



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

**CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE PLEGAMIENTO Y
ASOCIACIÓN DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA
DE HUMANO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN
PRESENTA**

LAURA GONZÁLEZ TORRES

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. HUGO NÁJERA PEÑA**



PACHUCA HGO

JULIO DEL 2007

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 becas otorgadas por PAI-UAEH y CONACYT.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitirme ser parte de su comunidad y formarme dentro de sus aulas.

A CONACYT por brindarme el apoyo económico y la oportunidad de colaborar en sus proyectos fomentando la investigación en jóvenes profesionistas.

A los sinodales de esta tesis: IBQ. Araceli Ortiz Polo, M. en C. Teodoro Suárez Dieguez, Dr Gabriel Betanzos Cabrera, Dr José Sampedro Pérez, Dr. Hugo Nájera Peña, M. en C. Amanda Peña Irecta y Dr. Ernesto Alanís García por todo su apoyo, observaciones y colaboración.

Al Área Académica de Nutrición por brindar el apoyo para realización de esta tesis, así como también a todos y cada uno de los profesores que compartieron sus conocimientos conmigo. A Francelia, Alejandra Islas por toda su colaboración. A todas las personitas con las que conviví en el laboratorio: desde mis inicios: Yadira, Alejandra, Andrea, Karina, Isabel, Gonzalo.

Al Área Académica de Farmacia, por darnos asilo en su laboratorio y permitir la culminación de esta tesis. Un agradecimiento muy especial al Dr. Alfredo Téllez Valencia por sus consejos, regañitos y bromas, porque de ellos aprendí mucho, mil gracias por su paciencia, así como también al M. en C. Abelardo Camacho Luís por sacarme de apuros y siempre insistir en que trabajara.

Al Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM por prestarnos sus instalaciones y todo el apoyo brindado en la realización de los experimentos.

Gracias especialmente a los doctores Alejandro Fernández Velasco y Alejandro Sosa Peinado por todas sus asesorías, ayuda y tiempo compartido. A todos los

chicos de laboratorio, Luís, Lalo, Martín, muchas gracias chicos por su ayuda y hacerme muy alegre la estancia en la UNAM.

Un agradecimiento muy especial a Hugo Nájera Peña (Dr.) por que has sido mi tutor, mi papá profesional, mi gran amigo y mi maestro, porque he aprendido mucho de ti, como investigador, como profesionista, pero sobretodo como persona, gracias mil gracias por todo Hugo, muchísimas gracias más por confiar y creer en mi.

Al Dr. Sampedro por todo todo su apoyo, consejos, asesorías, por todas esas charlas que me sirvieron de mucho profesional y personalmente, muchas gracias por su amistad y cariño. Gracias por su confianza.

A mis padres y mis hermanos, no hay palabras suficientes para agradecerles todo su amor, cariño, apoyo y comprensión que siempre he recibido de ustedes. Gracias por confiar y creer siempre en mí. LOS AMO.

A Charly por todo su amor, comprensión y apoyo, por regalarme ser mi mitad en esto del vivir.

A mis grandes amigas, Lirio, Grisell, Male, Ana y Azucena, por todo su apoyo pero sobre todo por su enorme y sincera amistad, las quiero mucho chicas.

A Iván por toda tu ayuda, sin ti no hubiera podido terminar esta tesis, pero sobre todo gracias por tu amistad y cariño, eso me ayudo muchísimo.

A todas las personas que compartieron y comparten un poco de su vida conmigo, son incontables, mil gracias a todos.

A Dios por permitirme vivir, por nunca abandonarme.

Dedicatorias

Esta tesis esta dedicada a todas y cada una de las personas que son parte importante en mi vida y que ocupan un lugar muy especial en mi corazón: Mis padres, mis hermanos (Alonso, Víctor, Karina, Berenice y Belinda), a Charly, a todos mis grandes amigos y amigas. A Hugo, al Dr. Sampedro y todos los que me ayudaron en esta tesis y en esta vida.

ÍNDICE

	Pág.
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	11
Marco Teórico.....	12
Proteínas.....	12
Plegamiento y origen de la asociación.....	16
Desordenes conformacionales de las proteínas (DCP).....	18
Triosafosfato isomerasa	20
Planteamiento del problema.....	20
Justificación.....	26
Objetivos.....	27
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
Metodología.....	30
Equipos y técnicas empleados.....	30
Infraestructura.....	30
Técnicas.....	30
1. Expresión y purificación de la triosafosfato isomerasa de humano.....	31
Expresión.....	31
Rompimiento.....	31
Purificación.....	31
Determinación de la concentración de proteína.....	32
Determinación de la actividad catalítica.....	32
2. experimentos de desnaturalización y neutralización.....	34
Desnaturalización.....	34
Renaturalización.....	34

Medición de espectros de fluorescencia.....	9
Medición de actividad catalítica.....	10
3. Patrón de plegamiento.....	11
4. Determinación de parámetros termodinámicos y/o cinéticos.....	12
Resultados y discusión.....	12
Purificación de la hTPI.....	16
Estudios cinéticos.....	18
Cinética enzimática.....	20
Estudios al equilibrio.....	26
Histéresis.....	27
Equilibrio real.....	29
Renaturalización de la hTPI en presencia de GuHCl o urea....	29
Cálculos de estabilidad para la hTPI.....	30
Conclusiones.....	30
Perspectivas.....	30
Bibliografía.....	30

ABREVIATURAS

CME	Centro de Masa Espectral
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
APDH	α -glicerolfosfato deshidrogenasa
hTPI	Triosafofato isomerasa de humano
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranosido
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Λ	Longitud de onda
M	Concentración molar
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NaCl	Cloruro de sodio
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	Triosafofato isomerasa
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
V_{max}	Velocidad máxima

RESUMEN

El plegamiento anómalo de las proteínas y los estados de enfermedad a los que conduce, son hoy en día objeto de investigaciones intensivas para conocer que lo provoca e intentar dar algunas soluciones o frenar las consecuencias resultantes. La triosafosfato isomerasa de humano (hTPI) es una importante proteína homodimérica, presente en la vía glucolítica, su deficiencia o alteración ha supuesto una relación con enfermedades neurodegenerativas. Recientes investigaciones muestran que tanto la proteína mal plegada como sus mutaciones pueden ser puntos clave en dichas enfermedades, aunque es necesario hacer más investigaciones para respaldar esta información. Para profundizar en este tema, se caracterizó cinéticamente y espectrofotométricamente a la enzima hTPI en presencia de cloruro de guanidina (GuHCl) y urea. El desplegamiento y replegamiento de esta enzima no fueron coincidentes después de tiempos de equilibrio “convencionales”, este fue alcanzado en el sentido de la renaturalización; en el cual, se observó la existencia de un intermediario monomérico activo; la enzima recupera casi completamente su actividad al renaturalizarse, el intermediario presenta características espectroscópicas más semejantes al estado desnaturalizado. Se evaluaron los cambios en energía de Gibbs para las transiciones observadas en los dos desnaturalizantes, de los ajustes hechos, la alternativa más favorable fue la que incluyó todos los datos de ambos desnaturalizantes, ajustados a un modelo de tres estados, y los ΔG obtenidos fueron $\Delta G_{\text{pleg}}^0 = -2.65 \pm 0.29 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta G_{\text{asoc}}^0 = -21.90 \pm 1.86 \text{ kcal mol}^{-1}$ y un $\Delta G_{\text{tot}}^0 = -27.20 \text{ kcal mol}^{-1}$. Es necesario estudiar más a fondo las características estructurales y el estado de asociación de la hTPI en diferentes condiciones y con otras técnicas a fin de caracterizar el intermediario.

Palabras clave: proteínas, plegamiento, asociación, desplegamiento, triosafosfato isomerasa de humano, caracterización termodinámica, enfermedades del plegamiento.

ABSTRACT

Nowadays, protein misfolding and the pathological conditions that this provokes has been subject of intensive studies. This may help to understand and find solutions of neurodegenerative diseases. Some of these disorders in humans are related to the misfolding or point mutations in the homodimeric glycolytic enzyme triosephosphate isomerase. In order to obtain more information about this, we made a kinetic and spectroscopic characterization of triosephosphate isomerase from human (hTPI), in the presence of guanidine hydrochloride (GuHCl) and urea. The results indicated that after a “standard equilibrium time” the unfolding and refolding of the enzyme was a hysteretic process and that the activity was almost completely recovered. An active monomeric intermediate was found in the renaturation pathway, where the equilibrium was reached. This intermediate presented spectroscopic characteristics similar to that of the unfolding state. The Gibbs energy changes obtained for folding and association were $\Delta G_{\text{fold}}^0 = -2.65 \pm 0.29 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta G_{\text{assoc}}^0 = -21.90 \pm 1.86 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $\Delta G_{\text{tot}}^0 = -27.20 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectively. The present work is very transcendent because there is not an active monomeric intermediate of hTPI reported before.

Key words: protein folding, triosephosphate isomerase from human, thermodynamic characterization, misfolding disease.

MARCO TEÓRICO

PROTEÍNAS

La palabra Proteína, del griego “proteios” que significa “primordial” o “primer lugar” fue sugerida por Berzelius para llamar así al material que describiera el químico holandés Mulder en 1838 como “sustancia compleja”; en cuya composición intervenía el nitrógeno y que era sin duda, la más importante de todas las sustancias conocidas en el “reino orgánico” sin la cual no parecía posible la vida sobre nuestro planeta (1). Aunque no son las más importantes son esenciales, pues las proteínas constituyen uno de los nutrimentos de mayor trascendencia en los seres vivos.

Muchas de las características que distinguen a los organismos vivos están mediadas por proteínas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos, además de ser esenciales para la vida, codifican la información genética, y la expresión de esta información depende completamente de proteína. Recientemente se han descubierto moléculas de RNA con actividad catalítica llamadas ribozimas pero no son consideradas proteínas (2).

Una clasificación general para las proteínas las divide en: proteínas globulares y proteínas fibrosas. Las primeras son de forma esférica, contienen en su estructura hélices α y hebras β además de estructuras no repetitivas (asas y giros), las cuales les proporcionan diseños compactos con funciones particulares, son solubles en agua y algunos ejemplos son: la insulina, albúmina, globulinas plasmáticas y numerosas enzimas. Las proteínas fibrosas son de forma alargada, su armazón es una repetición de elementos de estructura secundaria (hélices α y hebras β) lo cual le confieren la forma de fibras cilíndricas observables al microscopio, son de baja solubilidad en agua, resistentes a la tracción; dentro de éstas se encuentran la queratina, miosina, colágeno y fibrina (1, 3).

Las proteínas almacenan y transportan una variedad de partículas desde macromoléculas hasta electrones. Guían la circulación de electrones en el proceso vital de la fotosíntesis. Como hormonas, transmiten información entre células específicas y órganos en organismos complejos. Algunas proteínas controlan el paso de moléculas a través de las membranas que compartimentalizan células y organelos. Actúan en el sistema inmune de organismos complejos defendiéndolo contra “intrusos” (los más conocidos son los anticuerpos). Además del control de las proteínas en la expresión genética por unión a secuencias específicas de ácidos nucleicos, cerrando y abriendo genes. Las proteínas son los componentes cruciales para la conversión de energía química en energía mecánica en músculo y otros sistemas. También son necesarias para la vista, oído y los otros sentidos (1).

Las funciones desempeñadas por las proteínas determinan en gran parte la actividad metabólica y morfológica de los seres vivos. De acuerdo a su función pueden agruparse en dos clases: estructurales y dinámicas. Dentro de las primeras podemos mencionar la estructural, el soporte de tejidos y los procesos contráctiles. En cuanto a las segundas, el paso de solutos a través de una membrana, establecer comunicación entre los distintos componentes de una célula, catalizar reacciones con mecanismos químicos diferentes, entre muchas otras de igual importancia (3). De las funciones dinámicas, la más importante es la función catalítica, la cual se lleva a cabo a través de enzimas, casi todas ellas de naturaleza proteica y que participan en la mayor parte de las reacciones químicas.

A pesar de esta diversidad de funciones biológicas, las proteínas son un tipo de moléculas relativamente homogénea. Todas tienen el mismo tipo de polímero lineal, construido por varias combinaciones de los mismos 20 aminoácidos. Difieren sólo en la secuencia en la cual están ensamblados los aminoácidos en las cadenas poliméricas. El secreto de su diversidad funcional reside parcialmente en la diversidad química de los aminoácidos, pero principalmente en la diversidad de las estructuras tridimensionales que los bloques construidos pueden formar simplemente por estar unidos en diferentes secuencias. Las asombrosas propiedades de las proteínas sólo pueden ser

entendidas en términos de su relación con las estructuras tridimensionales de las mismas.

Las formas de vida hacen uso de diferentes reacciones químicas para suministrarse a sí mismas continuamente con energía química y usarla eficientemente, pero estas reacciones no pueden ocurrir por sí solas con suficiente rapidez bajo condiciones fisiológicas (soluciones acuosas, 37 °C, pH 7, presión atmosférica) para mantener la vida. Las velocidades de estas reacciones se ven incrementadas, en gran magnitud, en los organismos por la presencia de las enzimas, las cuales también son proteínas. Uno de los principales objetivos de la bioquímica es estudiar el papel que juegan las enzimas en los sistemas vivos (1).

La capacidad de reconocimiento de las proteínas es muy importante en el estudio de las mismas, pues son capaces de reconocer determinado tipo de moléculas que serán objeto de su actividad. Este sitio de reconocimiento se debe a la presencia en la proteína de una estructura complementaria a la molécula (llámese sustrato, hormona, antígeno, etc.) que permite a la proteína (sea enzima, anticuerpo, receptor membranal) reconocer a la molécula en cuestión y asociarse con ella en forma específica. Emil Fisher propuso en 1894 una analogía similar a la que existe entre llave y cerradura para explicar este fenómeno. Un modelo secuencial fue propuesto por Daniel Koshland en 1958: el modelo del ajuste inducido. Este postula que la unión del sustrato induce un cambio en la conformación en una subunidad individual (4). Un buen ejemplo de este ajuste inducido es el observado con la enzima hexocinasa; que cataliza la fosforilación de la glucosa en el primer paso de la glucólisis (Figura 1). Cuando la glucosa se une a la enzima, hace que dos dominios de ésta se plieguen uno hacia el otro, con lo que se cierra la hendidura del lugar de unión alrededor del sustrato (5).

