



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO.

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD.
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN.**

**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA
MUTACIÓN Gly 122 POR Arg DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE HUMANO (hTPI)”.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN NUTRICIÓN
P R E S E N T A**

ARMANDO ALVAREZ RODRÍGUEZ

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:
DR. HUGO NÁJERA PEÑA.**



PACHUCA DE SOTO, HGO; DICIEMBRE DE 2008.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Nutrición Molecular y el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Hugo Nájera Peña y con el financiamiento del proyecto: CONACyT 46298 “Estabilidad y desórdenes conformacionales de la Triosafosfato Isomerasa” y beca otorgada por CONACyT.

ÍNDICE.

	Pag.
1. Resumen.....	5
Abstract.....	6
2. Marco teórico.....	7
2.1. Generalidades de las proteínas.....	7
2.2. Estructuras de las proteínas.....	8
2.3. Triosafofato isomerasa (TPI o TIM).....	13
2.4. Estructura de la TPI.....	13
2.5. Plegamiento de proteínas.....	16
2.6. Plegamiento no convencional de proteínas.....	18
2.7. Mutaciones de la hTPI.....	20
2.8. Purificación de proteínas.....	20
2.8.1. Cromatografía.....	23
2.8.2. Electroforesis.....	27
2.8.3. Espectroscopía.....	28
3. Planteamiento del problema.....	30
4. Justificación.....	31
5. Objetivos.....	32
6. Metodología.....	33
7. Resultados y discusión.....	45
8. Conclusiones.....	69
9. Perspectivas.....	71
10. Bibliografía.....	72

ABREVIATURAS.

DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas, del inglés “Fast Protein Liquid Chromatography”
G3P	D-gliceraldehído-3-fosfato
GuHCl	Cloruro de guanidina
α -GDH	α -glicerolfosfato deshidrogenasa
hTPI	Triosafofosfato isomerasa de humano
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranosido
K _m	Constante de Michaelis-Menten
M	Concentración molar
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NaCl	Cloruro de sodio
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “Polymerase Chain Reaction”
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEA	Trietanolamina
TED	Amortiguador trietanolamina, ácido etilendiaminotetraacético, ditiotreitol
TPI	Triosafofosfato isomerasa
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
V _{max}	Velocidad máxima

1. Resumen.

La Triosafosfato isomerasa de humano (hTPI) es una enzima homodimérica de subunidades idénticas que interviene en la glucólisis. Se han reportado mutaciones de esta enzima que se relacionan con daños celulares y deficiencias que provocan enfermedades neurodegenerativas debido a un plegamiento no convencional y a la incapacidad de lograr una conformación nativa y funcional. Para dar pauta a los estudios del comportamiento de la hTPI que ha sufrido algún cambio estructural y funcional, se produjo una mutación cambiando el aminoácido Glicina (G) en la posición 122 por Arginina (R). Lográndose un porcentaje de purificación mayor al 98%, se caracterizó parcialmente para demostrar que ésta mutación provoca una modificación en el comportamiento comparativamente con la hTPI silvestre y con su forma nativa. Esta enzima fue desnaturalizada en presencia de urea y cloruro de guanidina (GuHCl), se siguió la emisión de fluorescencia y la recuperación de su actividad catalítica a las 24, 48 y 72 h, utilizando concentraciones de 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, los parámetros cinéticos se midieron en una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Los valores de la V_{max} fueron, para la nativa $4.79 \pm 0.50 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$, la renaturalizada en urea $21.83 \pm 1.53 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$ y la renaturalizada en GuHCl fue de $83.32 \pm 1.65 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$. La enzima renaturalizada en GuHCl presentó la mayor V_{max} siendo 17 veces mayor que la nativa y 4.5 veces mayor a la alcanzada por la renaturalizada en urea. La K_m para la enzima renaturalizada en GuHCl fue 20% mayor que el de la nativa, y la renaturalizada en urea fue un 6% menor. En el caso de la renaturalizada, en GuHCl fue 26% mayor que en urea. Los valores de K_m fueron, para la nativa $0.98 \pm 0.10 \text{ mM}$, renaturalizada en urea $0.93 \pm 0.17 \text{ mM}$ y la renaturalizada en GuHCl $1.18 \pm 0.05 \text{ mM}$, siendo en urea el caso con mayor afinidad de la enzima para la formación del complejo enzima-sustrato (ES). Por otro lado, la K_{cat} de la enzima mutada presentó los valores más bajos de eficacia para convertir al sustrato en producto, siendo para la nativa $0.0002551 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$, para las renaturalizadas $0.0011630 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ y $0.0044389 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ en urea y GuHCl respectivamente, en comparación con la K_{cat} reportada para la silvestre de $2.7 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$.

Palabras clave: proteína, enzima, triosafosfato isomerasa de humano, plegamiento, mutación, renaturalización, afinidad.

1. Abstract.

Human triosephosphate isomerase (hTPI) is a glycolytic dimeric enzyme of identical subunits. Some mutations have been reported on this enzyme that are related to cellular damages and deficiency provoking neurodegenerative diseases as a result of protein misfolding and disability to achieve the native state and functional conformation. In order to insight about the behavior of the hTPI that has suffered some structural and/or functional change, a mutation was produced changing Glycine (G) 122 by Arginine (R). Purification grade was greater than 98% and it was partially characterized in order to demonstrate that this single mutation provokes a modification in the behavior and stability in comparison with wild type hTPI and native form. Mutated enzyme was denaturalized in the presence of urea and guanidine chloride (GuHCl), following fluorescence emission spectrum and catalytic activity recovery at 12, 48 and 72 h, using protein concentrations of 5 and 50 $\mu\text{g/mL}$, kinetic parameters were calculated at 5 $\mu\text{g/mL}$ protein concentration. V_{max} values were for native state $4.79 \pm 0.50 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$, renatured in urea reached $21.83 \pm 1.53 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$ and renatured in GuHCl was of $83.32 \pm 1.65 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$. Renatured enzyme in GuHCl presented major V_{max} being 17-fold that the native form and 4.5-fold in the case of urea. The K_{m} for renatured enzyme in GuHCl was 20% major that native state, and renatured in urea was 6% minor. In case of the renaturalized in GuHCl was 26% major that in urea. K_{m} values were, for the native form $0.98 \pm 0.10 \text{ mM}$, renatured in urea $0.93 \pm 0.17 \text{ mM}$, and renatured in GuHCl $1.18 \pm 0.05 \text{ mM}$, being in urea the case with major affinity of the enzyme for the formation of the complex enzyme–substrate (ES). On the other hand, K_{cat} values for mutated enzyme presented lowest values of turnover efficiency being for native $0.0002551 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$, renatured $0.0011630 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ and $0.0044389 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ in urea and GuHCl respectively, comparing to wild type $K_{\text{cat}} 2.7 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$.

Key words: protein, enzyme, human triosephosphate isomerase, folding, mutation, renaturation, affinity.

2. Marco teórico.

2.1. Generalidades de las proteínas.

Las proteínas son constituyentes esenciales de todos los organismos, la mayoría de las tareas que realizan las células requieren proteínas. La diversidad de funciones que pueden realizar es asombrosa. Por ejemplo, en los animales, las proteínas son los componentes estructurales principales del músculo, el tejido conjuntivo, las plumas, las uñas y el pelo. Además de servir como materiales estructurales en todos los seres vivos, las proteínas participan en funciones tan diversas como la regulación metabólica, el transporte, la defensa, la catálisis entre otras.

La diversidad funcional que exhibe esta clase de biomoléculas está relacionada directamente con las posibilidades de combinación de 20 aminoácidos (McKee, 2003).

Actualmente se sabe que las proteínas son moléculas dinámicas que llevan a cabo cambios conformacionales para alcanzar el estado de transición en determinados procesos o reacciones. Las formas de vida en este planeta utilizan una gran variedad de reacciones químicas para obtener y utilizar la energía contenida en los enlaces de las moléculas.

En ausencia de un catalizador, estas reacciones proceden a una velocidad inferior a la necesaria para cumplir con los requerimientos celulares; sin embargo, en el interior de las células un tipo particular de proteínas, las enzimas, aceleran estas reacciones químicas para que se lleven a cabo a una velocidad compatible con las necesidades celulares. Además de acelerar las transformaciones químicas, las proteínas también transportan moléculas y electrones regulando su flujo a través de las membranas, de esta manera se hace posible la transmisión de información entre las células y órganos (Laguna, 2002).

En el estudio de las proteínas se ha propuesto una estrecha relación entre los cambios conformacionales observados y la función, por lo que frecuentemente se han analizado por diferentes medios las estructuras de dichos estados conformacionales. Sin embargo, algunos aspectos aún están sin resolver.

Para que se estudien a las proteínas en cada aspecto de interés, es necesario que en el laboratorio se cuente con la infraestructura para poder producir, sobreexpresar aislar y purificar dicha proteína, ya que si se quiere recabar información del comportamiento de ésta o corroborar resultados ya obtenidos, se tiene que estudiar a la proteína en forma particular, por lo tanto, de una mezcla de material celular en donde se encuentran inmersas proteínas junto con cientos de moléculas más, es necesaria la separación de ésta y su purificación, para lo cual se aprovechan sus características físicas y químicas.

2.2. Estructuras de las proteínas.

La arquitectura fundamental de las proteínas incluye las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos así como el orden jerárquico de las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Thomas, 2002). Cada proteína está definida por una única secuencia de aminoácidos en todos los niveles de organización. La estructura primaria de las proteínas (cadena polipeptídica) es la secuencia lineal de aminoácidos (Thomas, 2002). El esqueleto polipeptídico consiste en enlaces covalentes, llamados peptídicos, enlazados mediante el carbono α (C_α) de los aminoácidos (Jaenicke, 1987). Cada unión del C_α con el aminoácido adyacente está separado por tres enlaces covalentes C_α -C-N- C_α . El enlace peptídico C-N es más corto que el N- C_α . Dentro de la cadena polipeptídica, la unión C-N es rígida, no tiene rotación debido a que el oxígeno del grupo carbonil está parcialmente cargado negativamente y en posición trans a este se encuentra el nitrógeno del grupo amido cargado parcialmente positivo, esto le da carácter de doble unión a este enlace evitando que rote libremente (**Fig. 1**).

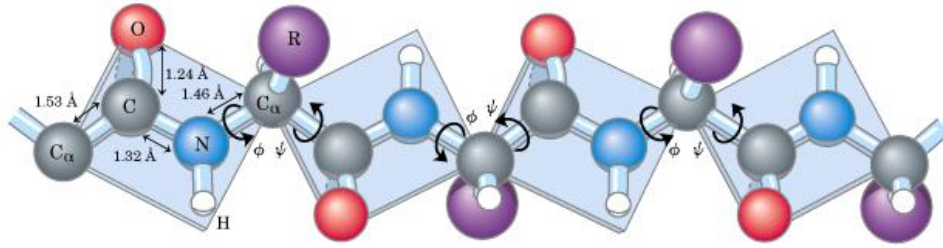


Fig. 1.- Estructura primaria.- Cadena polipeptídica en donde se visualiza el enlace C_{α} -C-N- C_{α} y los ángulos Φ y ψ que permiten la rotación de los enlaces (modificado de Nelson y Cox, 2000).

La estructura secundaria de las proteínas se refiere a los arreglos regulares de la cadena de aminoácidos, uno de estos arreglos es la hélice- α que es causada por puentes de hidrógeno formados por la rotación del C_{α} y los ángulos Φ (phi) -60° entre N- C_{α} y el ψ (psi) -45° a -50° entre C_{α} -C de los residuos de aminoácidos. Esta conformación da una hélice bipolar formada por puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo (C=O) cargado negativamente y amino (N-H) cargado positivamente (Fig. 2).

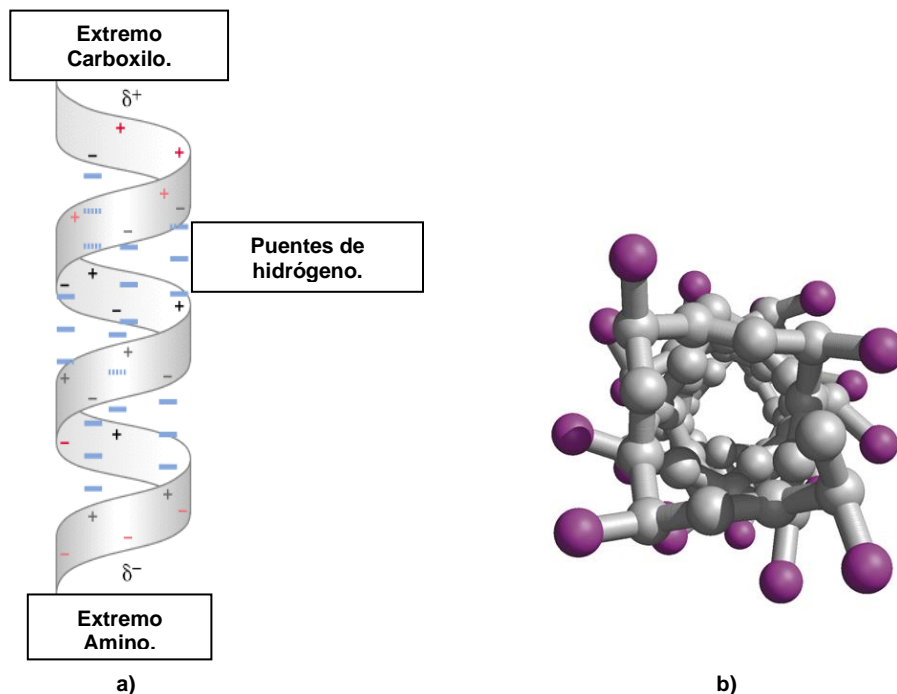


Fig. 2.- Estructura secundaria.- Hélice α , a) dipolo eléctrico transmitido a lo largo de la hélice α y representación de los puentes de hidrógeno, los grupos carbonilo y amino de la cadena polipeptídica se indican con $-$ y $+$ respectivamente. b) vista superior desde un extremo de la hélice α (modificado de Nelson y Cox, 2000).

La segunda conformación de la estructura secundaria es la hebra β que es causada por puentes de hidrógeno entre cadenas polipeptídicas adyacentes, cuando se alinean de lado dos o más segmentos de estas cadenas. Este tipo de hebra es totalmente extendida y es estabilizada por los puentes de hidrógeno formados entre los grupos N-H y C=O de las cadenas adyacentes. Hay dos tipos de hebra β , paralelas y antiparalelas. En el tipo paralelas las cadenas polipeptídicas están colocadas en la misma dirección y en la tipo antiparalelas van en direcciones opuestas ocasionando que éstas sean más estables que las anteriores debido a que forman puentes de hidrógeno totalmente colineales (Nelson y Cox, 2000) (**Fig. 3**).

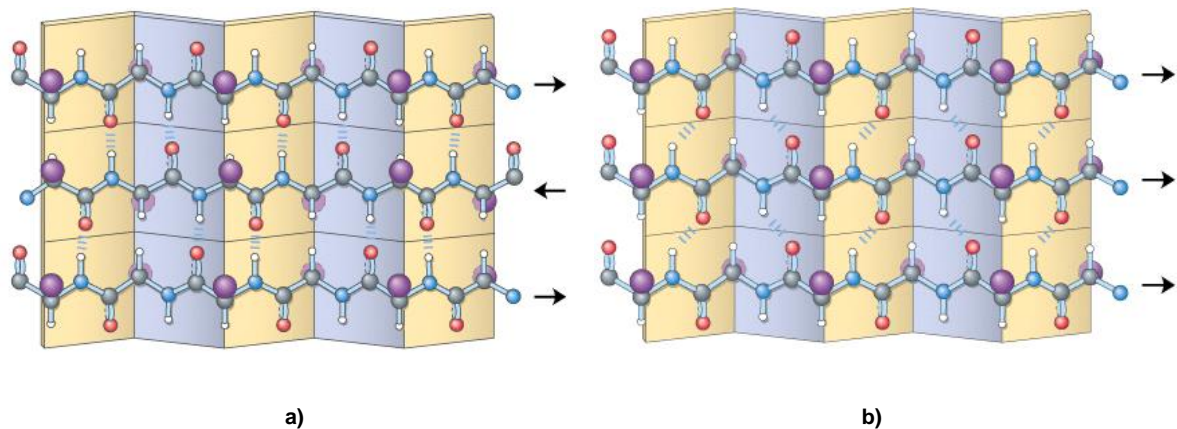


Fig. 3.- Estructura secundaria.- a) hebra β antiparalela, el grupo amino y carboxilo terminal de cadenas adyacentes están orientados uno a otro formando puentes de hidrógeno, las cadenas van en sentidos contrarios y b) hebra β paralela, las cadenas van en el mismo sentido (modificado de Nelson y Cox, 2000).

Muchas proteínas globulares contienen combinaciones de estructuras secundarias de hélice α y hebra β . Este tipo de conformación le otorga a la estructura secundaria más estabilidad termodinámica (Thomas, 2002).

La estructura terciaria de las proteínas señala las conformaciones tridimensionales que asumen las proteínas globulares al conformarse en sus estructuras nativas y es resultado de las interacciones entre los grupos R de la cadena de aminoácidos, enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas,

interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes de tipo disulfuro que se dan entre residuos de cisteína.

La estructura terciaria se podría decir que es el empaquetamiento de la estructura secundaria (Holme, 1998) (**Fig. 4**).

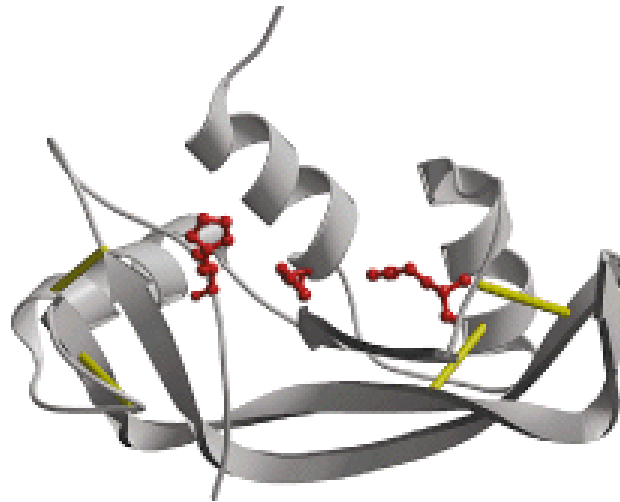


Fig.4.- Estructura terciaria.- Ribonucleasa, “modelo de listón” en donde se representa la hélice α con un listón en espiral y la hebra β con flechas planas indicando el sentido (modificado de Nelson y Cox, 2000).

