



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

Caracterización fisicoquímica de la Triosafosfato isomerasa de especies representativas de regiones poco exploradas del dominio *Eukarya*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:
LUIS ARTURO BECERRIL SESÍN

DIRECTOR DE TESIS:
DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO

Cd. Universitaria, D. F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la UNAM, por proveerme de todo lo que necesité durante mis estudios de licenciatura tanto para mi crecimiento académico como personal.

A la Facultad de Medicina, por acogerme y brindarme el espacio donde pude desarrollar mi proyecto.

Al departamento de Bioquímica y su personal administrativo, por apoyarme paciente y eficientemente con mis trámites y becas.

Al PAPIIT, cuyo proyecto IN 219913 financió parcialmente al proyecto y a mi conclusión de estudios.

Al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, por cuidarme durante mi aprendizaje, permitirme jugar con todos los equipos que necesité y agrandar mi familia.

A las técnicas M en C. Laura Ileana Álvarez Añorve y la Dra. María Isabel Velázquez López, por su ayuda incondicional, enseñanzas, paciencia y cariño.

A la señorita Margarita Ibarra Barrientos, por mantener impecables todas las áreas de trabajo y el material. Sin ella, el laboratorio no funcionaría.

A los miembros de mi jurado y revisores de tesis, por dedicar el tiempo y esfuerzo necesarios a guiarme para que mi tesis fuera impecable

León David Islas Suárez

María Soledad Funes Argüello

Adela Rodríguez Romero

Luis Servín González

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por abrirme las puertas de una colección perfecta que siempre tuvo lo que necesité

Lucía Brito Ocampo

Martha Cariño Aguilar

Julieta Cáliz Cecilia

María Petra Muñoz García

A Fernández, por salvarme de la derrota, creer en mí y hacerme escribir un cuento corto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá: mi más grande apoyo, mi maestra de vida y mi amiga incondicional. Gracias por haber creído en mí hasta cuando yo dejé de hacerlo, y levantarme por más pesado que fuera. Gracias a tu forma generosa y llena de amor de enfrentar al mundo, yo tengo la bondad y humildad que me definen.

A mi papá: por darme siempre un consejo interesante, totalmente fuera de lo que yo pudiera pensar. Sin tu forma única de ver el mundo, yo no hubiera descubierto mi gusto por la ciencia, ni mi pasión por salirme de lo establecido. Eres un hombre ejemplar y es un orgullo ser tu hijo.

A Fabiola: por catalizar mi mundo y enseñarme cuánto vale la pena luchar por mis sueños y creer en ellos cada mañana; ya que estos, incluyéndote, se pueden hacer realidad.

A Rosty y Sally: mis compañeros de vida, mis asistentes de redacción y mi fuente inagotable de besos y apapachos. El amor incondicional no es inherente al ser humano.

A Ale y Osita: por amarme y consentirme sin medida. Tengo la fortuna de estar rodeado de personas que me quieren, pero tener dos madres más del estándar es un privilegio.

A mi compadre y mi ahijado: por esas noches descifrando las bases del universo con café y dulces árabes, que me recargaron la pila cuando lo necesité.

A Juanito: por ser mi confidente y mi padre en ocasiones, me diste consejos que nadie más ha podido darme y eres un ejemplo de lo que constituye a un buen hombre.

A Geor y Alejandrita: por quererme tanto como para espantarme las malas compañías y recibirme siempre con los brazos abiertos.

A Tone: gentilhombre, ha sido un honor compartir tantos años y experiencias contigo. Con suerte, mucho trabajo y paciencia, volveremos a coincidir para jugar básquetbol de traje.

A Tehui: por compartir algunas de mis rarezas, reírte de algunas otras y darme de tu comida.

A Claudia y Mote: papás nunca sobran, y menos si me aman y me apoyan como ustedes. Me han dado y enseñado más de lo que podría escribir aquí.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| Plegamiento de proteínas | 7 |
| Estudios de plegamiento | 9 |
| La triosafofato isomerasa | 10 |
| Características estructurales | 10 |
| Actividad catalítica | 12 |
| Plegamiento de la TIM | 13 |
| ANTECEDENTES | 14 |
| OBJETIVOS | 17 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| Expresión y purificación de las TIM | 17 |
| Ensayos de cinética | 23 |
| Ensayos de dilución | 25 |
| Estudios espectroscópicos | 26 |
| Desnaturalización térmica | 29 |
| Desnaturalización con urea | 30 |
| MODELOS DE AJUSTE | 32 |
| Dos estados | 33 |
| Tres estados | 34 |
| RESULTADOS | 36 |
| Purificación | 36 |
| Actividad catalítica | 39 |
| Estabilidad a la dilución | 40 |
| Propiedades espectroscópicas | 41 |
| Desnaturalización térmica | 43 |
| Desnaturalización con urea | 46 |
| DISCUSIÓN | 53 |
| CONCLUSIONES | 57 |
| BIBLIOGRAFÍA | 58 |

RESUMEN

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima ubicua encontrada en los tres dominios de la vida (Eukarya, Archaea y Bacteria), lo cual sugiere que surgió en un ancestro común de todas las especies existentes. Esta enzima cataliza la interconversión del D- gliceraldehído -3- fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y su eficiencia catalítica se encuentra en el límite de difusión. La TIM presenta una estructura terciaria altamente conservada que se ha reportado para todas las estructuras de TIMs determinadas hasta el momento, denominada barril TIM o barril (β/α)₈. Aunque esta topología fue descrita por primera vez en una triosafosfato isomerasa, se ha encontrado en 15 familias diferentes de enzimas. Esto implica que el barril TIM no sólo es favorable termodinámicamente, sino que es suficientemente estable para albergar una gran diversidad de secuencias.

Para llegar a la estructura nativa y tener una función biológicamente relevante, los polipéptidos deben pasar por una serie de rearrreglos conformacionales, a este proceso se le conoce como plegamiento de proteínas. Pese a los extensos estudios que se han hecho en diversos modelos, no se han podido determinar los principios y “reglas” que siguen las proteínas durante su plegamiento, y las aplicaciones biotecnológicas se ven limitadas a las proteínas que existen en la naturaleza. Un mejor entendimiento del proceso de plegamiento de proteínas permitiría el diseño de proteínas *de novo* con funciones y propiedades únicas, así como el tratamiento de enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de las mismas (plegopatías).

En este trabajo se realizó la sobreexpresión, purificación y caracterización fisicoquímica de tres triosafosfato isomerasas citosólicas de especies eucariontes. Dichas especies pertenecen a regiones separadas del árbol de la vida: una planta, un insecto y un nemátodo. El propósito fue ampliar la base de datos de la TIM mediante la determinación de las propiedades catalíticas, la estabilidad y la ruta de plegamiento de la TIM de *Zea mays* (ZmTIM), *Bombyx mori* (BmTIM) y *Caenorhabditis elegans* (CeTIM). Una mayor colección de datos permitirá hacer una comparación entre TIMs y con ello determinar qué elementos de la secuencia guían la ruta de plegamiento de estas enzimas, y esa información ayudará en el entendimiento del plegamiento de proteínas.

Primero, se llevó a cabo la sobreexpresión de las tres enzimas mediante la transformación de bacterias *E. coli* con un plásmido pET-28 b(+) que contiene el gen codificante para cada enzima y una etiqueta de histidinas. Posteriormente, las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de intercambio aniónico. Las tres enzimas fueron sobre expresadas

exitosamente, son solubles y se obtuvieron con un rendimiento de 65 mg de proteína pura por litro de cultivo.

Mediante ensayos enzimáticos acoplados se obtuvieron los parámetros catalíticos de las enzimas. Las tres mostraron una cinética hiperbólica clásica y una eficiencia catalítica en el orden de $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Obtuvimos sus patrones de dicroísmo circular, en los cuales comprobamos que las tres proteínas contienen las firmas a 222 nm y 190 nm características de hebras-beta y alfa-hélices.

Finalmente, las TIMs se sometieron a condiciones desnaturalizantes y renaturalizantes de temperatura y urea para evaluar su estabilidad y determinar su patrón de plegamiento al equilibrio mediante el registro de actividad, fluorescencia y dicroísmo circular.

Las tres presentan un desplegamiento térmico irreversible, pero BmTIM mostró cierta recuperación de su espectro de dicroísmo. En el desplegamiento químico, únicamente BmTIM fue predominantemente irreversible y no permitió la obtención de parámetros termodinámicos. En cambio, CeTIM y ZmTIM fueron suficientemente reversibles para ajustar sus curvas de desplegamiento y replegamiento. El desplegamiento de ZmTIM mostró un proceso con una sola transición, lo cual corresponde a un proceso de dos estados. Al coincidir las curvas vistas por tres técnicas, fue posible obtener los parámetros termodinámicos del proceso. CeTIM mostró dos transiciones mediante técnicas espectroscópicas, pero una sola transición mediante actividad. Este es un comportamiento que se puede explicar con un intermediario inactivo como el reportado para la TIM de levadura. Las curvas obtenidas por dicroísmo y fluorescencia muestran histéresis, por lo que no ha sido posible obtener los parámetros termodinámicos de su plegamiento. Este trabajo resultó muy interesante, ya que tres enzimas homólogas con 60% de identidad de secuencia mostraron comportamientos muy diferentes al ser estudiadas en paralelo mediante las mismas técnicas.

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos, independientemente de su grado de complejidad, están constituidos por biomoléculas. Cada tipo de biomolécula (lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas) tiene un rol crucial para la existencia y preservación de la vida y, a su vez, la interacción entre ellas permite la inmensa variedad de especies que existieron, existen y existirán en la Tierra. Pese a que todas las biomoléculas tienen papeles fundamentales dentro de las células, son las proteínas las que tienen las funciones más diversas y las estructuras más complejas. Prácticamente todos los procesos que ocurren dentro de la célula involucran la interacción de una o más proteínas con otras biomoléculas; y ya que pueden llevar a cabo funciones de regulación, catálisis, transporte, soporte

mecánico, movimiento, señalización y reconocimiento, son denominadas como la maquinaria celular (Lehninger Principles of Biochemistry, 5th edition, Cap. 3, pp 71).

Químicamente, las proteínas son cadenas de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos que adoptan una estructura tridimensional específica, y con ella propiedades fisicoquímicas que le permiten desempeñar funciones de relevancia biológica. Todas las proteínas están compuestas de los mismos aminoácidos, y es la secuencia en que se encuentran dentro de la cadena lineal de la proteína la que distingue a cada una de ellas (Molecular Biology of the Cell, 5th edition, Cap. 3, pp 125). Las proteínas son sintetizadas a partir de los ARN mensajeros que resultan de la transcripción génica. En los organismos eucariontes los ARN mensajeros (ARNm) provienen del núcleo celular, mientras que en los procariontes, carentes de núcleo, el ARN se encuentra en el citoplasma desde que es sintetizado. Los complejos macromoleculares encargados de la traducción del ARNm y la síntesis de proteínas son los ribosomas, compuestos de ARN ribosomal y proteínas. A partir del codón de inicio, el ribosoma ensambla un aminoácido por cada triplete que compone al ARNm y lo recorre hasta encontrar un codón de paro, en el cual libera al polipéptido. Las proteínas son sintetizadas a partir de su extremo amino terminal (N-) y terminan en el carboxilo terminal (-C).

Para muchas proteínas, la síntesis no es suficiente para que estas inicien su función dentro o fuera de las células, para ello se necesitan dos cosas más: transporte y plegamiento. El transporte implica que las proteínas sean llevadas al sitio de la célula donde llevan a cabo su función; en el caso de las proteínas citoplásmicas no se necesita un transporte adicional, pero para algunas proteínas mitocondriales, membranales, nucleares, etc. las proteínas deben ser transportadas. Esto se puede llevar a cabo por tráfico vesicular desde el retículo endoplásmico, o mediante proteínas acarreadoras. El otro proceso es el que nos concierne en este trabajo, y que es clave para todas las proteínas: el plegamiento. Cada proteína puede plegarse y ser transportada en el orden que requiera el organelo destino. Una proteína desplegada contiene únicamente estructura primaria, que es su secuencia de aminoácidos. El plegamiento le confiere la estructura secundaria (formación de arreglos locales por la interacción entre las cadenas laterales de los residuos de la proteína), terciaria (la interacción de los elementos de estructura secundaria que dan la forma final) y cuaternaria (la asociación entre dos o más proteínas para formar un oligómero).

Plegamiento de proteínas

Desde que se describió por primera vez la estructura tridimensional de la proteína globular mioglobina (Kendrew. 1958), fue claro que el arreglo tridimensional que adoptan las proteínas en su

conformación natural es muy complejo e involucra múltiples interacciones entre los aminoácidos que las componen; el entendimiento de la relación entre la secuencia y la estructura de una proteína ha sido objeto de estudio por más de 50 años. Dado que las proteínas pueden realizar funciones sumamente diversas, es de particular interés entender cómo y por qué adoptan su estructura específica. Cuando las proteínas solubles son sintetizadas, a medida que el péptido naciente se desplaza fuera del ribosoma y entra en contacto con el citoplasma, la cadena comienza a torcerse y arreglarse hasta que el polipéptido final está en una conformación altamente específica y energéticamente favorable. Algunos polipéptidos requieren de chaperonas, las cuales son proteínas accesorias que asisten al péptido para acomodarse correctamente (Halperin et al. 2014), y pueden adquirir su estructura nativa hasta que alcanzan su organelo destino o se asocian a su ligando o receptor.

Por ejemplo, las proteínas de la matriz peroxisomal son sintetizadas en el citosol e importadas sin necesidad de vesículas, y se ha reportado que antes de ser importadas ya están plegadas, oligomerizadas y unidas a cofactores; en cambio, las proteínas de la membrana peroxisomal se pliegan durante su inserción y pueden ingresar directamente del citosol, o ser transportadas desde el retículo endoplásmico (Kim, Hettema. 2015).

El plegamiento de proteínas se define como el proceso mediante el cual una proteína desordenada difunde a través de un paisaje energético tridimensional y finalmente alcanza un mínimo energético, el cual corresponde al estado nativo (Figura 1) (Whitford, Onuchic. 2015).

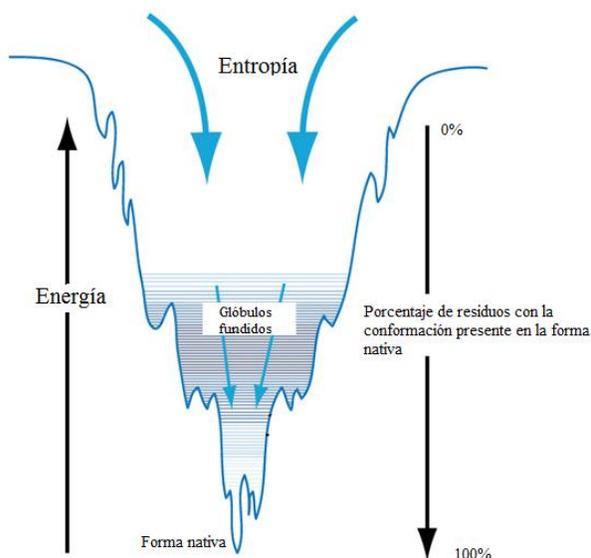


Figura 1) Paisaje energético del plegamiento de proteínas. Una cadena polipeptídica totalmente desplegada tiene un máximo de entropía. Conforme los aminoácidos adquieren la conformación que tienen en el estado nativo, disminuye la energía del polipéptido, pese a que disminuye la entropía. Esto se debe a una compensación entálpica por la formación de puentes de hidrógeno y la liberación de moléculas de agua que rodeaban a los residuos hidrofóbicos, al ser secuestrados en el interior de la proteína (Pace, 2001). (Imagen adaptada de “Lehninger Principles of Biochemistry, 5th edition, pp 143, fig. 4-28”)

A pesar de que algunas proteínas requieren asistencia, se demostró que de manera general que estas moléculas contienen la información necesaria para plegarse correctamente en su secuencia lineal de aminoácidos (Anfinsen, 1961). Al igual que la estructura, la vía de plegamiento es específica para cada proteína. Si se tratara de un proceso aleatorio, en el que los aminoácidos giraran libremente hasta que todos los enlaces peptídicos estuvieran en la conformación correcta, el tiempo que le tomaría a una proteína hipotética de 100 aminoácidos sería de escala astronómica, lo cual constituye una paradoja ya que las proteínas se pueden plegar en el orden de milisegundos (Levinthal, 1969). Por lo tanto, es evidente que el plegamiento de proteínas no es un proceso aleatorio, está guiado fisicoquímicamente por la interacción entre las cadenas laterales de los aminoácidos y entre los aminoácidos y el disolvente.

A pesar de que el estado nativo se considera el estado de mínima energía global de una proteína, en el embudo que forma el paisaje existen mínimos locales, los cuales corresponden a estados conocidos como glóbulos fundidos. Además, estados muy similares al nativo pueden existir por tiempos cortos o en condiciones parcialmente favorables, y se piensa que la proteína debe pasar por ellos para llegar al estado nativo; estas conformaciones se denominan intermediarios del plegamiento.

Dado que el plegamiento de proteínas es un proceso sumamente complejo, sería razonable pensar que las proteínas homólogas de diferentes especies tendrían el mismo patrón de plegamiento, sobre todo si la secuencia de aminoácidos es parecida. Sin embargo, el entendimiento de este proceso no ha resultado para nada simple, ya que se ha hallado evidencia tanto a favor como en contra; proteínas homólogas con alta identidad de secuencia pueden tener mecanismos de plegamiento y parámetros termodinámicos diferentes, a pesar de que su estructura sea superponible (Zarrine-Afsar et al. 2005).

Estudios de plegamiento

Los métodos para determinar la ruta de plegamiento de una proteína son muy diversos, lo cual permite medir diferentes propiedades y correlacionar distintos tipos de información (Bartlett, Radford. 2009).

De manera general, el plegamiento se puede estudiar al someter a la proteína de interés a condiciones diferentes de estrés, que modifiquen la estabilidad de la proteína y vuelvan más favorable la formación de un estado desplegado o intermediarios parcialmente plegados.

Una vez que la proteína está en dichas condiciones, se monitorea alguna propiedad espectroscópica, geométrica, química o termodinámica y, en general, se obtiene una gráfica en la que se observa el

cambio de la propiedad estudiada en función de la variación de las condiciones desnaturalizantes. Una vez que se obtiene la gráfica, se busca un modelo mecanístico que pueda explicar el comportamiento observado, se plantea una ecuación que represente dicho modelo y se hace un ajuste de los datos a la ecuación para encontrar los parámetros que caracterizan al proceso. Dicha ecuación debe incluir los parámetros que se buscan y las variables consideradas en el experimento, de manera que el tipo de ecuación que mejor describa los datos determinará qué patrón de plegamiento es el más simple posible para explicar los datos.

Por ejemplo, en estudios de desnaturalización por temperatura se puede obtener un termograma, y con él determinar la temperatura media de las transiciones, así como el cambio en la capacidad calorífica asociado al desplegamiento y por tanto, la variación de la entalpía, entropía y energía libre de Gibbs con la temperatura (Lehmann et al. 2000).

En estudios de desplegamiento por agentes caotrópicos, como urea o cloruro de guanidinio, se puede determinar la concentración media de desnaturalizante, la dependencia de la energía libre con su concentración y el ΔG en agua (Forsyth, Matthews. 2002).

La triosafosfato isomerasa (TIM)

En este trabajo, nos centramos en el estudio del plegamiento de una enzima en particular, la TIM. Es una enzima ubicua, hallada en los tres dominios de la vida y en casi todas las especies descritas hasta el momento, que cataliza la interconversión del D- gliceraldehído -3- fosfato (G3P) y la Dihidroxiacetona fosfato (DHAP). De acuerdo a la clasificación de enzimas propuesta por la IUBMB (McDonald, Tipton. 2014) su código EC es 5.3.1.1, es decir, se trata de una isomerasa con actividad de oxidorreductasa que interconvierte aldosas y cetosas. Su eficiencia catalítica se encuentra dentro del límite de difusión, por lo cual se le conoce como una enzima perfecta (Albery, Knowles, 1976).

En la naturaleza, todas las TIM han sido descritas como un homodímero u homotetrámero, y se sabe que el estado oligomérico de la enzima es fundamental para su actividad catalítica, ya que mutaciones que desestabilizan la interfase del dímero disminuyen drásticamente la eficiencia catalítica de la TIM (Banerjee, 2009). No se ha encontrado ningún monómero activo, por lo que la TIM se considera un oligómero obligado.

Características estructurales

Esta proteína está formada por 248 aminoácidos en promedio, con un peso aproximado de 27,000 Da por subunidad. Presenta una estructura tridimensional denominada barril $(\beta/\alpha)_8$.