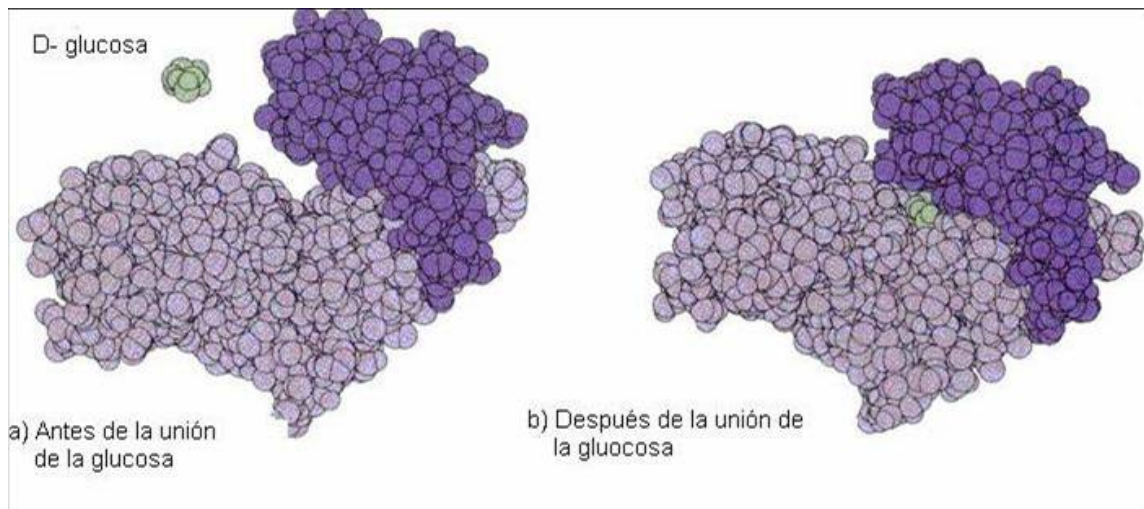


Figura 1. Cambio conformacional inducido en la hexocinasa. La unión de la glucosa a la hexocinasa induce un cambio conformacional importante en la enzima.

La importancia que tiene el estudio de las enzimas es cada vez mayor. Las implicaciones que tienen estas en el origen, diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades son múltiples. Muchas enfermedades se deben a la carencia o anomalía en la síntesis de una determinada enzima (galactosemia, fenilcetonuria, albinismo, pentosuria esencial, Alzheimer, Parkinson, etc.). Estos errores están codificados en el genoma y se denominan: “errores innatos del metabolismo”, “enfermedades hereditarias” o “enfermedades bioquímicas”. El diagnóstico de muchas enfermedades se puede realizar con bastante precisión determinando la actividad de ciertas enzimas o isoenzimas que son indicadores de la destrucción tisular de órganos específicos. Estas determinaciones son tan importantes que han dado lugar a la enzimología clínica como una nueva especialidad. Esta es un área de la medicina que utiliza las enzimas como auxiliares diagnósticos (1).

PLEGAMIENTO Y ORIGEN DE LA ASOCIACIÓN

Una vez que la proteína ha sido sintetizada en el ribosoma, podrá ejercer su función biológica sólo si es capaz de adoptar su estado nativo o plegado (N). El cual consiste en una conformación definida, específica y relativamente estable, es decir de mínima energía (6) a partir de un conjunto de muchas conformaciones ágilmente interconvertibles que no presentan interacciones intramoleculares bien establecidas (estado desnaturalizado, D). El proceso o reacción de conversión de D a N se denomina plegamiento, y el proceso contrario desnaturalización o desplegamiento (7).

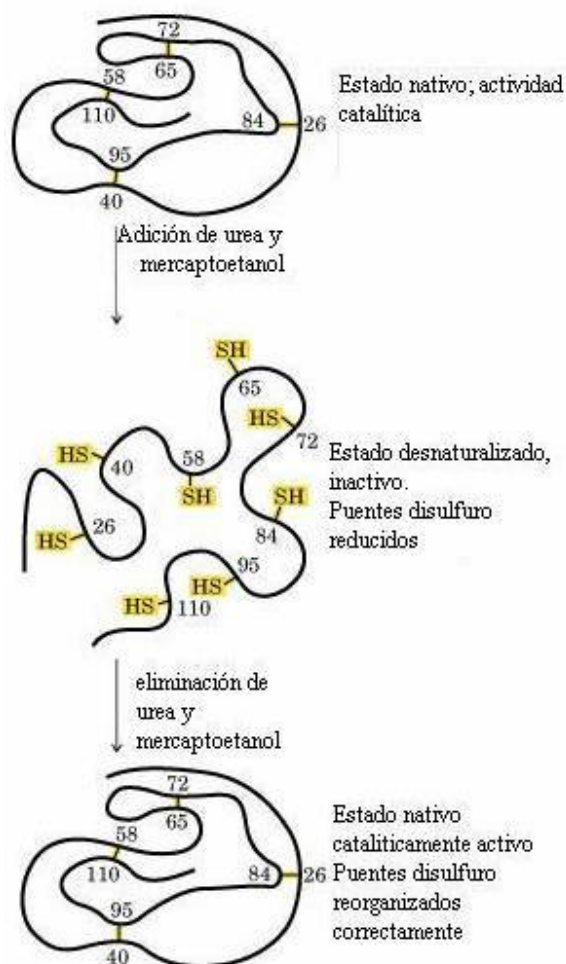


Figura 2. Proceso de desplegamiento y replegamiento de la Ribonucleasa. Modificado de Leningher (4).

Las conformaciones nativas de la mayor parte de las proteínas están estabilizadas principalmente por interacciones no covalentes. Por lo que su plegamiento puede ser alterado por factores como temperatura, cambios en el pH, presión o presencia de solventes orgánicos como el cloruro de guanidina (GuHCl) y la urea; dichos factores intervienen debilitando las interacciones. Las proteínas pueden ser desplegadas o replegadas *in vitro* con ayuda de estos factores. El cambio que se manifiesta en las condiciones de la disolución debido a la adición de estos desnaturalizantes es el que desencadenará la reacción de desplegamiento o replegamiento según sea el caso, este evento se puede presentar en una o varias etapas. La constante de velocidad de la reacción está directamente relacionada a la concentración de desnaturalizante, es decir, si la concentración de desnaturalizante aumenta, la velocidad de reacción será mayor y a la inversa si se trata del fenómeno de renaturalización. El efecto de los agentes caotrópicos es solvatar las cadenas laterales más hidrófobas con mayor facilidad, pues de acuerdo a la teoría de los polímeros, los desnaturalizantes convierten la solución acuosa en un buen disolvente para las proteínas (7). Estudios previos muestran que en el caso de la desnaturalización por cosolventes el desplegamiento está directamente relacionado a la unión de moléculas desnaturalizantes a grupos particulares de proteínas; los cuales son llamados residuos hidrofóbicos en el caso de los alcoholes y enlaces peptídicos en el caso de GuHCl y urea (8).

Cuando existe una alteración en la proteína que perturba su conformación nativa; este cambio provoca la modificación o desaparición de sus funciones. Al producirse esta desnaturalización se puede llegar a perder su estructura cuaternaria, terciaria y/o secundaria, conservándose la primaria (1).

Algunas proteínas, no sólo presentan el estado nativo y el desplegado, sino que muestran estados parcialmente plegados conocidos como intermediarios. Las proteínas en el estado nativo normalmente no se agregan aunque la concentración de proteínas en el citoplasma sea elevada, se ha observado que esto es debido a la especificidad que presentan las proteínas, no obstante, también se ha

propuesto la existencia de chaperonas que impiden la agregación o mal plegamiento de las proteínas (9).

Por otra parte, se ha observado que el estado desnaturalizado tiene una vida media muy corta. En este sentido, diversas evidencias sugieren que la agregación se presenta por la asociación específica de estados no nativos (10, 11). Existen mutaciones puntuales en la proteína que provocan su agregación. En términos fisicoquímicos, estas mutaciones alteran la estabilidad o la velocidad de interconversión entre la forma nativa y la forma fibrilar.

DESORDENES CONFORMACIONALES DE LAS PROTEÍNAS (DCP)

Las investigaciones hechas en años recientes muestran que existen “defectos” o pasos intermedios anormales en las rutas de plegamiento y desplegamiento. Lo cual sugiere que existen factores o intermediarios que están alterando la vía normal de plegamiento. Cuando esto ocurre, las proteínas cuya conformación nativa es globular resultan en estados agregados en forma de fibrillas o placas. Se ha encontrado que estas patologías pueden tener un origen genético, esporádico o infeccioso. Aunque aún no se ha podido explicar del todo que lo determina y como actúa esta alteración (7).

Algunas enfermedades del plegamiento anómalo son causadas por un cambio conformacional acoplado a la agregación de proteínas mal plegadas en el interior y/o exterior de la célula, más allá de la influencia de los sistemas intracelulares de “control de calidad” (9). Algunas de estas anormalidades se han asociado a factores genéticos (12).

La mejor representación de estos desórdenes es la amiloidosis, proceso por medio del cual una parte del péptido β -amiloide ($A\beta$) (residuos 40 a 43) se agrega en forma de fibras insolubles. La agregación de proteínas en el espacio intra o extracelular esta asociada a la aparición de una función tóxica (13). Esta se caracteriza por el depósito de proteínas mal plegadas, agregadas y/o ubiquitinadas o sus fragmentos en órganos como cerebro, bazo, riñón e hígado.

Estos eventos están íntimamente asociados con la neurodegeneración. La acumulación de los agregados amiloides no es reversible y se asocia con la disfunción del (los) órgano(s) afectado(s). La muerte de los pacientes llega en un período variable posterior a la aparición de los síntomas. Dentro de estas patologías se encuentran la enfermedad del Alzheimer (EA), Parkinson y otros males debilitantes del adulto mayor; la fibrosis quística y otras enfermedades fulminantes de la niñez.

En el caso de la EA (tipo de demencia senil más común) se ha estimado que el 10% de la población que rebasa los 65 años de edad la padece. Esta enfermedad ha sido largamente asociada con la acumulación de “placas” amiloides insolubles en el cerebro. Las lesiones observadas en el Alzheimer son “mezclas” neurofibrilares intracelulares que contienen la proteína Tau y placas extracelulares que contienen péptidos β -amiloides (14).

Muchas otras enfermedades neurodegenerativas han sido asociadas a agregaciones de proteínas específicas o péptidos en varias partes del cerebro. Dentro de estas se encuentran la α -sinucleína en la enfermedad de Huntington, los priones en la encefalopatía espongiforme y la transtirretina (TTR) en la amiloidosis transtirretinal. Algunos otros males no neurodegenerativos relacionados a la madurez y vejez se han asociado a este tipo de agregación en otras partes del cuerpo. Tal es el caso de la Diabetes tipo II, con el péptido conocido como amilina, que se agrega en forma de fibras en las células del páncreas (15).

Investigaciones recientes demuestran que algunas enzimas glucolíticas se asocian con proteínas aberrantes; por ejemplo la fosfofructocinasa se une a fragmentos β -amiloides (16) o la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se asocia a la proteína huntingtina mutante. Recientemente, se estudió la asociación entre la triosafosfato isomerasa de humano (hTPI) silvestre y mutada con la membrana de los eritrocitos y los microtúbulos (estos últimos constituyen el componente principal del axón de las neuronas), observando que tanto la hTPI silvestre como la proteína mutada muestran una capacidad de asociación muy similar con los microtúbulos (17). En otras investigaciones se ha estudiado la inactivación por temperatura de la enzima silvestre y una de las mutantes. Se ha

observado que la enzima mutante tiene una estabilidad menor por calor que la enzima silvestre por lo que se ha sugerido que las hTPIs mutantes son más termolábiles (18).

TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

La enzima triosafosfato isomerasa (TPI) (D-gliceraldehído-3-fosfato ceto-isomerasa E.C. 5.3.1.1) es una proteína homodimérica, de cadenas de 27 kDa, soluble, cataliza la interconversión de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en la vía glucolítica con alta eficiencia catalítica (por un factor de 10^{10}). La interconversión favorece la formación de DHAP 20:1. Ya que sólo el G3P continúa en la vía glucolítica, esta enzima asegura la síntesis neta de ATP en la oxidación de la glucosa hasta piruvato. El mecanismo catalítico se conoce con gran detalle (19). La TPI es una enzima que garantiza la “economía celular”, está altamente conservada, se expresa en todos los tipos de células que se han estudiado y juega un papel esencial en la glucólisis, gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y la vía de las pentosas fosfato (20). Es una enzima muy eficiente, la velocidad con que cataliza la isomerización del G3P es entre 10^8 y 10^9 veces mayor que en ausencia de ésta. La relación k_{cat}/K_m para el sustrato es de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; este valor es comparable al calculado ($10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión. El perfil de energía libre de la reacción catalizada por la TPI, muestra que el estado de transición más alto es la unión del G3P a la enzima (19). Gracias al estudio de los parámetros catalíticos de la TPI variando la viscosidad del solvente (21) se ha confirmado que la unión de del G3P a la enzima, esta limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos especies; por lo tanto, los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el solvente en la catálisis o los rearrreglos químicos entre el sustrato y la enzima son más rápidos. Debido a esto, la TPI es un catalizador “perfecto”, cualquier aumento en la velocidad de los pasos catalíticos no tendría efecto en la velocidad de la reacción (19).

La estructura secundaria de la TPI está formada por ocho hebras β que alternan con una (o dos) α hélice (s). La cadena polipeptídica se pliega de tal manera que las ocho hebras forman una hoja β paralela central semejando un barril. El sitio activo se encuentra en uno de los extremos del barril de la cavidad formada por las asas contiguas a las hebras β (22).

