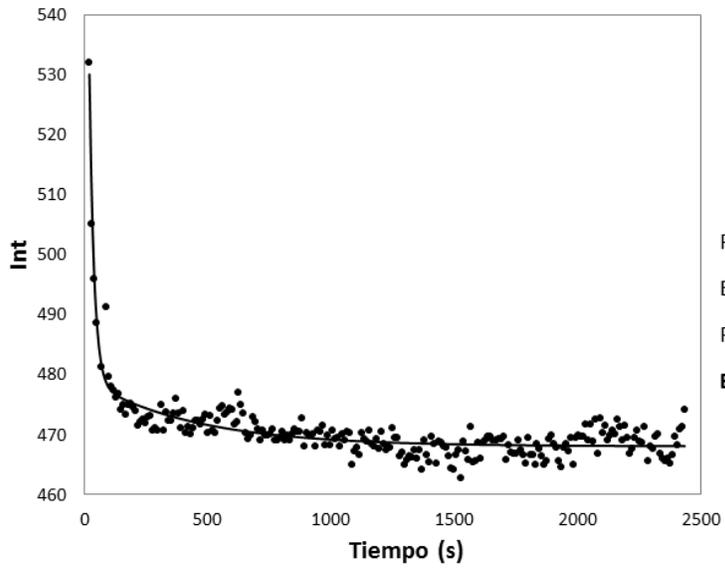
Cinética 3.0M de Urea



Cinética 4.5M urea



Cinética 5.0M urea



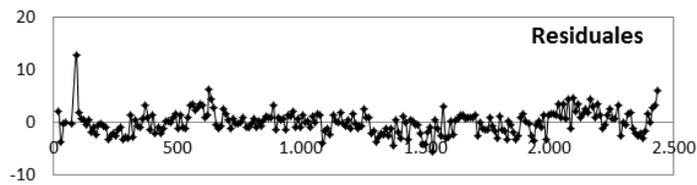
Pre-exponential Amplitude = 153.59 ± 18.27

Exponential Time Constant = 19.11 ± 1.76

Pre-exponential Amplitude = 11.32 ± 1.05

Exponential Time Constant = 435.74 ± 65.29

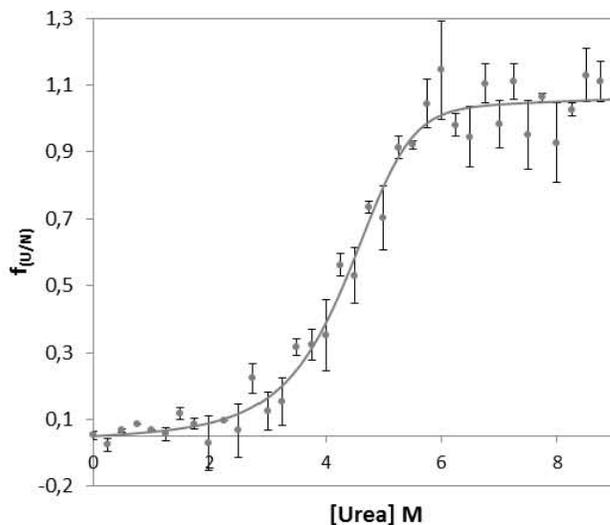
CONSTANT = 468.04 ± 0.26



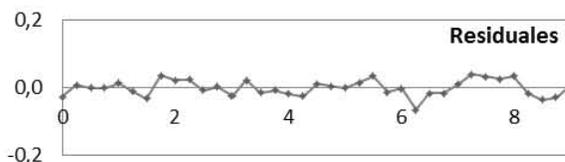
Anexo III. Curvas de desnaturalización de Urea

(a) Ensayos de CD

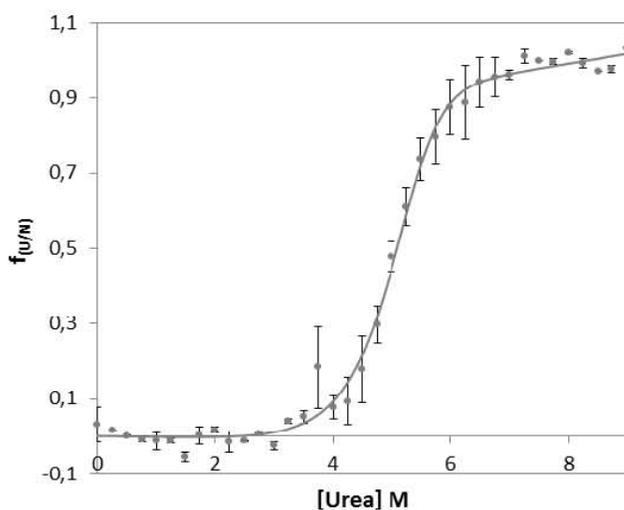
Desnaturalización de 1.8 μ M HsTIM, monitoreado por CD