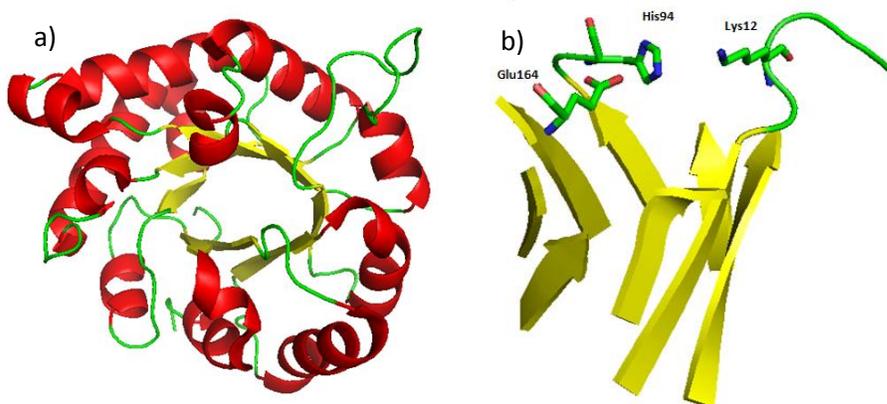
De acuerdo con la “Structural Classification of Proteins” (SCOP), la TIM pertenece a la familia de proteínas Alfa/Beta, el plegamiento tipo TIM β/α y la superfamilia Triosafosfato Isomerasa (Lo Conte et al. 2000). Mediante el nombre podemos describir su estructura: se trata de un barril compuesto por hélices alfa y hebras beta intercaladas; las hélices constituyen la cara externa del barril y las hebras se encuentran de forma paralela en la cara interna. Cada hélice se une a la hebra siguiente por un asa flexible en su extremo C-, de la misma forma cada hebra se une a la hélice siguiente por un asa en el extremo C- (Figura 2a). Dado que esta topología fue descrita por primera vez en la TIM de *Gallus gallus*, también se le conoce como Barril TIM (Banner et al. 1976).

Se han encontrado 15 familias de enzimas con topología de barril TIM, lo cual implica que es una estructura altamente estable y flexible, que permite el acomodo de diferentes sitios catalíticos (Wierenga. 2001). En todas las enzimas con topología de barril TIM descritas hasta el momento, el sitio activo se encuentra en la cara C- de la proteína, denominada así porque todos los extremos C- de las hebras están orientados hacia ella.

La triada catalítica de todas las TIM está conservada, y consiste en una lisina en la posición 12 (Lys12), una histidina en la posición 94 (His94) y un glutámico en la posición 164 (Glu164), de acuerdo con la secuencia de *Tenebrio molitor* (GenBank CAD43178) (Figura 2b). La Lys12 se encuentra en la asa $\beta\alpha_1$, la His94 en el asa $\beta\alpha_4$ y el Glu164 en el asa $\beta\alpha_6$. El componente principal de la interacción entre los monómeros es el asa 3, la cual se inserta en el otro monómero (Figura 3). En la TIM de *Trypanosoma brucei*, 11 residuos del asa 3 forman un bolsillo que envuelve a la cisteína 14 (Cys14) del otro monómero, lo cual es crucial para su estabilidad y capacidad catalítica. La derivatización de esta cisteína, presente en la TIM de un gran número de parásitos y ausente en la TIM de humano, ha sido propuesta para la generación de fármacos especie-específicos (Gómez-Puyou). (Cabrera et al. 2008).

Figura 2) Estructura de barril TIM y triada catalítica de la triosafosfato isomerasa.

- a) Monómero de TIM de *T. molitor* (PDB 2I9E). En rojo se representan las hélices, en amarillo las hebras y en verde las asas.
- b) Acercamiento de las hebras β y las cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos.



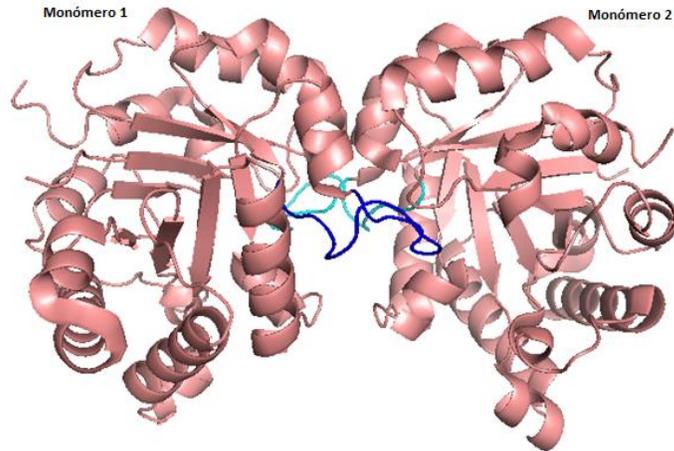


Figura 3) Interacción entre monómeros de la TIM de *T. molitor*. En azul, el asa del monómero 1. En cian, el asa del monómero 2.

Actividad catalítica

Uno de los mecanismos propuestos para la catálisis mediada por la TIM se basa en la formación de un intermediario enediol. El Glu164 actúa como aceptor de protones para ambos sustratos. El grupo imidazol de la His94 actúa como un electrófilo, de manera que pueda compensar las cargas negativas producidas por la desprotonación (Figura 4).

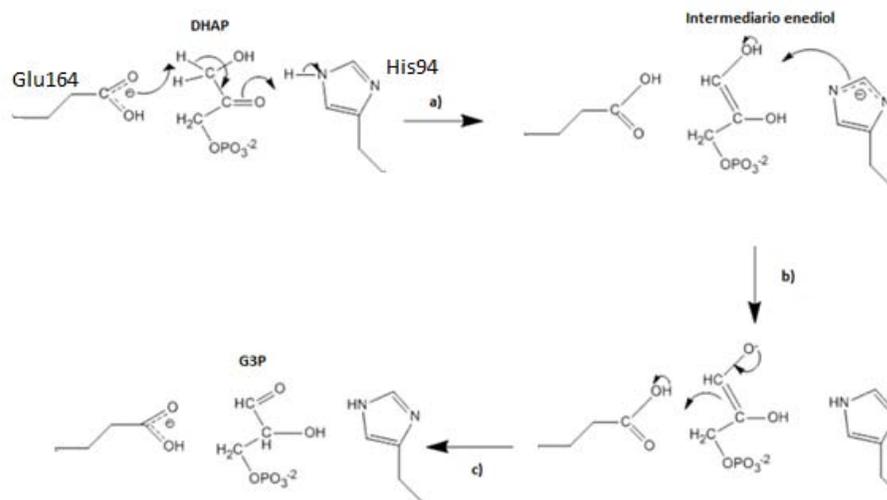


Figura 4) Mecanismo de reacción de la TIM para la conversión de DHAP a G3P.

- a) Glu164 desprotona el C3 de DHAP, que en respuesta forma un doble enlace con el grupo cetona y su oxígeno se protona mediante el grupo imidazol de His94. La forma bihidroxilada es el enediol.
- b) El grupo imidazol de His94 actúa como estructura resonante, y desprotona el grupo hidroxilo del C3, el cual forma un doble enlace con C2 y con ello el grupo aldehído.
- c) El doble enlace C2=C3 se desestabiliza y C3 se protona mediante el grupo carboxilo de Glu164.

La Lys12 se relaciona con la estabilización del sustrato y del intermediario mediante la interacción del amino de la cadena lateral con el fosfato del sustrato. La eliminación de esa carga positiva elimina la actividad catalítica (Lodi et al. 1994). Por otra parte, el asa 6 que contiene al Glu164 es de vital importancia para la función catalítica de la TIM. Las TIM cuya estructura se ha determinado en presencia de un análogo del sustrato, muestran que el asa 6 está en una conformación diferente a la observada en ausencia de ligando, la cual se denomina conformación “cerrada”, ya que cubre el sitio activo y posiciona al Glu164 para poder realizar los intercambios de protones necesarios en la reacción. La conformación cerrada es indispensable para el funcionamiento correcto de la TIM, ya que si el disolvente tiene acceso al sitio activo y no se estabiliza el intermediario, éste puede liberarse y descomponerse en metilglioxal y fosfato inorgánico (Pompliano et al. 1990).

Plegamiento de la TIM

Si bien la topología de la TIM está altamente conservada entre todas las especies en las que se ha estudiado, la ruta de plegamiento que sigue cada una es diferente. Pueden presentar mecanismos simples de dos estados, hasta dos tipos de intermediarios, uno monomérico y otro dimérico. Además, la secuencia puede ser sumamente similar, y aun así tomar rutas diferentes. Por ejemplo, mediante un alineamiento de secuencia de aminoácidos (algoritmo blastp), la TIM de *Leishmania mexicana* tiene un 70% de identidad con la de *Trypanosoma brucei* (Tabla1), pero para esta última se describió un patrón de plegamiento más complejo (Tabla 2).

Tabla 1) Alineamiento de secuencias de TIM con patrón conocido de plegamiento.

| | <i>O. cuniculus</i> | <i>H. sapiens</i> | <i>L. mexicana</i> | <i>S. cerevisiae</i> * | <i>T. brucei</i> | <i>T. cruzi</i> |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|------------------------|------------------|-----------------|
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 100% | | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> | 98% | 100 | | | | |
| <i>Leishmania mexicana</i> | 52% | 51% | 100 | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> * | 52% | 53% | 49% | 100 | | |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | 53% | 54% | 70% | 51% | 100 | |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | 52% | 52% | 68% | 47% | 74% | 100 |

*Cepa RM11-1^a. Acceso en GenBank: *O. cuniculus* P00939, *H. sapiens* CAA49379, *L. mexicana* CAA52804, *S. cerevisiae* EDV08247, CAA27559, *T. cruzi* AAB58349.

Tabla 2) Patrones de plegamiento de TIM de diferentes especies, las técnicas empleadas para su determinación y los agentes desnaturalizantes a los que fueron sometidas. (Peimbert et al. 2008₂)

| Organismo | Intermediarios | Perturbante (metodología) |
|----------------------|-----------------------|---|
| <i>O. cuniculus</i> | No | GdnHCl (fluorescencia) |
| | M* | GdnHCl y micelas reversas (actividad) |
| <i>H. sapiens</i> | No | Temperatura y urea (DC y fluorescencia) |
| <i>L. mexicana</i> | No | pH y GdnHCl (DC y fluorescencia) |
| <i>S. cerevisiae</i> | M* | Urea y GdnHCl (DC, fluorescencia, cromatografía de exclusión molecular y actividad) |
| <i>T. brucei</i> | M* y N* | GdnHCl (DC, fluorescencia, cromatografía de exclusión molecular y actividad) |
| <i>T. cruzi</i> | M* y N* | GdnHCl (DC, fluorescencia, cromatografía de exclusión molecular y actividad) |

M*: intermediario monomérico. N* intermediario dimérico.

Esta discrepancia constituye el problema abordado en este trabajo:

¿Cómo una enzima encontrada en los tres dominios de la vida, con una topología altamente conservada y secuencia que puede tener alta identidad entre especies sigue patrones de plegamiento diferentes? Es claro que el plegamiento tipo barril TIM es termodinámicamente favorable, ya que ha tolerado mutaciones y diversificaciones de función, ¿qué instrucciones dentro de la secuencia dictan entonces la formación de esta topología?

Algo que vale la pena notar, es la variedad de técnicas y aproximaciones utilizadas en el estudio de cada TIM. Se sabe que el uso de un mayor número de técnicas permite la detección de intermediarios más fácilmente (Bartlett & Radford 2009), entonces nos preguntamos: ¿En las TIMs de la tabla 2 en las que se reportan procesos de dos estados, no se observan intermediarios ya que estos no existen o debido a que no se emplearon varias técnicas para su detección?

El agente perturbante empleado es otro factor importante; se sabe que en algunas proteínas, el patrón de plegamiento obtenido al variar la temperatura es diferente al observado al utilizar urea o cloruro de guanidina para desplegar a la proteína (Krishna, Prakash. 2014). Por ello, resulta de suma importancia entender si las diferencias en los patrones de plegamiento de las proteínas son debidas al uso de diferentes perturbantes o a variaciones reales en el mecanismo de plegamiento.

Para responder esta pregunta, en este trabajo realizamos una caracterización simultánea del plegamiento de tres TIM con alta identidad de secuencia utilizando temperatura y urea como agentes perturbantes. Si los resultados son independientes de la metodología, observaremos el mismo

comportamiento en el patrón de plegamiento y las propiedades fisicoquímicas para las tres enzimas al usar el mismo perturbante y ser estudiadas mediante varias técnicas.

Si bien las TIM de eucariontes son las más estudiadas, siguen existiendo diversas ramas en las que los patrones de plegamiento reportados son escasos o nulos, tales como las plantas, los insectos y los nemátodos; por ello seleccionamos TIMs de especies representativas de estos grupos.

ANTECEDENTES

Las TIM de este trabajo

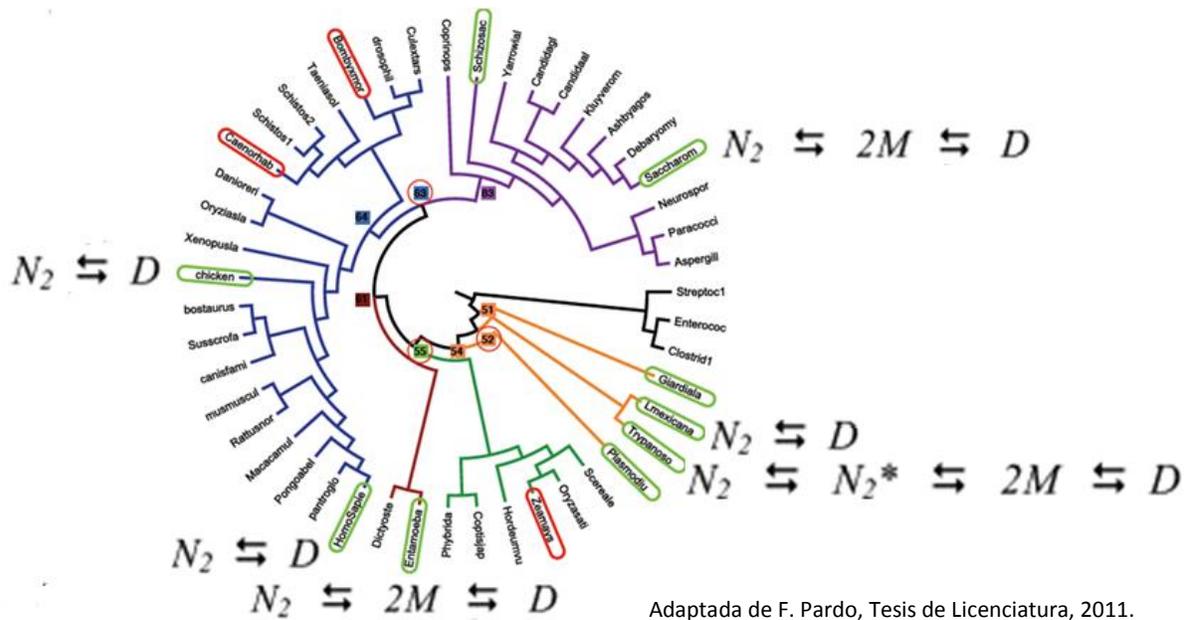
Nos enfocamos en estudiar la TIM de tres especies: *Zea mays* (ZmTIM), *Bombyx mori* (BmTIM) y *Caenorhabditis elegans* (CeTIM). Las tres representan buenos modelos de estudio, ya que no se ha hecho una caracterización fisicoquímica de TIM de plantas, de insecto se ha caracterizado únicamente la de *T. molitor* (Knobeloch et al. 2010) y *C. elegans*, pese a ser una de las especies más estudiadas, no ha sido seleccionada para estudiar esta enzima. Únicamente se ha determinado su estructura mediante difracción de rayos X, a una resolución de 1.7 Å (Symersky et al. 2003. PDB 1MO0).

Por otra parte, una caracterización de estas enzimas servirá para compararlas con TIM ancestrales que fueron propuestas, purificadas y estudiadas en el laboratorio en trabajos previos (F. Pardo, Tesis de Licenciatura, 2011 y M. Schulte-Sasse, Tesis de Licenciatura, 2013).

Mediante alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de diversas TIM y métodos de máxima verosimilitud, se infirió la secuencia de dos TIM pertenecientes a organismos ancestrales extintos: el ancestro común más reciente de animales y hongos y el ancestro común más reciente de animales, hongos y plantas, y fueron denominados TIM63 y TIM55, respectivamente.

Los nodos correspondientes están representados dentro de un árbol filogenético (Figura 5) que fue construido a partir del alineamiento de 36 genes pertenecientes a 191 especies diferentes (Ciccarelli et al, 2006). Las TIMs de este trabajo provienen de especies existentes y, dentro del árbol filogenético, las TIMs ancestrales estudiadas previamente pertenecen a ancestros de dos de las tres especies estudiadas en esta tesis, por ello servirán para hacer una comparación de sus propiedades fisicoquímicas. Las plantas son modelos complicados para el estudio de proteínas, ya que su genoma suele contener varios genes codificantes para la misma proteína, lo cual resulta en isozimas y una gran cantidad de pseudogenes. En particular, *Z. mays* tiene en su genoma cinco genes para TIM. Dos se identificaron como formas de cloroplasto y tres citosólicas (Wendel et al. 1989). La TIM estudiada en este trabajo se identificó como la única TIM citosólica que se expresa de manera constitutiva,

identificada al privar de la luz solar a las raíces de la planta, lo cual disminuyó la expresión de las otras 4 isozimas (Marchionni, Gilbert. 1986).



Adaptada de F. Pardo, Tesis de Licenciatura, 2011.

Figura 5) Árbol filogenético de eucarionotes. Señaladas en verde están las especies cuyas TIM han sido estudiadas, junto a ellas se añadió el patrón de plegamiento propuesto para cada una de acuerdo a los datos y simbología de la Tabla 2. Los nodos 63 y 55 señalados en rojo corresponden a los ancestros cuyas TIM fueron caracterizadas previamente. Señaladas en rojo en las ramas externas del árbol están las especies cuyas TIM fueron estudiadas en este trabajo.

Tabla 3) Identidad de secuencia de aminoácidos entre ZmTIM, BmTIM y CeTIM.

| Enzima | ZmTIM | BmTIM | CeTIM |
|--------|-------|-------|-------|
| ZmTIM | 100% | | |
| BmTIM | 61% | 100% | |
| CeTIM | 58% | 64% | 100% |

Números de acceso: ZmTIM NP_001140424.1, BmTIM NP_001119730, CeTIM NP_496563.

Las tres TIM muestran entre sí alrededor del 60% de identidad (Tabla 3), pero pertenecen a especies alejadas en el árbol filogenético utilizado (Figura 5).

Por ello, será interesante estudiarlas en paralelo para averiguar si el perturbante y la metodología empleada determinan los resultados que se pueden obtener, o cada proteína es diferente, aunque tenga pocas diferencias en su secuencia.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la purificación y caracterización de las propiedades catalíticas y fisicoquímicas de tres triosafosfato isomerasas de especies eucariontes, así como su patrón de plegamiento al equilibrio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Sobre expresar y purificar ZmTIM, BmTIM y CeTIM.
- Analizar sus propiedades espectroscópicas y compararlas con las reportadas para otras TIM.
- Determinar afinidad por el sustrato y eficiencia catalítica.
- Evaluar su estabilidad a la dilución.
- Caracterizar su patrón de plegamiento mediante desnaturalización térmica y química.

HIPÓTESIS

Un estudio en paralelo de proteínas homólogas permitirá detectar mecanismos similares en su plegamiento al equilibrio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Obtención de plásmidos y bacterias transformantes, y ensayo para sobre expresión y purificación de ZmTIM, BmTIM y CeTIM.

Los genes codificantes para las tres enzimas (números de acceso de la Tabla 3) fueron comprados en Epoch Life Science y clonados en un plásmido pBluescript II SK(-). En trabajos previos del laboratorio, Mariana Schulte-Sasse Jiménez y Fátima Alejandra Pardo Ávila subclonaron estos genes en plásmidos pET28b(+) (Figura 6), los cuales, además de la secuencia codificante de la TIM correspondiente, añaden una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, localizada río arriba del sitio de restricción de XhoI, y un sitio de reconocimiento y corte para trombina entre la proteína y la etiqueta. También contienen el gen codificante para la neomicina fosfotransferasa II, la cual confiere resistencia a kanamicina a las bacterias transformantes (Brzezinska, Davies. 1973). El plásmido contiene el operador *lacO* y el gen *lacI*, que codifica para el represor de *lacO*; de esta forma, la expresión del gen es inducible por alolactosa o una molécula análoga, como el isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) (Muller-Hill, Rickenberg, Wallenfels. 1964). (Figura 6).