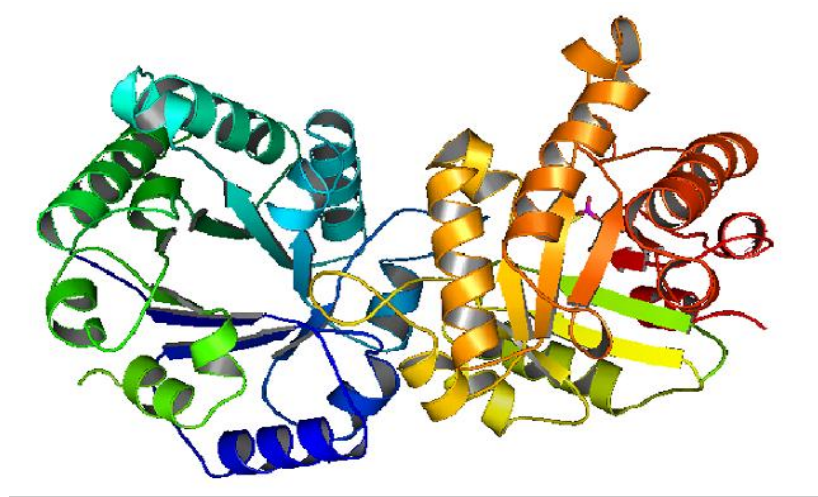


Figura 3. Estructura cristalográfica de la hTPI. Representación de los 2 monómeros de la hTPI. Las hélices α están representadas por espirales, las hebras β se muestran como flechas.

La Glucólisis es la vía metabólica más importante para los organismos. Proporciona energía y productos intermedios para otras vías metabólicas. Para muchos tejidos es una vía de producción de energía de “urgencia” cuando el oxígeno es el factor limitante. Consta de una secuencia de 10 reacciones que rompen una molécula de glucosa (seis carbonos) en dos moléculas de piruvato de tres carbonos, con la generación neta de dos moléculas de ATP y NADH. Por lo tanto, la glucólisis, a diferencia de otras vías puede producir ATP tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Se divide en dos fases, la primera es la fase preparativa (reacciones 1-5) y la segunda es la de generación de energía (reacciones 6-10) (23). La TPI interviene en la reacción 5, en la interconversión de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) como se mencionó anteriormente (4, 5).

La enzima glucolítica hTPI es codificada por un solo gen, TPI1, localizado en 12p13. Se ha reportado la secuencia de aminoácidos de TPI de más de 200 especies. Diecinueve diferentes especies, tanto silvestres como mutantes han sido descritas hasta ahora, con su estructura tridimensional a alta resolución (24). Los parámetros cinéticos de la TPI de diferentes especies se muestran semejantes entre sí. Por ejemplo la hTPI y la de levadura, tienen una estructura muy parecida (Figura 4). En algunas otras, a pesar de que sus propiedades fisicoquímicas y estructurales son diferentes, sus características cinéticas son muy similares, por ejemplo: la TPI de pollo y la de *Trypanosoma brucei* tienen parámetros cinéticos casi idénticos aunque difieren en casi un 50% en los aminoácidos, (25).

Cada monómero de la TPI cuenta con un sitio activo y funciona independientemente del otro, hasta ahora no se han descrito cofactores o reguladores alostéricos, ni se ha mostrado cooperatividad entre las subunidades (26). Se ha sugerido que la conexión de las subunidades induce la máxima estabilidad conformacional, pues los monómeros de la TPI por si solos son inestables (27).

Por otra parte, de acuerdo con la explicación “estructura-estabilidad”, se ha considerado que la dimerización es necesaria para perfeccionar la geometría espacial del sitio activo (28). Para proteínas como la TPI, una ventaja que puede resultar de adoptar una estructura permanentemente plegada (más que experimentando ciclos de disociación/asociación) es un incremento en la resistencia a modificaciones químicas tales como oxidación de tiol, desaminación o digestión proteolítica. Las conformaciones desplegadas o sin estructura son en general más vulnerables a estas modificaciones covalentes. De hecho la marcada resistencia de la TPI contra la oxidación y la proteólisis esta directamente relacionada con el mantenimiento de su estructura nativa dimérica (29).



Figura 4. Sobreposición del monómero de las estructuras de TPI de humano (gris oscuro) y levadura (gris claro).

Se han hecho experimentos de desnaturalización ($N \longrightarrow D$) y renaturalización ($D \longrightarrow N$) por presión hidrostática en la TPI de conejo y por agentes desnaturalizantes (físicos como temperatura, y químicos como GuHCl y urea) en la TPI de levadura. En estos estudios se encontró histéresis cinética (30, 31, 32). A pesar de esto, los trabajos en los que se ha calculado la estabilidad de la TPI de diferentes fuentes sólo han empleado experimentos $N \longrightarrow D$ (33-36). Sin embargo, en los experimentos realizados hasta ahora, no se ha reportado la presencia de intermediarios en la desnaturalización de la hTPI silvestre y se propone un modelo de dos estados $N \rightleftharpoons D$, donde N es el dímero nativo y D es el monómero desnaturalizado (27). Por otro lado, existe evidencia de que este modelo puede no estar al equilibrio y por tanto, no sea el correcto (32).

La deficiencia genética de la hTPI es un defecto recesivo autosómico, en ausencia de consanguinidad. Los pacientes clínicamente afectados tienen usualmente 2 genes mutantes defectuosos en su composición, dando por resultado una actividad de TPI menor al 20% de lo normal. La anomalía metabólica muestra un aumento de 20 a 60 veces más DHAP que G3P (37, 38). Las manifestaciones clínicas más importantes son la anemia hemolítica crónica y

muerte temprana antes de los 6 años de edad. Infecciones y complicaciones cardíacas han sido notadas en la minoría de los casos afectados. Los miembros de familia con un gen defectuoso y una actividad de hTPI aproximada del 50% son completamente normales (20).

La deficiencia heredada de la hTPI es caracterizada por una acumulación de DHAP y una actividad enzimática marcadamente reducida en células y tejidos. Un aumento de la formación de metilglioxal podría incrementar el flujo metabólico a través de la vía de glioxalato dando por resultado una disfunción neuromuscular usualmente fatal. En todos los individuos afectados la reducción de la actividad de la enzima está directamente relacionada a mutaciones en el gen que codifica para la hTPI (39). La microcompartimentalización de la hTPI puede disminuir aún más la ya reducida actividad de la isomerasa en las células deficientes. Además es responsable de los altos niveles de DHAP presentes en esta enzimopatía (38).

Para determinar las bases moleculares de este desorden, un alelo de hTPI de 2 pacientes homocigóticos independientes para la deficiencia de hTPI fueron comparados con un alelo de un individuo normal. Cada secuencia asociada a la enfermedad guarda una transversión en el codón y especifica una proteína estructuralmente dañada en la cual un residuo de glutamato 104 es remplazado por un residuo de aspartato. La importancia del glutamato 104 para la estructura y función de la enzima consiste en que es un aminoácido altamente conservado en las TPI de todas las especies que han sido caracterizadas a la fecha. La sustitución de glutamato por aspartato da como resultado una enzima termolábil. Pacientes con varias mutaciones heredadas han sido identificados y todos (uno homocigoto y diferentes heterocigotos) llevan la mutación Glu 104 Asp (18).

A la fecha se han reportado varias mutaciones en la enzima (37), dentro de las cuales se encuentran la mutación del Glu 104 por Asp. Esta mutación aparentemente le confiere termolabilidad (18). Las mutaciones Gly 122 por Arg y Phe 240 por Leu hacen enzimas termolábiles, pero esta variabilidad en la

estabilidad de la enzima no se presenta con otros desnaturalizantes. La sustitución del aminoácido Gly por Arg no involucra residuos del sitio activo y no altera en forma perceptible las propiedades cinéticas de la enzima (40).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio cinético y termodinámico del evento de plegamiento y asociación en las proteínas se ha estudiado desde hace algún tiempo. Sin embargo, la información recabada hasta la fecha no es suficiente para comprender enteramente el porque las proteínas no siguen un patrón de plegamiento. En muchas ocasiones presentan estados intermediarios, los cuales presumiblemente influyen en su agregación o mal plegamiento.

La TPI es una de las enzimas más importantes de la vía glucolítica y esta vía metabólica resulta imprescindible para el buen funcionamiento y mantenimiento de la vida (4). Es de gran importancia estudiar las características termodinámicas de la hTPI, puesto que si ésta no realiza sus funciones adecuadamente, no se produce eficazmente o no se encuentra presente, puede alterar gravemente el proceso de la glucólisis y por tanto dañar funciones vitales del organismo.

Debido a que la TPI se ha encontrado en todos los organismos en los que se ha estudiado (20) y con información de que la mutación de un solo aminoácido provoca desórdenes conformacionales en la proteína, que a su vez conducen a estados patológicos en los humanos, resulta imprescindible conocer la estabilidad termodinámica en la hTPI silvestre, como en la enzima mutada; además de la caracterización de sus parámetros cinéticos para así intentar esclarecer el panorama que ofrecen las reacciones de plegamiento y asociación, así como el plegamiento anómalo de esta proteína. Es de vital importancia ahondar en la energética de los intermediarios (a la fecha, poco explorada), ya que pueden ser determinantes en los procesos indeseados de inactivación de proteínas *in vitro* e *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

La glucólisis es la principal ruta para el metabolismo de la glucosa, y conduce a la producción de energía en forma de ATP (4). También es la vía principal para el metabolismo de los otros azúcares simples de la dieta, fructosa y galactosa (5). Sin embargo, existen algunas enfermedades que hacen que las enzimas de la ruta glucolítica presenten una actividad deficiente. Manifestándose anomalías como las anemias hemolíticas o las enfermedades neurodegenerativas. La TPI (presente en esta vía metabólica) es una de las enzimas que resulta afectada en este tipo de patologías, y estudiar sus parámetros cinéticos y termodinámicos resulta trascendental.

Comprender el plegamiento de las proteínas ha supuesto un enorme esfuerzo científico en las últimas décadas. Pero este problema no se puede resolver simplemente caracterizando macroscópicamente las estructuras de los estados conformacionales más o menos estables que se encuentren a lo largo de la reacción. La solución requiere la definición y estudio de transformaciones estructurales que transcurren en menos de un milisegundo y que implican interacciones y conformaciones alternativas que no pueden ignorarse o aislarse.

Ationu y col. en 1997 (39), con un modelo de células mutadas llamadas K562, confirman la existencia de un mecanismo del transporte que permita la transferencia de las TPIs activas de las células K562 a las células deficientes. Lo anterior puede tener implicaciones importantes para el desarrollo de diversos avances terapéuticos para la deficiencia de la TPI y otros desórdenes metabólicos de la glucólisis. Sin embargo, los resultados clínicos y experimentales recientes obtenidos de estudios hechos con el componente heterocigoto de dos hermanos húngaros, indican que las mutaciones por sí solas no son suficientes para explicar la extrema variabilidad de las enfermedades neurodegenerativas. Es necesario realizar investigaciones adicionales de la dinámica conformacional de proteínas y su relación con el plegamiento y las interacciones proteína-proteína con ayuda de otras técnicas fisicoquímicas para entender las alteraciones de la enzima y las patologías que puede provocar en el humano (17).

Los nuevos experimentos pretenden dar respuesta a las preguntas planteadas a la fecha. Pero la solución definitiva del problema de plegamiento no está a la vuelta de la esquina. Aunque los enormes beneficios que supondrá su resolución, incluso parcial, compensarán con creces la inversión realizada.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar los cambios en la cinética enzimática y en el patrón de plegamiento y asociación de la hTPI por efecto de 2 desnaturalizantes (urea y GuHCl).

Objetivos específicos

- 1.- Sobreexpresar y purificar la TPI de humano.
- 2.- Determinar los parámetros cinéticos de la hTPI.
- 3.- Comparar los datos cinéticos obtenidos en este trabajo con los reportados para la hTPI.
- 4.- Caracterizar termodinámicamente el patrón de plegamiento y asociación de la hTPI.

METODOLOGÍA

Equipos y técnicas empleados

Equipos

- Espectrofotómetro UV/VIS Agilent 8453
- Espectrofluorómetro Shimadzu RFC5301
- Sistema ATKÄ FPLC del inglés (Fast Protein Liquid Chromatography)
- Agitador orbital Barn Stead labline MaxQ 500
- Centrifuga Beckman-Coulter, modelo Avanti J25I

Infraestructura

- Laboratorio de Nutrición molecular del ICSa UAEH
- Laboratorio de Tecnología Farmacéutica del ICSa UAEH
- Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM

Técnicas

1. Expresión y purificación de la triosafosfato isomerasa de humano.

- a) sobreexpresión
- b) extracción
- c) purificación
- d) determinación de la concentración de proteína
- e) determinación de la actividad catalítica

2. Experimentos de desnaturalización y renaturalización.

3. Patrón de plegamiento

El patrón de plegamiento de la hTPI se determinó in vitro, utilizando como perturbantes al GuHCl y a la urea.

Desnaturalización por cloruro de guanidinio y / o urea.

- El estado de asociación de la hTPI en presencia de GuHCl o urea
- Estructura terciaria mediante fluorescencia intrínseca
- Determinación de la ruta de plegamiento en GuHCl y urea

4. Determinación de parámetros termodinámicos y/o cinéticos

1. Expresión y purificación de la triosafosfato isomerasa de humano

EXPRESIÓN

Se trabajó con las células de *E. coli*, (cepa BL21DE3) una vez transformadas se plaquearon en medio Luria Bertani (LB) con 100 µg/mL de ampicilina se adicionó el IPTG (β -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.4 mM.

ROMPIMIENTO

1. Partiendo de 2 litros de células que sobreexpresan la TPI de humano, se resuspendieron en amortiguador de extracción MES 25 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, fenilmetilsufonil fluoruro (PMSF) (200µL de DMSO) (amortiguador A).

2. Las células se rompieron en un ultrasonificador con 8 ciclos de 40 segundos con 1 minuto de descanso entre cada ciclo, para después centrifugarlas a 12,000 rpm por 20 minutos y proseguir su purificación en una centrifuga Beckman-Coulter modelo Avanti JA25I en un rotor Beckman JA-25.50.

PURIFICACIÓN.

1. La purificación de la TPI de humano se realizó principalmente combinando métodos de precipitación diferencial, cromatografías de filtración en gel y de intercambio iónico, basándose en el protocolo utilizado por Mande, S. C. y col., 1994 (48).

2. El sobrenadante obtenido del rompimiento, se precipitó diferencialmente del 45 al 75% con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3. El precipitado se separó por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min. a 4°C y se resuspendió a aproximadamente 4 mL de amortiguador B que contiene Tris/HCl 20mM, NaCl 100mM, PMSF 0.1 mM, EDTA 0.2 mM y azida de sodio 0.1mM, y se dializó (7.25 mL de muestra) contra 500 mL durante 3 h y luego contra 1 L toda la noche.