La estructura cuaternaria de las proteínas se refiere al acomodo de cadenas polipeptídicas en una proteína de cadenas múltiples (Thomas, 2002). A cada cadena polipeptídica se le conoce como subunidad, las subunidades en un complejo proteico pueden ser idénticas o diferentes.

Las proteínas con varias subunidades en las que alguna o todas las subunidades son idénticas se denominan oligómeros. Los oligómeros están formados por monómeros, que pueden estar formados por dos o más subunidades. Un gran número de proteínas oligoméricas contienen dos o cuatro subunidades monoméricas, denominadas dímeros y tetrámeros, respectivamente (McKee, 2003).

En muchos casos un solo polipéptido es necesario para que la proteína funcione, lo que se conoce como un monómero. Sin embargo, para que la proteína ejerza una función particular a veces es necesario que se presente la interacción de dos polipéptidos o más.

La estructura cuaternaria resulta de interacciones entre dos o más de estas cadenas para formar dímeros, trímeros, tetrámeros, etc., mismas que se mantienen unidas mediante enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y, menos comunes, interacciones hidrofóbicas entre las regiones no polares en las superficies y enlaces de tipo disulfuro entre cadenas polipeptídicas (Holme, 1998) (Fig. 5).

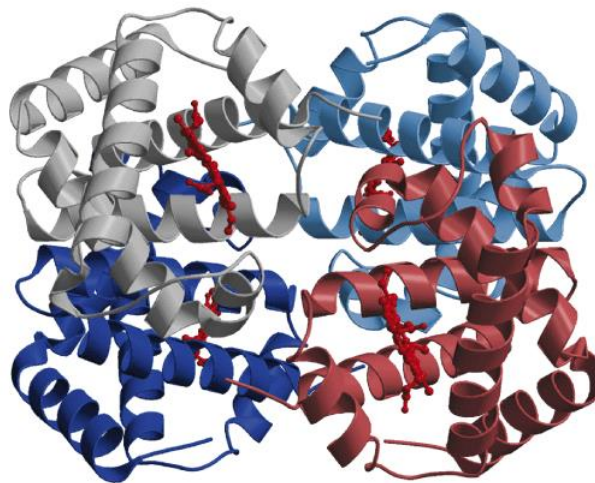


Fig. 5.- Estructura cuaternaria.- Representación del “modelo de listón” de la desoxihemoglobina donde se muestra como están empaquetadas las cuatro subunidades de polipéptidos (modificado de Nelson y Cox, 2000).

La estructura tridimensional de las proteínas fluctúa entre diferentes conformaciones para llevar a cabo la catálisis. Se ha demostrado que los cambios conformacionales pueden ser inhibidos por cambios en las condiciones del medio.

A esto se propuso que tanto las fuerzas que mantienen la estructura nativa como las que generan o incrementan los cambios conformacionales están involucradas en la estabilidad de las proteínas; además se ha sugerido que la magnitud de estos cambios es el origen de la desnaturalización de las proteínas; es decir, cuanto más grande sea la magnitud de los cambios, más fácilmente se desestabilizan las proteínas. Sin embargo, la estructura proteica ha evolucionado a través de millones de años para cambiar u optimizar su función.

2.3. Triosafosfato isomerasa (TPI o TIM).

La enzima TPI es la quinta enzima en la ruta glucolítica. De los dos productos de la reacción de la aldolasa, sólo el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) se utiliza como sustrato de la reacción siguiente de la glucólisis. El otro producto, dihidroxiacetona fosfato (DHAP), es rápidamente convertida de forma reversible a G3P por esta enzima (Nelson y Cox, 2000).

El equilibrio para la reacción va a favor de la DHAP, pero para evitar la pérdida de la glucólisis de la otra unidad de tres carbonos, la TPI cataliza la interconversión de la DHAP en G3P. Tras esta reacción, la molécula original de glucosa se ha convertido en dos moléculas de G3P (McKee, 2003).

La rápida remoción del G3P por reacciones sucesivas en la glucólisis llevan a la formación de G3P (Whitford, 2005). Solo el G3P continua la ruta glucolítica así que esta enzima asegura la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) en la oxidación de la glucosa hasta piruvato para la obtención de energía. Los parámetros cinéticos de la TPI de diferentes especies son semejantes (Lambeir, 1987), esta enzima es muy eficiente, la velocidad con que cataliza la isomerización de la G3P es entre 10^8 y 10^9 veces mayor que en ausencia de esta (Knowles, 1977).

2.4. Estructura de la TPI.

La TPI es una proteína homodimérica, de cadenas de 27 kDa, de naturaleza soluble, la TPI de humano consiste de 248 residuos, estas subunidades se asocian por enlaces no covalentes para formar un homodímero de 54 KDa y cuya estructura secundaria está formada por ocho hebras β que tienen alternancia con una o a veces dos hélices α , la cadena polipeptídica se pliega de tal manera que forman una hoja β paralela formando una especie de barril (Nájera, 2003).

Ambos monómeros contienen un sitio activo que se encuentra en uno de los extremos del barril en la cavidad formada por las asas contiguas de las hebras β (Banner, 1975).

En proteínas homólogas, los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo, están conservados, así como los residuos directamente relacionados con la catálisis (Creighton, 1997). Este patrón topológico se ha encontrado en aproximadamente el 10% de las proteínas cristalizadas.

No es claro si este patrón de plegamiento refleja las características de un ancestro común, o si el barril presenta una topología estable a la cual han convergido diferentes proteínas (Nájera, 2003).

La TPI solo es activa como dímero, de este modo se ha sugerido que los residuos de un monómero son importantes para mantener integro el sitio activo del otro monómero (Wierenga *et al.*, 1992) (**Fig. 6**).

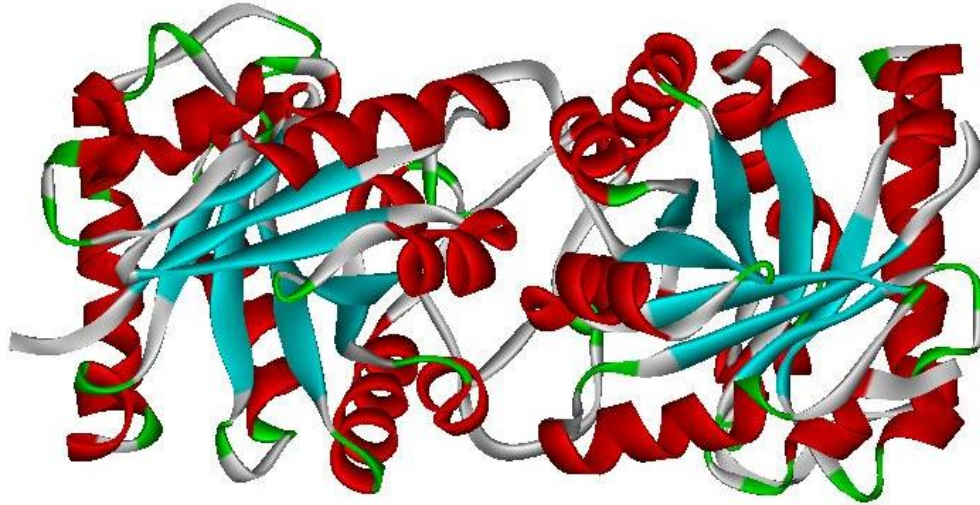


Fig. 6.- Modelo de listón de la hTPI o TIM, se describe la estructura homodimérica barril (β/α)₈, hélice- α como listones en espiral y hebras- β como listones planos.

Actualmente la TPI se ha encontrado en todos los organismos en los que se ha buscado y se ha reportado la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 1300 especies, teniendo en 13 de ellas su estructura tridimensional: *Gallus gallus* (pollo) (Banner *et al.*, 1975), *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis *et al.*, 1990), *Trypanosoma brucei brucei* (Wierenga *et al.*, 1991), *Escherichia coli* (Noble *et al.*, 1993), *Homo sapiens sapiens* (humano) (Mande *et al.*, 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni *et al.*, 1995), *Plasmodium falciparum* (Velanker *et al.*, 1997), *Vibrio marinus* (Álvarez *et al.*, 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado *et al.*, 1998), *Leishmania mexicana* (Williams *et al.*, 1999), *Thermotoga maritima* (Maes *et al.*, 1999), *Pyrococcus woeisi* (Walden *et al.*, 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002) y *Giardia lamblia* (Reyes-Vivas, 2007). Las propiedades reguladoras y funcionales de las proteínas oligoméricas están dadas principalmente por la formación de la estructura cuaternaria, (Jaenicke, 1987 y Traut, 1994).

La TPI es el prototipo de una estructura dimérica en forma de barril (β/α)₈, que es uno de los patrones de plegamiento más comúnmente encontrada en la naturaleza, (Farber, 1990 y Copley, 2000), con la excepción de dos enzimas de arqueobacterias hipertermófilas reportadas como homotetrámeros de 100 kDa (Kohlhoff *et al.*, 1996).

2.5. Plegamiento de proteínas.

La reacción de conversión de un estado desplegado o desnaturalizado (D) a su forma nativa (N) de una proteína se le llama plegamiento y al proceso inverso se le llama desnaturalización o desplegamiento.

El proceso de plegamiento es rápido, una cadena polipeptídica es capaz de adoptar millones de conformaciones o microestados y el tiempo que gastaría en pasar por todos ellos sería inmenso (Murphy, 2001).

Los estudios experimentales sobre las interacciones que estabilizan la estructura de una proteína son complicados por el hecho de que no se desnaturalizan a un solo estado y pareciera que se desnaturalizan en estructuras al azar. Una proteína en condiciones fisiológicas pasa por microestados estructurales que son inestables y rápidamente conforma su estado N (Shortle, 1996). Por lo tanto, se sugiere que la conformación N de una proteína sigue un patrón o ruta de plegamiento.

El objetivo de los estudios sobre el plegamiento de proteínas ha sido entender porque se forma este único estado estructural N y como se codifica su secuencia de aminoácidos.

La estructura normal de las proteínas determina su función por la presencia de sitios activos que son específicos para otras moléculas. El colapso de esta estructura está dado por la secuencia errónea de aminoácidos ya que los residuos hidrofóbicos tienden a quedar juntos y en la parte interna de la estructura plegada quedando lejos del medio acuoso.

El correcto plegamiento es usualmente soluble o se asocia a la membrana celular, el error en el plegamiento forma agregados insolubles de diferentes tamaños, esto lleva a una mala o nula función celular y se ha asociado este defecto a diferentes enfermedades en humanos.

Con el análisis de los parámetros termodinámicos se puede entender el proceso del plegamiento de proteínas. Termodinámicamente, el proceso de plegamiento puede ser visto como una especie de embudo de energía libre. Los estados desnaturalizados son caracterizados por un alto grado de entropía (desorden) conformacional y relativamente alta energía libre.

La punta del embudo representa el decreciente número de conformaciones presentes. Las pequeñas depresiones a lo largo de los lados del embudo de energía libre representan los estados intermedios que pueden ser breves en el proceso de plegamiento. En el fondo del embudo, se reducen los estados plegados en forma nativa (Nelson y Cox, 2000) (**Fig. 7**).

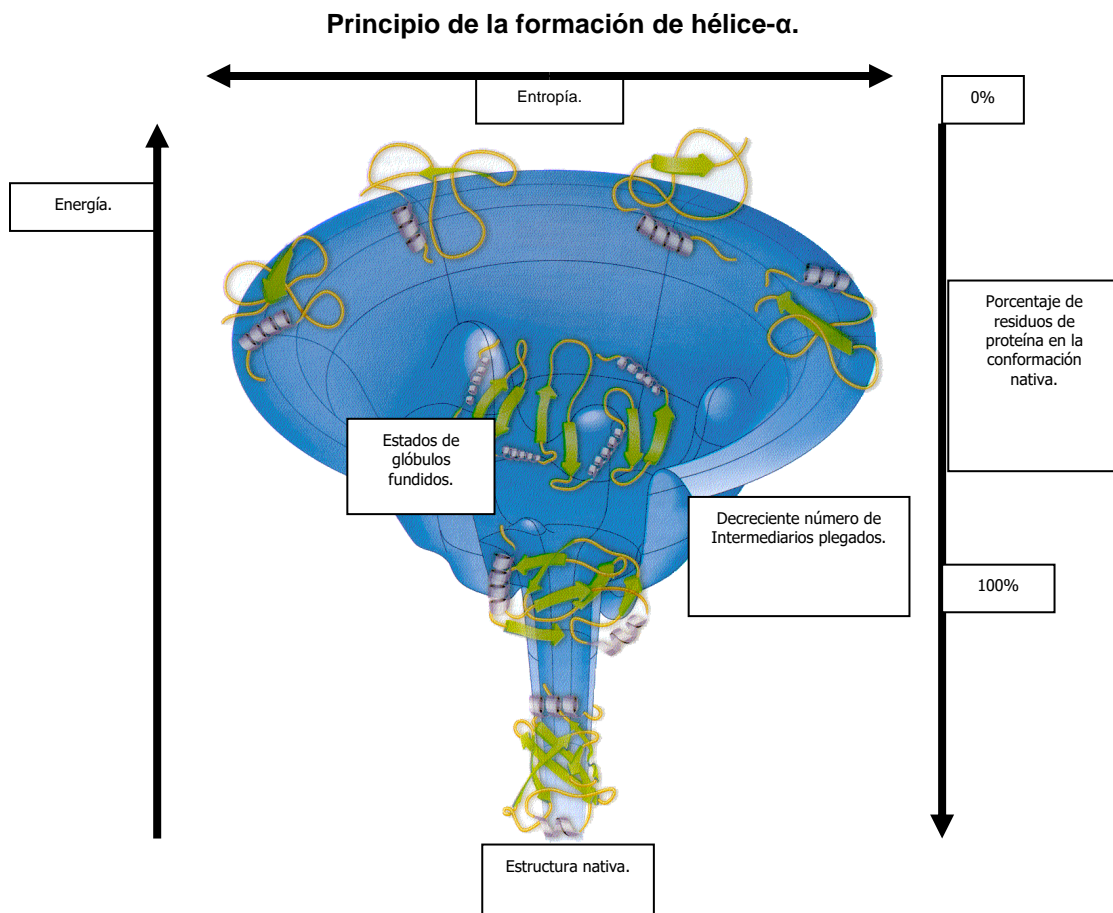


Fig. 7.- Termodinámica del plegamiento de proteínas descrito como un embudo o paisaje de energía libre (Modificado de: Nelson y Cox, 2000).

Las proteínas se pueden ver afectadas durante el proceso de plegamiento, es decir, que en el transcurso para llegar a la conformación N no se pliegan convencionalmente y esto ocasione una mala función. La manera en cómo se sintetiza una nueva cadena de aminoácidos y como se pliegan para formar una nueva proteína depende de las propiedades de la secuencia de aminoácidos (Dobson, 2003).

El plegamiento de las proteínas dependerá de las condiciones del medio en que se encuentra, y pueden ocurrir cambios en este plegamiento si este medio cambia, por ejemplo, cambios en la temperatura, variaciones en el pH, incremento de presión o con la adición de algún desnaturalizante como pueden ser la urea o el cloruro de guanidina.

La desnaturalización no envuelve cambios en la estructura covalente y es usualmente reversible. En algunos casos, las proteínas pueden ser desplegadas rompiendo algunas uniones disulfuro, removiendo algún cofactor esencial, mutando ciertos residuos o quitando determinados residuos de la estructura primaria (Creighton, 1997).

2.6. Plegamiento no convencional de proteínas.

El plegamiento y desplegamiento tiene caminos cruciales para una proteína en específico en diferente localización en la célula. La agregación de proteínas desplegadas que escapan al estricto mecanismo de control de calidad celular es una característica común en un amplio rango de enfermedades (Dobson, 2003). Un gran número de enfermedades están relacionadas con el mal plegamiento de proteínas que resultan en un mal funcionamiento de la maquinaria celular. El plegamiento incorrecto de las proteínas afecta las funciones celulares a diferentes niveles. La proteína afectada no se secreta en la cantidad adecuada, o bien, no lleva a cabo su función correctamente.

La fibrosis quística es un ejemplo en donde la mutación del gen que codifica una proteína de transporte hace que se pliegue incorrectamente y esta no se secreta en cantidades adecuadas para su función. Otras enfermedades incluyen algunos tipos de enfisema familiar resultado de una mutación que resulta en un inapropiado transporte de proteínas a los sitios en donde son necesitadas.

Recientemente se ha puesto la atención en un grupo de enfermedades donde proteínas o fragmentos de proteínas se convierten de su forma normalmente soluble a una forma de placas fibrilares insolubles las cuales se acumulan en una variedad de órganos incluidos el hígado, bazo y cerebro. La forma final de esos agregados es fibrilar y son conocidos como amiloides, por lo tanto el uso del término amiloidosis se utiliza para describir muchas condiciones clínicas con las que estos agregados están relacionados (Tan, 1994). En las amiloidosis se encuentran enfermedades diversas como Alzheimer y Creutzfeldt-Jakob, la diabetes tipo II y la encefalopatía esponjiforme bovina (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002).

Uno de los defectos de plegamiento más severos clínicamente es el que ocasiona la deficiencia de la TPI y que resulta en un error en la glucólisis, por fortuna esto no se presenta de forma común, son muy aislados los casos en donde se ha reportado esto, mismos que ha resultado en la muerte de los pacientes a temprana edad, dándose antes de los 6 años.

La deficiencia de la TPI, es un defecto autosómico recesivo caracterizado por anemia hemolítica, disfunción progresiva neuromuscular, susceptibilidad a infecciones bacterianas y cardiomiopatías. Para estos pacientes no hay una terapia descubierta que corrija los síntomas (Ationu, 1999).

El bloqueo metabólico en la glucólisis causa un alto nivel de DHAP en los eritrocitos (Orosz, 2001) modificando así la actividad de la TPI. Se han estudiado y evaluado las capacidades de enzimas exógenas para contrarrestar la deficiencia de TPI en las células afectadas como posible tratamiento, (Ationu, 1999).

El gen que codifica la hTPI abarca 3.5 kb del ácido desoxirribonucleico (DNA) localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13) y comprende 7 segmentos que codifican 1.2 kb del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) que traduce a los 248 aminoácidos de la proteína (Arya, 1996).