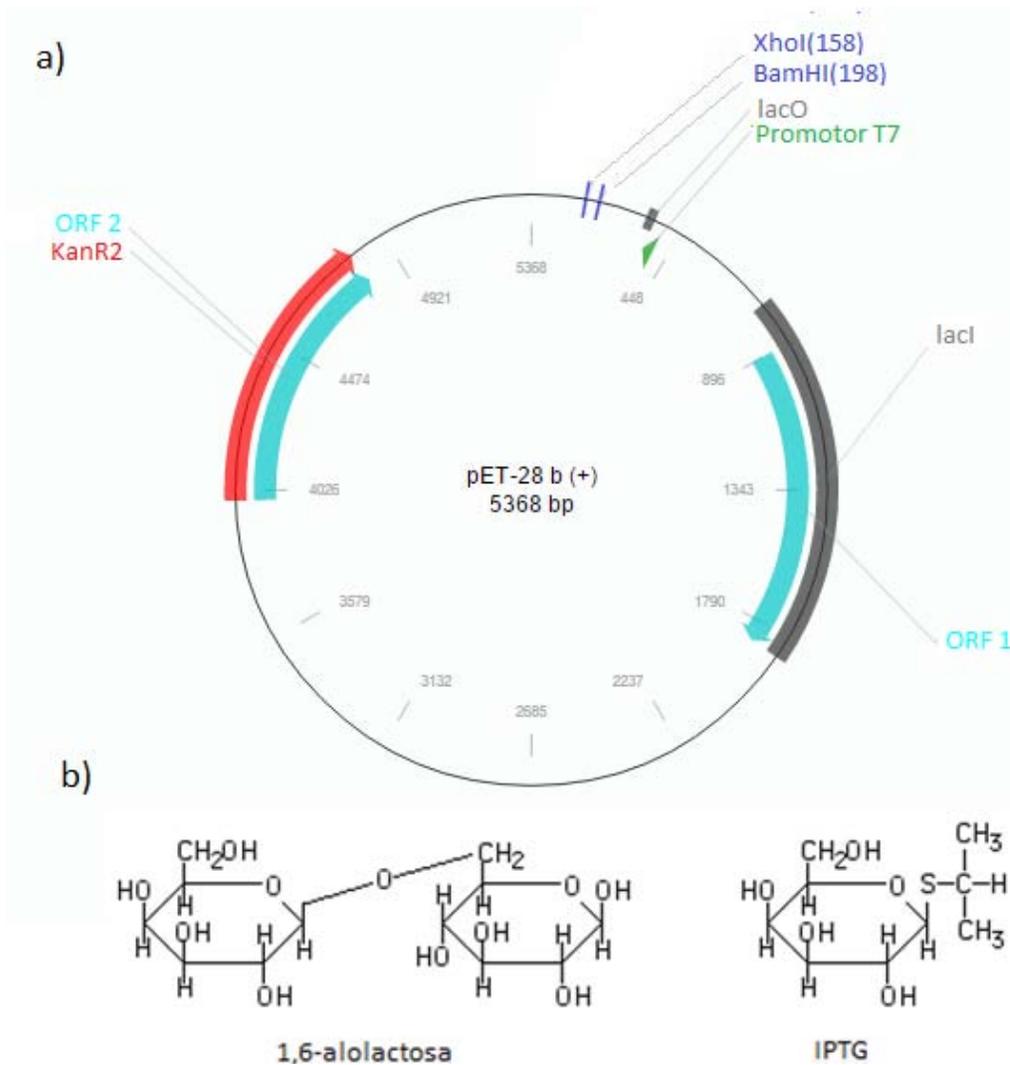


Figura 6) Componentes principales del plásmido pET-28b(+) y estructura del IPTG.

a) Elementos del plásmido pET-28 b(+):

- En cian: marcos de lectura abiertos para la expresión de LacI y el gen de resistencia a kanamicina.
- En gris: el sitio de reconocimiento de LacI, denominado LacO, y río abajo el gen LacI.
- En verde: el promotor T7 para la RNAPol.
- En azul: sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para insertar el gen de la TIM correspondiente.

b) Comparación entre la alolactosa y su análogo no metabolizable, el IPTG.

1.1) Amplificación del plásmido.

1.1.1) Transformación mediante choque térmico.

Células quimiocompetentes DH5 α fueron descongeladas e incubadas a 42 °C durante 45 segundos en presencia de 2 μ L de plásmido puro. Se enfriaron en hielo y posteriormente se indujo crecimiento de

las bacterias mediante la adición de 1 ml de medio Luria-Broth (LB) e incubación a 37 °C en agitación. El cultivo resultante fue sembrado en cajas de Petri con medio sólido con kanamicina y se incubó toda la noche a 37 °C.

1.1.2) Amplificación del plásmido y purificación mediante lisis alcalina.

Dos colonias individuales y separadas fueron colectadas y crecidas en 10 ml de medio LB con antibiótico durante 16 horas. El cultivo se transfirió a tubos Eppendorf^R y se centrifugó a 10000 rpm durante 3 minutos. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 100 µL de una disolución de glucosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM a pH 8, a la cual se le añadió lisozima a una concentración final de 1.6 mg/ml.

Se incubó durante una hora a 37 °C y se transfirió a hielo tras añadir 200 µL de una disolución 0.2M NaOH y 4% SDS.

Se mezcló la suspensión con 150 µL de una disolución 5M de acetato de potasio a pH 5. Tras centrifugar y recuperar el sobrenadante, se añadieron 400 µL de fenol saturado y 400 µL de cloroformo. La mezcla fue centrifugada de nuevo y la fase acuosa fue transferida a tubos limpios con 750 µL de isopropanol. Se incubaron toda la noche y se hicieron ciclos en los cuales se centrifuga la solución, se recuperara la pastilla y se resuspende en etanol al 70% para lavar el plásmido. Una vez desaparecido el olor a cloroformo, la última pastilla fue resuspendida en agua estéril y se cuantificó el plásmido.

1.2) Protocolo de purificación, adaptado de Pardo, F. Tesis de licenciatura, 2011.

1.2.1) Obtención de bacterias transformantes, cultivo, sobre expresión y purificación.

Con los plásmidos purificados en **1.1.2)** se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Zhang, Studier. 1997) mediante el protocolo **1.1.1)**, y con colonias individuales y separadas de bacterias transformantes se inocularon dos cultivos primarios en medio LB con kanamicina durante 16 horas a 37 °C en agitación. Parte del cultivo primario se almacenó a -70 °C en una solución 1:1 con glicerol estéril al 80%.

A partir de dichos cultivos, se inocularon dos medios de 250 ml de medio LB con kanamicina y se incubaron por 3 horas a 37 °C hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 0.8 con un haz de luz de 562

nm. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro DU7500 (Beckman Coulter) con una celda de cuarzo con 1 cm de paso de luz. Como blanco, se usó medio LB estéril.

La expresión de la proteína fue inducida mediante la adición de 48 mg de IPTG a cada cultivo e incubación durante 16 horas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron 20 min a 8000 rpm y a 4 °C. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendieron las pastillas en 10 ml de amortiguador de fosfatos con imidazol (300 mM NaCl, 40 mM NaH₂PO₄, pH 8) con fluoruro de metilfenil sulfonilo (PMSF), un inhibidor de proteasas, a una concentración final de 0.2 mM.

La suspensión resultante se sonicó mediante 15 a 20 pulsos de 40 segundos, con 40 segundos de enfriamiento en hielo entre cada uno. El lisado se centrifugó 20 min a 15000 rpm y 4 °C. Se separaron el sobrenadante y la pastilla, el cual se guardó para comprobar que la proteína no precipitó en la fracción insoluble.

La proteína se purificó del sobrenadante al pasarlo por una columna de afinidad a níquel (Protino NiTED) (Figura 7) acoplada a un sistema de FPLC (Antes Äkta, ahora GE-Healthcare). El equipo está conectado a una computadora y muestra la absorbancia a 280 nm del volumen que sale de la columna, con lo cual se puede detectar el momento de elución de las proteínas.



Figura 7) Interacción de dos histidinas con la resina Protino NiTED. Al tener la etiqueta de histidinas, la proteína recombinante se pega a la fase estacionaria de la columna al coordinar los iones de níquel con los grupos imidazol de las cadenas laterales de las histidinas.

Una vez que las proteínas no recombinantes salieron en el frente de elución, se aplicó un gradiente de imidazol en amortiguador de fosfatos que fue desde 5 mM hasta 500 mM. El paso del imidazol por la fase estacionaria interrumpe la interacción con la etiqueta de histidinas, provocando la elución de la proteína recombinante. Durante el gradiente, se fraccionó el volumen de elución (4 ml por fracción) y se recolectaron las fracciones en las que se observó un aumento en la absorbancia. Al final, para registrar el progreso de la purificación se corrió un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) para detectar la banda correspondiente a la TIM en el lisado total, el sobrenadante y la pastilla tras la sonicación, el frente de elución de la cromatografía y algunas fracciones con proteína. Con esto averiguamos si la proteína se sobre expresó, si fue soluble y si fue retenida por la fase estacionaria de la columna.

Las fracciones con proteína fueron concentradas en un Centricon (Millipore) para obtener un volumen final de 5 ml aproximadamente y éste se dializó en un amortiguador de Tris (50 mM pH 8). La diálisis se realizó con una membrana de celulosa (SIGMA-ALDRICH, D9652-100FT) cuyos poros permiten el paso de iones, pero no de macromoléculas superiores a 12000 kDa. Se realizaron tres diálisis de dos horas en 500 ml de amortiguador a 4 °C. En algunos casos el último volumen de diálisis se dejó toda la noche, sin ningún cambio apreciable en la eficiencia de la purificación.

1.2.2) Corte de etiquetas de histidina.

Primero, se adicionó CaCl_2 a la proteína, con una concentración final de 10 mM; esto es porque la reacción catalizada por la trombina requiere calcio. Antes de llevar a cabo la reacción de corte, se incubó la proteína con calcio a temperatura ambiente durante 15 min, ya que observamos la formación de agregados de tamaño variable. Al correr una muestra de la proteína antes y después de incubar con calcio en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, detectamos la presencia de ADN, lo cual implica que puede ser el responsable de los agregados al eluir junto con la proteína durante la cromatografía. Después de los 15 min, se removieron los precipitados mediante centrifugación 15 min a 5000 rpm y se prosiguió con el protocolo.

La etiqueta se cortó mediante un kit Clean Cleave (Sigma), que consiste en moléculas de trombina fusionadas a una resina de agarosa. La proteína con calcio se añadió a 1 ml de resina dentro de un tubo de 15 ml, se añadió 1 ml de amortiguador de corte (500 mM Tris-HCl, 100 mM CaCl_2 , pH 8) y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua.

La reacción se incubó 5 horas a temperatura ambiente y la proteína fue recolectada en la fase soluble mediante centrifugación 5 min, a 2500 rpm y 4 °C. La proteína recuperada se sometió a dos procesos de diálisis, inicialmente en amortiguador Tris 50 mM para eliminar el calcio y posteriormente en amortiguador de fosfatos con imidazol 5 mM.

Pese a que se observó una eficiencia de corte cercana al 100% en la mayoría de los casos, siempre hubo cierta fracción de proteína que conservó la etiqueta, por lo que se hizo una segunda ronda de cromatografía de afinidad. Esta vez se fraccionó y recolectó el frente de elución, ya que en ausencia de la etiqueta la proteína recombinante no interactúa con la fase estacionaria. Se aplicó el gradiente de imidazol para observar la cantidad de proteína no cortada.

Se concentraron las fracciones con proteína y se pasaron a una última diálisis en amortiguador TED (10 mM de trietanolamina, 1 mM de EDTA y 1 mM de ditiotreitól pH 8).

1.2.3) Purificación por intercambio aniónico y cuantificación.

Para aumentar la pureza de la proteína, se hizo un paso final por una columna de intercambio aniónico MonoQ 10/10 (Pharmacia Biotech). Esta columna separa a las proteínas de acuerdo con su carga neta, ya que la fase estacionaria está cargada positivamente.

Las proteínas se eluyen de manera diferencial al aplicar un gradiente de cloruro de sodio, el cual satura la fase estacionaria de cationes y aniones e impide la interacción con las proteínas.

Al final de la cromatografía de intercambio aniónico, se recolectan una o dos fracciones continuas, se cuantifica su proteína y se corren en un gel a distintas concentraciones para determinar la pureza. La cuantificación se realizó de dos maneras: mediante un ensayo con ácido bicinconínico (BCA) y absorbancia a 280 nm.

BCA

La cuantificación mediante BCA es un ensayo colorimétrico que se basa en dos reacciones principales: la reducción de iones cúpricos (Cu^{+2}) a cuprosos (Cu^{+1}) y el efecto quelante del ácido bicinconínico en presencia de iones Cu^{+1} (Smith, Krohn, Klenk. 1985). La mezcla de reacción para este ensayo contiene BCA y sulfato cúprico (CuSO_4), es decir, con el cobre en su forma más oxidada. Dado que los enlaces peptídicos tienen grupos amino expuestos, sus pares libres de electrones reducen los iones cúpricos. Las moléculas de BCA se coordinan con los iones cuprosos en una proporción 2:1, y esto produce un cambio fuerte de coloración de verde a morado de manera dependiente de la concentración de cobre reducido, y por lo tanto de proteína dentro de la muestra. Este cambio de color es fácilmente monitoreado al medir la absorbancia a 562 nm. Si se realiza esta reacción en presencia de concentraciones conocidas de proteína, se puede construir una gráfica estándar de [Proteína] VS Absorbancia, y mediante regresión lineal se puede calcular la concentración de proteína en muestras desconocidas. En general, para este ensayo construimos las gráficas estándar mediante distintas concentraciones de BSA (albúmina de suero bovino): 0, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Como blanco, usamos la absorbancia de 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para medir las muestras de interés, realizamos dos diluciones distintas, y cada una por duplicado. Los datos se graficaron en Excel y se realizó la regresión lineal para convertir los datos de absorbancia en concentración de proteína.

Absorbancia a 280 nm

Este ensayo requiere de poca proteína y es muy confiable, siempre que se conozca el coeficiente de extinción molar de la proteína de interés y ésta esté pura. El coeficiente de extinción molar está determinado mayoritariamente por la cantidad de residuos de tirosina, triptofano y cisteína reducida

(no en puentes disulfuro), además del pH que afecta el estado de protonación de las cadenas laterales. Nosotros lo llevamos a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop2000 (ThermoSCIENTIFIC, Accesolab), el cual requiere una muestra de 2 µl. Es necesario leer una muestra del amortiguador en el que está la proteína para que el espectrofotómetro sustraiga la señal del amortiguador al medir las muestras.

2 Ensayos para determinar los parámetros catalíticos de las TIM

Para obtener dos parámetros fundamentales de las enzimas: su velocidad en concentraciones saturantes de sustrato, o velocidad máxima (V_{max}) y la concentración de sustrato a la cual alcanzan la mitad de dicha velocidad, denominada constante de Michaelis (K_m), se desarrolló el siguiente protocolo:

La TIM cataliza la interconversión del D- gliceraldehído -3- fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) de manera sumamente rápida.

Para determinar la velocidad de cualquiera de las dos reacciones, se realiza un ensayo en el cual se mide la velocidad inicial de la enzima a concentraciones conocidas y crecientes de sustrato. La velocidad corresponde a la cantidad de sustrato convertido a producto por unidad de tiempo por cantidad de proteína, como unidad de medida se utilizan típicamente las [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$].

Si se construye una gráfica de [Sustrato] vs Velocidad inicial, para enzimas de un solo sustrato que no presentan cooperatividad se obtiene una gráfica hiperbólica, que se puede describir por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V(s) = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Donde:

[S] = concentración de sustrato, es la variable independiente

V(s) = velocidad de la enzima a la concentración de sustrato [S], es la variable dependiente

V_{max} = velocidad máxima de la enzima

K_m = constante de Michaelis

Al ajustar los datos obtenidos del ensayo mediante esta ecuación, se pueden determinar la V_{max} y la K_m de la enzima.

En el caso particular de la TIM, se debe hacer un ensayo acoplado, es decir, añadir otra enzima y los ingredientes de la reacción que cataliza, a la celda donde sucede la reacción de la TIM.

Esto es necesario porque no contamos con un método de detección directa de G3P ni DHAP, así que al acoplar la formación de DHAP a otra reacción que lo utilice como sustrato, y cuyo producto sí sea detectable y cuantificable, podemos determinar la velocidad de la TIM mediante la velocidad observada para la segunda enzima.

El ensayo acoplado utilizado para la TIM acopla la formación de DHAP a la reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α GDH), la cual consiste en la conversión de DHAP en glicerol-3-fosfato mediante la siguiente reacción (Felgner, 2011):



A 340 nm la forma reducida presenta una alta absorbancia, pero la oxidada no (Figura 8). Mediante esta diferencia, se puede monitorear la oxidación en el tiempo del NADH como resultado de la reacción de la α GDH en un espectrofotómetro.

La utilidad de esta reacción radica en el cambio en el coeficiente de absorción resultante de la oxidación del NADH. .

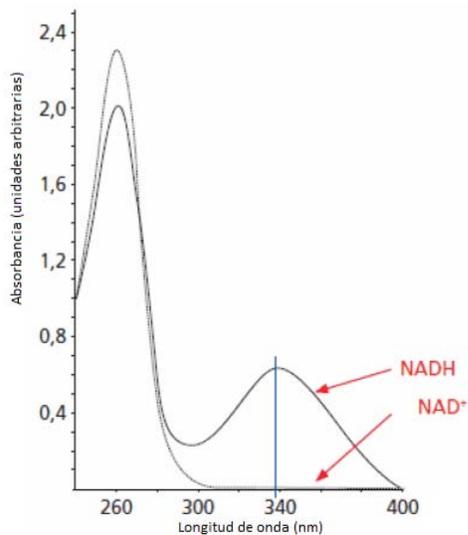


Figura 8) Curvas de absorbancia del NADH y el NAD^+
Únicamente el NADH presenta absorbancia a 340 nm.
(Adaptada de Felgner, 2011)

En condiciones saturantes de NADH y de α GDH, cada molécula de DHAP se convierte rápidamente en glicerol-3-fosfato, por lo que la velocidad de decaimiento del NADH es igual a la velocidad de formación de DHAP, y podemos calcular la velocidad de la TIM mediante la siguiente ecuación:

$$V = \frac{mAbs}{(\epsilon) \cdot L \cdot [E]} \quad (2)$$

V = velocidad a esa concentración de sustrato en $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$

mAbs = pendiente del cambio en la absorbancia de la celda tras añadir la TIM

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm = $6.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

l = paso de luz de la celda, la distancia que recorre el haz de luz dentro de la celda = 1 cm

[E] = concentración de enzima

Los ensayos fueron realizados en amortiguador TED 100:10:1 (Trietanolamina 100mM, EDTA 10 mM y DTT 1 mM, pH 8) a 25 °C. El volumen final en cada celda de reacción fue de 700 μl , la concentración inicial de NADH fue de 2 μM y 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de αGDH . La concentración final de TIM para cada medición fue de 5 ng/ml, y para llegar a esta concentración se añadieron 14 μl de una dilución inicial a 250 ng/ml, hechas justo antes de medir actividad para evitar inactivación por dilución.

Inicialmente, se incubaron las celdas sin TIM en el espectrofotómetro a 25 °C, el cual realizó mediciones a 340 nm cada 15 segundos. Esto fue para asegurarnos de que la temperatura fuera estable y la absorbancia en ausencia de TIM fuera constante y no hubiera una caída intrínseca por la mezcla de reacción. Tras 5 minutos de lectura, se añadió la TIM y cada celda se leyó por un mínimo de 6 minutos para tener una recta de la cual obtener la pendiente.