4. Se pasó la muestra por un filtro de 0.45 µm de abertura de poro.

5. La muestra (9.5 mL) se inyectó en una columna Superdex 200 de Amersham previamente equilibrada con el mismo amortiguador utilizando un sistema de FPLC. Se colectaron fracciones de 1.3 mL.

6. La proteína se cuantificó por absorbencia a 280 nm.

7. Se reunieron las fracciones con mayor actividad y se inyectaron en la columna mono Q de intercambio aniónico (Amersham) equilibrada con amortiguador B pH 8.0 (se cargaron las fracciones), utilizando un sistema de FPLC, aplicando un gradiente lineal de 0-0.3 mM de NaCl por elución, se colectaron fracciones de 1.5 mL.

8. La pureza se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para los lotes que presentaron contaminantes después de este paso, el concentrado se dializó contra 2L de amortiguador B pH 8.5 y se volvió a pasar por la columna mono Q equilibrada con el mismo amortiguador, aplicando el mismo gradiente para eluir la proteína.

9. La muestra se concentró en un tubo de ultrafiltración Amicon Ultra-4, con corte en 10,000 PM, el cual se centrifugó por 17 min a 25°C.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de absortividad molar (ϵ_{280}) de $33460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (41,42). Se tomó como blanco la fracción que no presentó ningún pico durante la elución en la purificación. Todas las fracciones de proteína que si presentaron picos se midieron, tomándose directamente de los tubos donde fueron colectadas, se colocaron una por una en la celda de cuarzo de 1.5mL para leer la absorbencia en el espectrofotómetro, restándole el blanco anterior.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA

La actividad catalítica de la hTPI se siguió por medio de la oxidación de NADH a 340nm, en un sistema acoplado a la producción de DHAP utilizando la α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α GDH) Figura 5. (3, 43).

La actividad de la hTPI se midió en celdas de 1.5 mL, en amortiguador TED 100/10/1 mM (Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM y DTT 1 mM) pH 7.4, conteniendo 2.0 mM D,L-gliceraldehído-3-fosfato, 20 μ g α GDH, 0.2 mM NADH y 150 pM de hTPI, en un volumen final de 1 mL (3, 43). La velocidad de la reacción se determinó en un espectrofotómetro UV/Vis Agilent 8453 a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. La actividad catalítica en presencia de altas concentraciones de desnaturalizante afecta la actividad de la enzima acoplante, (las mediciones de actividad catalítica se llevaron a cabo a concentraciones de proteína 1000 veces menores que las usadas para los experimentos espectroscópicos), por lo que, la actividad se midió como sigue:

- 1.- Las muestras a diferentes concentraciones (390 – 195 nM de hTPI) se diluyeron a 19.5 nM con cambio en la concentración de desnaturalizante dependiendo de la concentración deseada. Se tomó una alícuota de la mezcla anterior y se diluyó en la mezcla de reacción para la medición de la actividad a una concentración de 150 pM en celda.
- 2.- Se midieron los cursos temporales de oxidación del NADH, para indicar si hay o no reactivación o inactivación durante las mediciones.

Para la determinación de la K_m y de la V_{max} se varió la concentración de G3P de 0.15 a 3mM.

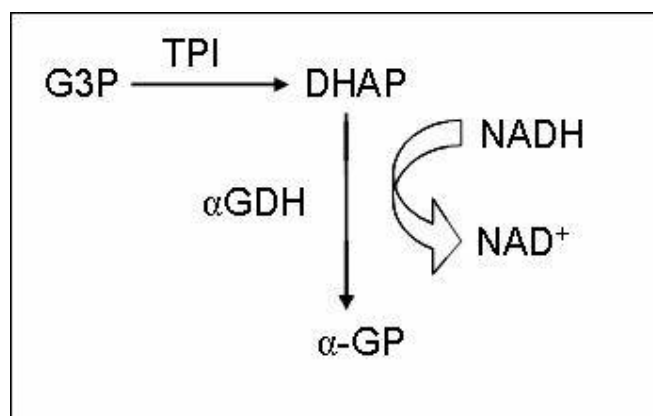


Figura 5. Esquema del ensayo acoplado para medir actividad catalítica de hTPI

2. Experimentos de desnaturalización y renaturalización

DESNATURALIZACIÓN

Para la desnaturalización de la hTPI se incubó la enzima en una disolución con 6 M de GuHCl en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4, por un periodo de 90 min en GuHCl y 2 h en 8 M de urea en el mismo amortiguador a 25°C. Por información previa, se sabe que en estas condiciones, los espectros de dicroísmo circular y la fluorescencia intrínseca indican que la proteína esta totalmente desnaturalizada.

RENATURALIZACIÓN

Se llevó a cabo por medio de diluciones de la proteína desnaturalizada en el amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4, las cuales contenían concentraciones decrecientes de GuHCl o urea. Las mediciones de desnaturalización y renaturalización se llevaron a cabo a las 24 h para el caso del GuHCl y a las 48 h para el caso de la urea.

MEDICIÓN DE ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando una longitud de onda de excitación de 280nm (ancho de banda de 4nm), la emisión se colectó de 300 a 400 nm (ancho de banda de 8nm) cada un nanómetro. Se utilizó una celda de cuarzo de 0.5 mL con un paso de luz de 0.4 cm. Las mediciones se realizaron a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y/o a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4, variando la concentración de desnaturalizante. El centro de masa espectral (CME) se calculó de los datos de intensidad (I_λ) obtenidos a diferentes longitudes de onda (λ), usando la siguiente ecuación: $\text{CME} = \sum \lambda I_\lambda / \sum I_\lambda$

MEDICIÓN DE ACTIVIDAD CATALÍTICA

El procedimiento para la medición de la actividad catalítica es el mismo que se utilizó en la purificación de la enzima.

3. Patrón de plegamiento

El patrón de plegamiento de la hTPI se determinó in vitro, utilizando como perturbantes al GuHCl y a la urea.

Desnaturalización por GuHCl y / o urea.

1) Estructura cuaternaria: El estado de asociación de la hTPI en presencia de GuHCl o urea se determinó mediante actividad catalítica

2) Estructura terciaria: mediante fluorescencia intrínseca utilizando un espectrofluorómetro Shimadzu RFC5301. Partiendo de los espectros de emisión colectados a diferentes concentraciones de desnaturalizante, se obtuvieron los siguientes parámetros relacionados con la exposición de los triptofanos al medio: longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}), intensidad de fluorescencia en longitud de onda y centro de masa espectral (CME).

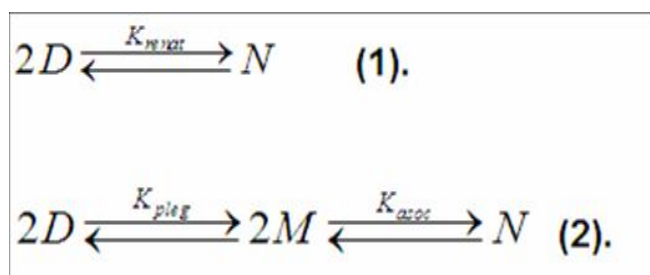
3) Determinación de la ruta de plegamiento en GuHCl o urea. A partir del análisis comparativo de las transiciones funcionales y estructurales se determinó la presencia o ausencia de intermediarios y su estado de asociación. De las rutas de plegamiento probables las más sencillas son:

1) Dos estados $N \rightleftharpoons D$

2) Tres estados con un intermediario monomérico (M); $N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$

4. Determinación de parámetros termodinámicos

El plegamiento de los monómeros desplegados (D) hacia el dímero nativo (N) se analizó de acuerdo al modelo de dos y tres estados para GuHCl y de tres estados para urea, implicando un intermediario monomérico (M):



En el modelo de dos estados los cambios en la energía libre para la renaturalización (ΔG_{renat}) se definen como $\Delta G_{\text{renat}} = -RT \ln \frac{[N]^2}{[D]}$ asumiendo que varía linealmente con la concentración de desnaturalizante x de acuerdo a:

$$\Delta G_{\text{renat}} = \Delta G_{\text{renat}}^0 + m_{\text{renat}} x \quad (3).$$

Las fracciones molares de los estados desnaturalizado y nativo se definen por $f_D = \frac{D}{P_t}$ y $f_N = \frac{2N}{P_t}$ respectivamente, donde la concentración de proteína total (P_t) esta expresada en relación de los monómeros ($P_t = D + 2N$).

En el modelo de tres estados los cambios en energía libre para el plegamiento del monómero (ΔG_{pleg}) y la asociación de los monómeros (ΔG_{asoc}), se definen como $\Delta G_{\text{pleg}} = -RT \ln \frac{M}{D}$ y $\Delta G_{\text{asoc}} = -RT \ln \frac{N}{M^2}$ asumiendo que varía linealmente con la concentración de desnaturalizante x de acuerdo a:

$$\Delta G_{\text{pleg}} = \Delta G_{\text{pleg}}^0 + m_{\text{pleg}} x \quad (4) \quad \Delta G_{\text{asoc}} = \Delta G_{\text{asoc}}^0 + m_{\text{asoc}} x \quad (5)$$

Las fracciones molares de los estados desnaturalizado, monomérico y nativo se definen por $f_D = \frac{D}{P_t}$, $f_M = \frac{M}{P_t}$, y $f_N = \frac{2N}{P_t}$, respectivamente, donde la concentración de proteína total (P_t) esta expresada en relación a los monómeros ($P_t = D + M + 2N$). f_M y f_N pueden ser expresadas en función de las constantes de equilibrio como:

$$f_M = \frac{-\left(\frac{1}{K_{\text{pleg}}} + 1\right) + \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{pleg}}} + 1\right)^2 + 8K_{\text{asoc}} P_t}}{4K_{\text{asoc}} P_t} \quad (6)$$

$$f_N = 2 (f_M)^2 K_{\text{asoc}} P_t \quad (7) \quad f_D = 1 - f_N - f_M \quad (8)$$

De la ecuaciones (6) y (7), el observable experimental (y) se asumió aditividad $y = y_D f_D + y_M f_M + y_N f_N$.

Para comparar y usar los datos provenientes de diferentes técnicas, es conveniente normalizar los valores experimentales como $\alpha = \frac{[y(x) - y(x')]}{[y(x=0) - y(x')]}$ donde x' es la concentración de desnaturalizante en la cual la enzima esta completamente

desplegada. Los parámetros ΔG_{pleg}^0 , m_{pleg} , ΔG_{asoc}^0 , y m_{asoc} , fueron ajustados a $\alpha(x)$ usando las ecuaciones (6) y (7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PURIFICACIÓN DE LA HTPI

La purificación de la hTPI se modificó ligeramente del protocolo original; básicamente se utilizó el método empleado por Mande y col., 1994 (41). De las fracciones colectadas, se eligieron las de mayor actividad catalítica y concentración de proteína (Fracciones 3, 4 y 5 observables en la Figura 6). Se realizó el gel de poliacrilamida en el cual se observó una sola banda correspondiente a la hTPI que no presentó contaminantes (carril 3 de la Figura 7), además de 2 bandas de hTPI con contaminantes de distinto peso molecular (carriles 1 y 2 de la Figura 7), por lo cual se volvió a dializar la proteína, se pasó por la columna mono Q con el mismo gradiente, pero esta vez, a pH de 8.5, para quitar dichos contaminantes. Por último, se reconcentró en un tubo de ultrafiltración Amicon, obteniendo una proteína con una concentración total de 5.2 mg/mL.

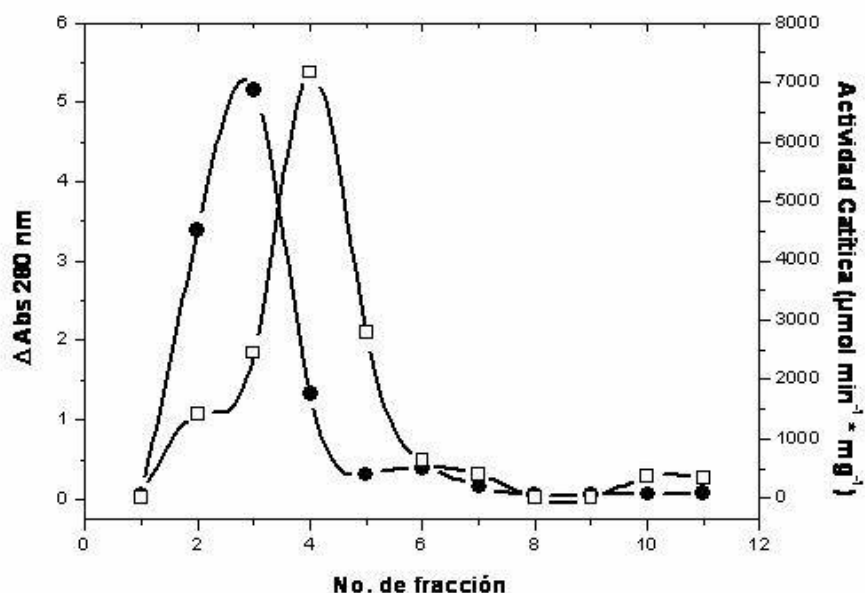


Figura 6. Perfil de elución de la purificación de hTPI en columna mono Q. Concentración de proteína (●) y actividad catalítica (□) de la hTPI.

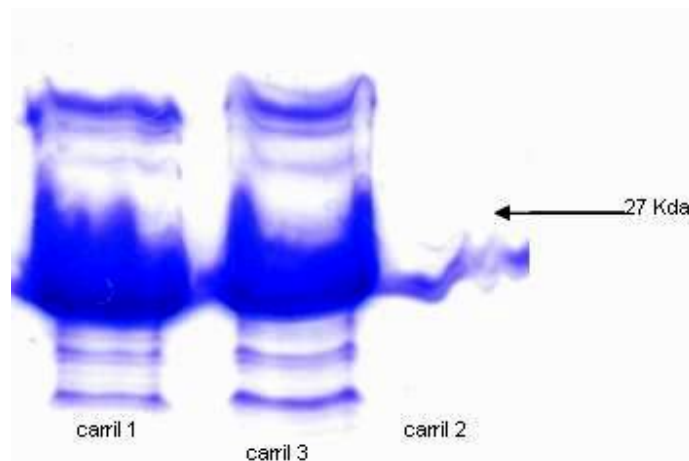


Figura 7. Gel de poliácridamida de la enzima hTPI realizado después del paso 7 de la purificación (elución en columna mono Q). Los carriles 1 y 2 corresponden a hTPI con contaminantes (fracciones 3 y 4 de la Figura 5), el carril 3 corresponde a la hTPI pura.