2.7. Mutaciones de la hTPI.

Se conocen algunas mutaciones de la enzima (Schneider, 1996), dentro de las cuales se han reportado la mutación del Glu 104 por Asp, esta mutación aparentemente le confiere termolabilidad (Daar *et al.*, 1986), la Gly 122 por Arg (Hollan *et al.*, 1993) y Phe 240 por Leu (Chang *et al.*, 1993) hacen enzimas termolábiles. Otras mutaciones fueron las reportadas por Bardosi y colaboradores (1990) en Val 231 por Met, en donde se reportó la existencia de características clínicas de miopatía degenerativa e incremento en los niveles de glucógeno intracelular. Arya y colaboradores (1995) reportaron la mutación de Ile 170 por Val, en donde se presentaron desórdenes neurológicos y se sugirió la alteración de la estructura de la enzima, presentando una catálisis anormal, generando manifestaciones clínicas comunes de la deficiencia de TPI.

2.8. Purificación de proteínas.

El primer paso en cualquier proyecto de investigación de proteínas, es aislarlas para su estudio y análisis. Este proceso requiere más de una etapa y en cada una de ellas irremediablemente hay una pérdida de producto, y dependiendo del número de etapas, al final se tienen cierto rendimiento de la muestra inicial a tratar.

El éxito de un proceso de purificación reside en la correcta selección de las técnicas a utilizar en cada etapa, y éstas deberán ser organizadas de una forma lógica para evitar pasos innecesarios. Las proteínas suelen extraerse de fuentes que contienen cientos de moléculas semejantes; por lo tanto, en su análisis es necesario que se trabaje de forma específica, es decir, aislar y tener pura a la proteína a estudiar y

aunado a esto, las técnicas utilizadas deben ser de fácil realización, ya que en un sólo estudio se podría requerir de aplicar varias veces estos procesos. Las fuentes de proteínas son esencialmente células y tejidos; por lo tanto, lo primero en una purificación es el romper estas células fraccionándolas y llevándolas a una solución homogénea, a esta solución se le llama extracto crudo, al cual posteriormente se le someterá a una centrifugación diferencial (Berg, 2002).

La extracción de una proteína, como ya se mencionó, se inicia con la ruptura y la homogeneización de las células, para realizar posteriormente la separación y purificación de la proteína con una centrifugación diferencial; ésta separación puede hacerse por sedimentación ocasionada por la fuerza de la gravedad terrestre, pero este evento se puede acelerar aumentando la fuerza de gravedad a través de la centrifugación. Al realizarse en un medio líquido, la separación no sólo depende de la fuerza centrífuga, sino de otros factores que modifican la sedimentación y que dependen de las características de la célula o partícula y del medio.

La solubilidad de las proteínas depende fuertemente de la concentración de sales (fuerza iónica) del medio. Las proteínas son poco solubles en agua, y su solubilidad se incrementa conforme aumentan las fuerzas iónicas, esto se debe a que los iones van rodeando y cubriendo la superficie de la proteína evitando, en un principio, la agregación de las moléculas, a esto se le llama “salting in”.

Al actuar gran cantidad de fuerzas iónicas y aumentando éstas en la superficie de la proteína se evita la hidratación, favoreciendo de este modo a la agregación y precipitación de las moléculas, a esto se le llama “salting out”. Por esta razón, al adicionar sales se hace posible la separación de proteínas de una mezcla de acuerdo a su grado de solubilidad (Koolman y Roehm, 2005).

Así que, tras obtener la fracción que contiene la proteína, para potenciar la purificación puede utilizarse el “salting out” y agregar sales hasta lograr una alta concentración. La sal comúnmente utilizada es el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ por su gran solubilidad en agua (Nelson y Cox, 2000).

Debido a que las proteínas tienen un punto de “salting out” característico, esta técnica elimina muchas impurezas. Las proteínas que no se quieren y que quedan en disolución son desechadas posteriormente cuando se decanta el líquido sobrenadante (McKee, 2003).

Cuando las proteínas están unidas fuertemente a la membrana, suelen utilizarse disolventes orgánicos o los detergentes. La diálisis se utiliza de forma rutinaria para eliminar las impurezas de peso molecular bajo, como sales, disolventes y detergentes. En esta técnica se utiliza una membrana semipermeable (bolsa o tubo de membrana semipermeable) que es colocada dentro de un recipiente con un gran volumen de solución amortiguadora con apropiadas fuerzas iónicas.

La diálisis se basa tomando en cuenta el “gran” tamaño de las proteínas, ya que debido a este, no pueden pasar a través de los poros de la membrana semipermeable mientras que otras moléculas más pequeñas se distribuyen y pasan de un lado a otro tanto fuera como dentro del tubo de diálisis o bolsa de membrana semipermeable. Después de un tiempo de que se da este intercambio de las partículas pequeñas hacia la solución que rodea al tubo o bolsa de diálisis, las condiciones dentro de esta, como pueden ser la concentración de sal, pH, etc., se igualarán a las condiciones del amortiguador que la está rodeando (Koolman y Roehm, 2005).

Para seguir y lograr una mayor purificación de las proteínas se emplean también métodos como lo son la cromatografía y la electroforesis.

2.8.1. Cromatografía.

La cromatografía se ha convertido en una herramienta importante en la purificación de las proteínas. Existe una extensa variedad de técnicas cromatográficas, que pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas de acuerdo con las propiedades moleculares, como el tamaño, la forma y el peso, o determinadas afinidades de unión.

Con frecuencia para obtener una proteína con una pureza demostrada deben emplearse varias técnicas de forma secuencial. Estas técnicas permiten separar eficiente y selectivamente a las proteínas de nuestro interés y, aunado a estas, el desarrollo de sistemas automatizados junto con programas de cómputo específicos se ha logrado una mayor rapidez y reproducibilidad de las separaciones (Berg, 2002).

Existen varios tipos de cromatografía, el principio de esta técnica es que las proteínas mezcladas se disuelven en un líquido conocido como fase móvil. Al pasar las moléculas de proteína a través de la fase estacionaria (una matriz sólida), se separan unas de otras debido a su diferente distribución entre las dos fases.

El movimiento relativo de cada molécula es consecuencia de su capacidad para permanecer asociada con la fase estacionaria mientras que continúa fluyendo la fase móvil. Si la separación se basa en el tamaño y la forma de la proteína, se trata de una cromatografía de filtración en gel; si es la carga neta de la proteína, es una cromatografía de intercambio iónico; si es la hidrofobicidad, será una cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía en fase reversa; y si es la función biológica, es una cromatografía de afinidad.

La fase estacionaria se trata de una matriz porosa, que normalmente se trata de un polímero hidrófilo, y un solvente, que usualmente es un amortiguador acuoso. Los materiales para preparar la matriz pueden ser inorgánicos (silica, cristal,

hidroxiapatita), polímeros orgánicos sintéticos (poliacrilamida, polimetacrilato, poliestireno) o polisacáridos (celulosa, dextrano, agarosa). Las propiedades fisicoquímicas de estos materiales deben ser consideradas en el momento de seleccionar el tipo de fase estacionaria.

Las características a tomar en cuenta de la matriz para la purificación son:

- *Estabilidad mecánica*, si es alta permitirá trabajar a flujos más elevados.
- *Estabilidad química*, es necesaria para mantener la estructura, permitir la esterilización y minimizar la contaminación bacteriana.
- *Capacidad*, si es alta permite aumentar la velocidad.
- *Tamaño y forma del poro*, afectan a la selectividad en la cromatografía de filtración de gel o a la difusión de las proteínas en los distintos tipos de cromatografía de adsorción.
- *Superficie de la matriz*, debe ser inerte para minimizar las interacciones no específicas.
- *Densidad*, apropiada para la aplicación.
- *Tamaño de las partículas*, influye en la elección del equipo (Gómez-Moreno, 2004).

Los métodos cromatográficos utilizados habitualmente para la purificación de proteínas son la cromatografía de filtración en gel, también conocida como de permeación o de exclusión molecular, que es un tipo de cromatografía de partición basada en la separación de moléculas en función de su tamaño.

La partición establece un equilibrio dinámico de las moléculas de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria, en el que interviene únicamente la difusión (Gómez-Moreno, 2004). En esta técnica, una columna empaquetada con un polímero gelatinoso separa a las moléculas de acuerdo a su tamaño y forma.

La matriz está conformada por partículas esféricas de tamaño de poro determinado, empaquetadas en una columna y rodeadas de solvente, esto es la fase estacionaria. Las moléculas que son mayores que los poros del gel quedan excluidas y por lo tanto se mueven rápidamente a través de la columna.

Las moléculas que son menores que los poros del gel difunden dentro y fuera de los poros, de forma que se retrasa su movimiento a través de la columna. Cuando menor es el peso molecular, más lento es el movimiento. Las diferencias de estas velocidades separan la mezcla de proteínas y estas fracciones se recogen separadamente (McKee, 2003).

Este tipo de cromatografía tiene poca capacidad de carga para ser utilizada en los primeros pasos de un proceso de purificación de proteínas, por lo que suele usarse en los pasos finales asegurando un elevado grado de purificación. Sus aplicaciones fundamentales son, separar grupos contaminantes de moléculas de alta o baja masa molar, desalado; y fraccionamiento de biomoléculas, determinación de masa molar relativa de las proteínas, detección de la formación de complejos y agregados, detección de proteínas desnaturalizadas y renaturalización de proteínas (Gómez-Moreno, 2004).

La cromatografía de intercambio iónico, es un tipo de cromatografía de adsorción basada en la separación de moléculas en función de su carga neta. La separación se produce por la adsorción reversible de las moléculas cargadas de la muestra, esto debido a que las proteínas tienen en su estructura cargas positivas y negativas que se forman en las superficies de las cadenas laterales ácidas y básicas de los aminoácidos que las componen y grupos inorgánicos de carga opuesta inmovilizados en la fase estacionaria. La proporción de cargas positivas o negativas variará debido al pH del medio.

Las resinas de intercambio aniónico, que están formadas por materiales con carga positiva, se unen de forma reversible con los grupos con carga negativa de la proteína. De igual forma, las resinas de intercambio catiónico se unen a los grupos con carga positiva.

Tras eliminar las proteínas que no se han unido a la resina, se recupera la proteína que interesa por medio de un cambio adecuado del pH del disolvente y/o de la concentración salina. Un cambio del pH altera la carga neta de la proteína. La elección del tipo de intercambiador dependerá del pH al que se realice la separación, y éste vendrá determinado por la estabilidad de la proteína. La proteína tiene una carga neta positiva o negativa dependiendo de si el pH del amortiguador es inferior o superior a su punto isoeléctrico, que es el punto en donde no existe la carga neta y es eléctricamente neutra.

Si la proteína es más estable a pH superior a su punto isoeléctrico se utilizará un intercambiador aniónico para su separación, mientras que si es más estable a pH inferior a su punto isoeléctrico se escoge uno catiónico. Por sus características, esta técnica se puede utilizar en todas las etapas del proceso de purificación, se destaca en separación de muestras complejas de proteínas, la concentración de muestras y/o la eliminación de contaminantes cargados (Gómez-Moreno, 2004).

Un método moderno de cromatografía, es la llamada Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). El HPLC usa bombas de alta presión que aumentan la velocidad en la circulación de las moléculas de proteína hacia abajo de la columna, por lo que es importante utilizar material de alta calidad que pueda soportar la alta presión del fluido dentro de la columna. Debido a que se reduce el tiempo de tránsito dentro de la columna, el HPLC puede limitar la difusión de las bandas de las proteínas y de este modo mejorar grandemente la resolución (Nelson y Cox, 2000).

Tomando en cuenta la base teórica y fundamentos utilizados en el HPLC, y concentrándose en el tamaño, la uniformidad y rigidez de las partículas de la fase estacionaria, se han podido desarrollar técnicas en la purificación de proteínas; a este desarrollo se le conoce como Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC, por siglas en inglés), en ambos tipos de cromatografía los principios son los mismos, pero en la purificación de proteínas FPLC se modifican las condiciones donde el soluto presenta una mayor afinidad por la fase estacionaria (Uversky, 1993).

Usualmente, condiciones como solventes, temperatura, fuerzas iónicas y pH de la fase móvil y la estructura química de la fase estacionaria son manipuladas para obtener un mayor grado de separación (Kyte, 1995), algunos de estos aparatos cuentan con un espectrómetro de masas que inmediatamente determina las masas de las proteínas que se van separando y fraccionando.

2.8.2. Electroforesis.

Las proteínas se mueven en un campo eléctrico como consecuencia de su carga eléctrica. En este proceso, que se denomina electroforesis, las moléculas se separan unas de otras debido a las diferencias en su carga neta, es decir, las moléculas con carga neta positiva migran hacia el electrodo con carga negativa (cátodo), mientras que las moléculas con carga neta negativa se mueven hacia el electrodo con carga positiva (ánodo). Las moléculas sin carga neta no se mueven. Ésta es una técnica que se utiliza con frecuencia en bioquímica, se realiza casi siempre utilizando geles como los de poliacrilamina o agarosa.

El gel, que actúa semejante a como lo hace en la cromatografía de filtración de geles, también actúa para separar a las proteínas de acuerdo con su peso molecular y su forma. Por lo que, la electroforesis en gel es muy eficaz para separar mezclas complejas de proteínas u otras moléculas.

Debido a su elevado poder de resolución, la electroforesis en gel suele utilizarse para valorar la pureza de las muestras de proteínas. La tinción de los geles con un colorante, como el azul brillante de Coomassie, es un método que se emplea comúnmente para valorar de forma rápida el éxito de un paso de purificación.

Una variante de la electroforesis en gel, que se denomina electroforesis en gel con SDS, en el cual se utiliza el Dodecil sulfato de sodio (SDS) que es un detergente que carga negativamente a las proteínas y se utiliza principalmente para caracterizar a las proteínas (McKee, 2003).

2.8.3. Espectroscopía.

La espectroscopía mide la absorción de la radiación electromagnética que tienen las moléculas. Los instrumentos que realizan este tipo de medición se denominan espectrofotómetros o espectrofluorómetros, y pueden realizar medidas en un amplio rango de frecuencias. Se denomina espectro de absorción o fluorescencia a las gráficas de la absorción o emisión de radiación que presentan las muestras (Deutscher, 1990).

Las proteínas purificadas son fácilmente detectadas y cuantificadas a través de la absorbencia y fluorescencia en las regiones aromáticas de las cadenas de aminoácidos que son las que tienen estas propiedades de absorción y emisión.

El rango de longitud de onda donde se detectan va desde los 250 a los 350 nm; por lo general alrededor de los 280 nm. La absorbencia y fluorescencia para cada proteína depende del número y posición de los residuos de aminoácidos aromáticos y está relacionada con el grado de excitabilidad de los electrones presentes en los diferentes niveles de energía.

La fluorescencia es luz de longitud de onda larga emitida rápidamente poco después de que una molécula ha absorbido luz de longitud de onda corta que usualmente es luz ultravioleta (UV). Los aminoácidos, fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y triptofano (Trp, W) son los residuos aromáticos responsables de las propiedades de absorción y fluorescencia de la luz UV de las proteínas y estos son muy sensibles, siendo el triptofano el de mayor coeficiente de extinción, seguido de la tirosina, de este modo, cuando registramos el espectro de absorción de una proteína estamos viendo la luz absorbida por estos dos tipos de residuos principalmente.

La excitación de tirosinas se transmite a los triptofanos por el fenómeno de transferencia de energía por resonancia, por lo cual, el espectro de las proteínas está casi siempre dominado por la emisión de triptofanos. La fluorescencia pueden variar dependiendo del estado de plegamiento en que se encuentran las proteínas, gracias a esto se pueden comprobar las estructuras de las proteínas (Creighton, 1997).

Si la proteína a analizar es una enzima, puede medirse la desaparición del sustrato el cual utiliza para llevar a cabo la reacción específica así como el producto que se forma de esta.

3. Planteamiento del problema:

La función particular de una proteína está determinada por su estructura tridimensional nativa. La habilidad de la proteína para llegar a este estado depende de su entorno durante su síntesis. Aún no se conoce lo suficiente en cuanto a los parámetros cinéticos y termodinámicos que puedan definir una ruta de plegamiento específica, pero se sabe que a través del estudio de dichos parámetros se puede estimar cómo es que se da el plegamiento y de este modo, podemos tener una idea más clara o concluir como se da la ruta de plegamiento en ciertas condiciones del medio, estos son estudios específicos que requieren de trabajar con la proteína purificada. Como ya se ha mencionado, los defectos en el plegamiento de las proteínas resultan en enfermedades letales e incompatibles con la vida.

En la ruta glucolítica, la TPI interviene de forma importante para que se lleve a cabo la obtención de energía. La mutación Gly 122 por Arg (G122R) de la hTPI se ha encontrado en pacientes que presentan cierto tipo de enfermedades relacionada con mal plegamiento de proteínas, no se sabe qué grado de inestabilidad ocasiona esta condición a la estructura nativa de dicha proteína, ni el tipo y cantidad de intermediarios que se forman y si es condicionante para la formación de agregados fibrilares en la célula que ocasionen una disfunción de la misma. De aquí la importancia de ésta investigación, es el comienzo para plantear estudios posteriores en los que parámetros tanto cinéticos como termodinámicos sean esclarecidos y definir así los posibles intermediarios para caracterizar de este modo la ruta de plegamiento y, conocer las condiciones que determinan el plegamiento anómalo de esta proteína y dar pauta para estudiar y definir si la presencia o deficiencia de ciertos nutrientes pueden estar involucrados en este defecto; por lo que la importancia de contar con una buena técnica de purificación, garantiza que el estudio de esta proteína se haga de forma específica y así, se obtengan resultados confiables que ayudarán en el análisis de los parámetros a medir arrojando bases fidedignas para su estudio.

4. Justificación.

Existen diversas enfermedades derivadas del mal plegamiento de proteínas afectando su funcionamiento y condicionando a trastornos fisiológicos. La deficiencia de la TPI ocasiona un desorden multisistémico. Se sabe que la mutación en genes humanos puede cambiar la secuencia de aminoácidos y por lo tanto la estructura nativa de las proteínas bloqueando su función y provocando algunas enfermedades, en este contexto, la investigación está dirigida a obtener la purificación de la mutante G122R de la hTPI y así definir en estudios posteriores la ruta de plegamiento de dicha proteína, caracterizando los estados conformacionales que ocurren en un pequeño lapso de tiempo y de este modo entender las alteraciones que ocurren en el proceso de plegamiento, con esto podremos conocer más de las patologías que se derivan de estos defectos en humanos y definir si la presencia o deficiencia de algún nutriente está involucrado en este defecto en el plegamiento, y así poder prevenir futuros trastornos o lograr revertir los daños ocasionados.

5. Objetivos.

Objetivo general.

- Purificar y caracterizar parcialmente la hTPI con la mutación Gly 122 Arg.

Objetivos particulares.