3 Evaluación de estabilidad a la dilución.

Debido a que la TIM es un oligómero, independientemente de la cantidad de pasos que dicten su plegamiento habrá uno que involucre una oligomerización, ya sea antes o después de un plegamiento parcial de los monómeros: $2M \rightarrow D$. Esto significa que una disminución en la concentración total de proteína desplazará el equilibrio en favor de la formación del monómero y favorecerá la disociación. De acuerdo a las concentraciones de cada estado en el equilibrio, se puede calcular una constante de disociación:

$$K_{dis} = \frac{[M]^2}{[D]} \quad (3)$$

K_{dis} = constante de disociación, expresada en (mol/L)

[M] = concentración de proteína en estado monomérico, expresada en (mol/L)

[D] = concentración de proteína en estado nativo, expresada en (mol/L)

Incubamos durante 24 horas diferentes concentraciones de proteína en amortiguador TED a 25 °C y medimos la actividad de la enzima. Como la TIM es un dímero obligado, únicamente la fracción de proteína que esté en la conformación nativa (fN) tiene actividad. Esto significa que al disminuir la

concentración de proteína y desplazar el equilibrio en favor de la formación del monómero, el cual es inactivo, habrá una caída de actividad. Gracias a este principio, al normalizar los datos de cada actividad, obtuvimos una curva de dilución, y cada punto experimental se representó con un valor de 0 a 1. Esta normalización se hizo mediante la siguiente ecuación:

$$fN = \frac{Act[E] - ActMin}{ActMax - ActMin} \quad (4)$$

fN = fracción de proteína en el estado nativo, expresada en (mol/L)

Act[E] = la actividad a cada concentración de proteína

ActMin = la actividad de la concentración más baja de proteína, cercana a 0

ActMax = la actividad de la concentración más alta de proteína

Mediante los datos normalizados pudimos realizar curvas de [Proteína] VS Actividad fraccional, las cuales nos permitieron determinar la constante de disociación de la enzima mediante la siguiente ecuación:

$$fN = \frac{Kdis + 4Pt - \sqrt{Kdis^2 + (8 * Kdis * Pt)}}{4Pt} \quad (5)$$

fN = fracción de proteína en estado nativo

Kdis = constante de disociación, expresada en (mol/L)

Pt = concentración de proteína total, expresada en (mol/L).

4 Estudios espectroscópicos.

Una vez que se tiene la proteína pura, es importante confirmar que presente una estructura plegada. Ya que la TIM es una enzima muy estudiada se conocen sus propiedades espectroscópicas generales, las cuales podemos usar para evaluar si las enzimas de este estudio están correctamente plegadas.

Las propiedades espectroscópicas son todas aquellas que se pueden detectar e incluso cuantificar mediante la respuesta de la proteína a la incidencia de la radiación electromagnética a través de ella.

Al variar la polarización de la luz incidente, su longitud de onda y el detector de la luz resultante, pudimos realizar dos estudios diferentes: obtención del espectro de dicroísmo circular (Chirascan, Applied Photophysics) y monitoreo de la señal de fluorescencia de residuos aromáticos (POLARstar OMEGA, BMG LABTECH).

Dicroísmo circular: este fenómeno sucede debido a la desviación diferencial de la luz circularmente polarizada al incidir en el esqueleto de carbono de las proteínas. La luz linealmente polarizada se

mueve en un solo plano bidimensional, y si se superponen perpendicularmente dos haces de luz polarizada, que estén en fase, la onda resultante seguirá siendo linealmente polarizada, y se desplazará en un plano bidimensional con un ángulo de 45° respecto a los haces que la generaron. Sin embargo, si los haces de luz no están en fase, la onda resultante se desplazará describiendo un espiral en un plano tridimensional. Dicha onda se conoce como luz circularmente polarizada (Figura 9).

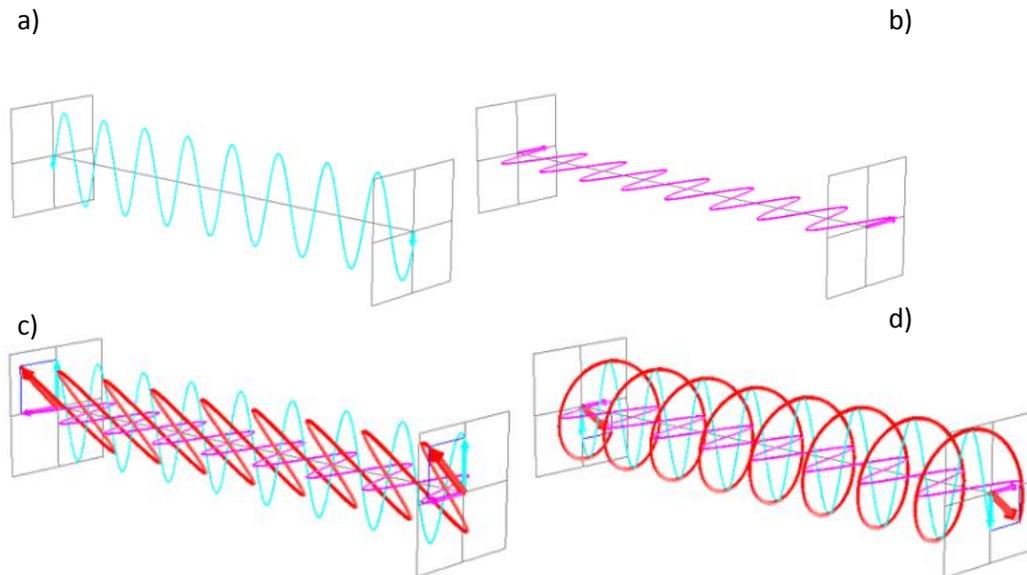


Figura 9) Polarización circular de la luz.

- a) Luz polarizada verticalmente
- b) Luz polarizada horizontalmente
- c) Superposición de ambas en fase, con la resultante a 45° en rojo
- d) Superposición de ambas fuera de fase, dando como resultado la luz circularmente polarizada

En función de cómo sea el desfase de los haces, la luz puede estar circularmente polarizada a la izquierda o a la derecha. Este es el factor clave para el estudio de proteínas por dicroísmo circular.

Con excepción de la glicina, los aminoácidos contienen al menos un carbono quiral, localizado entre el grupo amino y el grupo carboxilo, el cual los vuelve moléculas ópticamente activas. Esto quiere decir que absorben de manera diferencial luz polarizada hacia la izquierda o la derecha (<http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/1-understanding-circular-dichroism>).

La fuente de luz del Chirascan (Applied Photophysics) emite un haz orientado a la izquierda y uno a la derecha, los cuales al pasar por las proteínas de una muestra se desviarán de manera diferencial, y el plano por el que viaje el haz resultante tendrá cierta desviación, conocida como elipticidad, que

puede cuantificarse en miligrados. A partir del espectro de dicroísmo de una proteína, se pueden detectar desviaciones características de cada tipo de estructura secundaria reportada (Greenfield, 2006). En el caso de las TIM correctamente plegadas, hay dos mínimos (210 y 220 nm) y un máximo (190 nm) en su espectro de dicroísmo en el UV lejano (longitudes de onda de 250 a 180 nm), característicos de proteínas con hélices alfa y hebras beta. El mínimo a 220 nm fue utilizado para seguir los procesos de desplegamiento y replegamiento de ZmTIM, BmTIM y CeTIM.

Obtuvimos el espectro de dicroísmo de las tres enzimas en un rango de 190 nm a 260 nm con diluciones a 400 µg/ml en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 8, ya que altas concentraciones de sales en el disolvente absorben en las longitudes de onda utilizadas y vuelven ruidosos los espectros. Los estudios de plegamiento por temperatura y por urea se siguieron a 222 nm en el mismo amortiguador.

Fluorescencia: a diferencia del dicroísmo, con el que se detecta la presencia de estructura secundaria, la fluorescencia se utiliza para estudiar el ambiente químico que rodea a los residuos aromáticos de la proteína dentro de su estructura tridimensional.

La fluorescencia es un fenómeno en el cual un electrón es excitado por un fotón incidente de cierta longitud de onda, lo cual ocasiona que el electrón se mueva a un nivel energético mayor al de su estado basal. Dado que dicho salto es inestable, el electrón tiende a regresar a su estado basal, y al hacerlo emite un fotón de menor energía al incidente.

Cuando el electrón de una molécula está en estado excitado, hay diversas formas de disipación de esa energía además de la emisión de otro fotón, como la transmisión de calor en forma de vibraciones al medio en el que se encuentra la molécula.

Esta disipación energética disminuye la energía del fotón emitido, lo que hace que tenga una longitud de onda mayor.

Las moléculas que tienen la capacidad de emitir luz como fluorescencia se conocen como fluoróforos, y de manera general se trata de moléculas con grupos aromáticos (cíclicos).

Las proteínas son fluorescentes debido a su contenido de fenilalaninas, tirosinas y triptófanos, siendo los últimos dos los de mayor contribución.

La fenilalanina (Phe, F) es, como su nombre lo indica, un aminoácido con la estructura química de la alanina, más un grupo fenilo unido al C3. Su máximo de fluorescencia se observa al excitarlo a 257 nm. La tirosina (Tyr) puede pensarse como una fenilalanina con un grupo hidroxilo en el C4 del fenol. Su máximo de fluorescencia se observa al excitarlo a 274 nm. Finalmente, el triptófano (Trp) tiene un

grupo más complejo, conocido como indol. Su máximo de fluorescencia se observa al excitarlo a 295 nm.

La capacidad de fluorescencia de estos aminoácidos es altamente modificada por el ambiente que los rodea, y es esta característica la que sirve para estudiar la estructura terciaria de las proteínas. El fenómeno de fluorescencia se origina en sus grupos aromáticos, los cuales tienen enlaces dobles cuyos electrones pueden moverse de un enlace a otro, en un fenómeno conocido como resonancia. La inestabilidad de estos electrones les confiere la propiedad de ser excitables por fotones incidentes y emitir fotones de menor energía .

Si bien cada proteína tiene su “firma de fluorescencia” en función de cuántos residuos aromáticos tiene, cuáles son y en qué sitio de la proteína están ubicados, hay generalidades que se pueden usar:

- Cuando los residuos aromáticos están escondidos en el núcleo hidrofóbico de una proteína, los máximos de fluorescencia se observan a longitudes de onda más pequeñas.
- En cambio, la exposición de estos residuos al disolvente provoca un “corrimiento” al rojo, es decir, el máximo de fluorescencia se desplaza a longitudes de onda más grandes, de menor energía.

De esta manera, se puede estudiar el plegamiento de proteínas al evaluar el desplazamiento del máximo de fluorescencia de las mismas en condiciones desnaturizantes, o bien seguir la señal observada a una sola longitud de onda en la que la forma nativa presenta una fluorescencia alta.

Para este trabajo, las tres enzimas fueron excitadas a 280 nm variando la concentración de urea, y en distintas concentraciones de proteína. Se siguió la emisión a 320 nm en el fluorómetro de placas PolarSTAR OMEGA a 25 °C.

5 Evaluación de la estabilidad térmica.

Un acercamiento al estudio del plegamiento de proteínas es la desnaturalización y renaturalización de las mismas. Estos procesos se estudian al someter a la proteína de interés a condiciones que hagan desfavorable la presencia de su estado nativo. En este caso, sometimos a la proteína a un gradiente de temperatura, desde los 25 °C hasta alrededor de 80 °C a una velocidad de barrido de 1 °C por minuto. Para monitorear el estado de la proteína durante el proceso, medimos su elipticidad a 222 nm en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics).

Las tres enzimas se dializaron en amortiguador de fosfato dibásico de sodio (10 mM, pH 8), se filtraron y se cuantificaron al medir su absorbancia a 280 nm.

ZmTIM se analizó a una concentración de 200 µg/ml, mientras que BmTIM y CeTIM a 400 µg/ml en una celda de cuarzo de 0.1 mm de paso de luz.

El ensayo se hizo en ambas direcciones, es decir, al alcanzar la temperatura máxima se regresó cada enzima a 25 °C a la misma velocidad de barrido y se siguió la misma señal para ver si se trataba de un proceso reversible y si seguía el mismo camino, en caso contrario se determinó que presentaban histéresis. En caso de observar una sola transición, se asume que se trata de un modelo de dos estados: monómeros desplegados y el dímero activo. De ser así, se puede ajustar la curva mediante la ecuación de Boltzmann:

$$fD = y_{min} * \frac{(y_{max} - y_{min})}{1 + e^{\frac{(T_m - T)}{m}}} \quad (6)$$

fD = fracción de proteína en el estado nativo a la temperatura T, variable dependiente

y_{min} = señal de dicroísmo a temperaturas altas, constante

y_{max} = señal de dicroísmo de la proteína nativa, constante

T_m = temperatura media de la transición, es el punto de inflexión de la curva, constante

m = pendiente de la transición, constante

T = temperatura, variable independiente

La señal de dicroísmo observada en cada punto experimental se puede normalizar de la misma forma utilizada en el estudio de dilución (ecuación 4), sustituyendo actividades por la elipticidad medida en el espectropolarímetro con una longitud de onda de 222 nm.

En caso de que haya histéresis en el enfriamiento de la proteína, o que no se recupere la señal inicial, la T_m obtenida de esta ecuación es aparente y no se pueden obtener parámetros termodinámicos de este proceso, ya que no se están formando las mismas especies que al desnaturalizar a la proteína y por ello no se puede calcular una constante de equilibrio.

6 Ensayos de desplegamiento y replegamiento con urea

Las tres enzimas fueron estudiadas en paralelo y en las mismas condiciones.

Se prepararon muestras de cada TIM a una concentración constante de proteína en diferentes concentraciones de urea:

La urea se preparó a una concentración de 9 M en amortiguador de fosfato dibásico de sodio (10 mM, pH 8); ya que su disolución es un proceso endotérmico, tuvimos que calentar la solución al mezclarla.

Una vez que se disolvió por completo, ajustamos el pH y filtramos con una membrana de celulosa con un paso máximo de moléculas de 12 kDa (Millipore). Para cada experimento se preparó urea fresca y

se almacenó por un máximo de tres días a temperatura ambiente. Una vez preparada, se determinó su concentración exacta, ya que puede haber variaciones por evaporación o porque no se disolvió por completo. Para ello, se determinó su índice de refracción (IR) mediante un refractómetro (Atago). Se midió el IR del amortiguador en ausencia de urea, preparado de manera idéntica, y luego el de la urea. A partir de la diferencia en ambos IR, se calculó la molaridad real de urea mediante la siguiente ecuación (Warren, Gordon. 1966):

$$M = 117.66 * \Delta\eta + 29.753 * \Delta\eta^2 + 185.56 * \Delta\eta^3 \quad (7)$$

$\Delta\eta =$ diferencia entre los índices de refracción de la urea y del amortiguador

Para el desplegamiento, se incubó una dilución inicial a 1 mg/ml en amortiguador, durante tres horas a 25 °C; el replegamiento se realizó a partir de una dilución en las mismas condiciones, pero a una concentración de 5 M a 7 M de urea; esta concentración varió en función de cuál era la concentración más baja de urea que se quería alcanzar en las muestras, una concentración inicial de urea más baja permitió llegar a concentraciones finales menores. Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron alícuotas de ambas y se diluyeron en distintas concentraciones de urea.

En el caso del desplegamiento es sencillo, ya que sólo se debe calcular el volumen del stock de urea 9M que se requiere para que el volumen final de cada muestra tenga la concentración de urea correspondiente.

En cambio, para el replegamiento es necesario considerar la cantidad inicial de urea que viene con la alícuota. Calculamos dicha cantidad de urea, la restamos a la cantidad de urea total que debe haber en cada muestra y añadimos un volumen de urea para alcanzar dicha cantidad. Completamos el resto del volumen de cada muestra con amortiguador e incubamos un tiempo determinado.

Se incubaron inicialmente a diferentes tiempos para encontrar el tiempo en el que el proceso llegó al equilibrio, es decir, cuando la velocidad de interconversión de las especies formadas se volvió la misma y por lo tanto la señal monitoreada (en este caso fluorescencia) fue constante en el tiempo.

Esto sirvió también para evaluar si el desplegamiento de las tres enzimas se trató de un proceso reversible y la proteína replegada recuperó sus cualidades iniciales. Dado que BmTIM mostró una reversibilidad inferior al 70%, no la estudiamos más a fondo mediante este protocolo. ZmTIM tuvo reversibilidad del 100% y CeTIM de 85%, por lo que fueron utilizadas para estudios posteriores.

Dado que las curvas de desplegamiento y replegamiento permanecieron iguales a partir de las 24 horas de incubación, se seleccionó ese tiempo para los siguientes ensayos.

Las muestras de las tres TIMs fueron estudiadas con tres técnicas diferentes:

- a) Fluorescencia mediante un filtro de excitación de 280 nm y emisión de 320 nm.
- b) Dicroísmo circular a 222 nm.
- c) Actividad a concentración saturante de sustrato (2 mM).

MODELOS DE AJUSTE PARA ENSAYOS DE DESPLEGAMIENTO Y REPLEGAMIENTO CON UREA

Los datos obtenidos experimentalmente por sí solos, permiten observar de manera cualitativa el patrón de plegamiento de una proteína, sin embargo, para poder caracterizar termodinámicamente el proceso se requieren los parámetros asociados al proceso, los cuales pueden obtenerse al ajustar los datos a un modelo descrito por una ecuación que incluya dichos parámetros.

El plegamiento de una TIM involucra la formación de interacciones electrostáticas entre cadenas laterales, la conjunción de residuos hidrofóbicos y el desplazamiento de moléculas de disolvente y sales que interactuaban con la proteína desplegada. Todos estos procesos provocan un cambio entrálpico y entrópico, y el cambio energético neto del proceso se conoce como energía libre de Gibbs, o ΔG , que también puede estar expresado en términos de la temperatura y de la constante de equilibrio que exista entre el estado inicial y final del sistema:

$$K_{eq} = \frac{[D]}{[M]^2} \quad (8)$$

[D] = concentración de proteína en forma dimérica

[M] = concentración de proteína como monómero desplegado

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} \quad (9)$$

R = constante universal de los gases, para este trabajo, se usó como 0.0083 KJ/(mol*K)

T = temperatura, en todos los experimentos fue de 298 K

Por otra parte, en función de la concentración de desnaturizante (urea en este trabajo), se puede calcular la dependencia del ΔG . Es decir, cuánto se modifica la energía libre del plegamiento por mol de urea. Esto es posible gracias a que la dependencia es lineal. Si se grafican los ΔG resultantes de una curva de desnaturalización contra la concentración de urea en cada uno, se obtiene una línea recta. Esta transformación de los datos permite obtener el ΔG en ausencia de urea y la pendiente mediante la ecuación de una recta:

$$\Delta G(u) = \Delta G^\circ + m * u \quad (10)$$

$\Delta G(u)$ = cambio en la energía libre en función de la concentración de urea, variable dependiente

ΔG° = cambio en la energía libre en agua

m = dependencia del cambio en la energía libre con la concentración de urea

u = concentración de urea, variable independiente

Si sustituimos la ecuación 10 en la 9, podemos obtener una manera de expresar la constante de equilibrio en función del ΔG° y la dependencia del cambio de energía con la concentración de urea:

$$K_{eq} = e^{-\frac{\Delta G^\circ + (m * u)}{RT}} \quad (11)$$

Esto es cierto al estudiar un proceso de dos estados. Si se trata de un sistema más complejo, se puede estudiar cada una de las transiciones que lo componen mediante este método.

En un experimento de desplegamiento y replegamiento, no se obtienen valores de ΔG de manera directa, lo que se construye con los datos crudos son curvas de alguna señal observada (actividad, dicroísmo, fluorescencia) contra la concentración de urea. Esto hace que los datos deban reinterpretarse.

Mediante la ecuación 4 (página 24), se puede obtener el cambio fraccional, es decir, el valor observado para la señal estudiada como una fracción de la señal máxima en ausencia de urea. Al transformar así los datos, se obtiene una gráfica de cambio fraccional vs [Urea]. Todos los ajustes se hicieron en el programa OriginPro 9.0 (OriginLab).

Para este trabajo se utilizaron dos modelos de plegamiento, de dos estados y de tres estados con un intermediario monomérico.

Modelo de dos estados $D \leftrightarrow M$

En este tipo de plegamiento, la TIM sólo existe en dos conformaciones al equilibrio, el dímero nativo y funcional (D), o el monómero desnaturalizado (M). Para este modelo, las curvas deben mostrar una sola transición y el proceso debe ser reversible y estar al equilibrio, es decir, no debe detectarse histéresis entre las curvas de desplegamiento y replegamiento.