ESTUDIOS CINÉTICOS

Cinética enzimática

Debido a que la actividad catalítica es sensible a cambios en la estructura cuaternaria de una proteína, es posible verificar que la enzima (tanto nativa como renaturalizada) sea activa. Por medio de experimentos donde se comparan estas dos se obtuvo que el comportamiento de la hTPI renaturalizada es muy similar al de la hTPI nativa, alcanzando una recuperación del 73% con respecto a la última (Figura 8). El valor de la $V_{\max}$ y K_m para la proteína nativa fueron de $2076 \pm 99 \mu\text{mol/ min mg}$, y $0.48 \pm 0.08 \text{ mM}$ respectivamente, mientras que para la proteína renaturalizada fueron de $1455 \pm 38 \mu\text{mol/ min mg}$ y $0.58 \pm 0.04 \text{ mM}$. Se han estudiado los parámetros cinéticos de TPIs de diferentes especies en las que a pesar de que sus propiedades fisicoquímicas y estructurales son diferentes, sus características cinéticas son muy similares. Este el caso de la TPI de pollo y la de *T. brucei*, las cuales difieren en casi un 50% en estructura pero sus parámetros cinéticos son casi idénticos (25). La hTPI estudiada por Mande y col. en 1994 (41) presenta una K_m de 0.49 mM , la estudiada en este trabajo presentó una K_m de 0.48 mM para la nativa y 0.58 mM para la renaturalizada. Comparando dichas

enzimas, resultan ser casi indistinguibles; la proteína renaturalizada se comporta muy similar a su nativa (Figura 8). Debido a esto, se utilizó la proteína replegada para los experimentos posteriores.

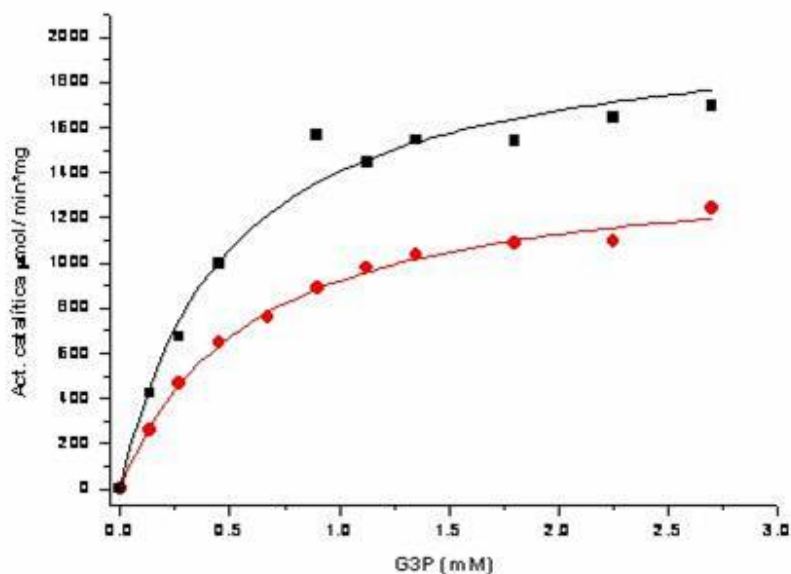


Figura 8. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima hTPI. Determinación de la K_m y la V_{max} de la hTPI, proteína nativa (■) y proteína renaturalizada (●)

La determinación de la estructura terciaria se realizó con los datos de los espectros de fluorescencia. La hTPI en presencia de urea muestra que la proteína nativa y renaturalizada presentan casi el mismo comportamiento, pues su espectro es muy similar y su pico máximo de fluorescencia se presenta a 330 ± 1 nm, mientras que la proteína desnaturalizada está corrida hacia el rojo con un pico máximo de emisión de fluorescencia a 354 ± 1 nm (Figura 9, panel a). Para el caso de la hTPI en presencia de GuHCl se observa un comportamiento muy parecido al visto con urea. Es decir, los mismos picos a las mismas longitudes solo que, el espectro de fluorescencia de la hTPI desnaturalizada difiere del presentado en urea; el pico máximo de fluorescencia de la proteína en presencia de GuHCl tiene una intensidad de fluorescencia de un poco más de 80 u. a. (Figura 9, panel b), mientras que el de urea está por arriba de las 120 u. a.

Lo anterior hace suponer que las cargas presentes en la GuHCl influyen de alguna forma al apagamiento de la señal de fluorescencia.

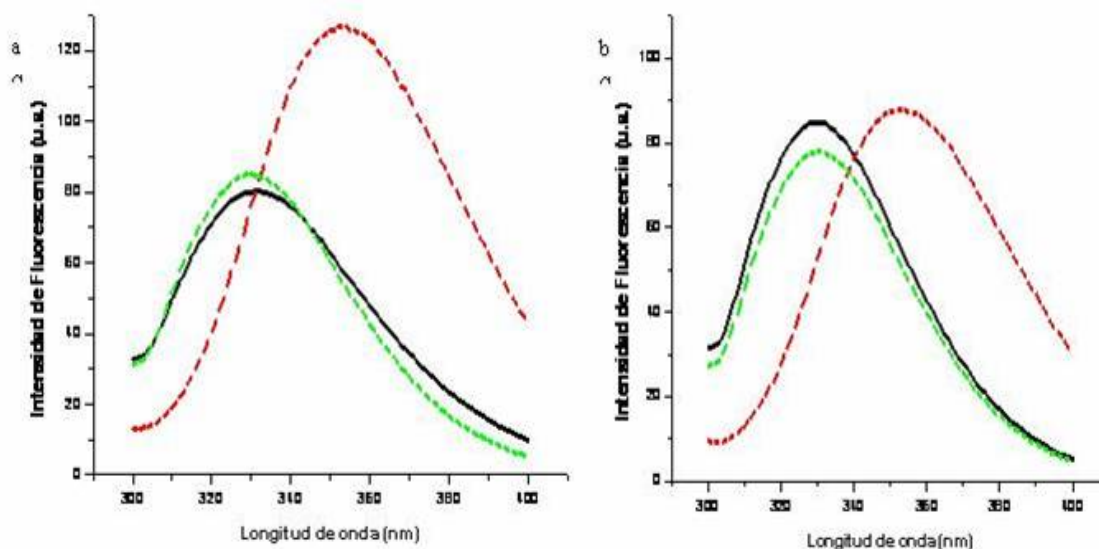


Figura 9. Espectros de fluorescencia de la hTPI en presencia de urea y GuHCl. Estructura terciaria seguida por espectros de fluorescencia de la hTPI en presencia de urea (panel a) y de GuHCl (panel b). Representada por, proteína nativa (—), desnaturizada (---) y renaturalizada (- -).

ESTUDIOS AL EQUILIBRIO

Histéresis

Para comprobar que la ruta de replegamiento hacia el estado nativo de la proteína es correcta, se realizó una cinética de desnaturalización y renaturalización tanto para urea como para GuHCl. Se desnaturizó previamente tanto en 6 M de GuHCl, como en 8 M de urea. Después se diluyó el desnaturizante hasta llegar a una concentración de 0.06 M de GuHCl y 0.08 M de urea. Éstas se incubaron a diferentes tiempos, a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, las mediciones se iniciaron a las 24 h.

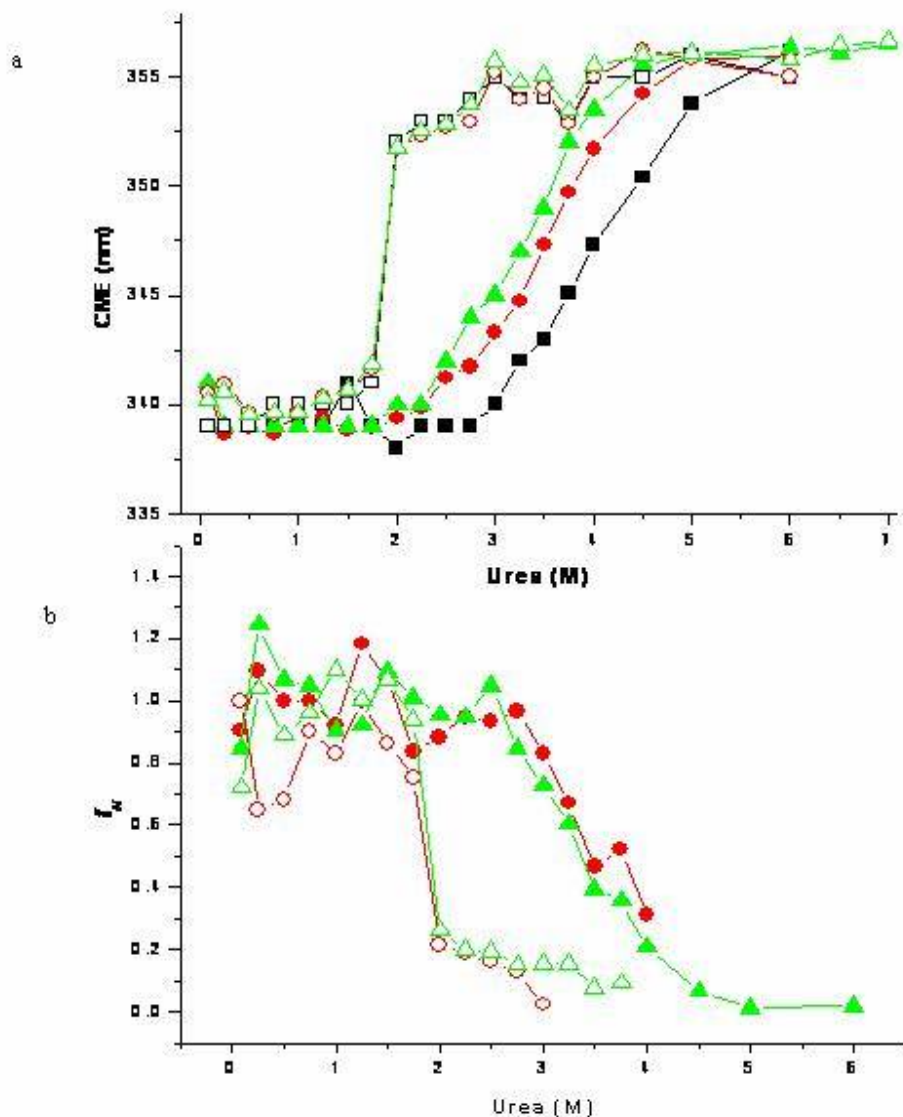


Figura 10. Histéresis entre la desnaturalización ($N \rightarrow D$) y la renaturalización ($D \rightarrow N$) de la hTPI en urea. Muestras de la hTPI (377 nM) de los experimentos $N \rightarrow D$ (símbolos llenos) y $D \rightarrow N$ (símbolos vacíos), seguidas por CME (a) y actividad catalítica (b). Las mediciones se realizaron luego de incubar por 24 (■, □), 50 (●, ○) y 70 (▲, △) h en urea.

Se observó que en las 2 rutas (de $D \rightarrow N$ y de $N \rightarrow D$), a concentraciones menores de 1 M para urea o 0.25 M de GuHCl, la actividad catalítica y los CME son muy parecidos entre sí y con la nativa (Figuras 10 y 11), por lo tanto, la renaturalización de la enzima es completamente reversible. Además, se obtuvo un

resultado similar a concentraciones altas de desnaturizante (6 M de urea y 0.8 M de GuHCl), indicando que es una proteína inactiva a dichas concentraciones y su CME muestra un patrón característico de proteínas desnaturizadas.

Para el caso de las concentraciones intermedias se observa que las señales de las muestras que van de $D \rightarrow N$ y de $N \rightarrow D$ no son coincidentes entre sí; la ruta de $D \rightarrow N$ alcanza un valor constante después de 24 h en GuHCl y luego de 48 h en urea por CME, pero no sucede así para la ruta $N \rightarrow D$, en la cual se aprecia un cambio lento hacia los valores observados para la ruta contraria. Los gráficos en las Figuras 10 y 11 muestran que los experimentos realizados en el sentido $D \rightarrow N$ alcanzaron el equilibrio, mientras que los del sentido $N \rightarrow D$ no lo hicieron. Este resultado muestra una histéresis, la cual puede deberse a que el paso de disociación, el desplegamiento, o ambos sean lentos.

Equilibrio real

A 25°C no se alcanzó un equilibrio real entre los experimentos $D \rightarrow N$ y $N \rightarrow D$ pues la primer ruta alcanzó el equilibrio en menos tiempo; debido a que en la ruta de $D \rightarrow N$ el equilibrio si se obtuvo, se decidió estudiar los efectos de la urea y del GuHCl a 37°C donde se esperaba que la cinética de renaturalización fuera más eficiente por efecto de la temperatura (Figura 12). Para facilitar el análisis y la comparación de los resultados usando diferentes técnicas, de aquí en adelante los datos se normalizaron como $\alpha(x)$ (ver determinación de parámetros termodinámicos).