1. Purificar la mutante Gly 122 Arg de la hTPI.
2. Determinar los parámetros cinéticos de la hTPI con la mutación Gly 122 Arg (K_m , k_{cat} y V_{max}).
3. Determinar el porcentaje de reversibilidad de la mutante Gly 122 Arg de la hTPI en diferentes condiciones de desnaturalización y renaturalización.

6. Metodología.

La construcción y sobreexpresión de la mutación G122R de la hTPI fue realizada en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a cargo del Dr. Alejandro Sosa Peinado.

A partir de estas células, se purificó la proteína extrayéndola por rompimiento a través de ultrasonificación y se utilizaron las técnicas de salting out, diálisis, cromatografía de exclusión y cromatografía de intercambio iónico.

Para determinar el grado de pureza se utilizó electroforesis, se reconcentró la proteína purificada, se calcularon los gramos de proteína finalmente obtenida y se realizaron experimentos de desnaturalización, renaturalización y reversibilidad determinando la actividad catalítica y concentración por espectroscopía UV.

Bioquímicamente se caracterizó parcialmente calculando los parámetros cinéticos velocidad máxima (V_{max}), la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) y la constante catalítica (K_{cat}) o eficacia de la enzima para convertir al sustrato en producto.

Equipos e infraestructura.

Equipos.

- Centrifuga Beckman avanti j-25I.
- Ultrasonicador Ultrasonic processor VCX.
- Centrifuga Dupont Instruments Sorvall RC-5B.
- Columna de exclusión Superdex 200 Pharmacia.
- Sistema ÄKTA-FPLC controlado con el software UNICORN 5.1.
- Columna de intercambio aniónico Mono Q Pharmacia.
- Espectrofotómetro UV/VIS Agilent 8453.
- Espectrofluorómetro Shimadzu RFC5301.

Infraestructura.

- Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- **Expresión.**

Construcción de la mutante.

En esta parte de la investigación, nos apoyamos con el Dr. Alejandro Sosa Peinado, investigador del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), quien construyó y sobreexpresó la mutación G122R de la hTPI para realizar este estudio.

La construcción de la mutación Glicina por Arginina en la posición 122 de la hTPI se llevó a cabo por mutagénesis sitio dirigida utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el “Expand High Fidelity PCR System” (Boehringer).

Para la mutante se realizó una reacción de PCR con 200 ng del oligonucleotido mutagénico directo y T7 terminador (Novagen pET System) y la mezcla de reacción para PCR del Expand High Fidelity PCR System a una concentración de MgCl₂ de 1.5 mM. Se utilizó un amplificador de PCR (Gene Amp PCR system 2400, Perkin Elmer) a 94°C por 35 minutos; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C y por último 10 minutos a 72°C.

Las mismas condiciones de tiempo y temperatura se utilizaron en una segunda reacción de PCR con 200 ng del oligonucleótido mutagénico complementario correspondiente y el T7 promotor. Con el DNA aislado, resultado de ambos PCRs para la mutante, se realizó la amplificación del gel completo (0.75 Kb más 0.350 Kb de secuencia del plásmido, 1.1 Kb) en una tercera reacción de PCR. Los genes completos se secuenciaron para confirmar la mutación y se verificó que no existieran errores.

Sobreexpresión.

Se produjeron células de *Escherichia coli* (cepa BL21DE3), y se plaquearon en medio Luria Bertani (LB) con 100 µg/mL de ampicilina. Se escogieron algunas colonias; el crecimiento se siguió hasta que se obtuvo una absorbencia =1.

En este momento se adicionó un inductor, isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM, el cual permite la sobreexpresión de la TPI con la mutación de interés. Se continuó con el cultivo durante 12 horas más y se procedió a cosecharlas. La purificación de la mutación G122R de la hTPI se realizó utilizando métodos de precipitación diferencial y cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico, basándose en los protocolos utilizados por Mande y colaboradores (1994).

- **Purificación de la mutante G122R.**

Extracción.

Partiendo de 2 litros de medio de cultivo con las células que sobreexpresan la mutante G122R de la hTPI se centrifugaron en la centrifuga Beckman avanti j-25l durante 15 minutos a 4,500 rpm a 13°C. El precipitado se resuspendió en aproximadamente 15 mL de amortiguador de extracción MES 25 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 mM, ditioneitol (DTT) 1mM, fluoruro de fenilmetanosufonato (PMSF) disuelto en 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (amortiguador A) y posteriormente se rompieron las células por ultrasonificación.

Rompimiento.

En un vaso de precipitado se colocó la resuspensión y se puso en una charola con hielo para evitar el calentamiento ocasionado por el efecto mecánico de la ultrasonificación, por el mismo motivo se dieron espacios de 1 minuto en este proceso. Con la ayuda de un ultrasonificador Ultrasonic processor VCX a una amplitud del 27% se dieron 8 ciclos de ultrasonificación por 40 segundos con 1 minuto de descanso entre cada ciclo. Una vez rotas las células, se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

Salting out.

Al sobrenadante se le midió su volumen para calcular el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ que se adicionó para precipitar diferencialmente de 0 a 45% (277 g/L), el volumen fue de 20 mL y se le adicionaron por lo tanto 5.54 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, este se adicionó lentamente con agitación en un vaso de precipitado colocado en una charola con hielo hasta disolverlo totalmente. El precipitado se separó posteriormente por centrifugación a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se volvió a precipitar diferencialmente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 45 al 75% (210 g/L) por el volumen del sobrenadante que fue de 18 mL, a este se adicionaron 3.78 g.

Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 5 mL aproximadamente de amortiguador TED 10/1/1 mM preparado con trietanolamina (TEA) 10 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM a un pH de 7.6 (amortiguador B).

Diálisis.

De la centrifugación anterior se dializó el sobrenadante en 350 mL de amortiguador B durante 4 h y después en 600 mL del mismo amortiguador durante toda la noche colocando este en una membrana para diálisis Spectra/poro de 16 mm de diámetro con corte en 12-14 KDa.

Se pasó esta muestra por un filtro de 0.45 µm de abertura de poro antes de ser inyectada en la columna Superdex 200.

Cromatografía de exclusión.

La muestra se inyectó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) previamente equilibrada con amortiguador B utilizando el sistema de ÄKTA-FPLC controlado con el software UNICORN 5.1 y se colectaron fracciones de 1.5 mL. Después de la elución, a ésta se le midió la absorbencia a 280 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro para cuantificar la actividad catalítica de las fracciones escogidas en las que se determinó mayor concentración de proteína.

Cromatografía de intercambio iónico.

Las fracciones con mayor actividad catalítica y las consideradas de mayor concentración de proteína se juntaron y se inyectaron en una columna de intercambio aniónico Mono Q (Pharmacia), lavada y equilibrada con 40 mL de amortiguador B pH 7.4 sin cloruro de sodio (NaCl), 80 mL del mismo amortiguador con 2 M de NaCl y 80 mL del mismo amortiguador sin NaCl; para la corrida, se aplicó un gradiente lineal de 0-100 mM de NaCl para la elución (100% = 1 M NaCl), se utilizaron 120 mL de 0 al 10%, 20 mL del 10 al 100% y 40 mL al 100% con 1 M de NaCl y 40 mL sin NaCl en el sistema de ÄKTA-FPLC. Se escogieron las fracciones

con mayor pureza y se dializaron con la misma metodología antes mencionada para la columna mono Q pero equilibrada con el amortiguador B pH 8.0 .

Se midió actividad enzimática a las fracciones que contenían la mayor concentración de proteína y se preparó un gel de poliacrilamida para observar y definir el grado de pureza de la proteína.

Electroforesis:

El método de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es el más utilizado para analizar de forma cualitativa mezclas de proteínas y es útil para determinar el grado de purificación de las mismas (Shägger y von Jagow, 1987), para realizarlo, se escogieron aquellas fracciones en las que se observaba la mayor concentración y la mejor actividad catalítica de la proteína.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico por lo que se desplazan cuando se someten a un campo eléctrico.

En función del estado N o D de las proteínas, una electroforesis desnaturizante es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización. En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma (Walker, 2002).

Se realizó un SDS-PAGE usando 12% de acrilamida en una cámara de electroforesis Mini Protean II, en la que se agregó una solución del gel separador y posteriormente otra de gel concentrador (colocando un peine de 10 pozos). Estas soluciones se prepararon previamente en tubos de ensaye. Para la solución del gel separador, se utilizaron 3.3 mL de H₂O, 4 mL de acrilamida mix al 30%, 2.5 mL de amortiguador TRIS 1.5 M pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato de amonio al 10%, 0.012 mL de TEMED. La solución para el gel concentrador al 5% se preparó con 2.1

mL de H₂O, 0.5 mL de acrilamida al 30%, 0.38 mL de amortiguador TRIS 1.0 M pH 6.8, 0.03 mL de SDS al 10%, 0.006 mL de TEMED.

Se colocaron 30 μ L de cada muestra y del marcador, adicionando a cada una 30 μ L de amortiguador desnaturalizante preparado con 4 mL de SDS al 10%, 1.0 mL de 2-mercaptoetanol, Azul de bromofenol, 2.5 mL de amortiguador TRIS base, 2.0 mL de glicerol, 10 mL de H₂O, dejando hervir por 5 minutos las fracciones en tubos antes de colocarlas en los carriles, esto para desnaturalizar a las proteínas.

En cada pozo se colocaron los 60 μ L correspondientes a cada fracción así como para el marcador de hTPI. Por último la base de la cámara se llenó con amortiguador de corrimiento preparado con Glicina, amortiguador TRIS base, SDS y H₂O.

La cámara se conectó a una fuente de poder de 125 mV y se dejó hasta que el frente de corrimiento llegara al final del gel. Se obtuvo el gel y se fijó con ácido acético al 10% durante 1 h, posteriormente se tiñó con azul de coomasie por 24 h y se decoloró con ácido acético. En el gel se buscó la banda teñida correspondiente a la hTPI marcador y se comparó con los demás carriles para cada fracción de la mutación G122R de la hTPI.

Se midió la concentración de las fracciones y se escogieron algunas para medir actividad específica. El cálculo de actividad específica para la G122R se estimó por medio de la oxidación del NADH. En la transformación del G3P a DHAP en donde interviene la TPI, la DHAP se transforma a α -glicerol fosfato (α GP) en donde interviene la α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α GDH) y la reducción del Dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) a NAD⁺, llevándose a cabo a una temperatura de 25 °C \pm 1 °C en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 (**Fig. 8**).

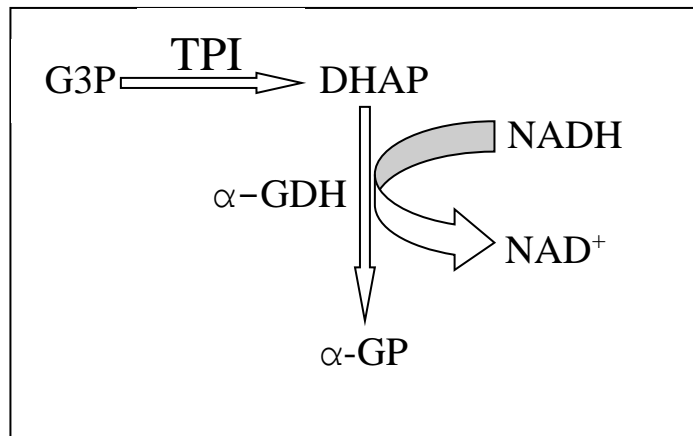


Fig. 8.- Esquema del sistema acoplado para medir actividad específica.

El NADH tiene su mayor absorbencia a 340 nm y un coeficiente de extinción de 6.22 con el cual se obtiene el factor (f) para calcular actividad específica en $\mu\text{molas}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína:

$$\text{Actividad} = 6.22 \cdot (\text{concentración de proteína en mg/mL}) = f$$

Se obtiene $1/f$

$$\text{Actividad catalítica} = [1/f] \cdot \text{u.a.} = \mu\text{molas} / \text{min} \cdot \text{mg de Prot.}$$

- **Reconcentración.**

De las fracciones colectadas que presentaron mayor actividad, concentración y pureza, se juntaron y se reconcentraron en un tubo de ultrafiltración Amicon Ultra-4 PM10, centrifugando a 10,000 rpm a 20 °C por 8 min.

Cálculo de concentración de proteína.

La concentración de proteína purificada se obtuvo multiplicando el promedio de las absorbencias por la dilución, y dividiendo este entre el factor de coeficiente de

absortividad molar (ϵ_{280}) de 1.33 para multiplicarlo por el volumen final de la reconcentración para obtener los mg/mL totales (Téllez-Valencia, 2002).

- **Experimentos de desnaturalización y renaturalización.**

Determinación de la actividad catalítica.

La actividad catalítica se siguió en el Espectrofotómetro UV/VIS Agilent 8453, observando la disminución de la absorbencia a 340 nm.

Las mediciones espectrofotométricas para determinar la actividad catalítica se realizaron utilizando una concentración de 40 ng/mL de la proteína mutada G122R de la hTPI, adicionando 15 μ L de G3P, 0.2 mM de NADH, 10 μ g de α GDH, llevados a un volumen final de 1 mL con amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4.

Medición del espectro de fluorescencia intrínseca.

Los espectros de fluorescencia intrínseca se obtuvieron utilizando el Espectrofluorómetro Shimadzu RFC5301, se utilizaron celdas de cuarzo de 0.5 mL de volumen y con 0.4 cm de paso de luz manteniéndolas a una temperatura de 25°C \pm 1°C. Se excitó a 280 nm (ancho de banda 4 nm) y se colectó la emisión de 300-400 nm (ancho de banda 8 nm).

Desnaturalización:

Una vez estimada la concentración de la proteína, se desnaturalizó con utilizando los desnaturalizantes químicos urea y cloruro de guanidina (GuHCl).

Para la desnaturalización de la mutación G122R de la hTPI, se incubó la enzima en una disolución a 6 M de GuHCl en amortiguador TED 100/10/1 mM a un pH de 7.4, por un periodo de 1 h y de 2 h a 8 M en el caso de la urea en el mismo amortiguador a 25 °C. Por información previa, se sabe que en estas condiciones, los espectros de la fluorescencia intrínseca indican que la proteína está totalmente desnaturalizada.

Se realizaron varios ensayos antes para determinar las concentraciones a utilizar en la investigación, determinándose que serían concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína mutada G122R de la hTPI utilizándose ambos desnaturalizantes, comparando con sus respectivas nativas.

Renaturalización:

Se llevó a cabo por medio de dilución de la proteína desnaturalizada, se tomó una pequeña alícuota de esta y se llevó a un volumen grande con amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 para obtener una concentración residual de urea de 80 mM y de GuHCl de 60 mM e iniciar la renaturalización siguiendo la recuperación de la actividad catalítica con ayuda del espectrofotómetro y su reestructuración seguida con el espectrofluorómetro.

- **Cinética enzimática (K_m , K_{cat} y V_{max}).**

Se preparó a la proteína para ser desnaturalizada tanto en urea y GuHCl así como una nativa sin desnaturalizantes. A estas se les renaturalizó y se prepararon tubos con concentraciones diferentes de sustrato (G3P), utilizando una concentración de enzima de 5 $\mu\text{g/mL}$, y se midió la actividad de la proteína siguiendo la reacción acoplada ya antes mencionada. Se estimó la velocidad máxima de la reacción catalítica (V_{max}) observando la respuesta de la enzima a los cambios de la concentración del sustrato.

Para estimar la velocidad máxima de una reacción enzimática, la concentración de sustrato se aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto, esa es la velocidad máxima (V_{max}) de la enzima. En ese caso, los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato.

La ecuación de Michaelis-Menten ilustra matemáticamente la relación entre la velocidad inicial de la reacción y la concentración del sustrato:

$$V_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Las enzimas pueden ser caracterizadas por la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima, a esta concentración de sustrato se le conoce como constante de Michaelis-Menten (K_m). Esta constante representa la afinidad del complejo enzima-sustrato (ES), los valores bajos indican que el complejo ES está unido muy fuertemente, es decir, existe gran afinidad de la enzima por el sustrato.

Se calculó la constante catalítica (K_{cat}) para la enzima una vez obtenidos los parámetros anteriores utilizando la ecuación:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]}$$

Donde:

K_{cat} = Número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima en condiciones óptimas, es decir, saturada con el sustrato.

$[E_t]$ = Concentración total de enzima.

Los valores aproximados de K_m y V_{max} pueden obtenerse construyendo un gráfico, pero datos más exactos se obtienen con una transformación algebraica de los mismos, de la ecuación de Michaelis-Menten, cuyo gráfico es una hipérbola, puede

reordenarse obteniendo su inversa, conocido este método como el de dobles inversas de Lineweaver-Burk, cuyo gráfico es una línea recta.

Para el cálculo de V_{max} y K_m se utilizó el software Origin 6.0 en el cual se introdujeron los datos y fueron tratados con la ecuación cuya gráfico es la hipérbola:

$$y = a \frac{bx}{1 + (bx)}$$

Sustituyendo:

$$Act = V_{max} \frac{Km[G3P]}{1 + Km[G3P]}$$

Donde:

$a = V_{max}$

$b = K_m$

$x =$ sustrato (G3P)

$y =$ actividad

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Purificación de la mutante G122R.

Las fracciones escogidas fueron aquellas en las que se observó un pico elevado tomándose como blanco la fracción que no presentó ningún pico durante la elución. Todas las fracciones de proteína que presentaron picos se midieron tomándose directamente de los tubos donde fueron colectadas, se colocaron una por una en una celda de cuarzo de 1.5 mL para leer la absorbencia en el espectrofotómetro, restándole el blanco. Se escogieron algunas de las fracciones con mayor concentración (4, 15, 17, 22, 26 y 36) para medir su actividad (**Fig.9**).