Para describir este proceso, se define la fracción de proteína nativa (f_D) en función de la proteína desnaturalizada como:

$$f_D = 1 - f_M \quad (12)$$

f_D = fracción de proteína en el estado nativo

f_M = fracción de proteína en el estado desnaturalizado

La concentración de proteína en estado nativo o desnaturizado puede definirse en función de dichas fracciones y la concentración total de proteína:

$$[D] = (1 - fM) * \frac{Pt}{2} \quad [M] = fM * Pt \quad (13.1 \text{ y } 13.2)$$

[D] = concentración de proteína en estado nativo, expresada en (mol/L)

Pt = concentración total de proteína, expresada en (mol/L)

Si sustituimos las equivalencias en las ecuaciones 13.1 y 13.2 en la ecuación 8, obtenemos una forma de calcular la constante de equilibrio en función de la fracción de proteína en estado monomérico:

$$Keq = \frac{(1-fM)}{2*fM^2*Pt} \quad (14)$$

Keq = constante de equilibrio, expresada en (M⁻¹)

Finalmente, si se despeja fM la ecuación 14 y se iguala a cero, se obtiene una ecuación de segundo grado. Si se resuelve mediante la fórmula general y se sustituye la Keq por su equivalencia en la ecuación 11, se obtiene la ecuación final con la que se ajustan las curvas normalizadas de los experimentos:

$$fM = \frac{-1 + \sqrt{1 + \left(8Pt * e^{-\frac{\Delta G^\circ + (m*u)}{RT}}\right)}}{4Pt * e^{-\frac{\Delta G^\circ + (m*u)}{RT}}} \quad (15)$$

ΔG° = cambio en la energía libre de Gibbs, expresada en (KJ/mol)

m = dependencia del ΔG con la concentración de urea, expresada en (KJ/(mol*M))

R = constante universal de los gases, en este caso expresada en (KJ/(mol*K))

T = temperatura, expresada en (K)

En el programa Origin, construimos una gráfica de fracción de fN VS [Urea], y ajustamos mediante esta ecuación, la cual programamos directamente:

$$1 - (-1 + \sqrt{1 + (8 * P * (\exp(-(D + (m * x)) / 2.477572)))) / (4 * P * (\exp(-(D + (m * x)) / 2.477572)))$$

donde P es la concentración de proteína expresada en moles de monómero/L, D es el ΔG° y m es la pendiente.

Modelo de tres estados con intermediario monomérico $D \leftrightarrow M'' \leftrightarrow M$

Aquí hay tres especies, y por lo tanto dos equilibrios; uno entre el dímero nativo (D) y monómeros parcialmente plegados (M''), y otro entre ellos y monómeros totalmente desnaturizados (M).

Este comportamiento provoca que en las curvas de desplegamiento y replegamiento se vea una meseta en la curva, o curvas idénticas de una sola transición, pero desfasadas.

Para definir la ecuación que se usará, es necesario tener consideraciones adicionales en comparación con el modelo de dos estados por la presencia del intermediario.

Primero, en el modelo de dos estados los datos se normalizan asumiendo que el estado desnaturalizado tiene una señal relativa de cero, por lo que toda la señal observada pertenece al estado nativo. Para el modelo de tres estados, se debe tomar en cuenta que el intermediario tiene una señal, diferente a la del estado nativo y desnaturalizado, distinta de cero. Por lo tanto, para establecer el equilibrio entre las especies se utiliza un término denominado alfa (α), que se refiere al cambio fraccional observado en las curvas normalizadas en función del estado nativo y el intermediario.

Segundo, si bien se puede usar el mismo truco algebraico para definir la constante de equilibrio en función del ΔG° y la "m", es necesario considerar que son dos procesos, por lo que habrán dos constantes de equilibrio, una de plegamiento de los monómeros y otra de la asociación de los mismos:

$$K_{pleg} = e^{-\frac{\Delta G_{pleg}^\circ + (m_{pleg} * u)}{RT}} \quad K_{asoc} = e^{-\frac{\Delta G_{asoc}^\circ + (m_{asoc} * u)}{RT}} \quad (16.1 \text{ y } 16.2)$$

$$\alpha = fD + (I * fM'') = (2Pt * fM'^2 * K_{asoc}) + I * fM'' \quad (17)$$

K_{pleg} = constante de equilibrio para el plegamiento de cada monómero

ΔG°_{pleg} = cambio en la energía libre de Gibbs del plegamiento de los monómeros, expresado en (KJ/mol)

m_{pleg} = dependencia del ΔG_{pleg} con la concentración de urea, expresada en (KJ/(mol*M))

K_{asoc} = constante de equilibrio para la asociación de los intermediarios monoméricos

ΔG°_{asoc} = cambio en la energía libre de Gibbs de la formación del dímero nativo, expresado en (KJ/mol)

m_{asoc} = dependencia del ΔG_{asoc} con la concentración de urea, expresada en (KJ/(mol*M))

fM'' = fracción de proteína en estado intermediario

I = señal normalizada del intermediario

De manera similar a la utilizada para el modelo de dos estados, se puede poner la fracción de proteína en estado intermediario (fM'') en función de las constantes de plegamiento y asociación, sustituirlas por las exponenciales de las ecuaciones 16.1 y 16.2 (ecuación 18) y sustituir en la ecuación 17 para llegar a la ecuación final. Esta ecuación fue utilizada para ajustar las curvas encontradas para la TIM de levadura (Nájera, Costas, Fernández. 2003).

$$fM'' = \frac{-\left(\frac{1}{e^{-\frac{\Delta G_{pleg}^{\circ} + (m_{pleg} \cdot u)}{RT}} + 1}\right) + \sqrt{\left(\frac{1}{e^{-\frac{\Delta G_{pleg}^{\circ} + (m_{pleg} \cdot u)}{RT}} + 1}\right)^2 + \left(8Pt \cdot e^{-\frac{\Delta G_{asoc}^{\circ} + (m_{asoc} \cdot u)}{RT}}\right)}}{4Pt \cdot e^{-\frac{\Delta G_{asoc}^{\circ} + (m_{asoc} \cdot u)}{RT}}} \quad (18)$$

El ajuste mediante la ecuación de α sustituida es más delicado que el de dos estados, ya que contiene cinco incógnitas, en lugar de dos: " ΔG°_{pleg} ", " m_{pleg} ", " ΔG°_{asoc} ", " m_{asoc} " e " I ". Los parámetros iniciales que se le dan al programa determinan enormemente si el ajuste converge.

La ecuación la programamos directamente:

$$(2 * (((-(1 / (\text{EXP}(-(F + (m * x)) / 2.477572))) + 1)) + \text{sqrt}((((1 / (\text{EXP}(-(F + (m * x)) / 2.477572))) + 1)^2 + (8 * (\text{EXP}(-(G + (n * x)) / 2.477572)) * P)))) / (4 * (\text{EXP}(-(G + (n * x)) / 2.477572)) * P))^2 * (\text{EXP}(-(G + (n * x)) / 2.477572)) * P) + (I * (((-(1 / (\text{EXP}(-(F + (m * x)) / 2.477572))) + 1)) + \text{sqrt}((((1 / (\text{EXP}(-(F + (m * x)) / 2.477572))) + 1)^2 + (8 * (\text{EXP}(-(G + (n * x)) / 2.477572)) * P)))) / (4 * (\text{EXP}(-(G + (n * x)) / 2.477572)) * P)))$$

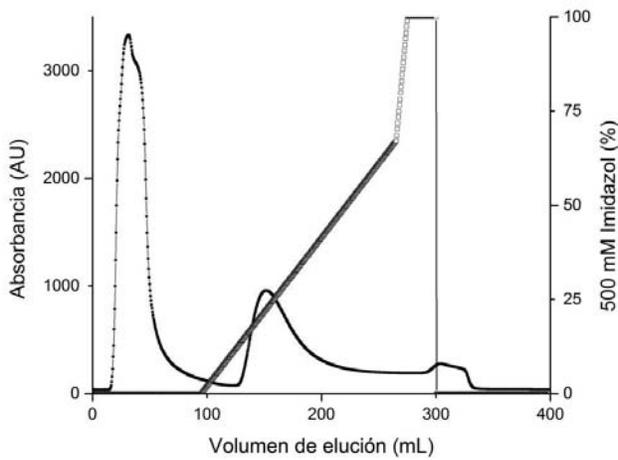
donde P es la concentración de proteína en molar, "F" y "m" son el ΔG°_{pleg} y m_{pleg} respectivamente, "G" y "n" son ΔG°_{asoc} y n_{asoc} , e "I" es la señal normalizada del intermediario.

RESULTADOS

Purificación de las TIM

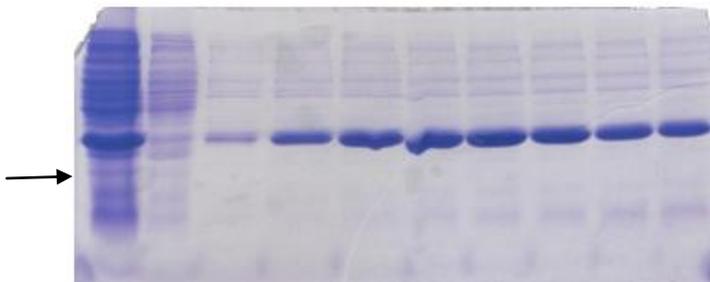
Para las tres TIM estudiadas, las bacterias transformadas con los plásmidos que contienen los genes de las TIMs se obtuvieron con éxito, se realizaron gliceroles al 40% de los cultivos resultantes y éstos sirvieron para todas las purificaciones llevadas a cabo. Tras crecer cultivos en presencia de kanamicina e inducir la sobre-expresión de la TIM correspondiente, las bacterias fueron cosechadas y sonicadas. Mediante centrifugación se separó el sobrenadante con las proteínas solubles de la pastilla que contiene restos celulares y bacterias que no se lisaron. El sobrenadante fue filtrado y se inyectó a una columna de afinidad a níquel acoplada a un sistema de FPLC. En la computadora conectada al FPLC se puede ver un cromatograma con la absorbancia del volumen que eluye de la columna al excitar a 280 nm (Figura 10a). Mediante el cromatograma, fue posible detectar a partir de qué volumen de elución comenzó a salir la proteína recombinante de la columna, y las fracciones se recolectaron y corrieron en un gel desnaturante de acrilamida junto con el frente de elución y una muestra del lisado total inicial (Figura 10b). Se obtuvo otro cromatograma al pasar la proteína por la misma columna, después de incubarla con la trombina para remover la etiqueta de histidinas (Figura 10c). Finalmente, se obtuvo un cromatograma al pasar la proteína por la columna de intercambio aniónico y se corrió un gel desnaturante con cada paso de la purificación (Figura 10d y 10e).

Figura 10) Etapas de la purificación de las enzimas. Se muestran los resultados obtenidos durante una purificación de ZmTIM, ya que los de las otras dos enzimas son similares. Los cromatogramas muestran la absorbancia excitando a 280 nm. La curva corresponde al volumen de elución, y las líneas rectas al porcentaje del amortiguador de separación.



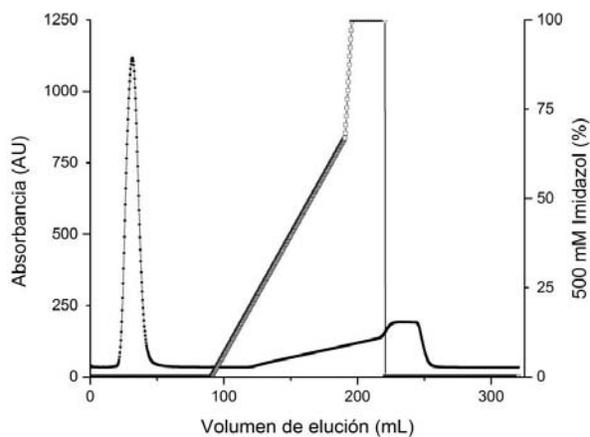
a) Cromatograma del lisado total de las bacterias. El primer pico corresponde al frente de elución de todo lo que no interactuó con la columna, el segundo a la proteína recombinante, la cual comienza a eluir a una concentración de 80 mM de imidazol.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

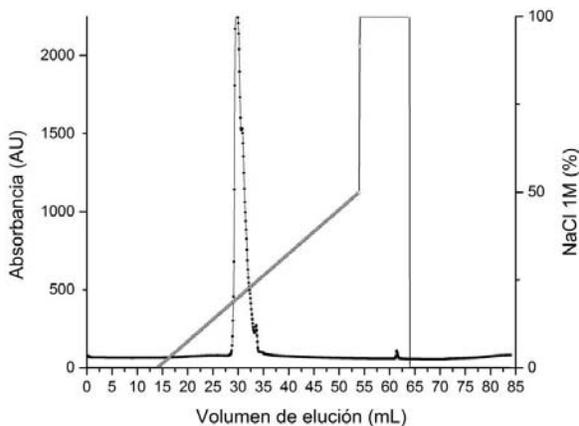


b) Gel del primer paso de la purificación.

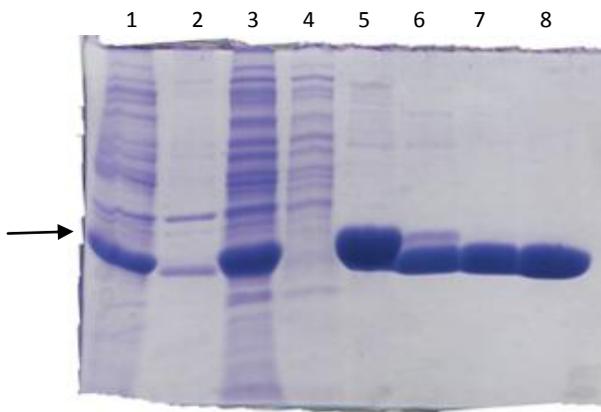
1: lisado total; 2: frente de elución de la cromatografía, en el cual no se detecta la banda correspondiente a la TIM; 3-10: fracciones del pico observado de 80 mM a 125 mM de imidazol. La flecha señala la banda cuyo peso corresponde al monómero de la TIM.



c) Segunda cromatografía de afinidad, tras cortar la etiqueta de histidinas con trombina. Podemos ver que existe un solo pico, que además eluye antes de aplicar el gradiente de imidazol. Esto significa que se trata de la proteína recombinante, recolectada en la cromatografía anterior, sin la etiqueta.



d) Finalmente, en la cromatografía de intercambio aniónico se observa un solo pico que eluye en una a dos fracciones, a una concentración de 200 mM de NaCl.



e) Gel con todas las etapas de la purificación.

1: sobrenadante tras centrifugar lisado de bacterias, 2: pellet resuspendido en agua, 3: lisado total, 4: frente de elución de la primera cromatografía, 5: proteína concentrada de las fracciones de la primera cromatografía, 6: proteína recuperada tras el corte con trombina, 7: proteína tras concentrar fracciones de la segunda cromatografía, 8: proteína recuperada de la cromatografía de intercambio aniónico.

En los tres cromatogramas obtenidos para los pasos principales de la purificación (Figura 10a, 10c, 10d), se observó el comportamiento predicho y las tres enzimas tuvieron rendimientos muy similares.

En el gel que resume toda la purificación (Figura 10e), podemos evaluar el éxito de cada paso:

El lisado total (Figura 10e, carril 3) presenta una gran cantidad de bandas claramente diferenciadas, salvo por un barrido de peso consistente con una banda observada en cada paso de la purificación; esto sugiere que es la proteína recombinante, ya que debe estar en altas concentraciones por la inducción. La misma banda se aprecia en el sobrenadante tras centrifugar el lisado, lo cual significa que la proteína es soluble. En la pastilla (Figura 10e, carril 2) se observa una banda ligeramente más abajo que la banda de sobre-expresión, que podría ser una fracción de proteína recombinante que se quedó en las bacterias que no se lisaron mediante sonicación.

El frente de elución de la primera cromatografía de afinidad (Figura 10e, carril 4) contiene todas las bandas observadas en el sobrenadante, pero la banda ancha y barrida no está, por lo que la proteína se quedó en la columna, coordinada con los iones de níquel. Tras concentrar todas las fracciones con proteína obtenidas durante el gradiente de imidazol, se pueden observar bandas de pesos variables, posiblemente de proteínas que eluyeron junto con las TIMs, o que quedaron de manera residual debido a la gran cantidad de proteínas intrínsecas de las bacterias.

Después de incubar la proteínas con trombina y recolectarlas, podemos ver que la banda de peso correspondiente a cada TIM se “dividió en dos”, una tenue de mayor peso y la más fuerte, de menor peso (Figura 10e, carril 6). Esto es porque la electroforesis del gel desnaturante se dejó suficiente tiempo para diferenciar la proteína cortada de la no cortada, que aún contiene la etiqueta de histidinas y es ligeramente más pesada. Después de la segunda cromatografía de afinidad y concentrar las fracciones del frente de elución, se observa una sola banda de menor peso que la observada después de la primera cromatografía, y las bandas inespecíficas desaparecieron. Esto indica que la proteína resultante no tiene la etiqueta de histidinas y las impurezas fueron separadas.

Finalmente, después de la cromatografía de intercambio aniónico queda una sola banda de masa molecular coincidente con el peso de los monómeros. En las últimas purificaciones se obtuvieron en promedio 32 mg de proteína total a partir de 500 ml de cultivo para las tres enzimas.

Obtención de parámetros catalíticos.

Obtener la proteína pura, soluble y en grandes cantidades no es garantía de que se tenga en estado nativo para ser estudiada; además, una proteína puede tener estructura secundaria o terciaria parcial. Para corroborar que la proteína está plegada correctamente se requiere determinar si posee las propiedades espectroscópicas y catalíticas características de las TIMs.

Al finalizar la purificación de cada proteína, se realizó una curva de saturación de sustrato con G3P para cada una. Los experimentos se hicieron por duplicado para ZmTIM y por triplicado para BmTIM y CeTIM (Figura 11). Para evaluar si la eficiencia de estas enzimas está dentro del límite de difusión, como las estudiadas hasta el momento, calculamos la k_{cat} y la eficiencia catalítica de cada una (Tabla 4).

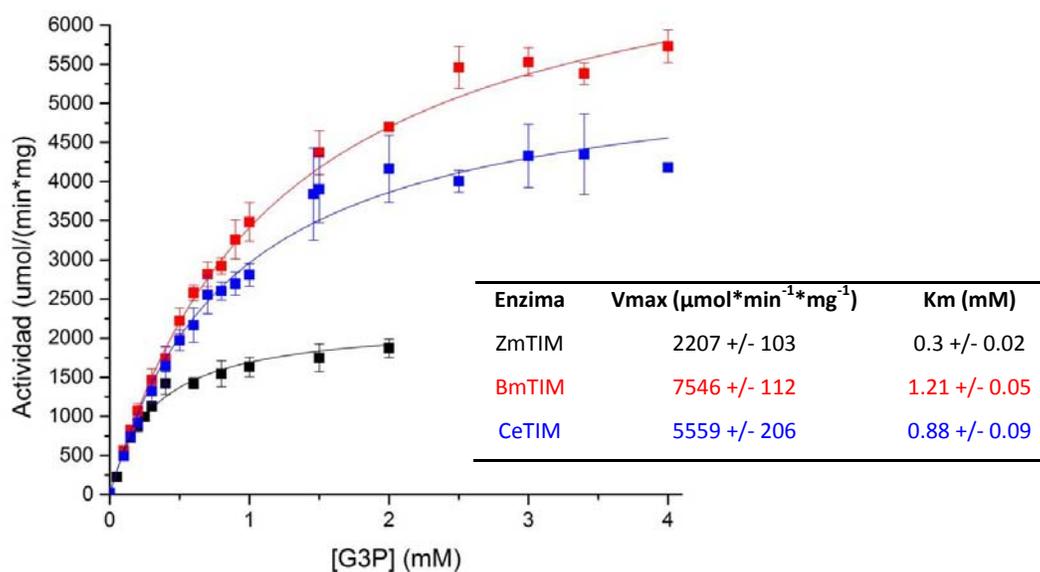


Figura 11) Cinéticas de ZmTIM (negro), BmTIM (rojo) y CeTIM (azul). Los cuadrados corresponden a los puntos experimentales y las líneas al ajuste realizado en OriginPro. La tabla muestra los parámetros catalíticos correspondientes a cada ajuste.

Tabla 4) Parámetros catalíticos de TIM reportadas y las de este trabajo.

| Especie | k_{cat} (s ⁻¹) | Km (mM) | k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹) |
|---------------------------------|------------------------------|---------|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6.4×10^3 | 1.4 | 1.3×10^8 |
| <i>Homo sapiens</i> | 6.2×10^3 | 0.25 | 7.2×10^8 |

| | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|---|
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 4.3×10^3 | 0.35 | 3.6×10^8 | Adaptada de (Schulte-Sasse, 2013) |
| <i>Giardia lamblia</i> | 4.8×10^3 | 0.53 | 2.6×10^8 | <i>S. cerevisiae</i> : Peimbert, Domínguez, Fernández. 2008. |
| <i>Tenebrio molitor</i> | 4.3×10^3 | 0.84 | 1.5×10^8 | <i>H. sapiens</i> : Schliebs, Thank, Jaenicke, Wierenga. 1997. |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 3.69×10^3 | 0.62 | 1.7×10^8 | <i>P. falciparum</i> : Gokhale, Ray, Balaram, Balaram. 1999. |
| TIM63 | 2.08×10^3 | 2.8 | 2.2×10^7 | <i>G. lamblia</i> : Reyes-Vivas et al. 2006. |
| TIM55 | 5.04×10^2 | 9.49 | 1.5×10^6 | <i>T. molitor</i> , <i>Oryctolagus cuniculus</i> : Knobeloch et al. 2010. |
| <i>Zea mays</i> | 1×10^3 | 0.3 | 8.4×10^7 | TIM63 y TIM55: M. Schulte-Sasse. 2013. |
| <i>Bombyx mori</i> | 3.4×10^3 | 1.21 | 7×10^7 | |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | 2.5×10^3 | 0.88 | 7.1×10^7 | |

Dado que ZmTIM llegó a la velocidad máxima a una concentración de 2 mM de G3P, no se estudió a concentraciones más altas de sustrato. Corregimos las Km obtenidas mediante el ajuste de las tres TIMs, ya que el G3P se encuentra en dos formas distintas en solución, con uno o dos hidroxilos (diol geminal) en el C2. Dado que sólo la forma con un hidroxilo puede ser convertida a DHAP, se ajustó el porcentaje de G3P en la forma catalizable, que es del 4%, o una proporción 1:29 (Trentham, McMurray, Pogson. 1969).