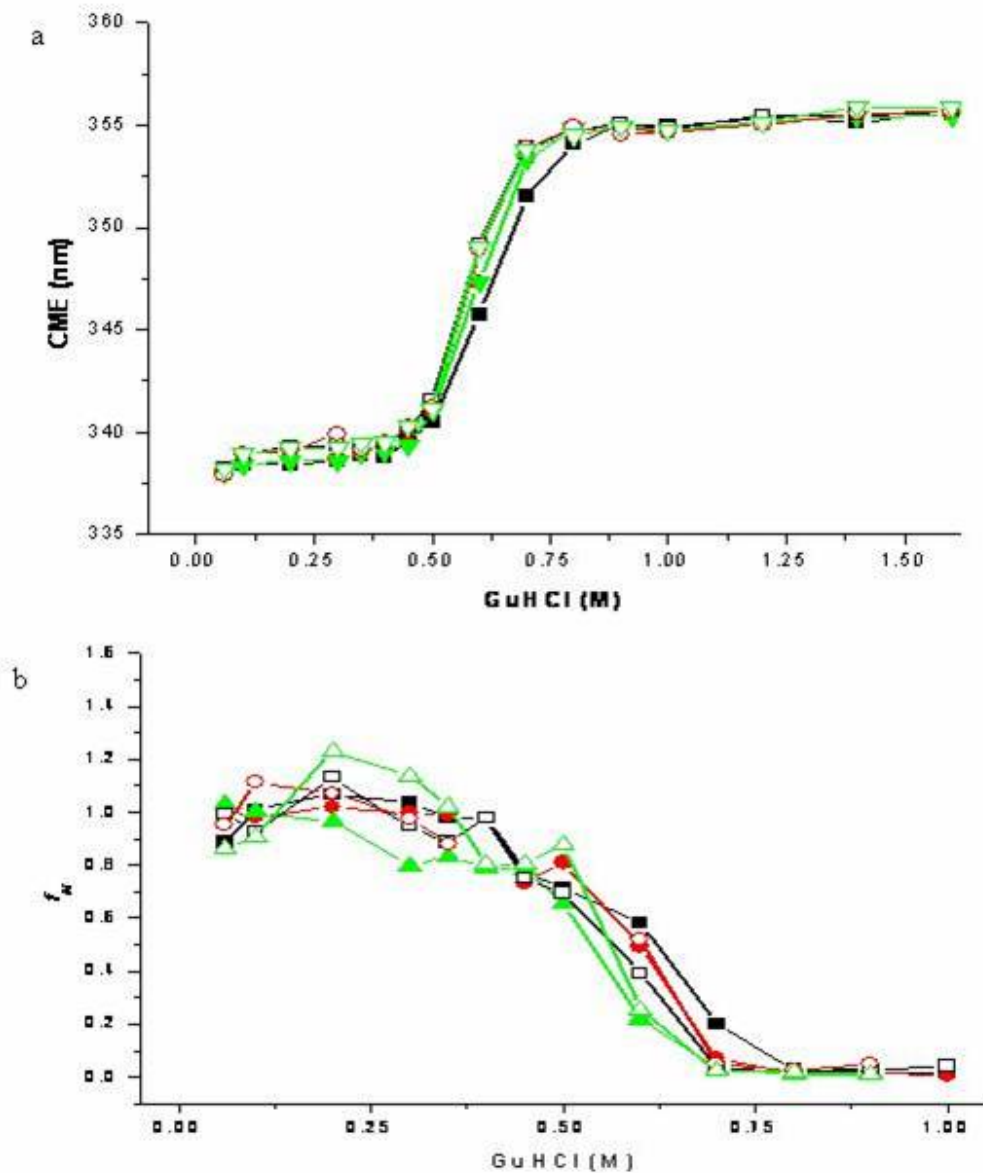


Figura 11. Histéresis entre la desnaturalización (N → D) y la renaturalización (D → N) de la hTPI en GuHCl. Muestras de la hTPI (390 nM) de los experimentos N→ D (símbolos llenos) y D→N (símbolos vacíos), seguidas por CME (a) y actividad catalítica (b). Las mediciones se realizaron después de incubar por 24 (■, □) 48 (●, ○) y 72 (▲, △) h en GuHCl.

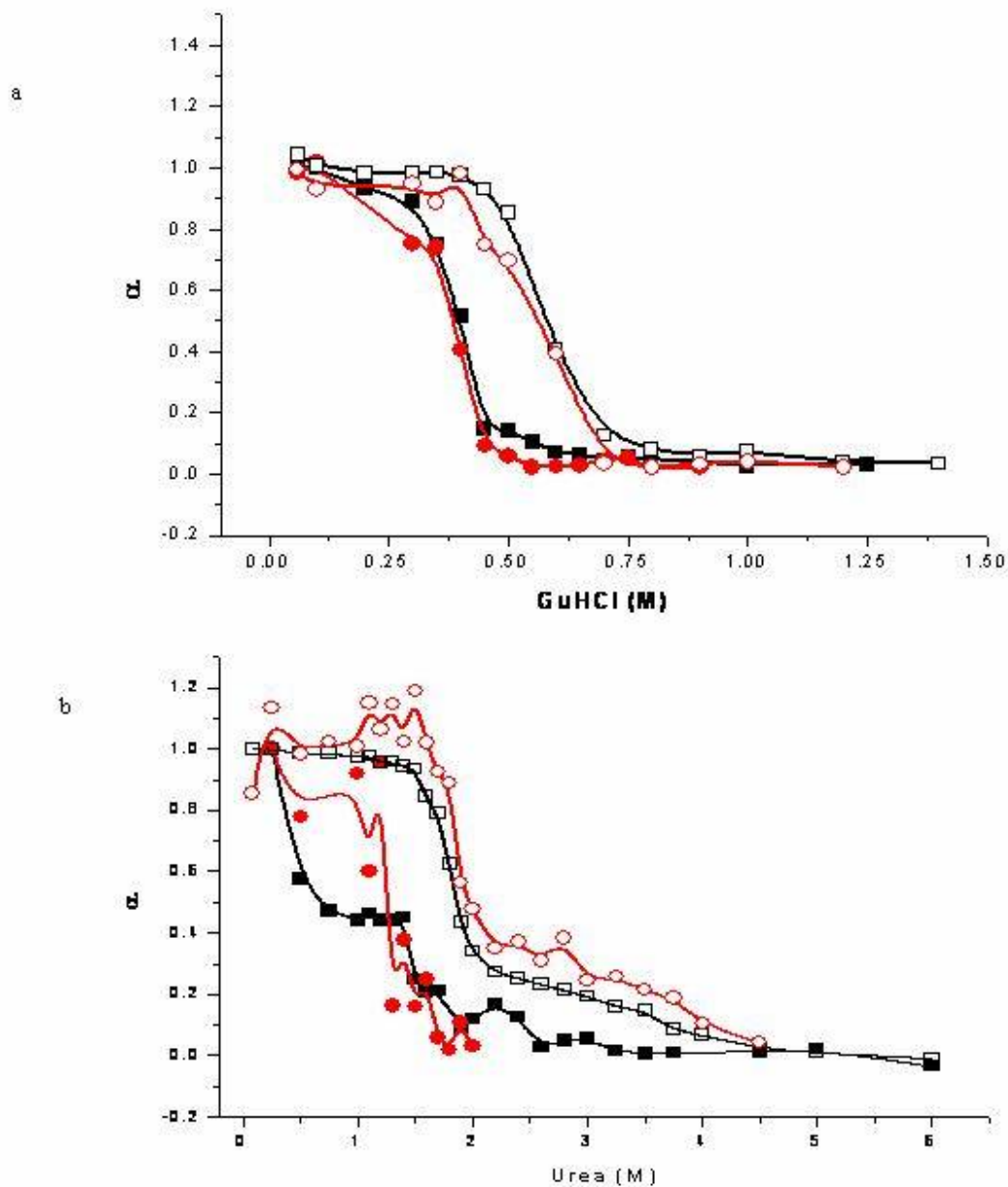


Figura 12. Comparación del CME y la actividad catalítica en el sentido D→N a 37°C y 25°C. Muestras de la hTPI (390 nM) en el sentido D→N, en GuHCl (panel a) y en urea (panel b) a 37°C (símbolos llenos) y a 25°C (símbolos vacíos), seguidos por el CME (■, □) y actividad catalítica (●, ○).

Los resultados que se obtuvieron de este experimento, muestran que la temperatura afectó la renaturalización, haciéndola más dependiente de la

concentración de desnaturalizante, ya que a temperatura de 37°C, necesitó menos concentración de desnaturalizante para alcanzar el estado renaturalizado (Figura 12).

Sin embargo, este experimento no se siguió por más tiempo debido a que, existen evidencias de que, temperaturas mayores y tiempos prolongados de incubación promueven reacciones químicas colaterales entre el desnaturalizante y las proteínas, así como la degradación de estas últimas (45).

RENATURALIZACIÓN DE LA hTPI EN PRESENCIA DE GuHCl O UREA

Considerando los resultados y la discusión de los experimentos anteriores, se tomó la decisión de analizar únicamente los experimentos en el sentido D→N, tanto a 25°C como a 37°C. Se estudio la hTPI a diferentes concentraciones (390, 195, 37.5 y 7.5 nM para GuHCl) y (377, 188.6, 37.5 y 7.5 nM para urea) a fin de observar el comportamiento de la enzima a diferentes concentraciones y su dependencia por el desnaturalizante.

Para el caso de los datos obtenidos a diferentes concentraciones de enzima en presencia de GuHCl a 25°C, la fluorescencia y la actividad catalítica muestran una ruta de una sola transición (Figura 13).

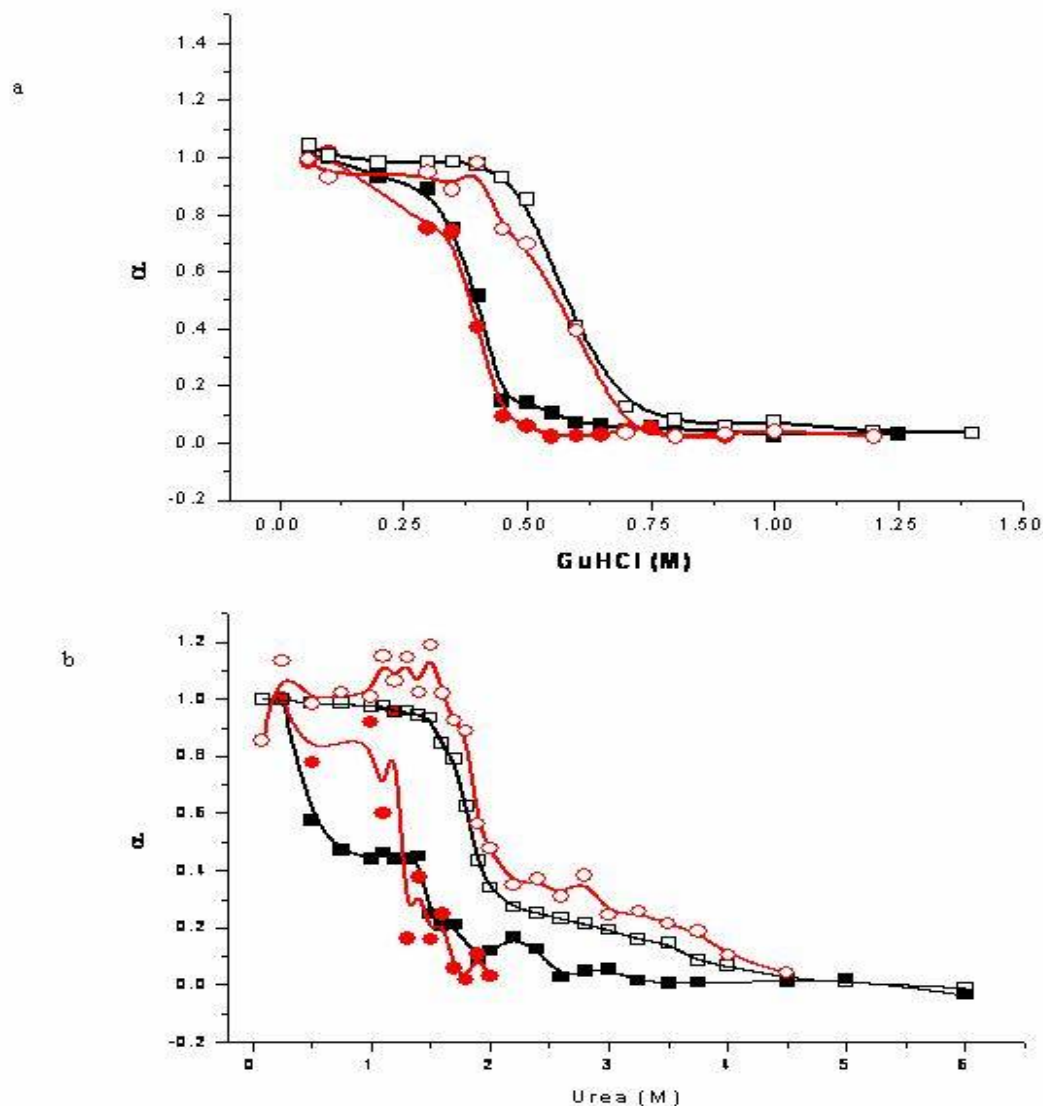


Figura 13. Análisis para la renaturalización (D→N) de la hTPI en presencia de GuHCl. Cambios normalizados para los experimentos D→N a ajustados al modelo de dos estados (Panel a) y a tres estados (Panel b), seguidos por CME a 390 (■), 195 (●) nM de hTPI, y actividad catalítica a 390 (□), 195 (○), 37.5 (△) y 7.5 (▽) nM de hTPI.

En concentraciones altas de GuHCl (1 a 0.75 M) se observa señal por parte de los aminoácidos aromáticos sin evidencia de actividad enzimática, sin embargo, a concentraciones decrecientes de desnaturalizante (0.65 a 0.3 M) se observa un aumento en la actividad y un ocultamiento parcial por parte de los aa; a

concentraciones menores (de 0.3 a 0.06 M) la proteína es completamente nativa y ha recuperado su actividad catalítica. El ajuste del panel “a” se realizó con un modelo de dos estados, mientras que el del panel “b” se ajustó a un modelo de tres estados, en ambos casos, los datos ajustaron satisfactoriamente, sugiriendo que no es clara la presencia de un intermediario pero tampoco se le descarta, ya que, aún al no presentarse una meseta u hombro que indique que un intermediario esta presente, las técnicas no son totalmente coincidentes.

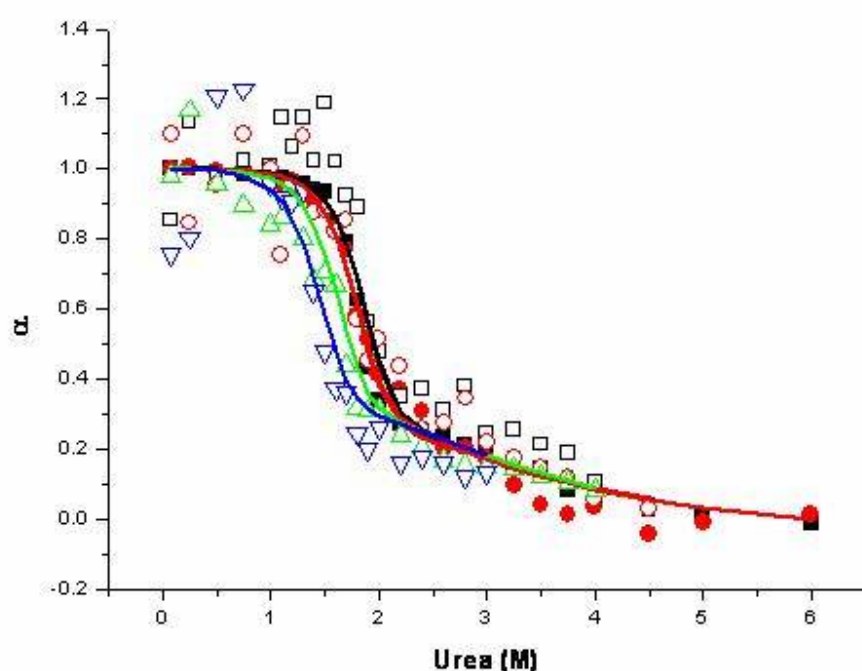


Figura 14. Análisis para la renaturalización (D→N) de la hTPI en presencia de urea. Cambios normalizados para los experimentos D→N seguidos por CME a 377.2 (■), 188.6 (●) nM de hTPI, y actividad catalítica a 377.2 (□), 188.6 (○), 37.5 (△) y 7.5 (▽) nM de hTPI.