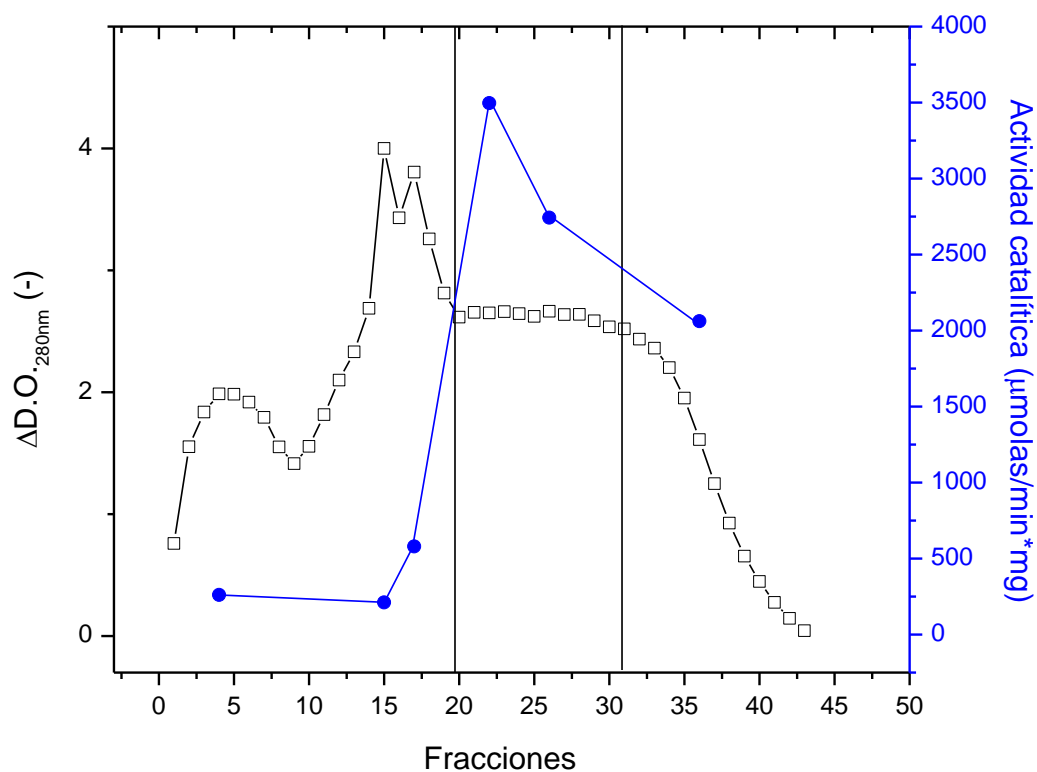


Fig. 9.- Perfil de elución de la purificación donde se observa la concentración (líneas y símbolos vacíos), actividad catalítica de la proteína (líneas y símbolos llenos) y fracciones que presentaron la mayor actividad (entre líneas) después de ser inyectadas en la columna Superdex 200.

Las fracciones con mayor actividad y concentración se juntaron y se inyectaron en la columna de intercambio aniónico Mono Q (Pharmacia), aplicando un gradiente lineal de 0-100 mM de NaCl para la elución.

Se observó un pico justo cuando la concentración de NaCl llegaba a 100 mM, se midió la concentración en las fracciones contenidas en este y se graficaron observándose una mayor concentración de proteína entre las fracciones 25-30 (**Fig. 10**), a las cuales se les midió su actividad específica a una concentración de 10 ng/mL siguiendo las mismas condiciones del ensayo anterior, en estas fracciones no se encontró actividad.

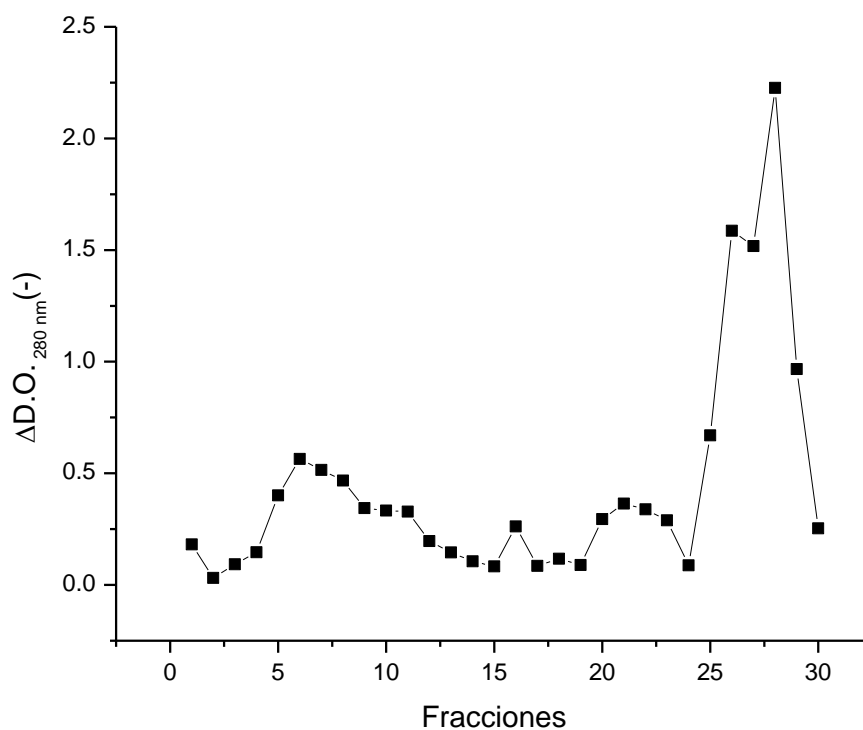


Fig.10.- Perfil de elución que muestra la concentración de proteína (líneas y símbolos llenos), de las fracciones después de ser inyectadas en la columna mono Q.

Se midió la concentración y actividad de la proteína presente en las fracciones 5-10 que presentaba una concentración menor, encontrándose en estas, actividad de la proteína (**Fig.11**).

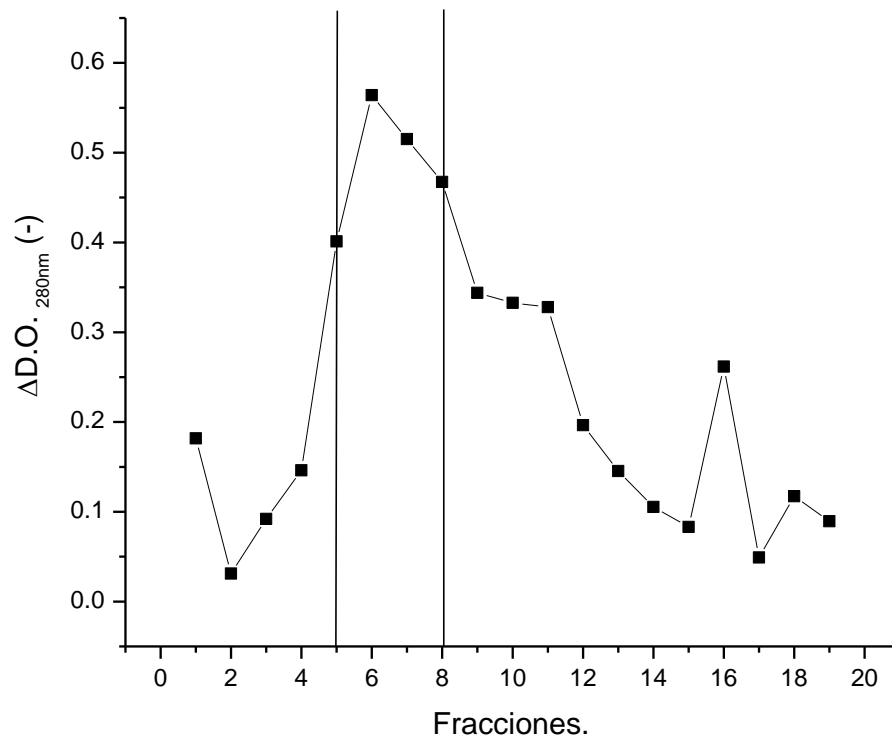


Fig. 11.- Perfil de elución de las fracciones con menor concentración de proteína (líneas y símbolos llenos), fracciones 5-8 las de mayor concentración (entre líneas).

Dentro de los rangos de las fracciones 5-8, se observó que a pesar de no presentar alta concentración de proteína, si presentaron actividad para la mutación G122R de la hTPI, así que de estas fracciones se escogieron algunas para preparar un gel de poliacrilamida y determinar el grado de pureza.

Se escogieron las fracciones 5, 6, 7, 8 y 9 para correrlas en el gel de poliacrilamida y se observó una sola banda correspondiente a la mutante G122R de hTPI, determinando así un grado de pureza del 98% de esta proteína (**Fig. 12**), posteriormente, se dializaron las fracciones con amortiguador B pH 8.5.

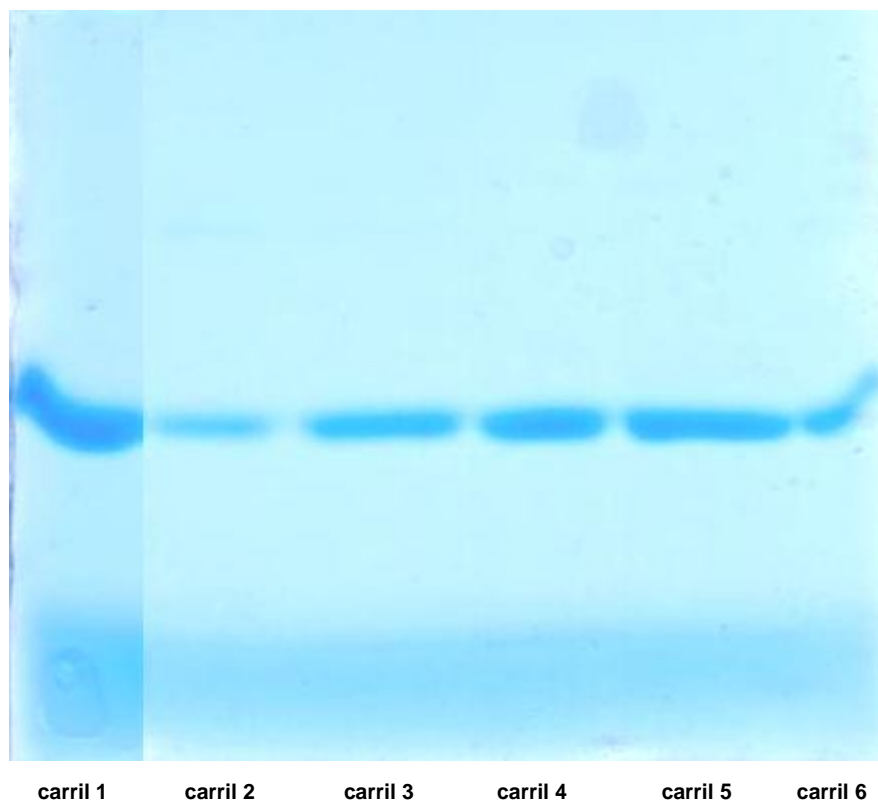


Fig 12.- Gel de poliacrilamida, carril 1 corresponde al marcador de hTPI, carriles 2,3,4,5 y 6 corresponden a las fracciones 5, 6, 7, 8 y 9 respectivamente de la mutación G122R de la hTPI después de ser inyectadas en la columna mono Q.

Después de dializar las fracciones con la metodología antes mencionada, se inyectaron en la columna mono Q equilibrada con el mismo amortiguador pero ahora utilizando un pH 8.0.

Se midió concentración y actividad de proteína en las fracciones que presentaron picos más altos (**Fig. 13**).

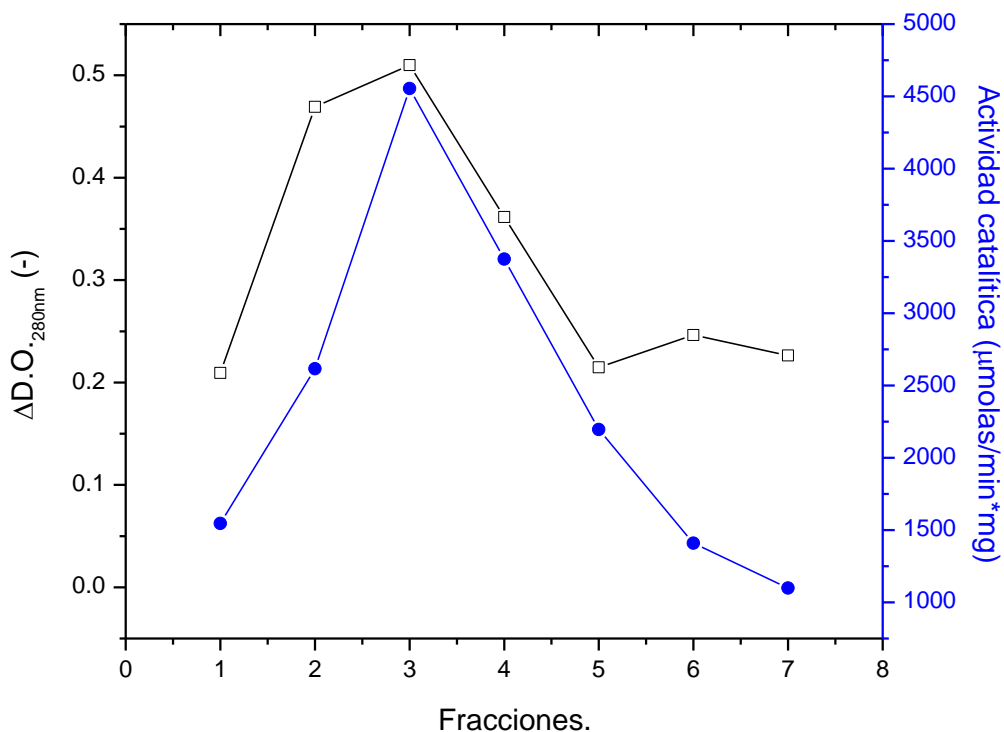


Fig. 13.- Perfil de elución donde se muestra la concentración de proteína (líneas y símbolos vacíos), actividad catalítica de proteína (líneas y símbolos llenos), de las fracciones que presentaron mayor actividad después de inyectadas en la columna mono Q.

Se reconcentraron estas fracciones en una membrana Amicon, y se calculó una concentración de 34.02 mg/mL de proteína, de este modo se lograron obtener 8.5 mg de proteína total con esta técnica de purificación.

REVERSIBILIDAD.

Se siguió la recuperación de la actividad catalítica de la mutación G122R de la hTPI previamente desnaturalizada, se utilizaron como perturbantes a la urea y al GuHCl con una concentración residual de 80 y 60 mM respectivamente.

Se midió la emisión de fluorescencia y se calculó la actividad catalítica a concentraciones de 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

Estos experimentos fueron medidos por espectrofluorescencia a las 24, 48 y 72 horas para cada desnaturalizante y para cada concentración.

En el caso de urea a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, se observó que la intensidad de fluorescencia a partir de las 24 h hasta las 72 h de renaturalización, fue disminuyendo llegando a un 25% en su renaturalización con respecto a la nativa.

El espectro de fluorescencia medido a las 72 h muestra que la proteína nativa (N) emitió su máxima intensidad de fluorescencia a los 330 nm de longitud de onda y alcanzó 130 u.a., no así la proteína renaturalizada (R), que su emisión máxima la presentó por arriba de los 340 nm de longitud y alcanzó sólo 70 u.a. con respecto a su nativa (**Fig. 14**).

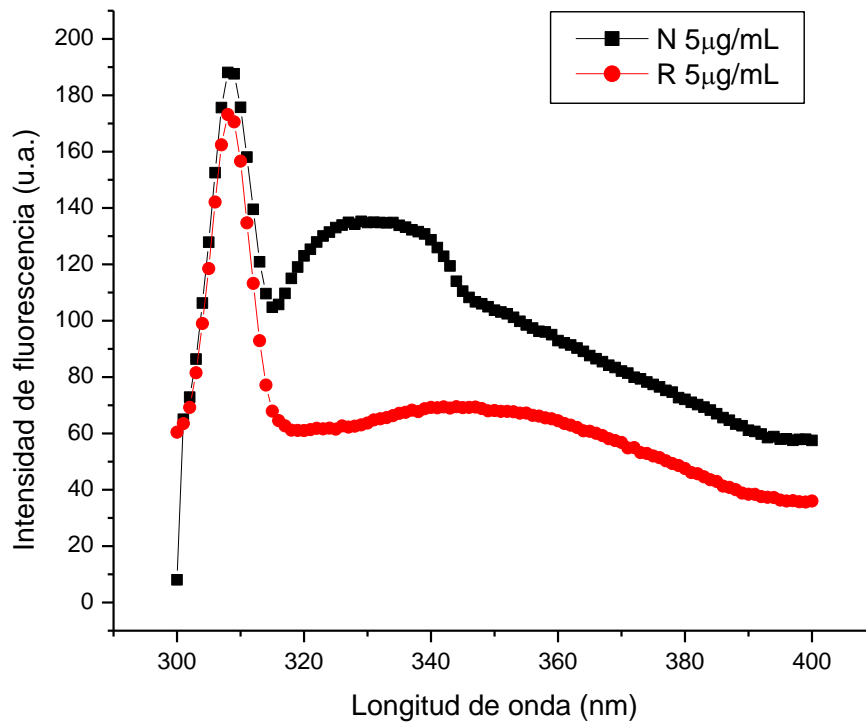


Fig. 14.- Espectros de emisión de fluorescencia de la mutante G122R de hTPI nativa (N) y renaturalizada (R) a una cocentración de 5 µg/mL de proteína a las 72 h después de ser desnaturalizada con urea.

La proteína nativa hasta este tiempo alcanzó su estado plegado, mientras que la renaturalizada a las 72 h permanecía desnaturalizada alcanzando así un bajo porcentaje en su renaturalización (**Fig. 15**).

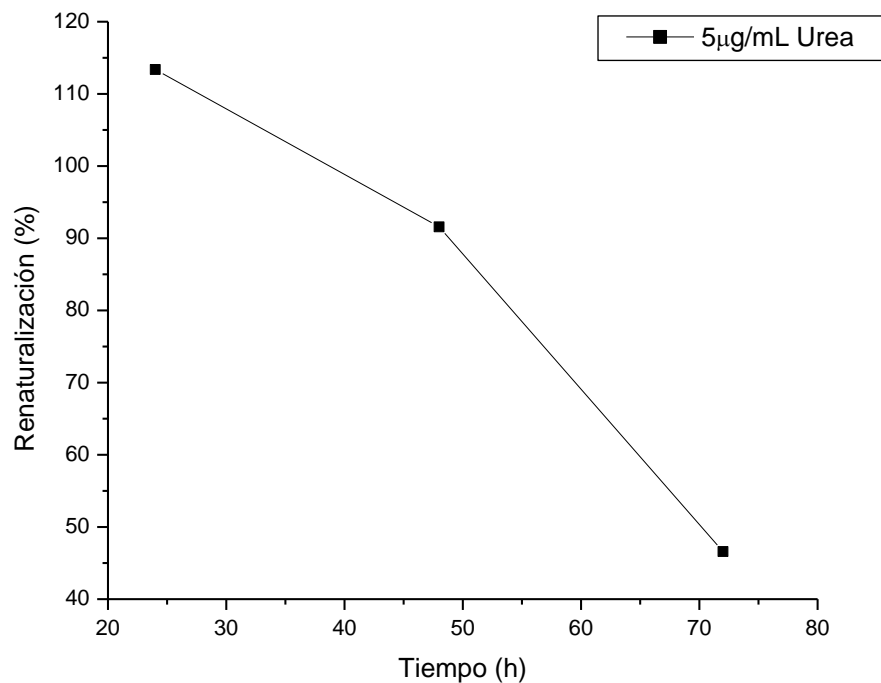


Fig. 15.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturizada con urea, resultados obtenidos por intensidad de fluorescencia a una concentración de 5 µg/mL de proteína.