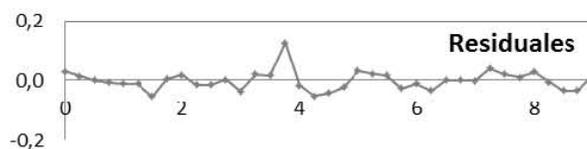
Gnu (Kcal/mol) = 14.835169+/- 1.810961
Anu (Kcal/mol/[D]) = 1.581073+/- 0.373476
SLOPE OF NATIVE BASELINE = 0.007537 +/- 0.032320
Y-INT OF NATIVE BASELINE = -0.001938+/- 0.035638
SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = 0.006746+/-0.021535
Y-INT OF UNFOLDED BASELIN = 0.946763+/-0.165967
TEMPERATURE (K) = 298.150000
CONC (UNFOLDED) = 0.180000E-05



Desnaturalización de 5.7 μ M HsTIM, monitoreado por CD

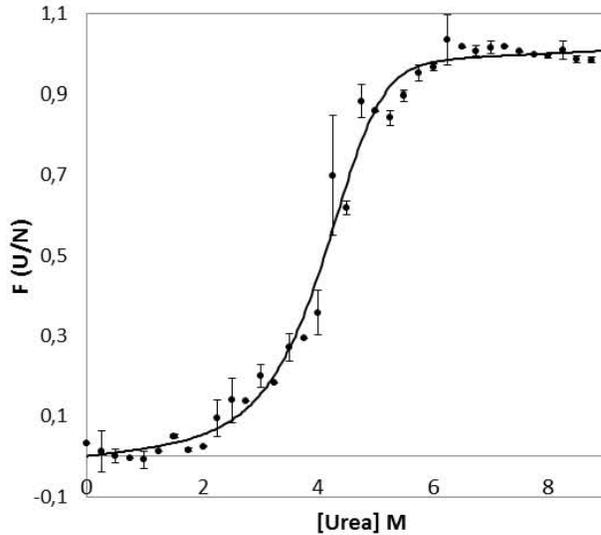


Gnu (Kcal/mol) = 17.499821+/-1.171440
Anu (Kcal/mol/[D]) = 2.066200+/-0.226303
SLOPE OF NATIVE BASELINE = -0.002650+/-0.010132
Y-INT OF NATIVE BASELINE = 0.001349+/-0.017652
SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = 0.025929+/-0.012494
Y-INT OF UNFOLDED BASELIN = 0.785129+/-0.096989
TEMPERATURE (K) = 298.150000
CONC (UNFOLDED) = .570000E-05

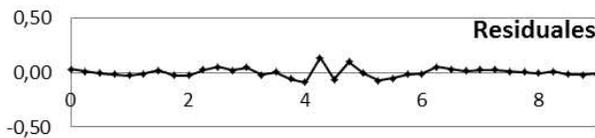


(b) Ensayos de Fluorescencia Intrínseca

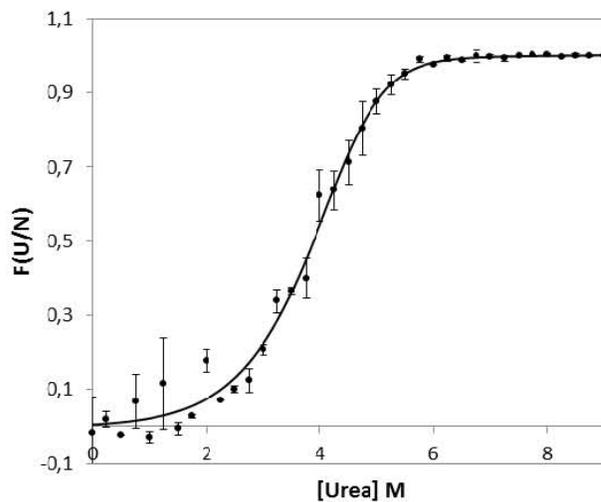
Monitoreo del cambio FI de la HsTIM 0.3 μ M



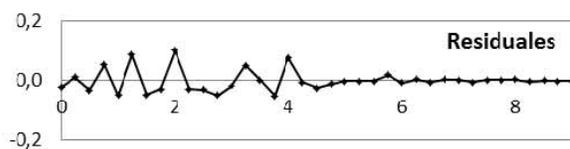
Gnu (Kcal/mol) = 16.077096+/-1.405258
Anu (Kcal/mol/[D]) = 1.732776+/-0.307592
SLOPE OF NATIVE BASELINE = 0.013660+/-0.025361
Y-INT OF NATIVE BASELINE = -0.000521+/-0.027005
SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = 0.006881+/-0.01300
Y-INT OF UNFOLDED BASELIN = 0.944818+/-0.097518
TEMPERATURE (K) = 298.150000
CONC (UNFOLDED) = .300000E-06



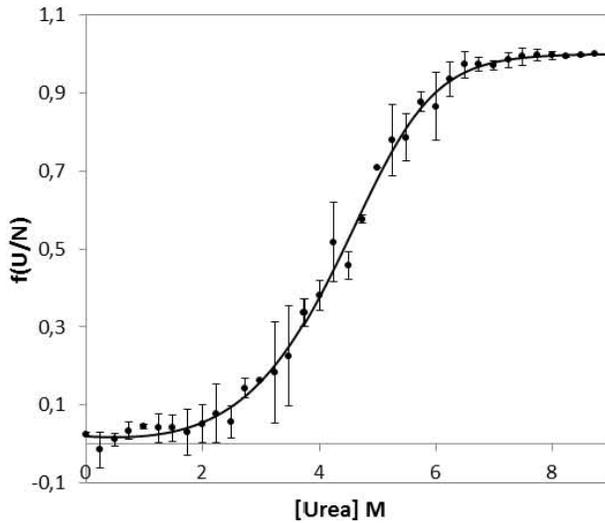
Desnaturalización de 0.6 μ M HsTIM, monitoreada por Fluorescencia