La eficiencia catalítica de las tres enzimas está en el orden de 10^7 , el cual corresponde al límite de difusión. Cabe mencionar que ZmTIM tiene la mayor afinidad por el sustrato (Km menor) y la velocidad menor, mientras que BmTIM es la más rápida de las tres y a la vez tiene la menor afinidad por el sustrato.

Estabilidad a la dilución

Las tres enzimas fueron estudiadas en un rango de concentraciones de 200 µg/ml a 50 ng/ml. Tras 24 horas de incubación en cada concentración se midió su actividad en una celda de reacción con 2 mM de G3P. Los datos obtenidos se graficaron y se ajustaron mediante el programa Origin al modelo de disociación (Ecuación 5, página 24). Para poder visualizar mejor las curvas de dilución se representa el logaritmo de la concentración de proteína (Figura 12).

Las tres enzimas fueron estudiadas en un rango de concentraciones de 200 µg/ml a 50 ng/ml. Tras 24 horas de incubación en cada concentración se midió su actividad en una celda de reacción con 2 mM de G3P. Los datos obtenidos se graficaron y se ajustaron mediante el programa Origin al modelo de disociación (Ecuación 5, página 24). Para poder visualizar mejor las curvas de dilución se representa el logaritmo de la concentración de proteína (Figura 12).

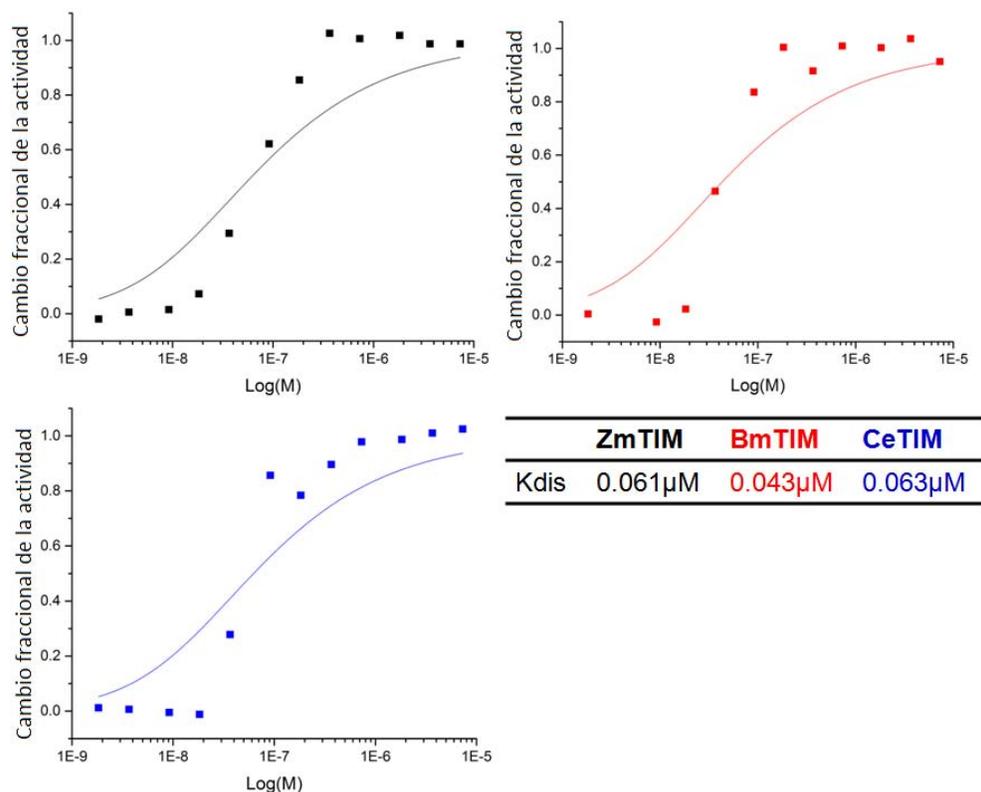


Figura 12) Curvas Actividad vs Concentración de proteína en (mol/L) de ZmTIM (negro), BmTIM (rojo) y CeTIM (azul). Las líneas representan el mejor ajuste posible mediante el modelo y las K_{dis} corresponden a dicho ajuste.

Ninguna de las curvas obtenidas pudo ajustarse adecuadamente mediante el modelo de disociación; en todos los casos la pérdida de actividad detectada experimentalmente es más cooperativa que la predicción del modelo, lo cual sugiere que está controlada cinéticamente; es decir, suceden cambios irreversibles durante la disociación que forman especies incapaces de formar el estado nativo, lo cual provoca una caída más abrupta en el cambio fraccional de la actividad y se desplaza el equilibrio a favor de las especies inactivas. Debido a esto, las K_{dis} reportadas son aparentes y representan una cota mínima para el valor de K_{dis} . Las constantes obtenidas son significativamente mayores a la reportada para la TIM de humano, que es de $3.2 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ (Mainfroid et al. 1996).

Propiedades químicas y espectroscópicas.

Mediante el software ProtParam (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://web.expasy.org/protparam/>) obtuvimos algunos parámetros teóricos de las tres TIMs: la masa molecular por subunidad, el punto isoeléctrico y el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 280 nm (Tabla 5). Ya que estas no son propiedades conformacionales, sino dependientes de la composición, lo único que requiere el software es la secuencia de aminoácidos de la proteína en el código de una letra.

La masa molecular es calculada a partir de la masa isotópica promedio de los residuos de la proteína, el valor arrojado por ProtParam está en Daltons (g/mol). El punto isoeléctrico es calculado a partir del pK de cada aminoácido calculado experimentalmente (Bjellqvist et al. 1993).

El coeficiente de extinción molar (ϵ) representa la capacidad de una proteína (u otra molécula) para absorber luz a cierta longitud de onda, está en unidades recíprocas de concentración y distancia ($M^{-1}cm^{-1}$), para considerar el paso de luz.

A 280 nm, los residuos que contribuyen casi en su totalidad al coeficiente de extinción molar de una proteína son los triptofanos, las tirosinas y las cisteínas que forman puentes disulfuro.

ProtParam lo calcula por el método de Edelhoch (Edelhoch, 1967), el cual estima dos ϵ diferentes a partir de los coeficientes de extinción molar de esos residuos, uno lo calcula considerando todas las cisteínas reducidas, y otro con todas formando parte de puentes disulfuro:

$$\epsilon_{prot} = (\epsilon_W * n_W) + (\epsilon_Y * n_Y) + (\epsilon_C * n_C)$$

ϵ_{prot} = coeficiente de extinción molar de la proteína

ϵ_W , ϵ_Y , ϵ_C = coeficientes de extinción molar del triptofano, la tirosina y las cisteínas oxidadas, con un valor de $5500 M^{-1}cm^{-1}$, $1490 M^{-1}cm^{-1}$ y $125 M^{-1}cm^{-1}$, respectivamente (Pace et al. 1995).

n_W , n_Y , n_C = número de residuos de triptófano, tirosina y cisteínas oxidadas

Tabla 5) Propiedades de ZmTIM, BmTIM y CeTIM calculadas con ProtParam

| Enzima | Masa molecular (Da) | pI | ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) |
|--------|---------------------|------|--------------------------------|
| ZmTIM | 27306 | 5.66 | 38960 |
| BmTIM | 27060 | 5.8 | 38960 |
| CeTIM | 26856 | 6.35 | 36440 |

Para las propiedades espectroscópicas, obtuvimos su espectro de dicroísmo circular en el UV lejano, en un rango de 185 nm a 260 nm (Figura 13).

Las tres enzimas mostraron el espectro de dicroísmo esperado para las proteínas alfa-beta en el rango del UV lejano. Los espectros de BmTIM y CeTIM se obtuvieron en amortiguador de fosfatos 10 mM pH8, y el de ZmTIM en 50 mM Tris pH8.

Los espectros obtenidos indican la presencia de estructura secundaria característica de los barriles alfa-beta en las tres enzimas. Gracias a esto, pudimos monitorear la señal a 222 nm para los experimentos de plegamiento por temperatura y urea.

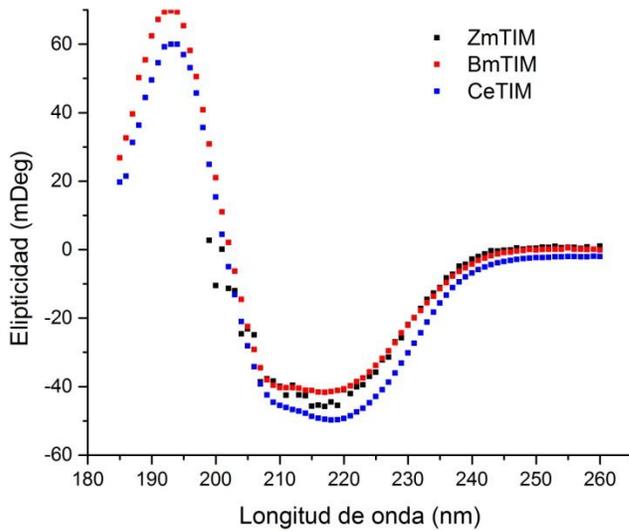
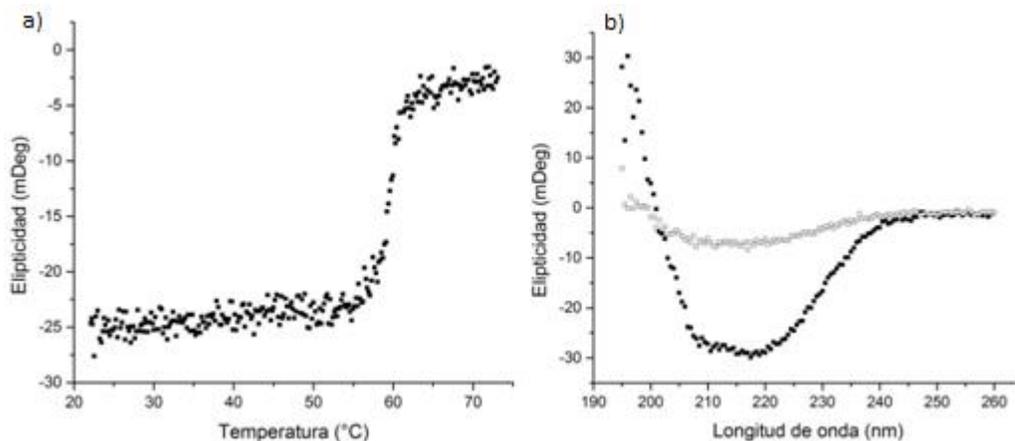


Figura 13) Espectros de dicroísmo en el UV lejano. Las tres enzimas muestran los mínimos característicos a 200 y 220 nm, BmTIM y CeTIM muestran el máximo a 190 nm. La señal de ZmTIM se volvió ruidosa debajo de 200 nm y no pudimos detectarlo, posiblemente por el tipo de sales presentes en el amortiguador.

Desplegamiento térmico.

Las tres rampas de temperatura se realizaron a una velocidad de barrido de 1 °C/min. ZmTIM en Tris 50 mM pH8 y BmTIM y CeTIM en fosfatos 10 mM pH 8. Se siguió el mínimo en 222 nm.

El desplegamiento térmico de las tres proteínas fue irreversible; ZmTIM y CeTIM se agregaron de manera visible y la señal de dicroísmo perdida no se recuperó al regresar a la temperatura inicial (Figura 14, negras y azules). BmTIM no se agregó visiblemente y el espectro de dicroísmo al enfriarla a 25 °C es similar al inicial, pero la intensidad no se recupera por completo y la rampa inversa de temperatura sigue un camino completamente diferente, lo cual indica histéresis (Figura 14, rojas). Pese a que el espectro de dicroísmo es similar antes y después de las rampas de temperatura, el final muestra un mínimo cerca de 208 nm, característico de cadenas polipeptídicas desordenadas.



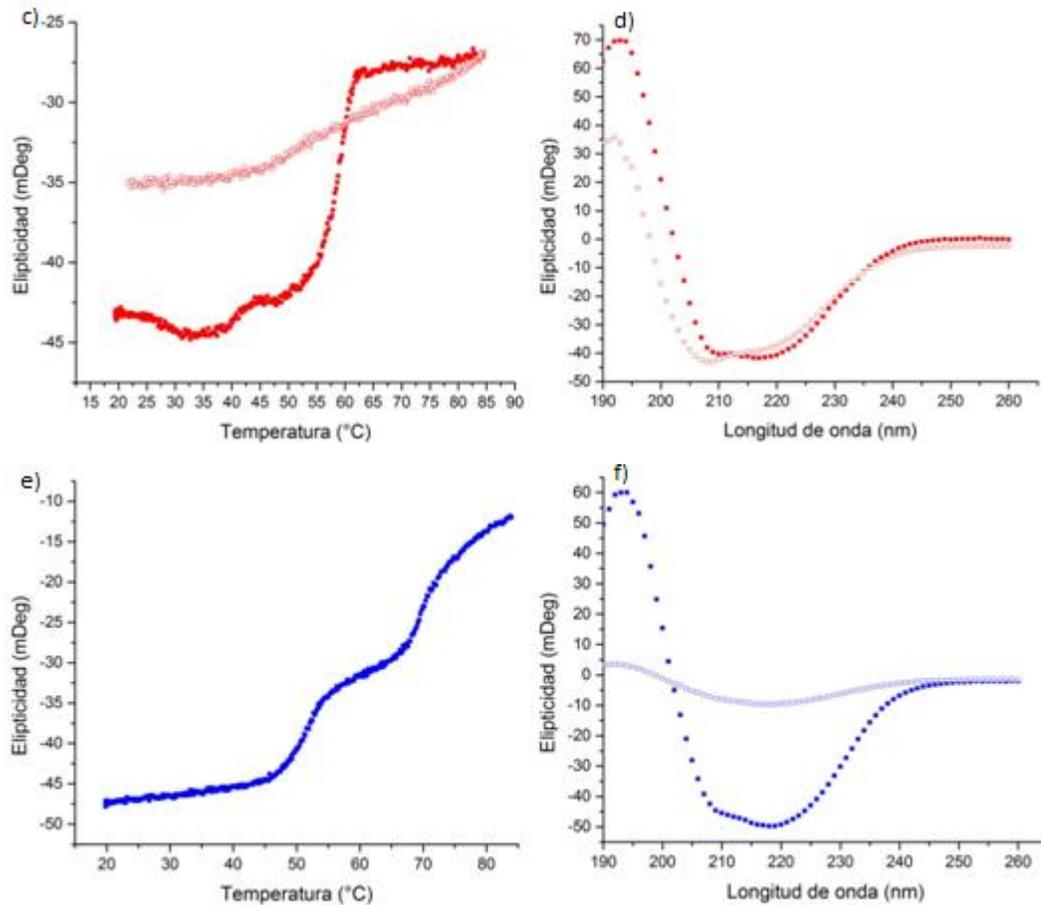


Figura 14) Rampas de temperatura de a) ZmTIM, c) BmTIM y e) CeTIM seguidas a 222 nm y espectros de las mismas antes (símbolos llenos) y después (símbolos vacíos) de las rampas de temperatura. Para BmTIM se muestra también la señal de dicroísmo al enfriar la proteína a la misma velocidad de barrido.

En ninguno de los casos fue posible obtener parámetros termodinámicos reales, ya que no sabemos cuánto contribuye la formación de agregados a la señal observada.

Sin embargo, ya que ZmTIM mostró una sola transición (Figura 14a), pudimos ajustar los datos mediante la ecuación de Boltzmann, la cual representa una curva sigmoide y nos permite estimar dos parámetros: la temperatura media aparente del proceso, es decir, el punto de inflexión de la curva, y la pendiente de la transición, la cual nos habla de qué tan cooperativo es el proceso.

Primero, normalizamos los datos con la ecuación (4), para tener una curva de la fracción de proteína desnaturizada, y con los datos normalizados realizamos el ajuste:

$$fD = \frac{y_{max}}{1 + e^{\frac{(T_m - T)}{m}}}$$

FD = fracción de proteína desnaturalizada, la variable dependiente

y_{max} = señal máxima de dicroísmo

T_m = temperatura media del desplegamiento

T = temperatura en cada punto, la variable independiente

m = pendiente de la transición

Mediante este ajuste, la T_m de ZmTIM es de 59.4 °C, la cual está dentro de las temperaturas reportadas para otras TIMs de especies mesófilas, e inferior a la reportada para organismos termófilos (Tabla 6).

Tabla 6) Temperaturas medias de desnaturalización reportadas.

| Especie | T _m (°C) | |
|--|---------------------|--|
| <i>Thermotoga marítima</i> (termófilo) | 82 | <i>T. marítima</i> : Beaucamp, Schurig, Jaenicke. 1997. |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> (termófilo) | 76 | <i>B. stearothermophilus</i> : Alvarez et al. 1999. |
| TIM63 | 68.7 | <i>S. scrofa</i> , <i>T. solium</i> : Jimenez et al. 2003. |
| TIM55 | 67.4 | <i>S. cerevisiae</i> : Benítez, Rojo, Hernández. 2001. |
| <i>Sus scrofa</i> | 63.9 | <i>T. cruzi</i> : Costas et al. 2009. |
| <i>Taenia solium</i> | 62.3 | <i>G. gallus</i> : Shi, Liu, Zhang, Ding. 2008. |
| Zea mays | 59.4 | <i>P. falciparum</i> : Gopal et al. 1999. |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 59.1 | <i>L. mexicana</i> : Williams et al. 1999. |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | 58.5 | <i>T. brucei</i> : Schliebs et al. 1997. |
| <i>Gallus gallus</i> | 58.4 | <i>M. tuberculosis</i> : Mathur, Malik, Garg et al. 2006. |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 58 | <i>H. sapiens</i> : Mainfroid et al. 1996. |
| <i>Leishmania mexicana</i> | 57.5 | TIM63 y TIM55: M. Schulte-Sasse, 2013. |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | 57 | |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 55 | |
| <i>Homo sapiens</i> | 54.8 | |

Realizamos un desplegamiento parcial, llegando a una temperatura inferior a la T_m, para ver si había recuperación de la señal de elipticidad. Al normalizar los datos, la fracción de la señal perdida coincidió con la fracción de temperatura a la que llegamos respecto al rango de temperatura en el que la proteína siguió en estado nativo. Es decir, una vez desnaturalizada la proteína es incapaz de plegarse de nuevo en las condiciones experimentales que utilizamos.

Dado que en el desplegamiento de CeTIM mostró una meseta a los 55 °C en el termograma, es posible que se forme una tercera especie, distinta al monómero desplegado y al dímero, con propiedades espectroscópicas particulares.

Hasta el momento, no se ha encontrado ninguna TIM eucarionte cuyo desplegamiento térmico sea un proceso completamente reversible y que llegue al equilibrio. Sin embargo, en la TIM de *Entamoeba histolytica*, se encontró por dicroísmo un mecanismo de tres estados, en el cual el intermediario sí

puede regresar al estado nativo, pero si se despliega completamente la proteína, se agrega (Tellez, et al. 2008). Por ello, realizamos un desplegamiento parcial de CeTIM, llegando hasta 54 °C, para determinar si el intermediario puede regresar al estado nativo. Al igual que ZmTIM, la fracción de proteína que se despliega por temperatura no puede regresar al estado nativo (datos no mostrados).

Experimentos de desplegamiento y replegamiento por urea.