Así mismo, se midió la actividad catalítica en cada tiempo y se observó que al transcurrir este, se recuperaba satisfactoriamente con respecto a la nativa, alcanzando a las 48 h un 95% y su máxima actividad la presentó a las 72 h siendo esta del 125% (**Fig. 16**).

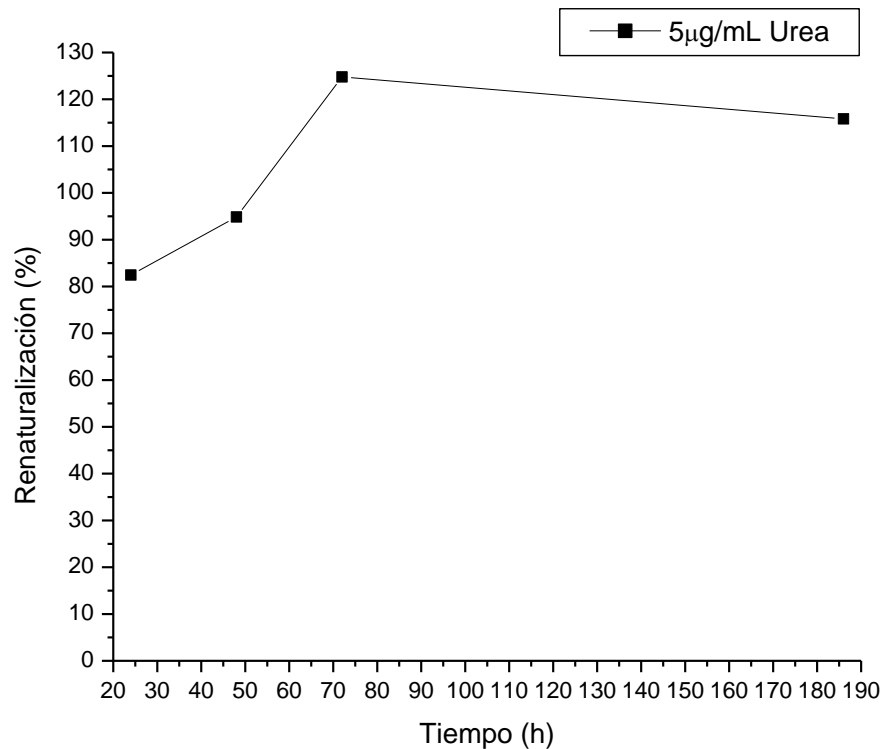


Fig. 16.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturalizada con urea, resultados obtenidos por actividad catalítica a una concentración de 5 µg/mL de proteína.

En el análisis de estos resultados, se dedujo que alguna condición podría estar interfiriendo en la emisión de fluorescencia de alguno de los fluoróforos, puesto que alcanzó y rebasó a la enzima nativa en cuanto a la recuperación de su actividad catalítica aún cuando se podría pensar, según el espectro de emisión, que la estructura de la proteína renaturalizada se encuentra en un estado desplegado y por lo tanto inactivo.

Para la concentración de proteína de 50 µg/mL desnaturalizada en urea, se observó que a las 72 h la proteína alcanzó un 34% en su renaturalización referente a la nativa.

Se observó también que el pico máximo se presentó alrededor de los 330 nm para la renaturalizada y la nativa con una emisión de 75 y 260 u.a. respectivamente. Aquí la conformación de la enzima tanto renaturalizada como nativa se encuentran en una conformación semejante (**Fig. 17**).

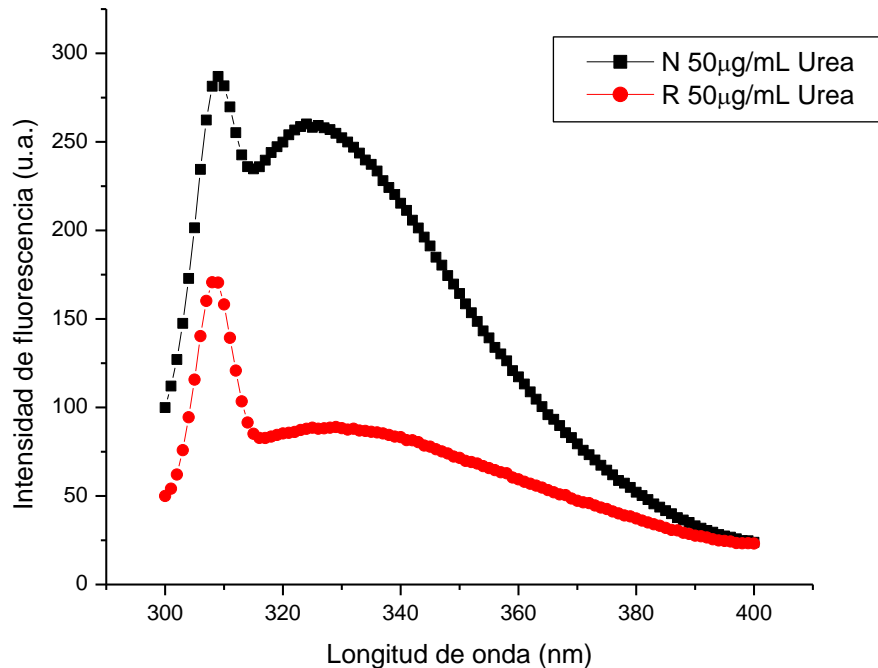


Fig. 17.- Espectros de emisión de fluorescencia de la mutante G122R de hTPI nativa (N) y renaturalizada (R) a una cocentración de 50 µg/mL de proteína a las 72 h después de ser desnaturalizada con urea.

En el seguimiento de la emisión de fluorescencia, se observó que la proteína renaturalizada al transcurrir el tiempo, la conformación de la cadena de aminoácidos y posición de los fluoróforos iba siendo más parecida a la nativa, emitiendo ambas a la misma longitud de onda, no así en la intensidad de emisión que fue menor para la enzima renaturalizada, logrando a las 72 h un porcentaje bajo en su renaturalización (**Fig. 18**).

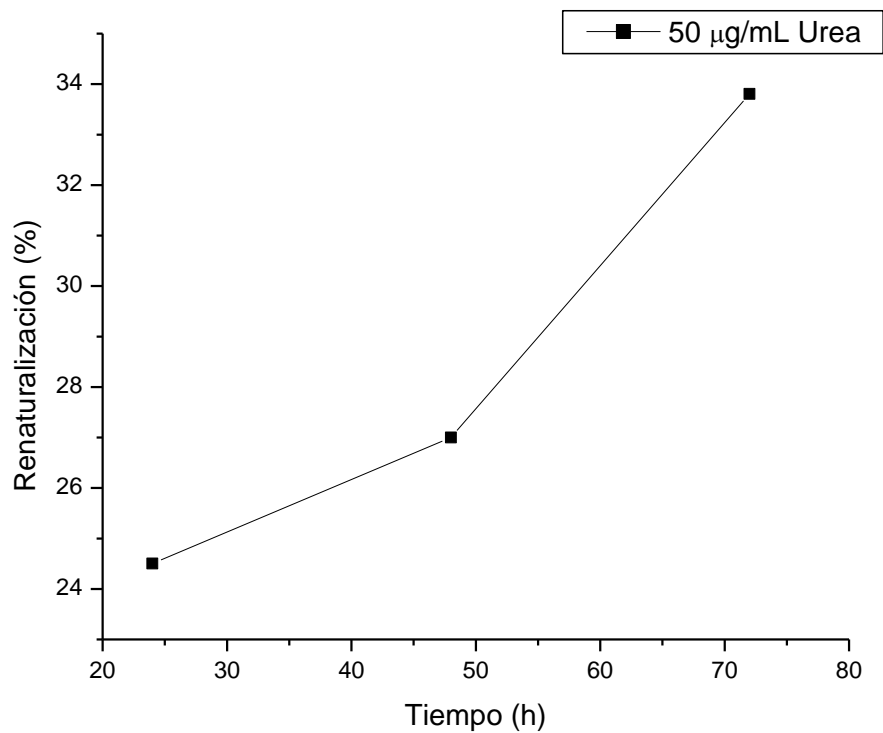


Fig. 18.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturalizada con urea, resultados obtenidos por intensidad de fluorescencia a una concentración de 50 µg/mL de proteína.

Se determinó la actividad catalítica en cada tiempo y se observó que al transcurrir este, la actividad aumentaba con referencia a su nativa, pero en un bajo porcentaje, alcanzando un 23% a las 72 h (**Fig. 19**). Prácticamente la proteína se inactivó a estas concentraciones de desnaturalizante y proteína.

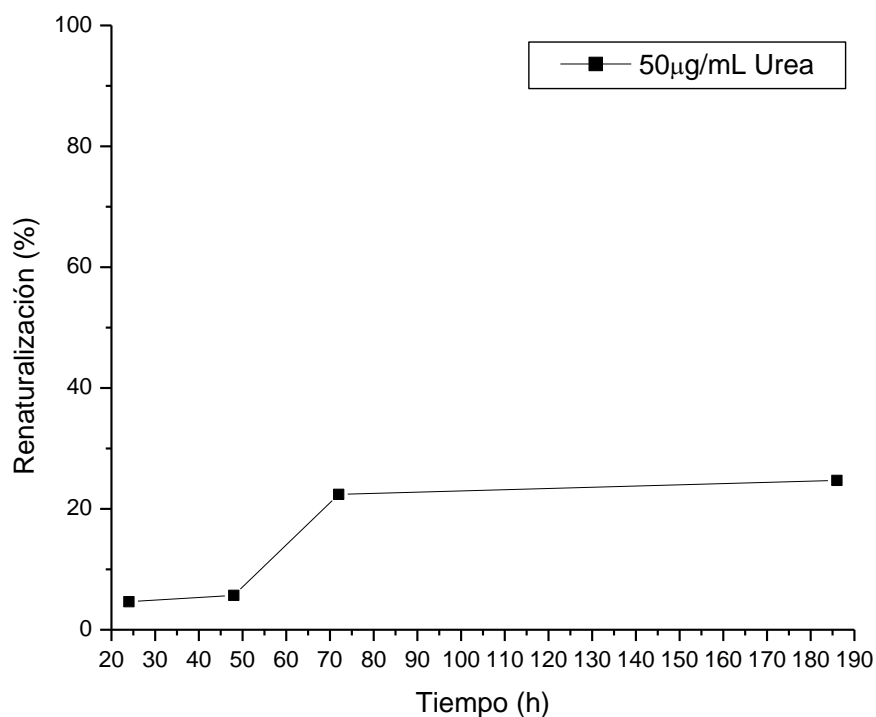


Fig. 19.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturalizada con urea, resultados obtenidos por actividad catalítica a una concentración de 50 µg/mL de proteína.

Se comparó la proteína desnaturalizada con urea contra la nativa sin desnaturalizante y una nativa con una concentración residual de 80 mM de urea. Se observó en el espectro de fluorescencia un comportamiento similar entre las nativas emitiendo ambas un pico máximo a 325 nm de longitud de onda alcanzando 260 u.a. y 280 u.a. respectivamente, siendo la enzima reanaturalizada la que no alcanzó a renaturalizarse por completo emitiendo un pico máximo a los 330 nm de longitud de onda y una emisión de fluorescencia de 80 u.a. (**Fig. 20**).

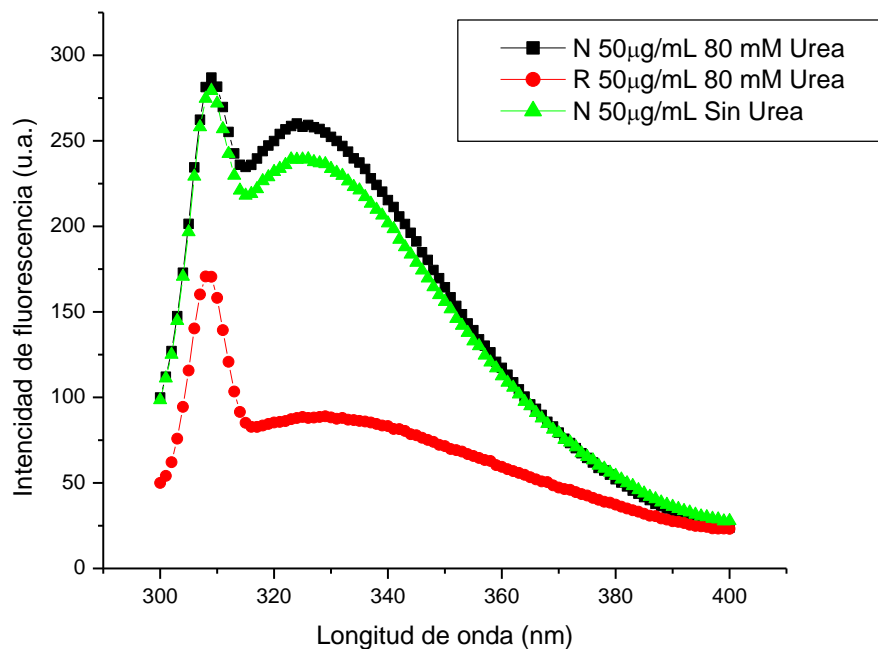


Fig. 20.- Espectros de emisión de fluorescencia de la mutante G122R de la hTPI tanto nativas (N) como renaturalizada (R) a una concentración de 50 µg/mL y concentración residual de 0.08mM de urea.

Con respecto al tiempo de renaturalización, la enzima logra alcanzar una mejor actividad a concentraciones menores de proteína, ya que a una concentración mayor la enzima se inactiva en este desnaturizante.

En el seguimiento de los espectros de fluorescencia, la enzima a baja concentraciones aparentemente no logra conformarse a su estado nativo pero si recupera su actividad catalítica, y a una mayor concentración no logra plegarse por completo y pierde su actividad.

Para el caso del desnaturizante GuHCl, a una concentración de proteína de 5 µg/mL, se observó que al transcurrir el tiempo fue disminuyendo su emisión de fluorescencia, a las 72 h la proteína nativa emitió a la los 330 nm a una intensidad de 85 u.a., no así la renaturalizada que a este tiempo emitió a los 345 nm de longitud de

onda y 40 u.a. alcanzando así un 45% de renaturalización referente a su nativa, esto es, que se encontraba desplegada a este tiempo (**Fig. 21**).

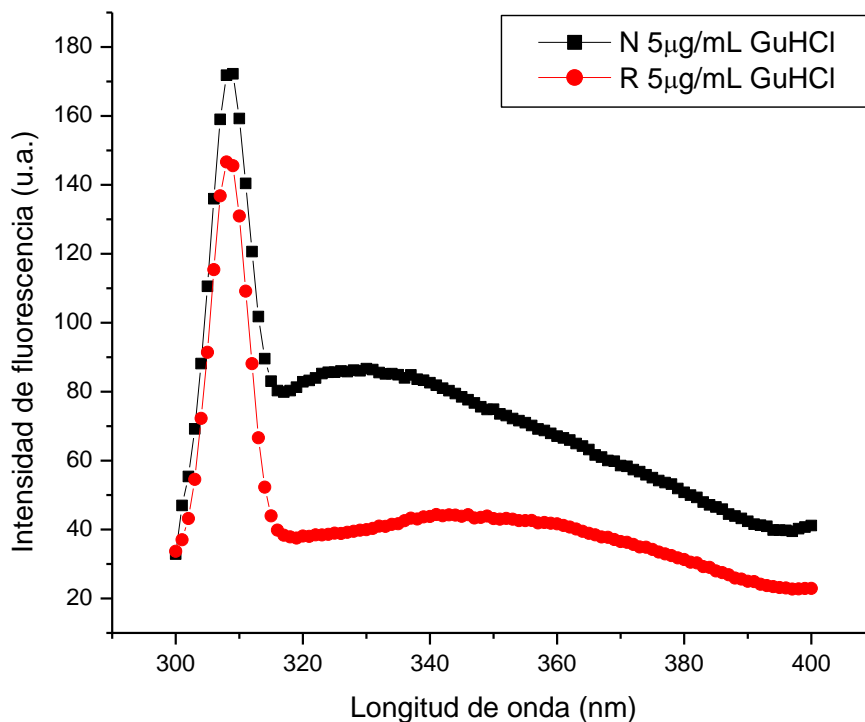


Fig. 21.- Espectros de emisión de fluorescencia de la mutante G122R de hTPI nativa (N) y renaturalizada (R) a una concentración de 5 µg/mL de proteína a las 72 h después de ser desnaturada con GuHCl.

El porcentaje de renaturalización disminuyó con respecto al tiempo (**Fig. 22**). Se determinó la actividad catalítica en cada tiempo y se observó que la actividad alcanzaba un mejor porcentaje referente a la nativa siendo a las 48h del 110% y a las 72 h del 125% (**Fig. 23**).

En las lecturas de los espectros de fluorescencia para seguir la renaturalización de la enzima, se observó el mismo comportamiento que para urea. La emisión de fluorescencia en las primeras 24 h era menor, mientras que la actividad al transcurrir el tiempo se recuperó.

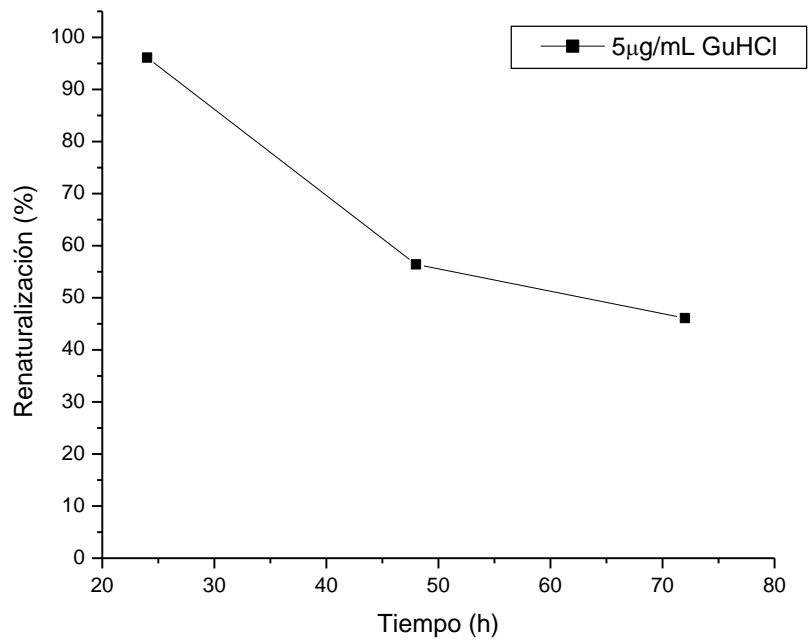


Fig. 22.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturizada con GuHCl, resultados obtenidos por intensidad de fluorescencia a una concentración de 5 µg/mL de proteína.