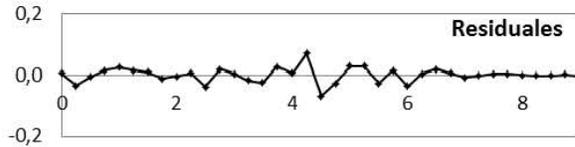
Gnu (Kcal/mol) = 13.643288+/-0.997537
Anu (Kcal/mol/[D]) = 1.355044+/-0.216377
SLOPE OF NATIVE BASELINE = -0.001054+/-0.031143
Y-INT OF NATIVE BASELINE = -0.003196+/-0.021461
SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = 0.001513+/-0.011675
Y INT OF UNFOLDED BASELIN = 0.987816+/- 0.089060
TEMPERATURE (K) = 298.150000
CONC (UNFOLDED) = .690000E-06



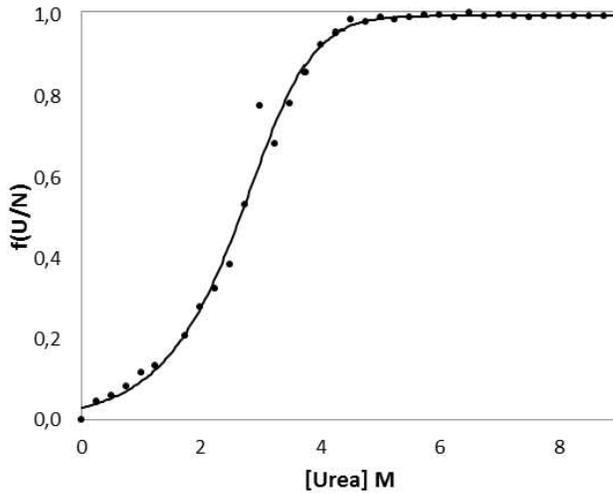
Monitoreo del cambio en FI de HsTIM, 1.8μM, respecto a [urea]



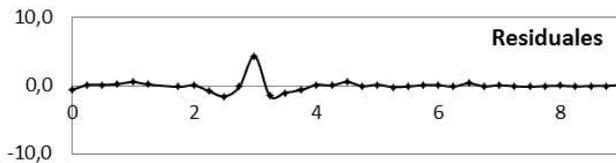
Gnu (Kcal/mol) = 12.106505+/-0.638841
Anu (Kcal/mol/[D]) = 1.006516+/-0.124776
 SLOPE OF NATIVE BASELINE = -0.025295+/-0.024500
 Y-INT OF NATIVE BASELINE = 0.001253+/-0.014640
 SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = 0.000528+/-0.014557
 Y-INT OF UNFOLDED BASELIN = 0.995149+/-0.119468
 TEMPERATURE (K) = 298.1500000
 CONC (UNFOLDED) = .1800000E-05



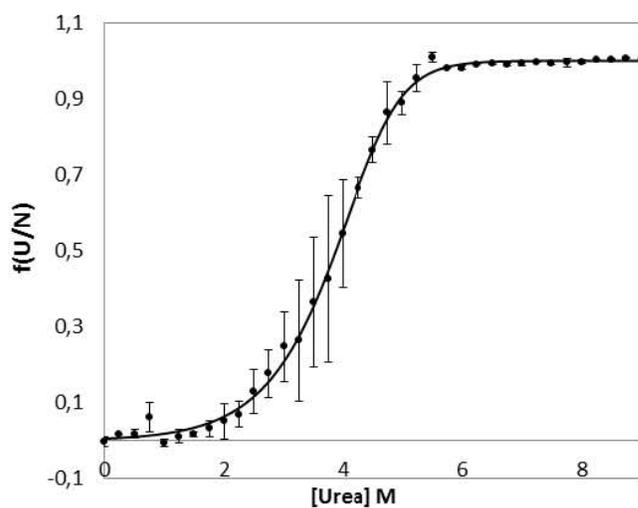
Monitoreo del cambio FI de la HsTIM 3μM



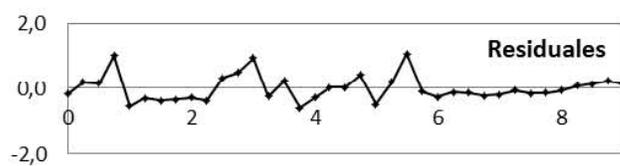
Gnu (Kcal/mol) = 11.227772+/-0.824806
Anu (Kcal/mol/[D]) = 1.393536+/-0.219316
 SLOPE OF NATIVE BASELINE = -3.328628+/-1.616929
 Y-INT OF NATIVE BASELINE = 343.627411+/-0.645209
 SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = -0.055283+/-0.189687
 Y-INT OF UNFOLDED BASELIN = 364.676543+/-1.354343
 TEMPERATURE (K) = 298.150000
 CONC (UNFOLDED) = 0.304000E-05