La urea es una molécula compuesta por un grupo carbonilo cuyos dos sustituyentes son grupos amino. Tiene una gran densidad electrónica debido a los pares de electrones libres del oxígeno y los nitrógenos; eso hace que en altas concentraciones interrumpa todas las interacciones electrostáticas dentro de la cadena principal y entre las cadenas laterales de los residuos de las proteínas, eliminando así la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de manera reversible, ya que al diluirla los polipéptidos se pueden plegar de nuevo, aunque eso depende de cada proteína. Han pasado más de 100 años desde que se describieron sus propiedades desnaturizantes (Ramsden, 1902), y hasta el momento, es uno de los agentes caotrópicos más utilizados para estudiar el plegamiento de proteínas, junto con el cloruro de guanidinio.

Para estos experimentos, preparamos muestras de cada proteína a concentración constante, variando la concentración final de urea.

1 BmTIM

Primero, la proteína fue incubada a 1 mg/ml durante tres horas a 25 °C, una en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 8 y la otra a una concentración de 6 M de urea.

Posteriormente, preparamos cada muestra de manera que quedara a una concentración específica de urea entre 0 M y 5 M, a una concentración final de proteína de 100 µg/ml.

Se compararon el desplegamiento y el replegamiento tras diferentes tiempos de incubación y se midió la fluorescencia a 280 nm con 320 nm de emisión en el lector de placas POLARstar, así como la señal de dicroísmo a 222 nm en un espectropolarímetro JASCO. Los datos se normalizaron como se describió en la ecuación (4). Estos análisis permitieron calcular el grado de desplegamiento y replegamiento de BmTIM a cada concentración de urea.

En un rango de tiempo de 36 a 60 horas no hubo coincidencia de las curvas (Figura 15), indicando que no se trata de un proceso reversible que llega al equilibrio. A concentraciones altas de urea parecen seguir el mismo camino, pero en el replegamiento BmTIM no recupera por completo la señal de fluorescencia que se observa en el desplegamiento a concentraciones bajas de urea.

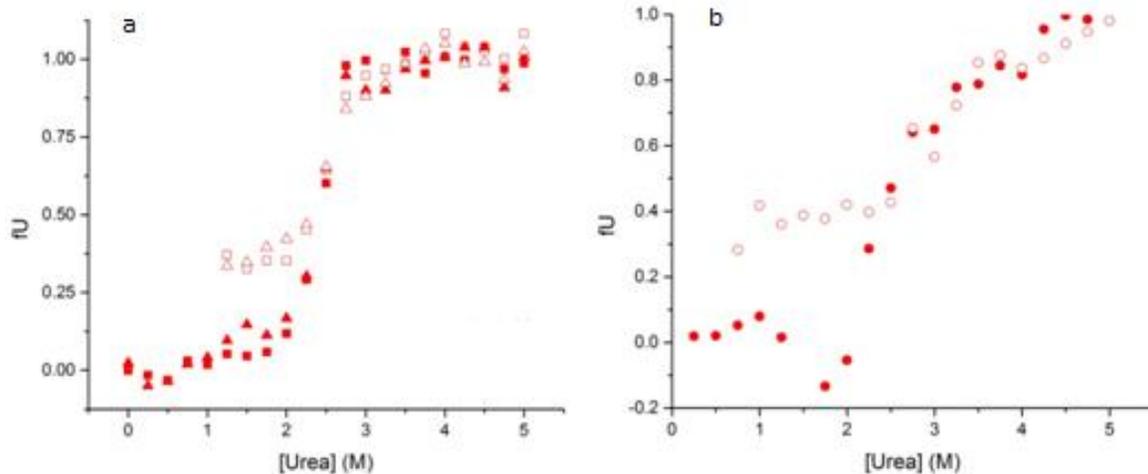


Figura 15) Desplegamiento y replegamiento de BmTIM. Curvas de desplegamiento (símbolos llenos) y replegamiento (símbolos vacíos) de BmTIM en urea a 36 horas (cuadrados) y 60 horas (triángulos) de incubación vistas por fluorescencia (a) y dicroísmo (b).

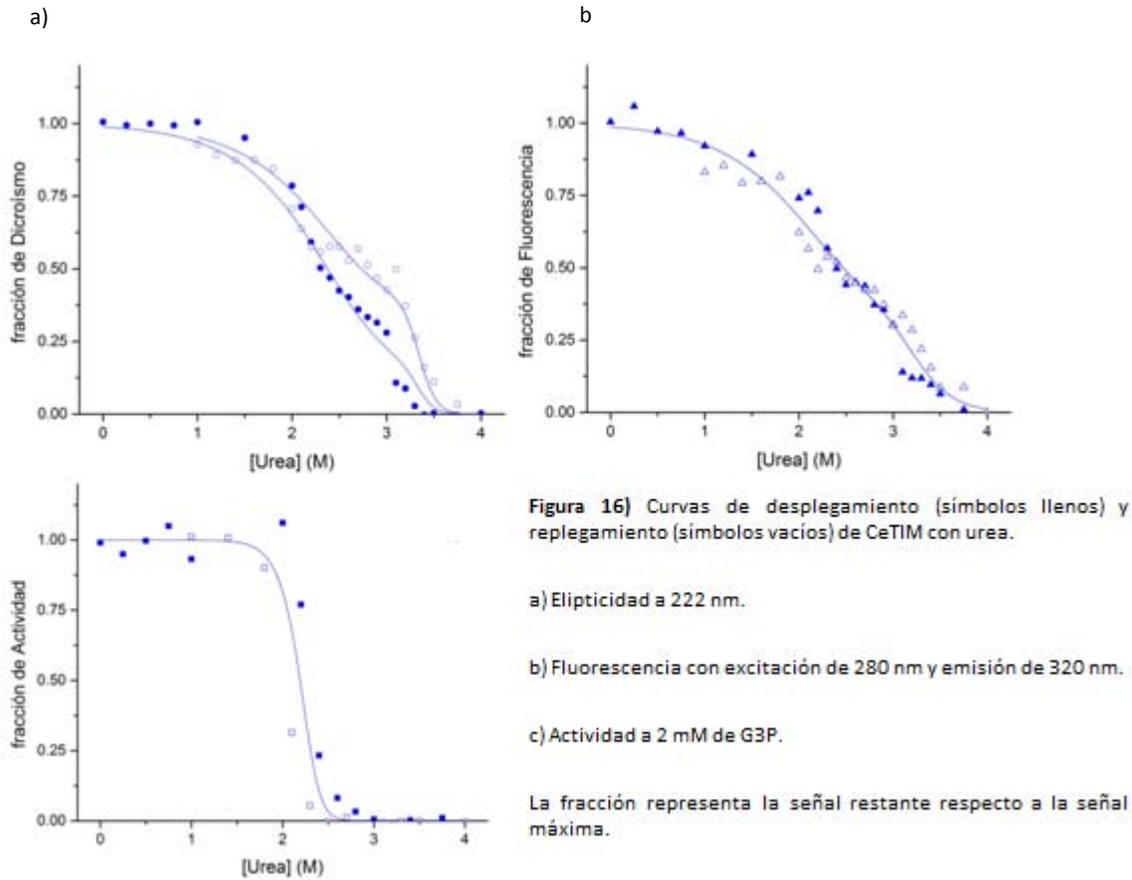
f_U representa la fracción perdida de la señal de fluorescencia observada en cada concentración de urea respecto a la máxima.

A una concentración de 1.25 M de urea, la proteína en el desplegamiento tiene 90% de la señal vista tanto por dicroísmo como fluorescencia a concentraciones bajas de urea, mientras que la del replegamiento muestra únicamente el 65%, y esta diferencia no se modificó en ninguno de los tiempos de incubación.

Por ello, concluimos que hay una fracción de BmTIM que no puede replegarse, ya sea por agregación o porque se queda en una conformación de glóbulo fundido, atrapada por una barrera energética demasiado alta. Al no ser un proceso completamente reversible no se puede usar ningún modelo de ajuste para determinar su patrón de plegamiento ni los parámetros termodinámicos asociados.

2 CeTIM

Se incubó en las mismas condiciones que BmTIM. Desde 24 horas de incubación en adelante, no se encontraron diferencias entre las señales de dicroísmo y fluorescencia, por lo que se utilizó como tiempo de incubación. En el caso de CeTIM, se encontró reversibilidad de alrededor del 85%, por lo que se pudieron ajustar las curvas. Un modelo de dos estados no nos permitió realizar un buen ajuste, por lo que utilizamos un modelo de tres estados (Ecuación 17), asumiendo un intermediario monomérico como el reportado para la TIM de levadura (Nájera et al. 2003). En las curvas de CeTIM encontramos un comportamiento diferente al comparar las curvas de dicroísmo y fluorescencia con las de actividad, lo cual implica que la capacidad catalítica de CeTIM no se pierde a la par con la estructura secundaria y terciaria.



Para las curvas de dicroísmo (Figura 16a), observamos histéresis, por lo que hicimos el ajuste global haciendo que las curvas compartan los valores de ΔG_{asoc} , ΔG_{pleg} , m_{asoc} y m_{pleg} , pero con diferente señal del intermediario. De acuerdo con este ajuste, en el desplegamiento el intermediario muestra el 14% de señal respecto al estado nativo (datos no mostrados), mientras que en el repliegamiento tiene el 36%. Esto no necesariamente indica que haya una especie distinta en cada curva, sino que la cantidad de intermediario es diferente, y por ello el programa supone que el intermediario es diferente en cada caso. Debido a la histéresis, el error en los parámetros calculados es muy alto y no son confiables.

En el caso de las curvas de fluorescencia las curvas se sobrelapan mejor, por lo que pudimos hacer un ajuste global completo. De acuerdo con el modelo, el intermediario tiene 40% de señal de fluorescencia respecto al estado nativo (Figura 16b).

El modelo asume que la curva tiene 1 como máximo y 0 como mínimo, por ello mientras mayor sea el porcentaje de reversibilidad, mejor es el ajuste. La fluorescencia del repliegamiento llegó a 82%, por lo que el error en los parámetros es muy alto, al igual que en las curvas de dicroísmo.

La curva de actividad es muy interesante, ya que observamos una sola transición (Figura 16c). Si hubiéramos hecho el estudio de plegamiento de CeTIM únicamente por actividad, la conclusión hubiera sido que se trata de una ruta de dos estados.

Ya que es una sola transición, pero participa en un plegamiento de tres estados, hicimos el ajuste mediante el modelo de tres estados, asumiendo que la señal del intermediario es cero, es decir, que el intermediario es inactivo (Ecuación 18).

Comparamos las curvas de desplegamiento obtenidas mediante actividad, dicroísmo y fluorescencia para describir mejor el proceso (Figura 17).

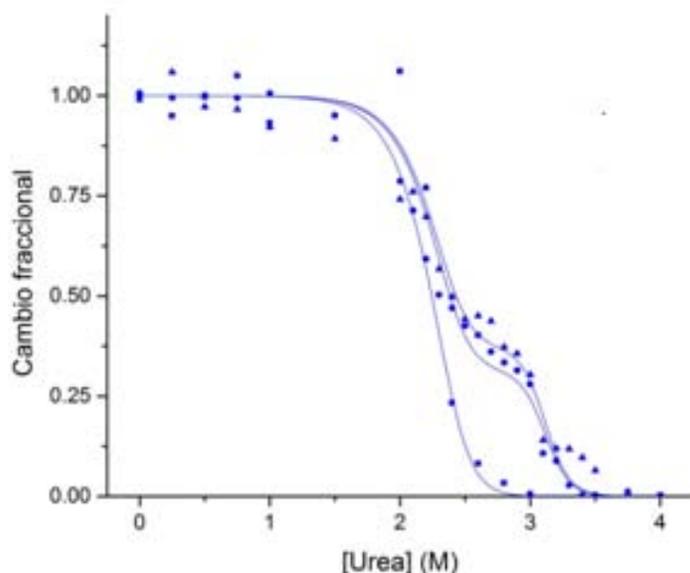


Figura 17) Curvas de desplegamiento de CeTIM vistas por actividad (cuadrados), dicroísmo (círculos) y fluorescencia (triángulos). Las líneas continuas corresponden a los ajustes globales.

La concentración media de desnaturalizante en la curva de actividad (2.2 M urea, Figura 17) coincide con la primera transición observada por dicroísmo y fluorescencia, además la actividad fraccional se vuelve cero cuando se observa la meseta. Esto nos indica que todas las especies involucradas en el plegamiento de CeTIM, el intermediario y la proteína totalmente desnaturalizada, son inactivas.

La curva de dicroísmo y la de actividad mostraron una señal para el intermediario de 34%.

El acomodo del sitio activo es fundamental para la actividad catalítica, y si el intermediario retiene el 34% de la estructura secundaria y terciaria del estado nativo, es razonable que carezca de actividad.

Aún desconocemos la naturaleza del intermediario, si se trata de un dímero o monómeros parcialmente plegados, pero dado que el comportamiento es similar al visto para la TIM de amiba (Tellez et al. 2008) y la de levadura (Nájera, Costas, Fernández. 2003), usamos como primera aproximación el modelo de intermediario monomérico para ajustar las curvas.

Si se tratara de un intermediario dimérico inactivo, lo podremos detectar mediante cromatografía de exclusión molecular para calcular el radio hidrodinámico del intermediario; o bien, al variar la

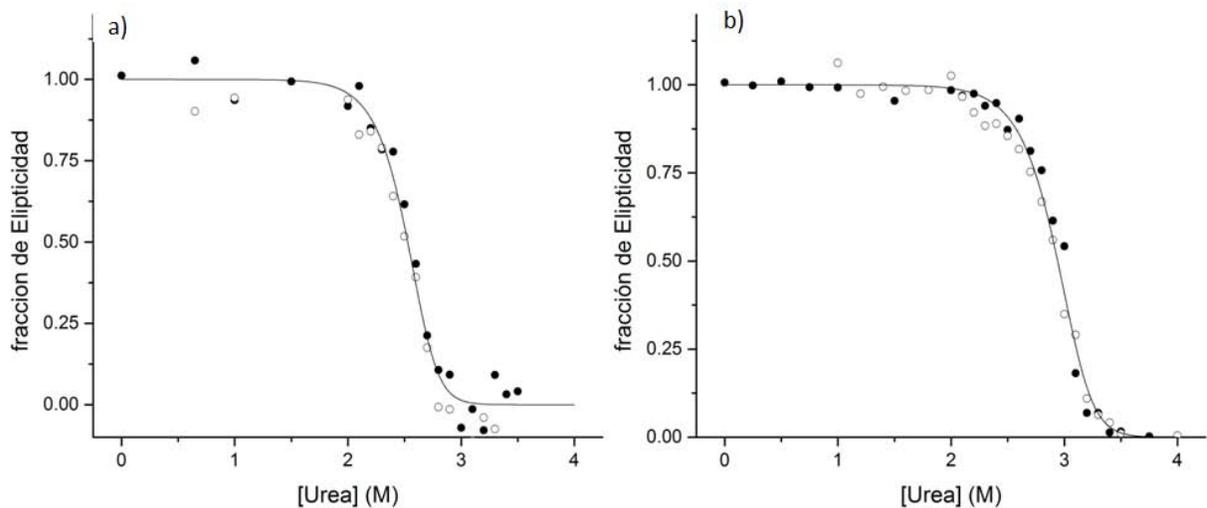
concentración de proteína en los ensayos para determinar cuál de las transiciones es susceptible a ella, como se hizo en el estudio de estabilidad a la dilución. En este caso, si al aumentar la concentración de proteína observamos que la primera transición se recorriera hacia concentraciones mayores de urea, significaría que el primer paso es la asociación de los monómeros, correspondiente a un intermediario dimérico. Si, en cambio, se recorre la segunda transición, primero sucede un plegamiento parcial de los monómeros y luego la asociación de los mismos.

3 ZmTIM

Para esta enzima vimos una reversibilidad completa mediante las tres técnicas utilizadas en este trabajo. ZmTIM mostró las mismas curvas de fluorescencia de 20 a 72 horas de incubación, por lo que seguimos ocupando el tiempo de 24 horas.

Se hizo el ensayo a dos concentraciones diferentes de proteína, a 80 $\mu\text{g/ml}$ y 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 18).

Las tres técnicas dieron como resultado un comportamiento monofásico, tanto en el desplegamiento como en el replegamiento. Todas las curvas se ajustaron bien mediante un modelo de dos estados (ecuación 15), y al haber recuperación completa en todos los ensayos, incluida la actividad enzimática, pudimos obtener el ΔG del proceso en agua y la dependencia de la concentración de urea mediante un ajuste global (Figura 19).



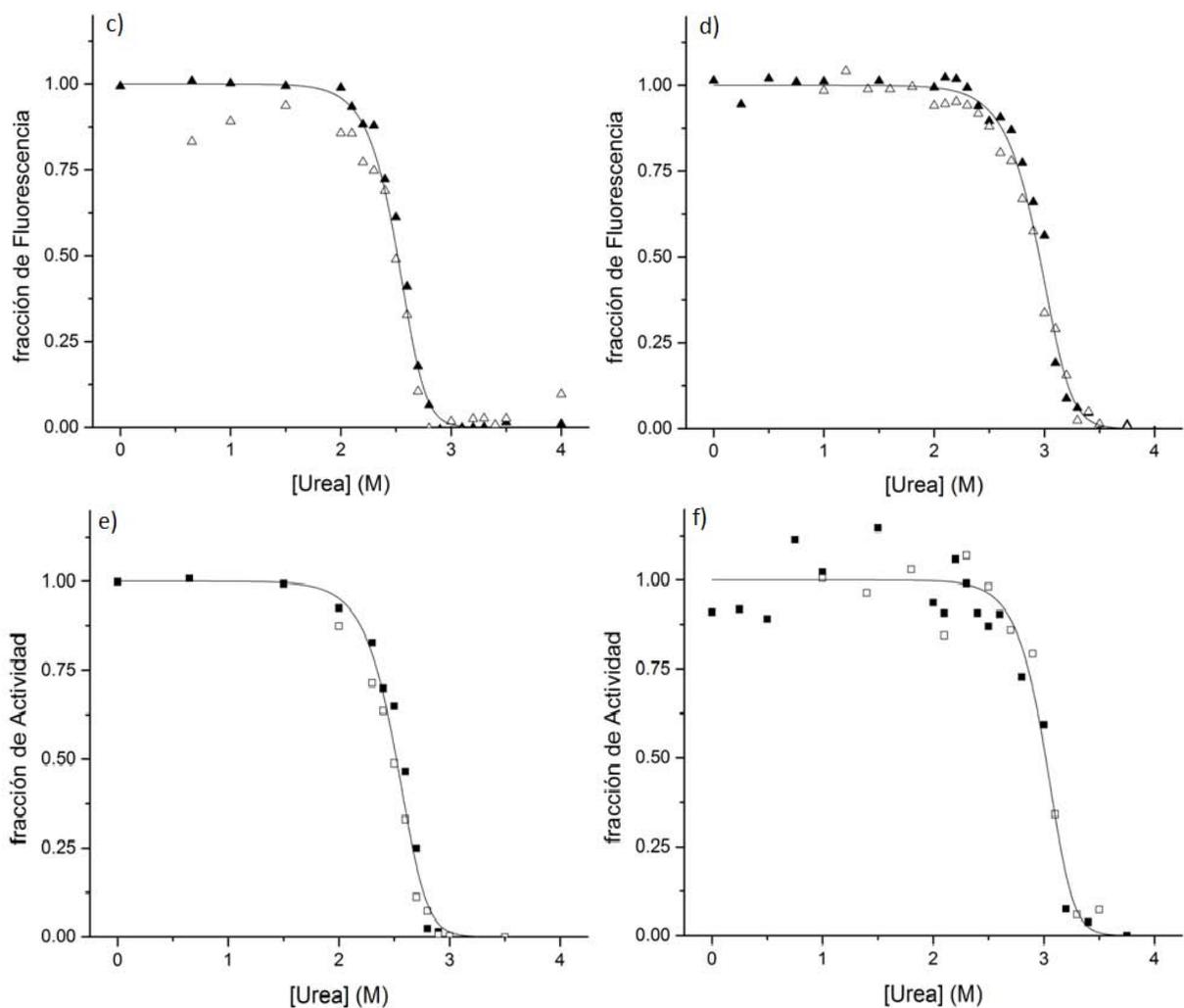


Figura 18) Despliegamiento (símbolos llenos) y replegamiento (símbolos vacíos) de ZmTIM, vistos por dicroísmo (gráficas “a” y “d”), fluorescencia (gráficas “b” y “e”) y actividad (gráficas “c” y “f”). Los experimentos de la izquierda se hicieron a 80 µg/mL y los de la derecha a 200 µg/mL.

El ajuste global en los dos experimentos muestra que las curvas siguen el mismo camino. Los ajustes muestran un ΔG en agua y dependencia de la concentración de urea similares, dentro del error experimental, pero distinta concentración media de desnaturante (Tabla 7).