Al realizar el análisis para los datos obtenidos en presencia de urea a diferentes concentraciones, el ajuste mostró que existe un intermediario el cual puede ser activo, ya que se observó una ruta con 2 transiciones (Figura 14). Esto ayudó a respaldar la suposición que se tenía con GuHCl sobre la presencia del intermediario. A concentraciones elevadas de urea (6 a 4.5 M) hay poca señal por parte de los aa aromáticos y no se advierte actividad catalítica; pero al disminuir la

concentración del desnaturalizante (4 a 2 M) la actividad comienza a recobrase, la señal de fluorescencia cambia, y es posible observar una meseta en la ruta; como la proteína no esta completamente nativa, pero la actividad que presenta es significativa, quizá se deba a la presencia de un intermediario activo, debido a que la actividad catalítica comienza en la primera transición, puede tratarse de un intermediario monomérico activo. A concentraciones menores del desnaturalizante (1.5 a 0.08 M) la proteína ha recuperado su actividad y es completamente nativa.

Debido a que en los ajustes hechos para guanidina se utilizaron tanto el modelo de dos estados como el de tres y que ambos obtuvieron un buen resultado para el ajuste es difícil deliberar si existe o no un intermediario. Debido a que la hTPI es una enzima dimérica, la renaturalización debiera tener un paso bimolecular, sin embargo, para los datos de GuHCl se observa una sola transición, no obstante, al ajustar convenientemente en ambos modelos (Figura 13) y siendo que en urea el ajuste es aceptable para el modelo de tres estados, resulta más adecuado elegir la opción de un modelo de tres estados para la renaturalización; aunque en GuHCl no es muy marcado en que estado o forma se encuentra el intermediario, es decir, si es activo o inactivo, monomérico o dimérico.

Sin embargo, el ajuste realizado con los datos de urea muestra una presencia más clara del intermediario, su actividad es perceptible, y se puede apreciar estructura terciaria, además de la evidente presencia de una meseta en la ruta. El espectro de fluorescencia intrínseca muestra residuos aromáticos expuestos (datos no mostrados). Se han reportado espectros de fluorescencia similares para experimentos en el sentido N→D (35) y en el D→N (32) pero sin intermediarios activos. Lo anterior sugiere fuertemente que el mecanismo de tres estados que se suponía en GuHCl se pone de manifiesto en urea.

De los 2 modelos utilizados, el modelo más simple es el de dos estados $2D \rightleftharpoons N$, donde sólo tenemos a la proteína en estado desnaturalizado como 2 monómeros desnaturalizados, con una sola transición al estado nativo como dímero activo nativo, con este modelo el ajuste fue aceptable para el caso de guanidina.

Con el modelo de tres estados $N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$, ambos desnaturalizantes ajustaron convenientemente, es por ello, que resulta un tanto impreciso definir la presencia o no de un intermediario. Pues al ajustar favorablemente ambos modelos para GuHCl no es posible definir si existe o no intermediario. Favorece un poco el hecho de que en urea solo es posible el ajuste a un modelo de tres estados por la evidente presencia de la meseta. Esto invita a inclinarse por la opción del modelo de tres estados.

Cálculos de estabilidad para la hTPI

Los datos utilizados para calcular los cambios de energía libre (de Gibbs) asociado con las transiciones, es decir, el replegamiento del monómero (ΔG_{pleg}) y la asociación de los mismos (ΔG_{asoc}) son los datos de la ruta $D \longrightarrow N$, debido a que son estos datos los que alcanzaron el equilibrio. Ya que con los experimentos hechos en este trabajo se obtuvieron datos con dos desnaturalizantes y dos técnicas diferentes, es posible obtener parámetros termodinámicos con diferentes juegos de datos, estos valores, esencialmente, deberían ser independientes de los datos utilizados. Referente a esto, el ΔG_{pleg}^0 , ΔG_{asoc}^0 y el ΔG_{tot}^0 , se evaluaron de 6 distintas maneras. En todos los ajustes, las señales normalizadas del monómero desnaturalizado se fijaron a $y_D = 0$ y del dímero nativo a $y_N = 1$. Para el caso de los ajustes con un modelo de tres estados, la señal normalizada del intermediario y_M fue tomada como un parámetro ajustable usando los datos espectroscópicos.

De acuerdo con la Tabla 1, la alternativa 1 corresponde al ajuste realizado con el modelo de dos estados con todos los datos provenientes de la hTPI en GuHCl a $25^\circ\text{C} \pm 1$ a diferentes concentraciones. La alternativa 2 corresponde al ajuste realizado con el mismo modelo en GuHCl pero a $37^\circ\text{C} \pm 1$, este ajuste solo se realizó a concentración de 390 nM.

En la Tabla 2, todos los ajustes mostrados se realizaron con el modelo de tres estados. La alternativa 3 corresponde al ajuste hecho con todos los datos provenientes de los experimentos realizados con la hTPI en urea a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ a diferentes concentraciones. La alternativa 4 corresponde al ajuste hecho con todos los datos provenientes de los experimentos realizados con la hTPI en urea pero a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, este ajuste solo se realizó a concentración de 377.3 nM de hTPI. La alternativa 5 corresponde al ajuste hecho con todos los datos provenientes de los experimentos realizados con GuHCl a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ a diferentes concentraciones. La alternativa 6 corresponde al ajuste realizado con todos los datos provenientes de los experimentos realizados tanto con GuHCl como con urea a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ a diferentes concentraciones. En todos los ajustes realizados con el modelo de tres estados el valor de y_M es compartido entre los datos provenientes de CME y los de actividad catalítica a diferentes concentraciones.

Ajuste	ΔG_{tot}^0 (kcal mol ⁻¹)	m_{tot} (kcal mol ⁻¹ · M ⁻¹)
Alternativa 1	-17.37 ± 0.12	15.2 ± 0.01
Alternativa 2	-13.34 ± 0.08	12.68 ± 0.02

Tabla 1. Estabilidad de la hTPI a 25°C y 37°C y pH 7.4. Ajustes realizados con el modelo de dos estados.

Ajuste	ΔG_{asoc}^0 (kcal mol ⁻¹)	m_{asoc} (kcal mol ⁻¹ · M ⁻¹)	ΔG_{pleg}^0 (kcal mol ⁻¹)	m_{pleg} (kcal mol ⁻¹ · M ⁻¹)	ΔG_{tot}^0 (kcal mol ⁻¹)
Alternativa 3 ^ε	-18.99 ± 0.79	5.36 ± 0.47	-1.60 ± 0.36	0.60 ± 0.12	-22.21
Alternativa 4 ^κ	-10.42 ± 3.65	1.63 ± 2.27	-3.46 ± 8.95	2.21 ± 5.95	-17.33735
Alternativa 5 [§]	-16.58 ± 2.32	11.08 ± 7.59	-3.48 ± 2.24	6.93 ± 1.97	-23.54
Alternativa 6 ^ψ	-21.90 ± 1.86	7.26 ± 1.04 (urea)	-2.65 ± 0.29	0.90 ± 0.03 (urea)	-27.20
		22.15 ± 4.82 (GuHCl)		2.58 ± 7.64 (GuHCl)	

Tabla 2. Estabilidad de la hTPI a 25°C y 37°C y pH 7.4. ^ε y_M (CME) = 0.41 y y_M (Act Catalítica) = 0.44 fueron tomados como constantes, son los promedios obtenidos en ajuste previo (no mostrado), ^κ y_M = 0.30 ± 1.0 usado como parámetro de ajuste, [§] y_M = 0, ^ψ y_M = 0.45 ± 0.07 fue tomado como parámetro de ajuste.

De los ajustes hechos con los datos obtenidos en este trabajo se expone lo siguiente: al hacer las comparaciones entre las alternativas de la tabla 1, que corresponden a los datos de GuHCl a 25 y 37°C ± 1, se observa que el valor del ΔG_{tot}^0 es considerablemente diferente a 25°C que a 37°C, habiendo una diferencia de 4 kcal mol⁻¹ entre ambos, lo cual indica que, la temperatura afecta el cambio en energía libre haciendo a la proteína menos estable a temperaturas más elevadas (37°C).

Algo muy parecido pasa con las alternativas 3 y 4, donde también se comparan los datos obtenidos a 25 y 37°C ± 1, pero esta vez en urea. Al igual que con GuHCl, la diferencia de energía libre entre una alternativa y otra es de casi 5 kcal mol⁻¹, haciendo nuevamente menos estable a la enzima a 37°C. Lo anterior indica que la hTPI es sensible al cambio de temperatura o “termolabil” y que a temperaturas mayores de 25°C pueden estarse presentando cambios que afecten su estructura y funcionalidad haciéndola menos eficiente.

En la Tabla 2, los valores obtenidos para ΔG_{asoc}^0 y ΔG_{pleg}^0 de las alternativas 3 y 5 son muy parecidos entre sí, y en estas el ΔG_{asoc}^0 es mayor que el ΔG_{pleg}^0 lo que supone, el paso de nativa a monómeros disociados es mas favorable que el de monómeros disociados a monómeros desplegados. El solo es parecido entre estas alternativas.

Si se realiza una comparación entre las alternativas realizadas con un modelo de tres estados se observa que tanto el desplegamiento como la disociación son termodinámicamente equivalentes en ambos desnaturalizantes. Además se corrobora lo observado previamente para otras proteínas, es el hecho de que los valores de m para GuHCl son siempre más grandes que los de urea (Tabla 2).

Ya que los datos de los experimentos realizados en GuHCl ajustaron convenientemente tanto para el modelo de dos estados como el de tres y dado que urea solo ajustó al modelo de tres estados, se decidió realizar un ajuste global (alternativa 6), incluyendo todos los datos provenientes tanto de urea como de GuHCl, así que, se obtuvo un ajuste más robusto el cual esta más acorde con ambos desnaturalizantes, disminuyendo el error que pudiesen presentar los ajustes previos debido al ruido experimental, es por ello que esta alternativa, mostró un ΔG_{asoc}^0 y ΔG_{tot}^0 mayor que cualquiera de las alternativas anteriores, el ΔG_{pleg}^0 fue intermedio entre las alternativas 3 y 5.

Se eligió la alternativa 6 como la opción que mejor ajusta al comportamiento de la hTPI en la ruta del plegamiento, ya que a pesar de que la enzima ajustó bien al modelo de dos estados en GuHCl, el hecho de que también ajustara favorablemente al modelo de tres, y que urea solo ajustara por este último modelo, llevó a pensar que el mejor ajuste para la hTPI es por el modelo de tres estados, en el cual, la presencia del intermediario se torna evidente, y la proteína claramente ajusta a una ruta con dos transiciones. El valor del intermediario en esta alternativa (0.45 ± 0.07) es similar al obtenido en las alternativas previas e indica que sus aa aromáticos no se encuentran totalmente expuestos y que su actividad ya es considerable.

Es importante reafirmar que es la primera vez que se reporta un intermediario monomérico activo. Aunque son necesarios experimentos con otras técnicas para saber más acerca de él, como el radio de Stokes de la hTPI con este intermediario, dicroísmo circular, radio de giro, así como estudiar las mutantes y ver el comportamiento del intermediario en ellas o si se presenta o no.

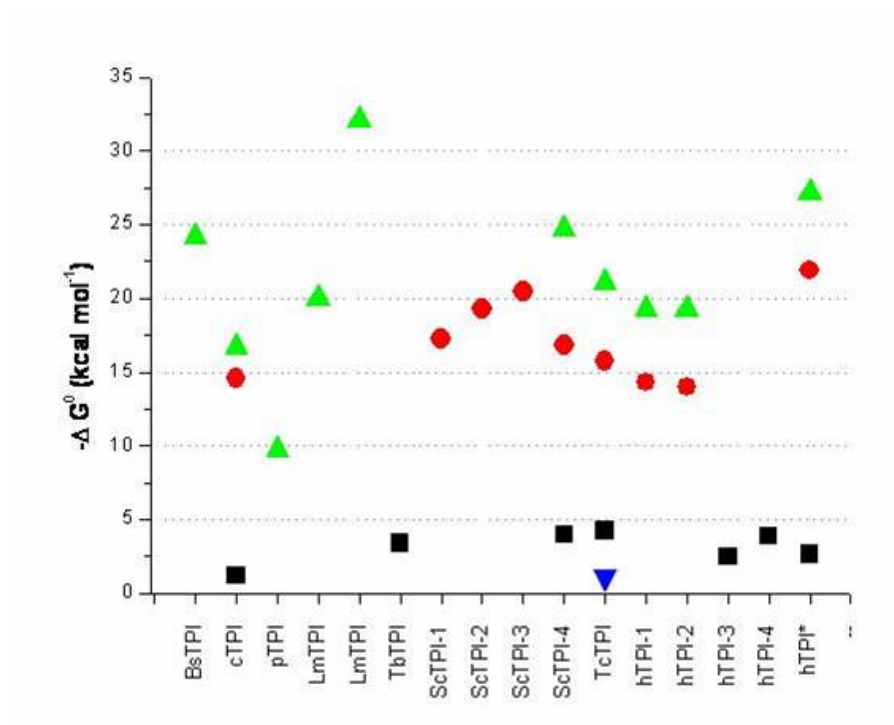


Figura 15. Estabilidad de la TPI de diferentes especies. Los datos que se presentan a continuación son para enzimas silvestres a 25°C y pH 7.4, salvo en los casos que se indique. ΔG°_{pleg} (■), ΔG°_{asoc} (●), ΔG°_{tot} (▲), $\Delta G^{\circ}_{plegdim}$ (▼). El código para el eje de las x es el siguiente, BsTPI: TPI de *Bacillus stearothermophilus* (33), cTPI: TPI de conejo (34), pTPI: TPI de pollo a 30.4 °C (46), LmTPI-1: TPI de *Leishmania mexicana* a pH 7.5 (47), LmTPI-2: mutante E65Q a pH 7.7 (47), TbTPI: mutante monomérica de la TPI de *Trypanosoma brucei* a pH 6.8 (46), ScTPI-1: TPI de *Saccharomyces cerevisiae* ΔG°_{asoc} promedio a pH 7.2 (35), ScTPI-2: ΔG°_{asoc} extrapolación a 25°C de la desnaturalización / renaturalización por temperatura (31), ScTPI-3: ΔG°_{asoc} promedio calculado de datos estructurales y parámetros de solvatación (48), y ScTPI-4: TPI de *Saccharomyces cerevisiae* a pH 7.4 (32), TcTPI: TPI de *Tripanosoma cruzi* a pH 7.4 (36), hTPI-1: TPI de humano a pH 8.0 (27), hTPI-2: ΔG°_{asoc} de ref. (27) y ΔG°_{tot} de ref. (33), hTPI-3: M14Q/R98Q mutante monomérica (27, 33), hTPI-4: M14Q / R98Q / Q179D / K193A / A215P mutante monomérica (33), hTPI-5: datos de este trabajo (tabla 2, alternativa 6).