Desnaturalización de 5.7 μ M HsTIM, monitoreada por Fluorescencia



Gnu (Kcal/mol) = 12.994766+/-0.434457
Anu (Kcal/mol/[D]) = 1.509352+/-0.097436
SLOPE OF NATIVE BASELINE = -1.575547+/-0.294248
Y-INT OF NATIVE BASELINE = 345.294072+/-0.251174
SLOPE OF UNFOLDED BASELIN = -0.161782+/-0.121135
Y-INT OF UNFOLDED BASELIN = 364.961315+/-0.911859
TEMPERATURE (K) = 298.150000
CONC (UNFOLDED) = 0.570000E-05



Anexo IV. Cálculo del ASA, archivos de salida.

a) Accesible Surface Area para cada residuo

Chain A							
I	II	I	II	I	II	I	II
1	140,32	63	0,34	125	0,00	187	81,93
2	70,52	64	0,18	126	0,13	188	0,09
3	124,73	65	13,93	127	0,75	189	30,66
4	34,48	66	0,92	128	4,49	190	41,01
5	88,32	67	18,67	129	0,00	191	21,71
6	4,34	68	72,65	130	82,29	192	0,00
7	0,00	69	51,69	131	44,39	193	106,28
8	0,00	70	66,06	132	115,79	194	86,86
9	1,44	71	57,30	133	37,90	195	85,94
10	0,90	72	14,95	134	40,82	196	67,17
11	2,02	73	44,69	135	108,91	197	35,82
12	0,50	74	41,22	136	67,73	198	85,30
13	28,64	75	0,00	137	56,57	199	83,27
14	0,00	76	20,82	138	60,75	200	10,30
15	33,82	77	15,06	139	13,69	201	4,17
16	10,44	78	6,86	140	56,94	202	91,61
17	50,50	79	0,00	141	105,67	203	66,41
18	58,21	80	0,13	142	15,78	204	2,48
19	154,87	81	8,04	143	1,73	205	25,19
20	57,51	82	0,00	144	51,61	206	0,00
21	1,16	83	0,07	145	85,41	207	0,00
22	16,81	84	85,97	146	15,62	208	4,60
23	135,94	85	54,35	147	0,16	209	11,89
24	14,46	86	7,66	148	98,31	210	11,96
25	2,33	87	35,38	149	19,01	211	93,78
26	39,68	88	0,30	150	0,15	212	3,70
27	55,04	89	67,42	151	15,14	213	47,81
28	1,03	90	24,52	152	95,37	214	20,36
29	50,09	91	0,00	153	30,27	215	73,72
30	94,46	92	1,24	154	13,06	216	51,49
31	17,08	93	0,81	155	191,06	217	0,00
32	159,04	94	0,50	156	76,25	218	103,57
33	40,67	95	7,28	157	30,02	219	109,92
34	13,98	96	16,11	158	81,13	220	7,16
35	104,31	97	17,99	159	77,46	221	2,40
36	73,20	98	21,78	160	2,33	222	77,59
37	7,29	99	29,84	161	0,18	223	21,77
38	46,56	100	70,90	162	0,00	224	101,59
39	4,49	101	76,85	163	0,00	225	19,54

40	2,45	102	41,33	164	0,76	226	1,50
41	0,15	103	62,12	165	10,68	227	10,30
42	2,36	104	22,46	166	1,13	228	0,00
43	0,00	105	62,81	167	21,89	229	0,00
44	0,00	106	46,14	168	7,67	230	9,37
45	6,81	107	118,92	169	16,07	231	1,26
46	0,97	108	31,46	170	104,06	232	22,79
47	0,10	109	0,15	171	88,09	233	41,13
48	0,09	110	0,00	172	55,61	234	9,91
49	9,79	111	69,27	173	71,36	235	0,05
50	16,14	112	3,18	174	101,27	236	55,69
51	0,00	113	0,00	175	112,17	237	97,09
52	43,71	114	35,61	176	27,34	238	83,16
53	129,77	115	35,86	177	61,31	239	41,63
54	116,94	116	0,06	178	31,79	240	0,40
55	9,07	117	21,96	179	119,68	241	27,71
56	54,46	118	84,85	180	44,58	242	76,50
57	114,59	119	39,08	181	0,75	243	0,00
58	77,05	120	46,82	182	15,28	244	2,34
59	0,66	121	0,38	183	87,75	245	44,17
60	21,67	122	7,07	184	2,20	246	4,48
61	0,00	123	0,00	185	0,00	247	107,45
62	0,50	124	1,65	186	104,91	248	164,03

Chain B

I	II	I	II	I	II	I	II
1	123,80	63	0,00	125	0,00	187	86,59
2	127,15	64	0,00	126	0,64	188	0,07
3	105,80	65	12,70	127	3,58	189	20,87
4	70,97	66	1,21	128	5,95	190	33,40
5	100,76	67	14,02	129	0,12	191	27,22
6	12,60	68	64,60	130	70,36	192	0,00
7	0,00	69	51,99	131	99,04	193	115,95
8	0,00	70	62,29	132	97,42	194	96,76
9	1,95	71	68,07	133	24,24	195	85,18
10	1,09	72	14,05	134	56,74	196	57,68
11	0,04	73	47,31	135	126,75	197	43,16
12	0,45	74	42,29	136	68,80	198	73,77
13	6,54	75	0,00	137	52,46	199	74,54
14	0,00	76	18,40	138	68,82	200	20,77
15	40,85	77	19,25	139	9,64	201	1,93
16	10,22	78	5,26	140	64,84	202	96,47