Tabla 7) Parámetros termodinámicos de ZmTIM, comparados con otras dos TIM de dos estados estudiadas con agentes caotrópicos. Los ΔG H₂O reportados en éste y los trabajos citados son para el monómero de cada TIM.

| Especie | [Proteína] (µg/ml) | ΔG H ₂ O (KJ/mol) | m ((KJ/mol)*M ⁻¹) | Cm (M) |
|---------------------|--------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------|
| <i>Z. mays</i> | 80 | -97.72 +/- 3.1 | 26.25 +/- 1.22 | 2.52 |
| <i>Z. mays</i> | 200 | -99.94 +/- 2.59 | 23.84 +/- 0.87 | 2.96 |
| <i>O. cuniculus</i> | 160 | -71 | 63 | *0.6 |

| | | | | |
|--------------------|-----|---------------|---------------|------|
| <i>L. mexicana</i> | 200 | -80 | 18.56 | *2.8 |
| <i>H. sapiens</i> | 250 | -80.6 +/- 1.7 | 7.11 +/- 0.42 | 5.6 |

* Se estudiaron con cloruro de guanidinio.

O. cuniculus: Rietveld, Ferreira. 1998. *H. sapiens*: Mainfroid et al. 1996. *L. mexicana*: Lambeir et al. 2000.

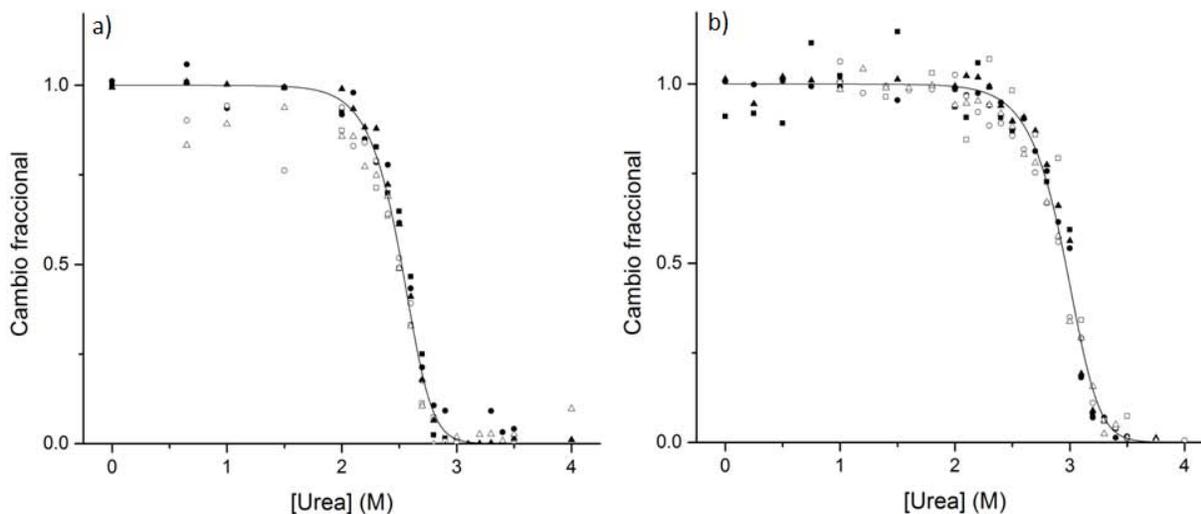


Figura 19) Comparación del ajuste global a distintas concentraciones de proteína. a) 80 µg/ml, b) 200 µg/ml.

Los símbolos llenos corresponden a datos de desplegamiento y los vacíos de replegamiento. En círculos se muestran los datos de dicroísmo, en triángulos de fluorescencia y en cuadrados de actividad.

Un mecanismo de una sola transición en una proteína dimérica implica que existe un equilibrio entre los monómeros desplegados y el dímero plegado. El valor para la pendiente de la curva es alto, lo cual significa que hay una alta cooperatividad en el plegamiento de ZmTIM.

De manera general, se ha visto que la mayor contribución a la estabilidad de las TIM está dada por la asociación de los monómeros (Peimbert et al. 2008) y no por el plegamiento de los mismos.

Un incremento de 2.5 veces en la concentración de ZmTIM modificó la C_m 0.4 M de urea, lo cual comprueba el efecto de la concentración en la asociación de los monómeros.

DISCUSIÓN

En este trabajo, realizamos la purificación y caracterización de la trisfosfato isomerasa de *Z. mays*, *B. mori* y *C. elegans* mediante las mismas técnicas y condiciones.

Las tres enzimas fueron purificadas con éxito, son solubles y se obtuvieron en rendimientos altos.

El protocolo de purificación fue el mismo utilizado para otras TIM en trabajos previos del laboratorio, mas hay algunos puntos que pueden modificarse.

Durante una purificación de ZmTIM, utilizamos la prensa de French en lugar del sonicador para lisar las bacterias. Este método llevó a una lisis total de las bacterias y no hubo agregación. El rendimiento final fue ligeramente mayor al visto mediante el protocolo original, pero no de manera significativa.

Por otra parte, el protocolo no es tan eficiente como podría ser, debido a la gran cantidad de pasos de diálisis que se deben realizar. En las diálisis puede perderse proteína, y se está sometiendo a cambios en la fuerza iónica del amortiguador constantemente.

Al momento de añadir el calcio para el corte con trombina, si aún hay fosfatos en la muestra se precipita una sal, probablemente fosfato de calcio, cuya eliminación requiere pasos adicionales de centrifugación y filtración, lo cual disminuye el rendimiento.

Será recomendable encontrar otro método de purificación que involucre menos diálisis y la interacción entre sales que no precipiten, tanto para las TIMs estudiadas en este trabajo como para proteínas que se estudien próximamente en el laboratorio.

Una vez purificadas, las tres proteínas mostraron parámetros catalíticos esperados para enzimas limitadas por difusión, aunque ligeramente más bajos a los reportados previamente. ZmTIM mostró una V_{max} notablemente más baja, pero también la K_m más baja, lo cual la hizo tener una eficiencia catalítica similar a las otras.

Hubo que repetir varias veces los experimentos para CeTIM, ya que el protocolo involucra realizar una dilución a 250 ng/ml y de ahí tomar la proteína para cada celda de reacción, y notamos al principio que los puntos en cada concentración de sustrato decaían, aunque al medir la actividad de cada celda no vimos inactivación. Esto nos hizo pensar que había un efecto de disociación en la dilución inicial, lo cual afectaba cada actividad conforme avanzó el tiempo del experimento. Al preparar la dilución justo antes de medir cada celda, obtuvimos una curva que se ajustó bien mediante la Ecuación 1.

Ninguna de las curvas de dilución pudo ajustarse al modelo de disociación y las tres mostraron una pendiente más cooperativa de lo que permite el mismo, lo cual significa que existe control cinético de la disociación y se pierde parte de la proteína en cada muestra en formas que no

se pueden asociar nuevamente en el estado nativo. Se observó inestabilidad a la dilución en el ancestro TIM63, pero en su caso sí fue posible ajustar la curva de dilución al modelo de dos estados (experimentos en proceso).

Las tres enzimas mostraron estructura secundaria y terciaria, como se vio por dicroísmo y fluorescencia. Mostraron además las firmas de elipticidad a 222 nm, 210 nm y 190 nm.

Pese a tratarse de organismos mesófilos, en los cuales no se ha reportado ninguna TIM tetramérica, falta realizar un ensayo de exclusión molecular para confirmar la naturaleza dimérica de estas TIM.

Ninguna de las enzimas mostró reversibilidad al ser desnaturalizada por temperatura, ZmTIM y CeTIM mostraron además agregación visible. BmTIM mostró recuperación parcial de su señal de dicroísmo, aunque por un camino diferente al visto durante la desnaturalización.

No vimos agregados en la celda, y el espectro final de dicroísmo en el UV lejano es similar al del estado nativo, salvo por un mínimo visto a 205 nm, característico de estructuras desordenadas.

Si bien el cambio en el espectro de dicroísmo puede deberse a la formación de agregados no visibles, la presencia del mínimo en 222 nm y el máximo en 190 nm, aunque con una elipticidad menor, sugiere la formación de una estructura de glóbulo fundido, con menor cantidad de estructura secundaria, que no pueda replegarse para llegar al estado nativo. Para analizar esto, podremos realizar ensayos de desplegamiento y replegamiento térmico a velocidades de barrido mayores, ya que se ha reportado que esto contribuye a que haya menor agregación y quizás evite la formación de los glóbulos fundidos, si los hay. De manera independiente, modificar la velocidad de barrido para las tres TIM nos permitirá determinar la energía de activación del desplegamiento, aunque éste sea un proceso irreversible. En otras TIM eucariontes se ha reportado control cinético, ya que varía la temperatura media de desnaturalización al variar la velocidad de barrido. Además, medir la actividad de la proteína al final del enfriamiento nos permitirá saber si tenemos proteína en estado nativo.

CeTIM mostró una meseta en el desplegamiento, lo cual implica la formación de un intermediario; aunque al realizar un desplegamiento parcial no recuperamos la señal, por lo que el intermediario no puede regresar al estado nativo.

Los estudios de plegamiento por urea fueron muy interesantes, ya que observamos tres comportamientos diferentes.

CeTIM mostró un patrón de tres estados con un intermediario inactivo, este comportamiento ya se había reportado para otras TIM eucariontes. El replegamiento mostró histéresis respecto al desplegamiento, por lo que no fue posible obtener parámetros termodinámicos.

Para determinar la naturaleza del intermediario, podremos realizar cromatografía de exclusión molecular, equilibrando la columna con la concentración de urea en la que detectamos al intermediario. Con esto, podremos calcular el radio de Stokes de las especies observadas.

Si el intermediario es monomérico, observaremos un pico de elución correspondiente a una proteína más pequeña que el estado nativo. Sin embargo, esta evidencia no fue suficiente al estudiar la TIM de levadura, en la cual el intermediario es un monómero expandido, de radio similar al del dímero (Nájera et al. 2003). Otra forma de estudiar la naturaleza del intermediario, es variar la concentración de enzima en los ensayos. En un dímero, un patrón de plegamiento de tres estados involucra un paso de asociación y otro predominantemente de plegamiento. La pregunta por resolver es cuál es el estado de asociación del intermediario.

La estequiometría en ambos mecanismos es distinta, ya que la asociación de los monómeros es $2 \rightarrow 1$, mientras que el plegamiento del dímero es $1 \rightarrow 1$. Por lo tanto, si se aumenta la concentración de enzima, se desplazará el equilibrio en el paso que involucre una dimerización, ya sea la formación de un intermediario o del dímero nativo. Eso se puede observar en las curvas de desplegamiento, y determinar cuál de las transiciones se desplaza a concentraciones mayores de urea.

Algo interesante de CeTIM, es que mostró un intermediario tanto en el desplegamiento térmico como el químico.

BmTIM mostró, en cambio, un desplegamiento altamente irreversible, por lo que no pudo ajustarse a ningún modelo. El desplegamiento parece seguir un proceso de dos estados, pero el replegamiento se estanca antes de llegar a la señal del estado nativo. Este comportamiento es similar a lo que vimos en el desplegamiento térmico, en el cual vimos una recuperación parcial de la señal de dicroísmo, pero el espectro final fue diferente

Esto puede apoyar la propuesta del glóbulo fundido, en el replegamiento BmTIM puede llegar a un hoyo termodinámico, cuya barrera energética es demasiado alta y no puede plegarse por completo.

ZmTIM tuvo un plegamiento totalmente reversible que llega al equilibrio tras 24 horas de incubación, lo cual nos permitió obtener el ΔG y la dependencia en la concentración de urea. Además, se trató de un proceso de dos estados, el dímero nativo y monómeros desnaturalizados.

En ningún trabajo previo se había descrito un proceso de dos estados para una TIM mediante tres criterios, incluyendo la pérdida y recuperación de la actividad.

Sus características nos permitirán hacer pruebas para estudiar cinéticamente el plegamiento.

En el laboratorio se cuenta con un dispositivo de stopped-flow acoplado a un espectropolarímetro, el cual permite estudiar desplegamiento y replegamiento en tiempos sumamente cortos. Si logramos

obtener curvas en el tiempo del desplegamiento y replegamiento de ZmTIM en distintas concentraciones de urea, los datos se podrán analizar mediante gráficas de Chevron, las cuales sirven para encontrar las constantes microscópicas de velocidad y será un nuevo tipo de estudio que se le realiza a la TIM, ya que por su naturaleza oligomérica es difícil hacer estudios cinéticos.

Será importante también determinar la estructura de las tres enzimas mediante cristalografía y difracción de rayos X, para poder relacionar la topología y las interacciones entre los residuos con el patrón de plegamiento. Por ejemplo, si detectamos un mayor número de interacciones en la interfase de CeTIM, podría relacionarse con la formación del intermediario y sugeriría que éste es dimérico. O bien, si hay una gran cantidad de interacciones dentro de cada monómero, se estabilizarían tras la disociación y favorecería la formación de un intermediario monomérico.

BIBLIOGRAFÍA

- Albery W., Knowles J. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry*, 15, pp 5631-40, 1976.
- Alvarez M., Wouters J., Maes D., Mainfroid V., Rentier-Delrue F., Wyns L., Depiereux E., Martial J.A. Lys13 plays a crucial role in the functional adaptation of the thermophilic triose-phosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus* to high temperatures. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, pp 19181-7, 1999.
- Andrea F. Enzymatic Assay Kits for Nutrients. *AnalytiX*, 7, art. 4.
- Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47, pp 1309-14, 1961.
- Banerjee M., Balaram H., Balaram P. Structural effects of a dimer interface mutation on catalytic activity of triosephosphate isomerase. The role of conserved residues and complementary mutations. *Federation of European Biochemical Societies*, 276, pp 4169-83, 2009.
- Bartlett A.I., Radford S.E. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, pp 582-88, 2009.
- Beaucamp N., Hofmann A., Kellerer B. Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science*, 6, pp 2159-65, 1997.
- Benítez-Cardoza C.G., Rojo-Domínguez A., Hernández-Arana A. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry*, 40, pp 9049-58, 2001.
- Bjellqvist B., Hughes G.J., Pasquali C., Paquet N., Ravier F., Sanchez J.C., Frutiger S., Hochstrasser D. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14, pp 1023-31, 1993.
- Brzezinski M., Davies J. Two enzymes which phosphorylate neomycin and kanamycin in *Escherichia coli* strains carrying R factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, pp 266-69, 1973.
- Cabrera N., Hernández-Alcántara G., Mendoza-Hernández G., Gómez-Puyou A., Perez-Montfort R. Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*, 18, pp 3499-506, 2008.
- Costas M., Rodríguez-Larrea D., De Maria L., Borchert T.V., Gómez-Puyou A., Sanchez-Ruiz J.M. Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *Journal of Molecular Biology*, 385, pp 924-37, 2009.

- Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, pp 1948-54, 1967.
- Forsyth W.R., Matthews C.R. Folding mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: a test of the conservation of folding mechanisms hypothesis in (beta(alpha))(8) barrels. *Journal of Molecular Biology*, 320, pp 1119-33, 2002.
- 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, pp 423-31, 1999.
- Gopal B., Ray S.S., Gokhale R.S., Balaram H., Murthy M.R., Balaram P. Cavity-creating mutation at the dimer interface of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry*, 38, pp 478-86, 1999.
- Greenfield J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), pp 2876-90, 2006.
- Jiménez L., Fernández-Velasco D.A., Willms K., Landa A. A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *Journal of Parasitology*, 89, pp 209-14, 2003.
- Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M., Parrish R.G., Wyckoff H. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, 181, pp 662-66, 1958.
- Knobeloch D., Schmidt A., Scheerer P., Krauss N., Wessner H., Scholz Ch., Küttner G., von Rintelen T., Wessel A., Höhne W. A coleopteran triosephosphate isomerase: X-ray structure and phylogenetic impact of insect sequences. *Insect Molecular Biology*, 19, pp 35-48, 2010.
- Lambeir A.M., Backmann J., Ruiz-Sanz J., Filimonov V., Nielsen J.E., Kursula I., Norledge B.V., Wierenga R.K. The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *European Journal of Biochemistry*, 267, pp 2516-25, 2000.
- Lo Conte L., Ailey B., Hubbard T.J., Brenner S.E., Murzin A.G., Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Research*, 28, pp 257-9, 2000.
- Lodi P.J., Chang L.C., Knowles J.R., Komives E.A. Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, 33, pp 2809-14, 1994.
- Mainfroid V., Terpstra P., Beauregard M., Frère J.M., Mande S.C., Hol W.G., Martial J.A., Goraj K. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *Journal of Molecular Biology*, 257, pp 441-56, 1996.

- Marchionni M., Gilbert W. The triosephosphate isomerase gene from maize: introns antedate the plant-animal divergence. *Cell*, 46, pp 133-41, 1986.
- Mathur D., Malik G., Garg L.C. Biochemical and functional characterization of triosephosphate isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 263, pp 229-35, 2006.
- McDonald A.G., Tipton K.F. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *FEBS Journal*, 281, pp 583-92, 2014.
- Muller-Hill B., Rickenberg H.V., Wallenfels K. Specificity of the induction of the enzymes of the Lac operon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 10, pp 303-18, 1964.
- Nájera H., Costas M., Fernández 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, pp 785-92, 2003.
- Pace C.N., Grimsley G.R. Protein stability. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp 1-4, 2001.
- Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4, pp 2411-23, 1995.
- Pardo F., Evolución de la triosafosfato isomerasa. Tesis de licenciatura, 2011.
- Peimbert M., Domínguez-Ramírez L., Fernández-Velasco D.A. Hydrophobic repacking of the dimer interface of triosephosphate isomerase by in silico design and directed evolution. *Biochemistry*, 47, pp 5556-64, 2008.
- Peimbert M., Domínguez-Ramírez L., Tellez L.A., Blancas L.M., Fernández-Velasco D.A. Triosephosphate isomerase. *Advances in Protein Physical Chemistry*, pp 193-217, 2008.
- Pompliano D.L., Peyman A., Knowles J.R. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 29, pp 3186-94, 1990.
- Ramsden W. Some new properties of urea. *The Journal of Physiology*, 28, pp 23-6, 1902.
- Reyes-Vivas H., Diaz A., Peon J., Mendoza-Hernandez G., Hernandez-Alcantara G., De la Mora-De la Mora I., Enriquez-Flores S., Dominguez-Ramirez L., Lopez-Velazquez G. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *Journal of Molecular Biology*, 365, pp 752-63, 2007.
- Rietveld A.W., Ferreira S.T. Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: The importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, 20, pp 933-7, 1998.

- Schliebs W., Thanki N., Jaenicke R., Wierenga R.K.. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*, 36, pp 9655-62, 1997.
- Schliebs W., Thanki N., Jaenicke R., Wierenga R.K.. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*, 36, pp 9655-62, 1997.
- Schulte-Sasse M., Caracterización fisicoquímica de un ancestro eucarionte de la triosafosfato isomerasa. Tesis de licenciatura, 2013.
- Shi Y., Liu J.H., Zhang H.J., Ding Y. Equilibrium unfolding mechanism of chicken muscle triose phosphate isomerase. *Protein and peptide letters*, 15, pp 365-70, 2008.
- Smith P. K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Frovenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, pp 76-85, 1985.
- Tellez L., Blancas-Mejia L., Carrillo-Nava E., Mendoza-Hernández G., Cisneros D., Fernández-Velasco D.A. Thermal unfolding of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*: dimer dissociation leads to extensive unfolding. *Biochemistry*, 47, pp 11665-73, 2008.
- Trentham D.R., McMurray C.H., Pogson C.I. The active chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochemical Journal*, 114, pp 19-24, 1969.
- Warren J.R., Gordon J.A. On the refractive indices of aqueous solutions of urea. *Journal of Physical Chemistry*, 70, pp 297-300, 1966.
- Wendel J.F., Stuber C.W., Goodman M.M., Beckett J.B. Duplicated plastid and triplicated cytosolic isozymes of triosephosphate isomerase in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Heredity*, 80, pp 218-28, 1989.
- Wierenga R.K. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*, 492, pp 193-8, 2001.
- Williams J.C., Zeelen J.P., Neubauer G., Vriend G., Backmann J., Michels P.A., Lambeir A.M., Wierenga R.K. Structural and mutagenesis studies of *Leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Engineering*, 12, pp 243-50, 1999.
- Zarrine-Afsar A., Larson S.M., Davidson A.R. The family feud: do proteins with similar structures fold via the same pathway? *Current Opinion in Structural Biology*, 15, pp 42-9, 2005.
- Zhang X., Studier F.W. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 269, pp 10-27, 1997.