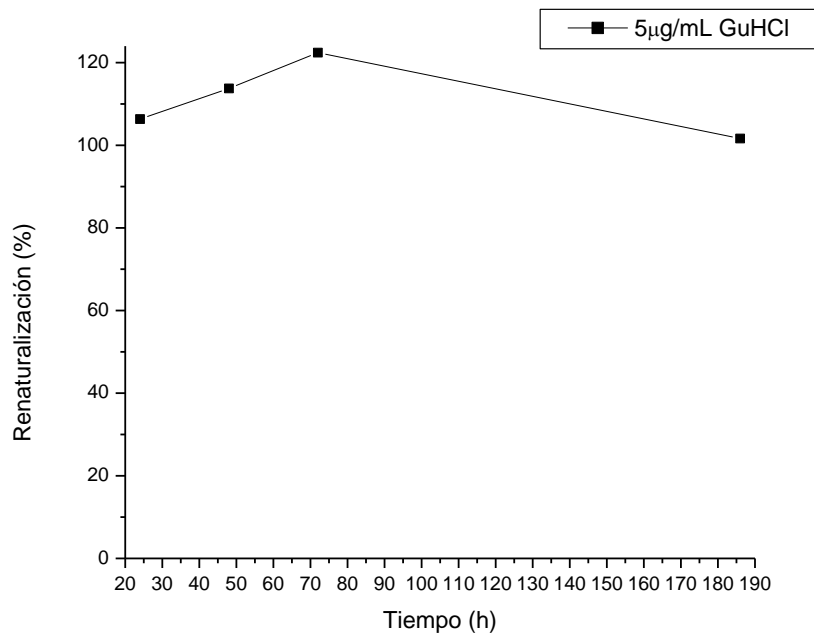


Fig. 23.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturizada con GuHCl, resultados obtenidos por actividad catalítica a una concentración de 5 µg/mL de proteína.

Se midieron así mismos los espectros de fluorescencia a una concentración de proteína de 50µg/mL desnaturalizadas en GuHCl, y se observó que a las 72h la proteína alcanzó un 27% de renaturalización referente a su nativa. La enzima renaturalizada se observa plegada en este tiempo midiendo su espectro de fluorescencia (**Fig. 24**), emitiendo a los 330 nm su pico máximo alcanzando 150 u.a., no así la proteína nativa que permanecía desplegada emitiendo su pico máximo arriba de los 330 nm y alcanzando 90 u.a.

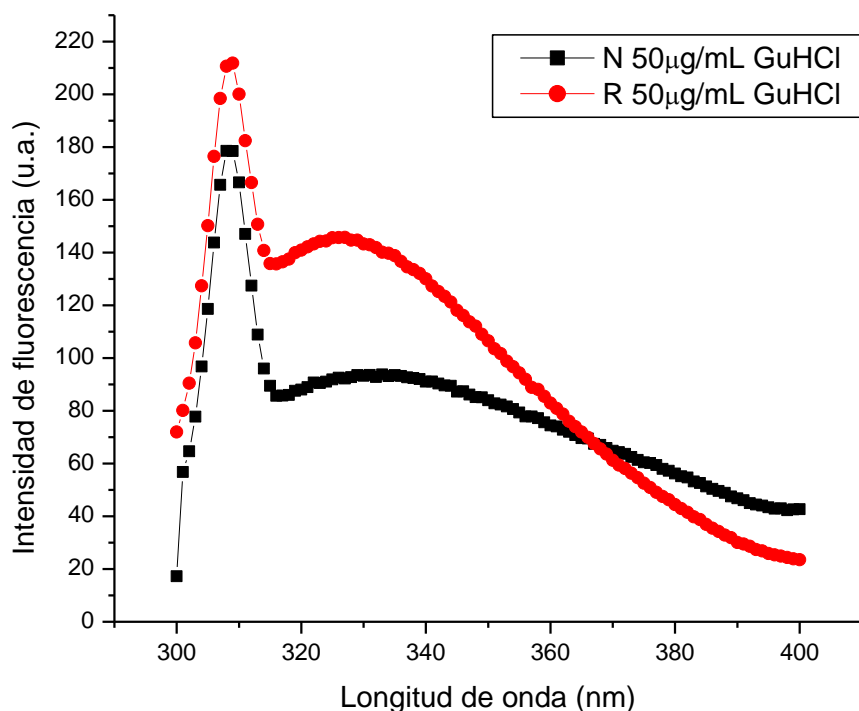


Fig. 24.- Espectros de emisión de fluorescencia de la mutante G122R de hTPI nativa (N) y renaturalizada (R) a una concentración de 50 µg/mL de proteína a las 72 h después de ser desnaturalizada con GuHCl.

La proteína presentó un porcentaje máximo de renaturalización de 33% a las 24 h disminuyendo al 23% a las 72 h (**Fig. 25**). Así mismo se determinó la actividad para cada tiempo y se observó que la enzima perdió totalmente su actividad (**Fig. 26**).

La proteína en una mayor concentración en el desnaturizante GuHCl, se ve afectada en su actividad hasta quedar inactiva y no logra recuperar su estructura plegada con respecto a su nativa.

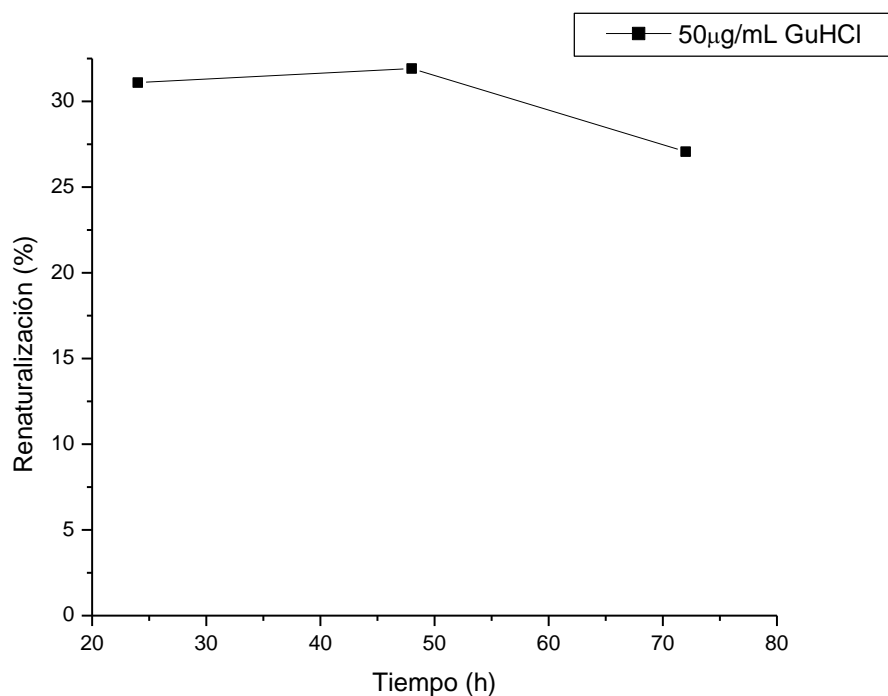


Fig. 25.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturizada con GuHCl, resultados obtenidos por intensidad de fluorescencia a una concentración de 50 µg/mL de proteína.

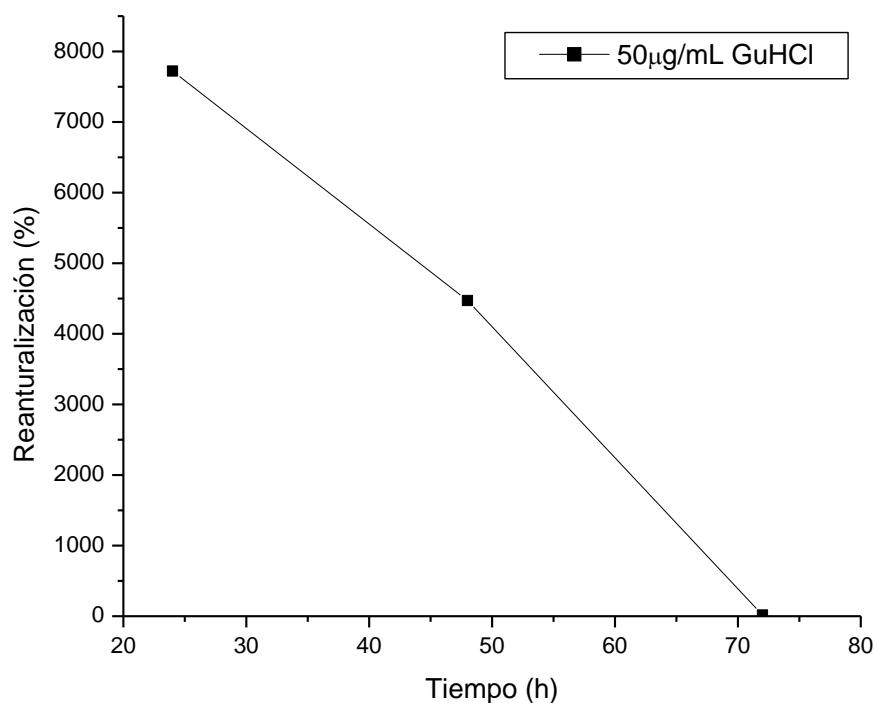


Fig. 26.- Porcentajes de renaturalización respecto a la nativa de cada tiempo de la mutante G122R de la hTPI después de ser desnaturizada con GuHCl, resultados obtenidos por actividad catalítica a una concentración de 50 µg/mL de proteína.

Se comparó de igual manera a la enzima renaturalizada contra una nativa, ambas con una concentración residual de 60 mM de GuHCl, y una nativa sin desnaturizante. Se observó en sus espectros de fluorescencia un comportamiento diferente entre las nativas, las nativas lograron una conformación estructural parecida emitiendo ambas un pico máximo de fluorescencia a 330 nm de longitud de onda, observándose una intensidad de fluorescencia de 150 u.a. para la nativa con GuHCl y de 100 u.a. para la proteína sin desnaturizante. La enzima renaturalizada a esta concentración perdió su estructura y su actividad catalítica (**Fig. 27**).

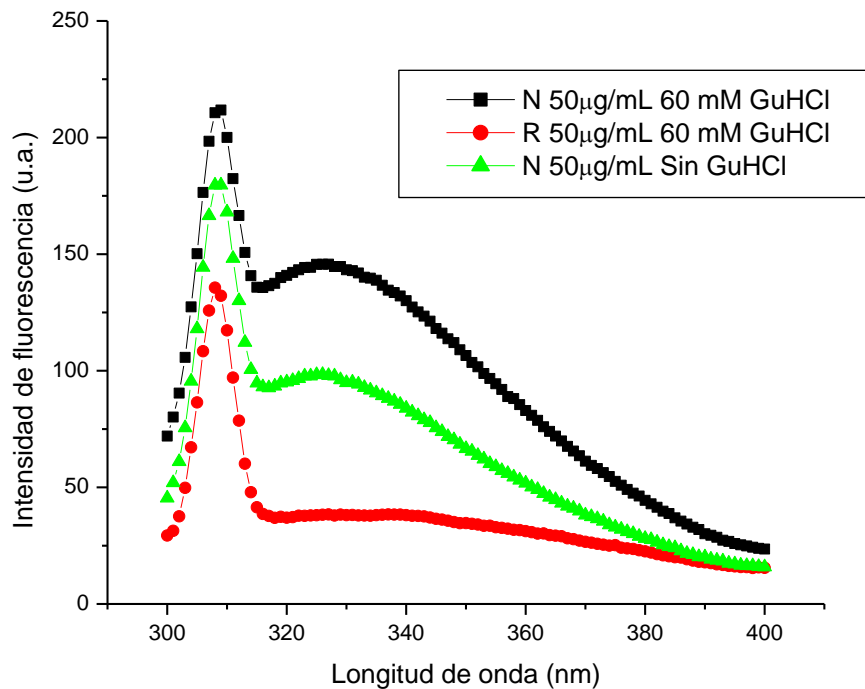


Fig. 27.- Intensidad de fluorescencia de la mutante G122R de la hTPI tanto nativa(N) como renaturalizada (R) en GuHCl a una concentración de 50 µg/mL e igualadas a una concentración residual de 0.06mM contra la nativa sin desnaturizante.

Parámetros cinéticos.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la mutante G122R de la hTPI, preparando diferentes tubos con diferentes concentraciones del sustrato G3P de 0.15 hasta 6 mM a una concentración de 5 µg/mL de enzima.

El valor de la V_{max} para la mutante nativa fue de 4.79 ± 0.50 µmol/min*mg, de 21.83 ± 1.53 µmol/min*mg y de 83.32 ± 1.65 µmol/min*mg para las renaturalizadas en urea y en GuHCl respectivamente.

Los valores calculados de K_m fueron, para la nativa de 0.98 ± 0.10 mM, 0.93 ± 0.17 mM y de 1.18 ± 0.05 mM para las renaturalizadas en urea y GuHCl respectivamente (**Fig. 28**).

El valor de Kcat para la mutante nativa fue de $0.0002551 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$, para la mutante renaturalizada en urea fue de $0.0011630 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ y para la mutante renaturalizada en GuHCl fue de $0.0044389 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$.

La variación en los datos obtenidos posiblemente esté dado por el aumento de la fuerza iónica del medio por adición de urea o GuHCl, que también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan (Koolman, 2005), evitando así lograr un plegamiento correcto y la activación catalítica.

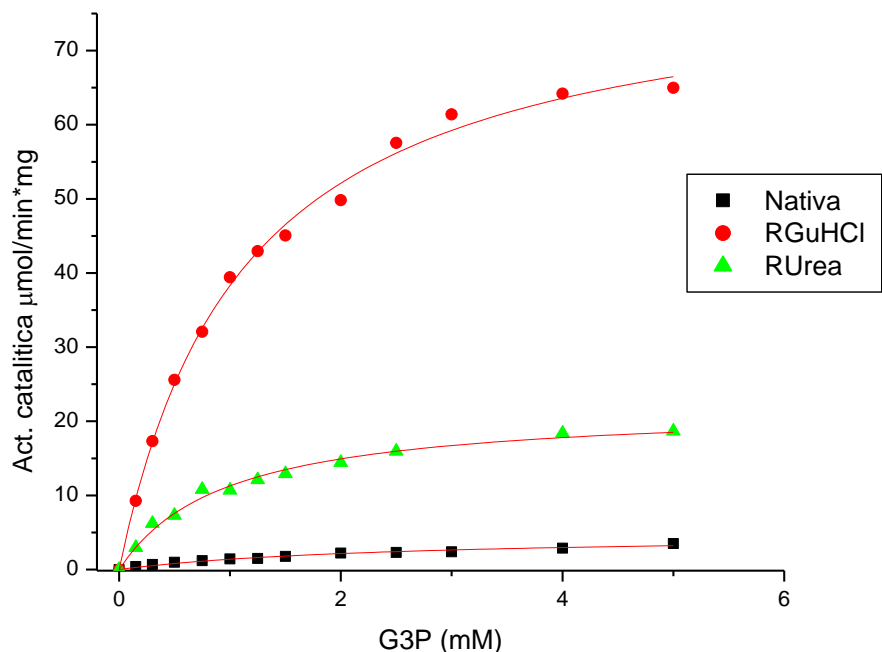


Fig. 28.- Parametros cinéticos de la mutante G122R de la hTPI, Determinación de Vmax y Km de la mutante nativa (Nativa), renaturalizada en urea (RUrea) y reanaturalizada en GuHCl (RGuHCl).

La mutante desnaturalizada en GuHCl presentó la mayor Vmax de la reacción catalítica, aumentando 17 veces más el valor de la enzima nativa y 4.5 veces a la Vmax alcanzada por la mutante desnaturalizada en urea.

En el caso de K_m , para la enzima renaturalizada en GuHCl fue 20% mayor que la nativa, y en el caso de la proteína renaturalizada en urea fue un 6% menor con respecto a la mutante nativa. Y en el caso de las renaturalizadas, en GuHCl fue en un 26% mayor que en urea.

Las proteínas en ambos perturbadores alcanzaron una mayor V_{max} con respecto a la nativa, siendo en urea el caso con mayor afinidad de la enzima por la formación del complejo ES y en GuHCl fue la que menos afinidad presentó, estos resultados se comparan con valores reportados para otras especies y otras mutantes (**Tabla 29**).

TPI	Nativa V_{max} . ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Renat. V_{max} . ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Nativa K_m (mM)	Renat. K_m (mM)	Nativa Kcat (min^{-1})	Renat. Kcat (min^{-1})	Referencia.
S. <i>cerevisiae</i>	-	-	1.22 \pm 0.05	-	7.9 $\times 10^5$	-	Lambeir, 1987.
	-	-	1.27	-	10.0 $\times 10^5$	-	Krietsch, 1979.
	-	-	0.62 \pm 0.05	1.86 \pm 0.12	1.41 $\times 10^5$	0.88 $\times 10^5$	Sun, 1992.
	11536 \pm 979	8148 \pm 637	0.77 \pm 0.08	0.72 \pm 0.09	-	-	Nájera, 1997.
<i>T. brucei</i>	-	-	0.25 \pm 0.05	-	3.7 $\times 10^5$	-	Lambeir, 1987.
Conejo	-	-	0.39 \pm 0.05	-	6.3 $\times 10^5$	-	Lambeir, 1987.
	-	-	0.43 \pm 0.06	1.40 \pm 0.28	1.86 $\times 10^5$	1.67 $\times 10^5$	Sun, 1992.
	-	-	0.32	-	5.1 $\times 10^5$	-	Krietsch, 1979.
Pollo	-	-	0.39	-	2.60 $\times 10^5$	-	Plaut y Knowles, 1972.
	-	-	0.47	-	2.56 $\times 10^5$	-	Putman, 1972.