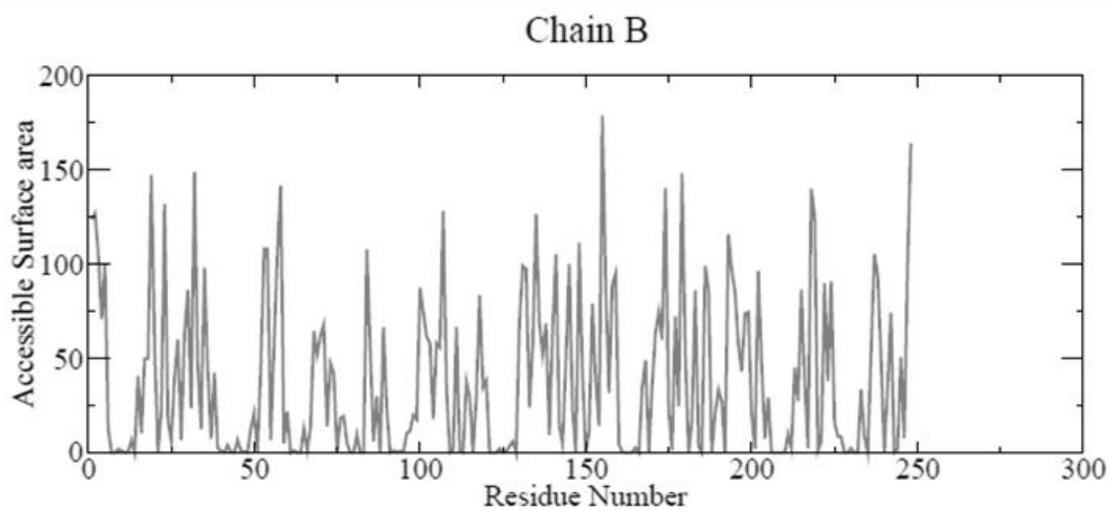
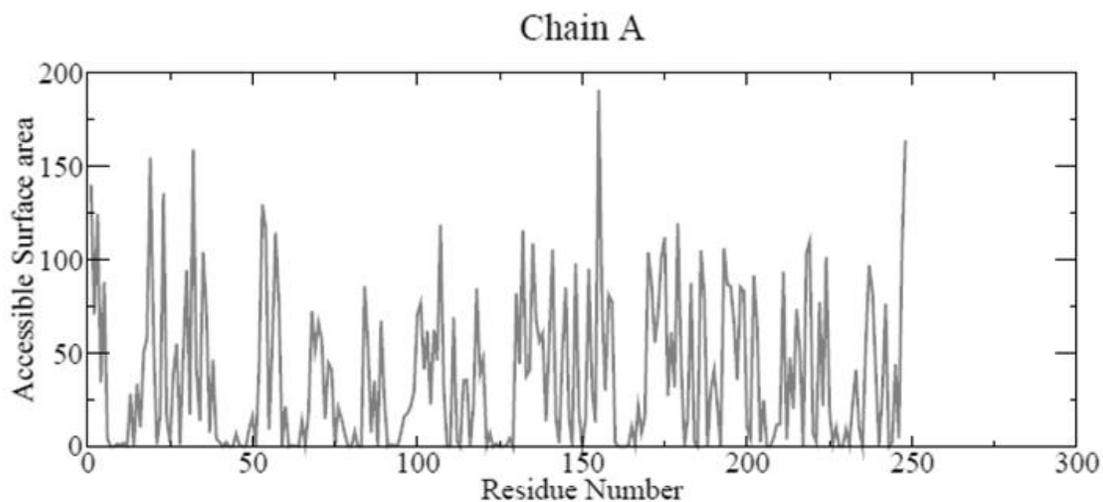
17	49,99	79	0,00	141	105,33	203	48,35
18	49,96	80	0,00	142	14,37	204	7,41
19	147,51	81	9,50	143	4,57	205	29,38
20	55,91	82	0,00	144	48,53	206	0,00
21	0,30	83	0,03	145	100,30	207	0,00
22	22,21	84	107,91	146	23,21	208	0,00
23	131,99	85	54,99	147	0,00	209	0,00
24	16,95	86	6,07	148	111,47	210	0,00
25	6,42	87	30,14	149	42,36	211	9,82
26	39,84	88	0,02	150	0,02	212	2,30
27	60,06	89	66,50	151	11,57	213	45,29
28	6,65	90	22,42	152	79,18	214	27,51
29	62,63	91	0,00	153	37,95	215	86,63
30	86,33	92	1,18	154	14,22	216	37,93
31	23,92	93	0,16	155	179,05	217	2,52
32	148,75	94	0,99	156	88,22	218	140,15
33	46,55	95	0,30	157	32,02	219	125,41
34	12,54	96	10,19	158	89,23	220	1,13
35	98,25	97	11,67	159	95,12	221	6,06
36	44,45	98	19,98	160	4,38	222	90,10
37	7,45	99	17,71	161	0,35	223	38,03
38	42,39	100	87,45	162	0,00	224	91,24
39	2,50	101	74,69	163	0,00	225	15,91
40	1,07	102	61,64	164	0,27	226	8,79
41	0,17	103	58,27	165	2,61	227	8,36
42	3,96	104	17,97	166	0,00	228	0,00
43	0,35	105	58,07	167	34,13	229	0,00
44	0,00	106	55,96	168	49,06	230	2,44
45	6,65	107	128,34	169	0,00	231	0,00
46	1,21	108	34,74	170	35,43	232	0,00
47	0,51	109	0,09	171	63,35	233	33,63
48	0,03	110	1,47	172	74,65	234	8,57
49	13,05	111	66,89	173	59,90	235	0,17
50	20,96	112	0,93	174	140,58	236	51,78
51	0,12	113	0,00	175	22,28	237	105,49
52	45,70	114	37,80	176	1,43	238	94,37
53	108,23	115	29,29	177	72,44	239	52,04
54	108,27	116	0,00	178	24,48	240	0,18
55	6,78	117	29,94	179	148,48	241	34,45
56	57,14	118	83,46	180	53,78	242	74,45
57	105,83	119	34,58	181	0,00	243	0,00
58	141,73	120	38,30	182	16,53	244	1,73
59	4,85	121	0,10	183	86,16	245	50,91