La Figura 15 muestra todos los datos disponibles acerca de la estabilidad termodinámica de la TPI de diferentes especies. En estas caracterizaciones se utilizó el modelo de dos estados ($2D \rightleftharpoons N$), empleando transiciones monofásicas. Por consiguiente, solo se han reportado los cambios en energía libre involucrando un intermediario a partir de datos cinéticos para la TPI de conejo (34), la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* (31, 32), o de mutantes monoméricas de la TPI de humano (27, 33). Para el caso de la hTPI estudiada en este trabajo, (última opción de la Figura 14), el intermediario es monomérico y activo, está ajustada al modelo de tres estados ($2D \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons N$) en el sentido $D \rightarrow N$. Las demás caracterizaciones termodinámicas de la estabilidad de la TPI en la figura 14 (a excepción de la nuestra), usaron experimentos solo en el sentido $N \rightarrow D$ y no alcanzan el equilibrio, esto, debido a que esta ruta es mucho más lenta que la ruta $D \rightarrow N$, una posible consecuencia de esto es precisamente el indicio de la existencia de un intermediario, es decir, transiciones bifásicas y la no coincidencia de las técnicas, pueden haber pasado desapercibidas en estudios anteriores (ver figuras 5 y 6, comparando símbolos llenos contra vacíos). Además, en transiciones complejas y ocupando una sola técnica y/o un solo desnaturalizante, es muy probable que la confianza de los parámetros de estabilidad calculados este muy disminuida.

Es por ello que algunos de los valores plasmados en la literatura pueden entrar en discusión, como en el caso de los resultados publicados para la hTPI y mutantes creadas por Mainfroid y col. en 1996 (27), donde su caracterización termodinámica se realizó en el sentido de $N \rightarrow D$, y donde las técnicas no son comparadas una contra otra, sino solamente se muestran resultados por separado. En la presente tesis, se comprobó que el sentido $N \rightarrow D$ no es el mejor, y que con el sentido inverso, los resultados son confiables, además de que las técnicas son comparadas unas con otras, obteniendo resultados diferentes a los publicados, pues en estos últimos se afirma que la hTPI presenta un modelo de una sola transición $2D \rightleftharpoons N$, sin presencia de intermediario. Esto resulta ser totalmente contrario a lo obtenido en este trabajo.

No obstante, existe una clara relación entre los valores en energía libre para las transiciones de asociación y plegamiento, pues en todas las TPIs estudiadas el ΔG^0_{asoc} es más grande que el ΔG^0_{pleg} .

CONCLUSIONES

- La hTPI presentó histéresis cinética en la ruta $N \rightarrow D$, no siendo así para la ruta inversa, es por ello que se eligió la ruta $D \rightarrow N$ como la mejor opción para estudiar sus parámetros cinéticos y termodinámicos de forma confiable.
- Al estudiar la proteína a temperatura corporal (37°C) se observó que la proteína se vuelve más dependiente de la concentración de desnaturalizante que a 25°C (temperatura ambiente).
- Los ajustes realizados a los datos obtenidos en presencia de GuHCl, donde se ajusta la proteína a un modelo de dos y tres estados, sugieren la presencia de un intermediario, aunque en éste no se puede afirmar del todo su existencia, la no coincidencia entre técnicas y el buen ajuste con los dos modelos lo sugieren.
- Los ajustes realizados con los datos obtenidos en presencia de urea corroboran la suposición anterior, pues en estos, además de ser un ajuste de tres estados, en el que se propone un intermediario, es más evidente la presencia de una meseta y las técnicas no son coincidentes.
- En literatura previa no se había propuesto la presencia de un intermediario para la hTPI, ni mucho menos que este intermediario fuese activo. En el presente trabajo, los resultados obtenidos parecen indicar que existe el intermediario y que sus características son de uno que es monomérico y activo.
- La triosafosfato isomerasa de humano resultó ser más estable a 25°C que a 37°C , no importando en que desnaturalizante se encuentre, ya sea urea o GuHCl.
- La hTPI mostró una estabilidad mayor con el modelo de tres estados, siendo éste el elegido como el modelo que mejor ajustó a los datos, reflejando el comportamiento de la enzima, ya que la presencia del intermediario es evidente y su estado monomérico activo se respalda en este ajuste.

- De este ajuste (alternativa 6 de la tabla 2) se obtuvo un $\Delta G_{\text{pleg}}^0 = -2.65 \pm 0.29$ kcal mol⁻¹, un $\Delta G_{\text{asoc}}^0 = -21.90 \pm 1.86$ kcal mol⁻¹ y un $\Delta G_{\text{tot}}^0 = -27.20$ kcal mol⁻¹.

PERSPECTIVAS

Es necesario conocer más acerca del plegamiento y asociación de proteínas oligoméricas a fin de constatar si realmente existe un código de plegamiento que prediga el tipo de plegamiento que tendrá en su forma biológicamente activa una cadena lineal de aminoácidos dada. Es importante continuar con el estudio detallado y a profundidad de las características estructurales y el estado de asociación de la hTPI en diferentes condiciones y con otros parámetros a fin de descartar o afirmar la presencia del intermediario.

Se propone realizar experimentos de Radio de Stokes para conocer las características estructurales y corroborar el estado de asociación del intermediario en la ruta de renaturalización del hTPI. Generar las 3 mutantes de la hTPI involucradas en desordenes conformacionales: Glu 104 Asp, Gly 122 Arg y Phe 122 Leu. Estudiarlas termodinámicamente, a fin de conocer sus características estructurales y parámetros termodinámicos y saber si existe o no un intermediario en su cinética de renaturalización.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pacheco, L. D. (2004). Estructura y función de aminoácidos y proteínas, Estructura, función y clasificación de las enzimas. En: Bioquímica médica. (1a Ed). Grupo Noriega Editores. Editorial Limusa, México. pp: 95-194.
2. Creighton T. E. (1997). PROTEINS. Structures and molecular properties. (5ª Ed). Freeman and Company. Nueva York. 507 páginas.
3. Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G. y Pérez-Montfort. R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from Trypanosoma brucei: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. Arch. Biochem. Biophys. **399**: 117-129.
4. Nelson D. L. y Cox M. M. (2000). Lehninger. Principles of Biochemistry. (3ª Ed). Worth Publishers, Nueva York, EUA. 1152 páginas.
5. Mathews, C. D., van Holde, K. E. y Ahern, K. G. (2002). Bioquímica... 3ra Edición. Editorial Pearson Addison Wesley. Madrid. España. 1368 páginas.
6. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. Science **181**: 223-230.
7. Gómez-Moreno, C. C. y Sancho, S. J. (2004). Plegamiento de proteínas y enfermedades relacionadas. En: Estructura de Proteínas. (1a Ed) Ariel, España. pp: 201-231.
8. Gekko, K. y Timasheff, S. N. (1981). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. Biochemistry **20**: 4677-4686.
9. Dobson, M. C. (2003). Protein folding and misfolding. Nature **426**: 884-890.
10. Chitti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. y Dobson, M. C. (1999). Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 3590-3594.
11. Fändrich, M., Fletcher, M. A. y Dobson, M. C. (2001). Amiloid fibrils from muscle myoglobin. Nature **410**: 165-166.
12. Buxbaum, J. N y Tagoe, C. E. (2000). The genetic of the amyloidoses. Annu. Rev. Med. **51**: 543-569.

13. Cohen, E. F. y Kelly, W. J. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**: 905-909.
14. Muchowski, J. P. (2002). Protein Misfolding, Amyloid Formation and Neurodegeneration: A Critical Role for Molecular Chaperones? *Neuron* **35**: 9-12.
15. Mason, M. J., Kokkoni, N., Stott, K., Doig, J. A. (2003). Design strategies for anti-amyloid agents. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 526-532.
16. Meier-Ruge, W. A. y Bertoni-Freddari, C. (1997). Pathogenesis of decreased glucose turnover and oxidative phosphorylation in ischemic and trauma-induced dementia of the Alzheimer type. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **826**: 229-241.
17. Oláh, J., Orosz, F. Keserű G. M., Kovári, Z., Kovács, J., Hollán, S. y Ovádi, J. (2002). Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 30-38.
18. Daar, I. O., Artymiuk, P. J., Phillips, D. C. y Maquat, L. E. (1986). Human triose-phosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 7903-7907.
19. Knowles, J. R. y Alberly, J. W. (1977). Perfection in enzyme catalysis: The energetics of Triosephosphate Isomerase. *Acc. Chem. Res.* **10**:105-111.
20. Hollán, S., Dey, I., Szollár, L., Horányi, M., Magócsi, M., Harsányi, V. y Farkas, T. (1995). Erythrocyte lipids in triose-phosphate isomerase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 268-271.
21. Blacklow, S., Raines, R., Lim, W., Zamore, P. y Knowles, J. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry* **27**: 1158-1167.
22. Banner, D., Bloomer, A., Petsko, A., Phillips, D., Pogson, C., Wilson, I., Corran, P., Furth, A., Milman, J., Offord, R., Priddel, J. y Waley, S. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature.* **255**: 609-614.
23. Mathews, C. D., van Holde, K. E. y Ahern, K. G. (2002). Metabolismo de los hidratos de carbono I: Procesos anaeróbios en la generación de energía

metabólica. En: Bioquímica.. 3ra Edición. Editorial Pearson Addison Wesley. Madrid. España. 1368 páginas.

24. Peimbert, M., Domínguez-Ramírez, L., Téllez, L., Blancas, L. y Fernández-Velasco, D. A. (2007). Chapter 11. Triosephosphate Isomerase (en preparación).

25. Lambeir, A., Opperdoes, F. R. y Wierenga, R. K. (1987). Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* **168**: 69-74.

26. Schnackerz, K. D. y Gracy, R. W. (1991). Probing the catalytic sites of triosephosphate isomerase by ³¹P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *Eur. J. Biochem.* **199**: 231-238.

27. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. y Goraj, K. (1996) (b). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* **257**: 441-456.

28. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**: 9655-9662.

29. Ferreira, T. S. y De Felice, G. F. (2001). Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS Letters* **498**: 129-134.

30. Rietveld, A. W. y Ferreira, S. T. (1996). Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**: 7743-51.

31. Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (2001). Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of **dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein**. *Biochemistry* **40**: 9049-9058.

32. Nájera, H., Costas, M. y Fernández-Velasco, D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding. Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**: 785-792.

33. Mainfroid, V., Mande, S., Hol, W., Martial, J. y Goraj, K. (1996) (a). Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual α -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* 35: 4110-4117.
34. Rietveld, A. W. y Ferreira, S. T. (1998). Kinetics and energetics of subunit dissociation / unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* 37: 933-937.
35. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y. y Dobson, C. M. (2000). A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 300: 11-16.
36. Chanez-Cárdenas, M. E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar B. G., Miguel, C., y Vázquez-Contreras, E. (2005). Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* 44: 10883-10892.
37. Schneider, A. y Cohen-Solal, M. (1996). Hematologically important mutations: triosephosphate isomerase. *Blood Cells Mol. Dis.* 22: 82-84.
38. Orosz, F., Vertéis B. G., Hollán, S., Horányi, M. y J. Ovádi. (1996) Triosephosphate isomerase deficiency: predictions and facts. *J. Theor. Biol.* 182: 437-447.
39. Ationu, A., Humphries, A., Bellingham, A. y Layton M. (1997). Metabolic correction of triose phosphate isomerase deficiency in vitro by complementation. *Biochem Biophys Res Commun.* 232:528-531.
40. Perry, B. A. y Mohrenwieser, H. W. (1992) Human triosephosphate isomerase: substitution of Arg for Gly at position 122 in a thermolabile electromorph variant, TPI-Manchester. *Hum. Genet.* 88: 634-638.
41. Mande, S., Mainfroid, V., Kal, K., Goraj, K., Martial, J. y Hol, W. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. *Protein Sci.* 3, 810-821.

42. Pace, C., Vadjos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). How the measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4: 2411-2423.
43. Téllez, V. A., Àvila, R. S., Pérez, M. R., Rodríguez, R. A., Tuena, de G. P. M., López, C. F. y Gómez P. A. (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *BBRC.* 295: 958-963.
44. Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A. y Gracy, R. W. (1971). Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 146: 312-320.
45. Stark, G. R. (1965). Reactions of cyanate with functional groups of proteins. IV. Inertness of aliphatic hydroxyl groups. Formation of carbamyl- and acylhydantoins. *Biochemistry* 4: 2363-2367.
46. McVittie, J., Esnouf, M. P. y Peacocke, A. R. (1977). The denaturation-renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* 81: 307-315
47. Lambeir, A. Backmann, J., Ruiz.Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B.V. y Wirenga, R. K. (2000). The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* 267: 2516-2524.
48. Lolis, E., Aber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., y Petsko, G. A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 29: 6609-6618.