TPI.	Nativa Vmax. ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Renat. Vmax. ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Nativa K_m (mM)	Renat. K_m (mM)	Nativa Kcat (min^{-1})	Renat. Kcat (min^{-1})	Referencia.
Humano	-	-	0.43	-	-	-	Sawyer y Gracy, 1975. Mainfroid, 1996. González, 2007. Rodríguez, 2008
	-	-	0.49	-	2.7×10^5	-	
	2076 ± 99	1455 ± 38	0.48 ± 0.08	0.58 ± 0.04	0.11018×10^5	0.07722×10^5	
	7080 ± 415	-	0.74 ± 0.1	-	-	-	
MUTANTE hTPI E104D	60.38 ± 2.12	76.14 ± 2.48	0.76 ± 0.07	0.94 ± 0.08	3211.70×10^5	4050.00×10^5	Resultados obtenidos simultaneamente con este trabajo.
MUTANTE hTPI G122R	4.79 ± 0.50	21.83 ± 1.53	0.98	0.93 ± 0.17	0.0002551×10^5	0.00116×10^5	Resultados obtenidos en este trabajo.
		83.32 ± 1.65		1.18 ± 0.05	-	0.00443×10^5	
MUTANTE hTPI E104D	-	-	0.70 ± 0.15	-	-	-	Rodriguez-Almazan, 2008.
MUTANTE hTPI M14Q	-	-	2.56	-	0.00272×10^5	-	Mainfroid, 1996.
MUTANTE hTPI Q179D	-	-	0.48	-	2.7×10^5	-	Mainfroid, 1996.
MUTANTE hTPI S105D	-	-	0.93	-	8.2×10^5	-	Mainfroid, 1996.
MUTANTE hTPI Q179A	-	-	0.49	-	2.69×10^5	-	Mainfroid, 1996.

TPI.	Nativa Vmax. ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Renat. Vmax. ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	Nativa K_m (mM)	Renat. K_m (mM)	Nativa Kcat (min^{-1})	Renat. Kcat (min^{-1})	Referencia.
MUTANTE hTPI K193A	-	-	0.51	-	2.67×10^5	-	Mainfroid, 1996.
MUTANTE hTPI A215P	-	-	0.55	-	2.49×10^5	-	Mainfroid, 1996.

Tabla 29.- Tabla comparativa de los parámetros cinéticos entre los resultado obtenido en este trabajo para la mutante G122R de la hTPI nativa y renaturalizada con los de otras mutantes y especies reportadas.

A continuación se comparan los valores de las constantes de velocidad (K_{cat}/K_m), que se refiere a la eficacia catalítica de la enzima (**Tabla 30**).

hTPI	K_{cat}/K_m NATIVA ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	K_{cat}/K_m RENATURALIZADA ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	REFERENCIA
Silvestre	5.5×10^5		Mainfroid, 1996.
Silvestre	0.22955×10^5	0.13313×10^5	González, 2007.
MUTANTE hTPI E104D	4225.92×10^5	4308.51×10^5	Resultados obtenidos simultaneamente con este trabajo.
MUTANTE hTPI G122R	0.00026×10^5	0.00125×10^5 0.00376×10^5	Resultados en este trabajo.

Tabla 30.- Tabla comparativa de la K_{cat}/K_m de algunas mutantes de la hTPI y la hTPI silvestre.

Para la enzima mutada E104D de la hTPI se obtuvo el mayor valor de K_{cat}/K_m , es decir, que convierte una mayor concentración de sustrato a producto, aún rebasando a los resultados obtenidos y reportados para la proteína silvestre.

La enzima mutada G122R de la hTPI presentó los valores más bajos de la eficacia de esta proteína para convertir al sustrato en producto aún cuando esta presentó la mayor afinidad a éste.

La V_{max} de la mutación G122R de la hTPI nativa es muy baja y al ser renaturalizada alcanza un mayor valor, pareciera que al ser renaturalizada, ambos desnaturalizantes ayudan a su correcto plegamiento siendo en GuHCl la que favorece a que logre un acomodo más parecido a su forma nativa.

En comparación con otras mutaciones reportadas es muy bajo el valor de V_{max} , no así para K_m , que es pequeño como para la de otras especies, refiriendo de este modo que la mutación G122R en su conformación nativa tiene una alta afinidad al sustrato comparativamente a las demás, y en su renaturalización en urea aumentó esta afinidad.

La eficiencia de conversión de sustrato (K_{cat}) es muy baja para la mutación G122R comparándola con la TPI de otras especies, determinando que ésta mutación ocasiona un plegamiento anómalo e inactivación, sino total, de forma parcial evitando que su función sea como la de tipo silvestre.

Con las concentraciones utilizadas se observó que la proteína pudiera formar agregados en concentraciones altas, siendo esto parte de otra línea a investigar.

8. CONCLUSIONES.

- Con esta metodología para la purificación de la mutante G122R de la hTPI se logró obtener un porcentaje de pureza mayor al 98%, lográndose así un mejor rendimiento en comparación con trabajos previos de purificación reportados para la hTPI silvestre.
- Altas concentraciones de proteína en ambos desnaturalizantes, afectan su renaturalización, no logrando recuperar su conformación nativa ni su actividad, esto es debido a que la proteína tiende a agregarse al encontrarse en un ambiente concentrado por la cercanía de las moléculas y por encontrarse en estado desnaturalizado; de modo contrario, esta enzima en concentraciones bajas se ve favorecida debido a que este espacio intermolecular es mayor y evita que la proteína interaccione con otras moléculas, favoreciendo así, su conformación nativa y activa, mismo caso para ambos desnaturalizantes, aquí el plegamiento de la proteína tanto nativa como renaturalizada es comparable a través del tiempo, reflejando una mayor actividad debido a que las proteínas que estaban inactivas o mal plegadas antes del proceso de desnaturalización, posiblemente al ser renaturalizadas se favorece su reestructuración ayudadas por la baja concentración de proteína, recuperan su conformación nativa y activa.
- La sustitución del aminoácido Glicina 122 por Arginina afecta el microambiente de la proteína, esto debido a la diferencia entre los tamaños de las moléculas de los aminoácidos sustituidos. Es probable que esta sustitución afecte el rededor de los triptófanos de tal manera que altere la emisión e intensidad de la fluorescencia, la cual al ser medida, aparezca como si hubiera una falla en su renaturalización e interpretándose como si la proteína se encontrara aún en un estado desplegado sin lograr su conformación nativa. Por otro lado, en la recuperación de su actividad catalítica, ésta se recupera en ambos desnaturalizantes a una baja concentración de proteína, por lo que la enzima

si alcanza a renaturalizarse y adoptar su conformación nativa contrario a lo que se puede interpretar con las lecturas que arroja la medición de fluorescencia.

- La mutante G122R de la hTPI tanto en su forma nativa como renaturalizada cinéticamente presenta tanto una V_{max} como una K_m menor referente a la enzima silvestre en ambos desnaturalizantes, esto es una menor afinidad por el sustrato, por lo tanto esta sustitución en la cadena de la secuencia de aminoácidos afecta considerablemente la función y eficiencia de la enzima.
- En comparación con la misma enzima mutada, la proteína renaturalizada en Urea presenta una mayor afinidad por el sustrato con respecto a su nativa y con respecto a la renaturalizada en presencia de GuHCl, la cual presenta una menor afinidad con respecto a la silvestre y a la renaturalizada en urea.

9. PERSPECTIVAS.

- Estructurar y estudiar in silico la mutación G122R de la hTPI para observar, estudiar y definir cómo es que se pueden estar modificando las interacciones intermoleculares de la proteína y cómo esta mutación afecta el microambiente alrededor de su estructura y con esto emprender otras líneas de investigación para conocer cómo esto afecta su afinidad al sustrato y que pasa con su sitio activo.
- Estudiar el comportamiento de la proteína mutada a la temperatura corporal de 37 °C y a 25 °C para saber que tan estable es en estas condiciones.
- Tanto la urea como el GuHCl modifican las interacciones de la proteína y por lo tanto su estabilidad. La desaparición total o parcial de la envoltura acuosa, la neutralización de las cargas eléctricas o la ruptura de los puentes de hidrógeno facilita la agregación intermolecular y provoca la precipitación, por lo que realizar experimentos de fibrillogénesis ayudarán a definir las condiciones que pueden estar favoreciendo esta acción.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Álvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Reintier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. y Maes, D. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**: 2199-2206.
- Arya, R., Lalloz, M., Bellingham, A.J. y Layton, D.M. (1995). Molecular pathology of human triosephosphate isomerase. *Blood.* **86**: 585a.
- Arya, R., Lalloz, M., Nicolaidis, K., Bellingham, A., Layton, D. (1996). Prenatal Diagnosis of Triosephosphate Isomerase Deficiency. *The Ame. Soc. Of Hema.* **87**(11): 4507-4509.
- Ationu, A., Humphries A., Lalloz M., Arya R., Wild B., Warriolow J., Morgan J., Bellingham A., Layton M. (1999). Reversal of Metabolic Block in Glycolysis by Enzyme Replacement in Triosephosphate Isomerase-Deficient Cells. *The Ame. Soc. Of Hema.* **94**(9): 3193-3198.
- Banner, D.W., A.C. Bloomer., G.A. Petsko., D.C. Phillips., C.I. Pogson., I. A. Wilson. P. H. Corran., A. J. Furth., J. D. Milman. R. E. Offord., J. D. Priddle y Waley, S.G. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature.* **255**: 609-614.
- Bardosi, A., Eber, SW., Hendrys, M. y Pekrun, A. (1990). Myopathy with altered mitochondria due to a triosephosphate isomerase (TPI) deficiency. *Acta Neuropathologica* **79**: 387-394.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002). Exploring Proteins. En: *Biochemistry*. 5ª Edición. (ed) W. H. Freeman and Company, UK. pp: 137-194.
- Chánez-Cárdenas, M. E., Cisneros, D., Yauner, L., Becerril, B., y Fernández-Velasco, D. A. (2002). Enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas. *Mensaje bioquímico* **26**: 1-26.
- Chang, M. L., Artymiuk, P. J., Wu, X., Hollan, S., Lammi, A. y Maquat, L. E. (1993). Human triosephosphate isomerasa deficiency resulting from mutation of phe-240. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 1260-1269.

- Copley, R. R. y Bork, P. (2000). Homology $(\beta\alpha)_8$ barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J. Mol. Biol.* **303**: 627-641.
- Creighton, E. T. (1997). Chemical Properties of Polypeptides, Proteins in Solution and in Membranes. En: *PROTEINS Structures and Molecular Properties*. 2nd Edition. (ed) W.H. Freeman and Company, New York, N.Y., USA. pp: 14-17, 287-291.
- Daar, I. O., Artymiuk, P. J., Phillips, D. C. y Maquat, L. E. (1986). Human triosephosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 7903-7907.
- Delboni, L. F., S. C. Mande., F. Rentier-Delrue., V. Mainfroid., S. Turley., F. M. D. Vellieux., J. A. Martial y Hol. W. G. J. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**: 2594-2604.
- Deutscher, P. M. (1990). Methods in Enzymology. En: *Guide to protein purification*. Vol.182. (ed) Academic Press, San Diego, California, U.S.A. pp: 50-67.
- Dobson, M. C. (2003). Protein folding and misfolding. *Nat. Pub. Group.* **426**(18)(25): 884-890.
- Farber, G. K. y Petsko, G. A. (1990). The evolution of α/β barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 228-234.
- Gómez-Moreno, C. (2004). Purificación de proteínas. En: *Estructura de proteínas*. (ed) Ariel, España. pp: 117-146.
- Gonzalez, T. L. (2007). Caracterización del Patrón de Plegamiento y Asociación de la Triosafosfato Isomerasa de Humano. *Tesis de Licenciatura. Área Académica de Nutrición, ICSa, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, UAEH.*
- Holme, D. Y Peck, H. (1998). Proteins. En: *Analytical Biochemistry*. 3^a Edición. (ed) Prentice Hall. London, England. pp: 381-396.

- Hollán, S., Fujii, H., Hirono, A., Hirono, K., Karro, H., Miwa, S., Harsanyi, V., Gyodi, E. y Inselt-Kovacs, M. (1993). Hereditary triosephosphate isomerase (TPI) deficiency: two severely affected brothers one with and one without neurological symptoms. *Hum. Genet.* **92**: 486-490.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and Association of Proteins. *Prg. Biophys. Molec. Biol.* **49**: 117-327.
- Knowles, J.R. y Albery, J.W. (1977). Perfection in Enzyme Catalysis: The Energetics of Triosephosphate Isomerase. *Accounts of Chemical Research.* **10**:105-111.
- Kohlhoff, M., Dahm, A. y Hensel, R. (1996). Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters.* **383**: 245-250.
- Koolman, J. y Roehm, K.H. (2005). Peptides and Proteins. En: *Color Atlas of Biochemistry*. 2ª Edición. (ed) Thieme, New York, U.S.A., pp: 78-79.
- Krietsch, W. K. G., Pentchev, P. G., Klingenburg, H., Hofstatter, T. & Bucher, T. (1979) *Eur. J. Biochem.* **14**, 289-300.
- Kyte, J. (1995). Purification. En: *Structure in Protein Chemistry*. (ed) Garland. New York, U.S.A., pp: 6-7.
- Laguna, J. (2002). Estructura y propiedades de las proteínas. En: *Bioquímica de laguna*. 5ª Edición. (ed) El Manual Moderno, México, D.F., pp: 109.
- Lambeir, A., Opperdoes F.R. y Wierenga R.K. (1987). kinetic properties of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *European journal of biochemistry.* **168**: 69-74.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, FC. y G. A. Petsko. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**: 6609-6618.
- Maes, D., Zeelen, J.P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H. D., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Struc. Func. Gen.* **37**: 441-453.

- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A. y Goraj, K. (1996). Three hTIM Mutants that Provide New Insights on Why TIM is a Dimer. *Journal of Molecular Biology*. **257**: 441-456.
- Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A., Goraj, K. (1996). Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry*. **35**: 4110-4117.
- Maldonado, E., Soriano-Garcia, M. M. A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., y Perez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Chem.* **283**:193-203.
- Mande, S. C., Mainfroid, V. P., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A. y Hol, W. G. J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. *Protein Sci.* **3**: 810-821.
- McKee, T. y McKee, R.J. (2003). Enzimas y Metabolismo de los hidratos de carbono. En: *Bioquímica: la base molecular de la vida*. 3ª Edición. (ed) McGraw Hill Interamericana, Colombia. pp: 152-157, 161-199, 239-240.
- Murphy, K. P. (2001). Stabilization of Protein Structure. En: *Protein Structure, Stability, and Folding*. (ed) Humana Press, Totowa, N.J. pp: 2-15.
- Nájera, P. H. (1997). Cinética de renaturalización de la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de glicerol. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM*.
- Nájera, P. H. (2003). Caracterización cinética y termodinámica del plegamiento y la asociación de la triosafosfato isomerasa. *Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM*.
- Nelson D.L. y Cox, M.M., (2000). The Three-Dimensional Structure of Proteins. En: *Principles of Biochemistry*. 3ª Edición. (ed) Worth, New York, N.Y. pp: 89-96, 195.

- Noble, M. E. M., Zeellen, J. P., Wierenga, K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C. y Martial, J. A. (1993). Structure of triosephosphate isomerase from *E. coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog. Sect. D.* **49**:403-417.
- Orosz, F., Oláh, J., Alvarez, M., Keserü, G. M., Szabó, B., Wágner, G., Kovári, Z., Horányi, M., Baróti, K., Martial, A., Hollán, S. y Ovádi, J. (2001). Distinct behavior of mutant triosephosphate isomerase in hemolysate and in isolated form: molecular basis of enzyme deficiency. *The Ame. Soc. of Hema.* **98**(10): 3106-3112.
- Plaut, B. y Knowles, J. R. (1972). pH-Dependence of the Triose Phosphate Isomerase Reaction. *Biochem. J.* **129**: 311-320.
- Putman, A. F. W., Coulson, I. R. T., Farley, B. R. y Knowles, J. R. (1972). Specificity and Kinetics of Triose Phosphate Isomerase from Chicken Muscle. *Biochem. J.* **129**: 301-310.
- 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. (2007) Disulfide Bridges in the Mesophilic Triosephosphate Isomerase from *Giardia lamblia* Are Related to Oligomerization and Activity. *J. Mol. Biol.* **365**: 752-763.
- Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., De Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A., Torres-Larios, A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J. Biol. Chem.* **283**: 23254-23263.
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. y Fernández-Velasco, D. A. (2002). Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**: 669-675.
- Sawyer, T.H. y Gracy, R.W. (1975). Ligand Binding and Denaturation of free and matrix-bound Triosephosphate isomerases. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **169**: 51-57.

- Schneider, A. y Cohen-Solal, M. (1996). Hematologically important mutations: triosephosphate isomerase. *Blood Cells Mol. Dis.* **22**: 82-84.
- Shägger H. y von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of protein and peptides whit molecular masses 100,000-1000, and their detection whit picomolar sensitivity. *Electrophoresis.* **12**: 352-366.
- Shortle, D. (1996). The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *The FASEB journal.* **10**: 27-34.
- Sun, A. Q., Umit, Y. K. y Gracy, W. R. (1992). Interactions Between the Catalytic Centers and Subunit Interface of Triosephosphate Isomerase Probed by Refolding, Active Site Modification, and Subunit Exchange. *Journal of Biological Chemistry.* **267**:20168-20174.
- Tan, S.Y. y Pepys, M.B. (1994). *Histopalogy* **25**: 403-414.
- Tellez V. A., Ávila R. S., Pérez M. R., Rodríguez R. A., Tuena de Gómez P. M., López C. F. y Gómez P. A. (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **295**: 958-963.
- Thomas, M. (2002). Textbook of BIOCHEMISTRY with clinical correlations. 5ª Edición. (ed) Wiley-liss, New Cork. pp: 368.
- Traut, T. W. (1994). Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**: 125-163.
- Uversky, V. N. (1993). Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry.* **32**: 13288-13298.
- Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy, M. R. (1997). Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **5**: 751-761.
- Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. y Taylor, G.L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **306**: 745-757.

- Walker, J. M. (2002). Electrophoresis of proteins and peptides and detection in gels. En: *The protein protocols, handbook*. 2ª Edición. (ed) Humana Press, Totowa, N. J. pp: 57-307.
- Whitford, D. (2005). Enzyme kinetics, structure, function, and catalysis. En: *PROTEINS Structure and Function*. (ed) John Wiley & Sons, Ltd, England. pp: 215.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S. y Hol, W. G. J. (1991). Refined 1.83 Å structures of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* **220**: 995-1015.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M. y Davenport, R.C. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**: 1115-1126.
- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. y Wierenga, R. K. (1999). 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 Eng.* **12**: 243-250.