60	21,73	122	0,02	184	3,37	246	7,86
61	0,01	123	0,00	185	0,00	247	98,03
62	1,16	124	2,15	186	99,25	248	164,20

* I, residue

** II, Exposed Surface Area (\AA^2)

b) Gráficas



Anexo V. Secuencia de la HsTIM

Los codones de inicio y de paro están resaltados.

GGATTTCGTCTGAATATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCATCACCAT
CATCACACAGCAGCGGCCGTGAAAACCTGTACTTCCAGGGTCATGCGCCCTCCAGGAA
GTTCTTCGTTGGGGGAAACTGGAAGATGAACGGGCGGAAGCAGAGTCTGGGGGAGCTCA
TCGGCACTCTGAACGCGGCCAAGGTGCCGGCCGACACCGAGGTGGTTTGTGCTCCCCCT
ACTGCCTATATCGACTTCGCCCCGGCAGAAGCTAGATCCCAAGATTGCTGTGGCTGCGCAG
AACTGCTACAAAGTACTAATGGGGCTTTTACTGGGGAGATCAGCCCTGGCATGATCAAA
GACTGCGGAGCCACGTGGGTGGTCCTGGGGCACTCAGAGAGAAGGCATGTCTTTGGGG
AGTCAGATGAGCTGATTGGGCAGAAAGTGGCCCATGCTCTGGCAGAGGGACTCGGAGTA
ATCGCCTGCATTGGGGAGAAGCTAGATGAAAGGGAAGCTGGCATCACTGAGAAGGTTGT
TTTCGAGCAGACAAAGGTCATCGCAGATAACGTGAAGGACTGGAGCAAGGTCGTCCTGG
CCTATGAGCCTGTGTGGGCCATTGGTACTGGCAAGACTGCAACACCCCAACAGGCCCCAG
GAAGTACACGAGAAGCTCCGAGGATGGCTGAAGTCCAACGTCTCTGATGCGGTGGCTCA
GAGCACCCGTATCATTTATGGAGGCTCTGTGACTGGGGCAACCTGCAAGGAGCTGGCCA
GCCAGCCTGATGTGGATGGCTTCCTTGTGGGTGGTGCTTCCCTCAAGCCCGAATTCGTG
GACATCATCAATGCCAAACAAATGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAAGGYTRT
TT

Referencias

- 1 Sancho, J. The stability of 2-state, 3-state and more-state proteins from simple spectroscopic techniques... plus the structure of the equilibrium intermediates at the same time. *Archives of biochemistry and biophysics* **531**, 4-13, doi:10.1016/j.abb.2012.10.014 (2013).
- 2 Bolen, D. W. & Rose, G. D. Structure and energetics of the hydrogen-bonded backbone in protein folding. *Annual review of biochemistry* **77**, 339-362, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.131357 (2008).
- 3 Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-890, doi:10.1038/nature02261 (2003).
- 4 Ferreira, S. T. F., F.G. in *PABMB Lecture* Vol. 498 (ed G. von Heijne) 129-134 (FEBS Letters, 2001).
- 5 Tsytlonok, M. & Itzhaki, L. S. The how's and why's of protein folding intermediates. *Archives of biochemistry and biophysics* **531**, 14-23, doi:10.1016/j.abb.2012.10.006 (2013).
- 6 Ferreira, S. T. & De Felice, F. G. PABMB Lecture. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS letters* **498**, 129-134 (2001).
- 7 Kopito, R. R. & Ron, D. Conformational disease. *Nature cell biology* **2**, E207-209, doi:10.1038/35041139 (2000).
- 8 Alberts, B. J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walters, P. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth edn, (New York and London, 2002).
- 9 Fort, R. *Protein Folding*, <<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Folding.html>> (2013).
- 10 Bai, Y. Hidden intermediates and levinthal paradox in the folding of small proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **305**, 785-788 (2003).
- 11 Stryer, L. T., J.L.; Berg, J.M. *Bioquímica*. sixth edn, 52-57 (Reverté, 2008).
- 12 Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P. G. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual review of physical chemistry* **48**, 545-600, doi:10.1146/annurev.physchem.48.1.545 (1997).
- 13 Hingorani, K. S. & Gierasch, L. M. Comparing protein folding in vitro and in vivo: foldability meets the fitness challenge. *Current opinion in structural biology* **24C**, 81-90, doi:10.1016/j.sbi.2013.11.007 (2014).
- 14 Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893 (1999).
- 15 Shiber, A. & Ravid, T. Chaperoning Proteins for Destruction: Diverse Roles of Hsp70 Chaperones and their Co-Chaperones in Targeting Misfolded Proteins to the Proteasome. *Biomolecules* **4**, 704-724, doi:10.3390/biom4030704 (2014).

- 16 Castellan. *Fisicoquímica*. Second edn, 460-466 (Pearson, 1998).
- 17 Naganathan, A. N., Doshi, U., Fung, A., Sadqi, M. & Munoz, V. Dynamics, energetics, and structure in protein folding. *Biochemistry* **45**, 8466-8475, doi:10.1021/bi060643c (2006).
- 18 Pace, C. N. S., B. A.; Thomson, J. A. in *Protein structure: A practical approach* (ed T.E. Creighton) Ch. 13, 311-330 (IRL Press, 1990).
- 19 Razvi, A. & Scholtz, J. M. Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* **15**, 1569-1578, doi:10.1110/ps.062130306 (2006).
- 20 Mathews, C. v. H., K.; Ahern, K. *Biochemistry*. 183 (Pearson, 2000).
- 21 Doyle, C. M. *et al.* Energetics of oligomeric protein folding and association. *Archives of biochemistry and biophysics* **531**, 44-64, doi:10.1016/j.abb.2012.12.005 (2013).
- 22 Rumfeldt, J. A., Galvagnion, C., Vassall, K. A. & Meiering, E. M. Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Progress in biophysics and molecular biology* **98**, 61-84, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2008.05.004 (2008).
- 23 Orosz, F., Olah, J. & Ovadi, J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 1168-1174, doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.012 (2009).
- 24 Richard, J. P. A paradigm for enzyme-catalyzed proton transfer at carbon: triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **51**, 2652-2661, doi:10.1021/bi300195b (2012).
- 25 Maes, D. *et al.* The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* **37**, 441-453 (1999).
- 26 Mande, S. C. *et al.* Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein science : a publication of the Protein Society* **3**, 810-821, doi:10.1002/pro.5560030510 (1994).
- 27 Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G. & Venkatesan, R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, 3961-3982, doi:10.1007/s00018-010-0473-9 (2010).
- 28 Vega, M. C., Lorentzen, E., Linden, A. & Wilmanns, M. Evolutionary markers in the (beta/alpha)₈-barrel fold. *Current opinion in chemical biology* **7**, 694-701 (2003).
- 29 Albery, W. J. & Knowles, J. R. Free-energy profile of the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **15**, 5627-5631 (1976).
- 30 Knowles, J. R. & Albery, W. J. Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Accounts of Chemical Research* **10**, 105-111, doi:10.1021/ar50112a001 (1977).
- 31 Guzman-Luna, V. & Garza-Ramos, G. The folding pathway of glycosomal triosephosphate isomerase: structural insights into equilibrium intermediates. *Proteins* **80**, 1669-1682, doi:10.1002/prot.24063 (2012).
- 32 Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. & Goraj, K. Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the

- stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110-4117, doi:10.1021/bi952692n (1996).
- 33 Moraes, J. *et al.* Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect biochemistry and molecular biology* **41**, 400-409, doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.009 (2011).
- 34 Urfer, R. & Kirschner, K. The importance of surface loops for stabilizing an eightfold beta alpha barrel protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1**, 31-45, doi:10.1002/pro.5560010105 (1992).
- 35 Sawyer, T. H. & Gracy, R. W. Ligand binding and denaturation titration of free and matrix-bound triosephosphate isomerases. *Archives of biochemistry and biophysics* **169**, 51-57 (1975).
- 36 Najera, H., Costas, M. & Fernandez-Velasco, D. A. Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *The Biochemical journal* **370**, 785-792, doi:10.1042/BJ20021439 (2003).
- 37 Pan, H., Raza, A. S. & Smith, D. L. Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *Journal of molecular biology* **336**, 1251-1263, doi:10.1016/j.jmb.2003.12.076 (2004).
- 38 Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H. & Balaram, P. Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* **38**, 423-431, doi:10.1021/bi981087s (1999).
- 39 McVittie, J. D., Esnouf, M. P. & Peacocke, A. R. The denaturation-renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *European journal of biochemistry / FEBS* **81**, 307-315 (1977).
- 40 Rodriguez-Almazan, C. *et al.* The stability and formation of native proteins from unfolded monomers is increased through interactions with unrelated proteins. *PloS one* **2**, e497, doi:10.1371/journal.pone.0000497 (2007).
- 41 Forsyth, W. R., Bilsel, O., Gu, Z. & Matthews, C. R. Topology and sequence in the folding of a TIM barrel protein: global analysis highlights partitioning between transient off-pathway and stable on-pathway folding intermediates in the complex folding mechanism of a (betaalpha)₈ barrel of unknown function from *B. subtilis*. *Journal of molecular biology* **372**, 236-253, doi:10.1016/j.jmb.2007.06.018 (2007).
- 42 Mainfroid, V. *et al.* Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *Journal of molecular biology* **257**, 441-456, doi:10.1006/jmbi.1996.0174 (1996).
- 43 Perez-Iratxeta, C. & Andrade-Navarro, M. A. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC structural biology* **8**, 25, doi:10.1186/1472-6807-8-25 (2008).
- 44 Sarkar, N. & Dubey, V. K. Exploring critical determinants of protein amyloidogenesis: a review. *Journal of peptide science : an official*

- publication of the European Peptide Society **19**, 529-536, doi:10.1002/psc.2539 (2013).
- 45 Godzik, A., Skolnick, J. & Kolinski, A. Simulations of the folding pathway of triose phosphate isomerase-type alpha/beta barrel proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 2629-2633 (1992).
- 46 Rodriguez-Almazan, C. *et al.* 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**, 23254-23263, doi:10.1074/jbc.M802145200 (2008).
- 47 Guix, F. X. *et al.* Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain : a journal of neurology* **132**, 1335-1345, doi:10.1093/brain/awp023 (2009).
- 48 Thomas, M. R. & O'Shea, E. K. An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9565-9570, doi:10.1073/pnas.0501122102 (2005).
- 49 Plaut, B. & Knowles, J. R. pH-dependence of the triose phosphate isomerase reaction. *The Biochemical journal* **129**, 311-320 (1972).
- 50 Sullivan, B. J., Durani, V. & Magliery, T. J. Triosephosphate isomerase by consensus design: dramatic differences in physical properties and activity of related variants. *Journal of molecular biology* **413**, 195-208, doi:10.1016/j.jmb.2011.08.001 (2011).
- 51 Gloss, L. M. in *Methods in Enzymology* Vol. 466 *Biothermodynamics, Part B* (ed Michael L. Johnson; Gary K. Ackers; Jo M. Holt) Ch. 14, 325-355 (Elsevier Inc., 2009).
- 52 Gerstein, M. A Resolution-Sensitive Procedure for Comparing Protein Surfaces and its Application to the Comparison of Antigen-Combining Sites. *Acta Crystallographica A*, 271-276 (1992).
- 53 Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* **4**, 2411-2423, doi:10.1002/pro.5560041120 (1995).
- 54 Gopal, B. *et al.* Cavity-creating mutation at the dimer interface of Plasmodium falciparum triosephosphate isomerase: restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry* **38**, 478-486, doi:10.1021/bi981495w (1999).
- 55 Orosz, F. O., J.; Álvarez, M.; Keserü, G.M.; Szabó, B.; Wágner, G.; Kovári, Z.; Horányi, M.; Baróti, K.; Martial, J.A.; Hollán, S.; Ovádi, J. Distinct behavior of mutant triosephosphate isomerase in hemolysate and in insolated form: molecular basis of enzyme deficiency. *American Society of Hematology* **98**, doi:10.1182/blood.V98.103106 (2001).
- 56 Chu, C. H., Lai, Y. J., Huang, H. & Sun, Y. J. Kinetic and structural properties of triosephosphate isomerase from Helicobacter pylori. *Proteins* **71**, 396-406, doi:10.1002/prot.21709 (2008).
- 57 Schmid, F. X., Grafl, R., Wrba, A. & Beintema, J. J. Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**, 872-876 (1986).
- 58 González-Torres, L. *Caracterización del patrón de plegamiento y asociación de la triosa fosfato isomerasa de humano*. Licenciada en Nutrición thesis, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, (2007).
- 59 Saab-Rincon, G., Juarez, V. R., Osuna, J., Sanchez, F. & Soberon, X. Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein engineering* **14**, 149-155 (2001).
- 60 Benítez-Cardoza, C. G. *Estudio del desplegamiento de la triosa fosfato isomerasa humana* Maestra en Ciencias thesis, Universidad Autónoma Metropolitana, (1997).
- 61 Chanez-Cardenas, M. E., Perez-Hernandez, G., Sanchez-Rebollar, B. G., Costas, M. & Vazquez-Contreras, E. Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* **44**, 10883-10892, doi:10.1021/bi047687a (2005).
- 62 Uversky, V. N. & Dunker, A. K. Understanding protein non-folding. *Biochimica et biophysica acta* **1804**, 1231-1264, doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.017 (2010).
- 63 Gerber, R., Tahiri-Alaoui, A., Hore, P. J. & James, W. Oligomerization of the human prion protein proceeds via a molten globule intermediate. *The Journal of biological chemistry* **282**, 6300-6307, doi:10.1074/jbc.M608926200 (2007).
- 64 Renner, M. & Melki, R. Protein aggregation and prionopathies. *Pathologie-biologie*, doi:10.1016/j.patbio.2014.01.003 (2014).