



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA
TRIOSAFOFATO ISOMERASA DE HUMANO
MEDIANTE PROTEÓLISIS LIMITADA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

JOSÉ IGNACIO DE LA MORA DE LA MORA

DIRECTOR DE TESIS: Dr.GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

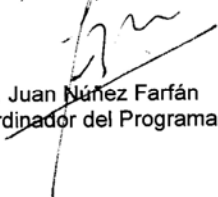
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de Febrero de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **JOSÉ IGNACIO DE LA MORA DE LA MORA** con número de cuenta **85224690** con la tesis titulada "**Análisis estructural y funcional de la triosafosfato isomerasa de humano mediante proteólisis limitada**", realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ**.

Presidente: DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ
Vocal: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Secretario: DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ
Suplente: DR. HORACIO REYES VIVAS
Suplente: DRA. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 18 de Abril de 2008.



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del comité tutorial por las imprescindibles sugerencias y aportaciones para la elaboración y enriquecimiento de este trabajo.

DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARRÉZ (*INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM*)

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA (*FACULTAD DE MEDICINA, UNAM*)

DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ (*INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, SS*)

Asímismo, agradezco a los miembros del jurado por sus acertados comentarios en la revisión de esta tesis.

DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ

DR. HORACIO REYES VIVAS

El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de los proyectos J37071-B y J43022-M. Dicha institución también otorgó una beca individual para estudios de Maestría que abarcó desde agosto del 2006 hasta enero de 2008.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría S.S.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y permitirme la formación; culminando de ésta forma este logro.

De igual manera, agradezco a todos los miembros del laboratorio de Bioquímica Genética por su invaluable comprensión, apoyo y asesoría en el desarrollo del presente trabajo. De manera muy especial a la Dra. Gloria Hernández Alcántara, Dra. Karla Carvajal Aguilera y al M. en C. Sergio Enríquez Flores. Por la motivación y entusiasmo del Dr. Horacio Reyes Vivas para guiar y llevar a buen término el presente trabajo de investigación, así como por mostrarme su interés e inculcarme el gusto por la investigación y el estudio de ésta proteína escuela.

De igual forma y de manera muy especial quiero dar las gracias al Dr. Gabriel López Velázquez por la dirección de este trabajo, por su apoyo incondicional tanto laboral como académico y por haber depositado en mí su confianza.

DEDICATORIA

INDICE GENERAL

	PÁGINA
INDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS	I
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Características del gen de la HuTIM	
1.2.- Defectos en el gen de la HuTIM	
1.3.- Importancia de la HuTIM	
1.4.- Referencias bibliográficas relacionadas con la deficiencia de la triosafosfato isomerasa (TPI1)	2
1.5.- Características de la enzima triosafosfato isomerasa	
1.6.- Condiciones que generan la variación electroforética en la TIM	5
1.7.- Modificaciones postraduccionales	8
1.7.1.- Desamidación en la TIM	
1.7.2.- Oxidación en la TIM	9
2.- ANTECEDENTES	10
2.1.- La triosafosfato isomerasa como objeto de estudio	
2.2.- Proteólisis limitada en la TIM	11
3.- JUSTIFICACIÓN	15
4.- OBJETIVOS	16
4.1.- General	
4.2.- Particulares	
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1.- Sobreexpresión y purificación de la enzima recombinante	
5.1.1.- Determinación de concentración de proteína	18
5.2.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA PROTEOLÍZADA	
5.2.1.- Digestión proteolítica de la HuTIM	
5.2.2.- Digestión proteolítica bajo diferentes relaciones molares	
5.2.3.- Digestión proteolítica en curso temporal	
5.3.- Escalamiento de la digestión proteolítica	19
5.4.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL	
5.4.1.- Electroforesis desnaturalizante	
5.4.2.- Electroforesis nativa	
5.4.3.- Doble dimensión electroforética	20
5.5.- Documentación de geles y análisis densitométrico	
5.6.- Secuenciación del NH - terminal de los péptidos	
5.7.- Separación por HPLC	21
5.7.1.- Cromatografía de intercambio iónico	
5.7.2.- Concentración de las fracciones obtenidas a partir de la columna Q-Resource	
5.7.3.- HPLC de exclusión molecular	22
5.8.- Cambios estructurales inducidos por la proteólisis	
5.8.1.- Caracterización de la estructura secundaria del Pico 3 y Pico 4	
5.8.1.1.- Dicroísmo circular en el UV lejano (<i>DC</i>)	
5.8.2.- Caracterización de la estructura terciaria del Pico 3 y Pico 4	23
5.8.2.1.- Fluorescencia Intrínseca (<i>FI</i>)	
5.8.2.2.- Dicroísmo circular en el UV cercano (<i>DC</i>)	
5.8.2.3.- Termoestabilidad ó desnaturalización térmica (<i>Tm</i>)	24
5.9.- Caracterización del Pico 3 y Pico 4 mediante HPLC de exclusión molecular	25
5.9.1.-HPLC analítica de exclusión molecular (Doble dimensión cromatográfica)	

	PÁGINA
5.10.- ANÁLISIS FUNCIONAL	
5.10.1.-Determinación de la actividad residual de la proteinasa K	
5.10.2.- Ensayos de actividad y determinación de sus parámetros cinéticos	26
5.10.2.1.- K_m	
5.10.2.2.- k_{cat}	
5.11.- Desamidación en la HuTIM	
5.11.1.- Curso temporal de desamidación en la HuTIM	
5.11.2.- Proteólisis limitada posterior a la desamidación de la HuTIM	
5.12.- Desnaturalización y renaturalización de la HuTIM a partir de la asociación de monómeros intactos y resistentes a la hidrólisis	
5.12.1.- Hidrólisis con dímeros resistentes de la HuTIM Pico 3	27
6.- RESULTADOS	28
6.1.- Sobreexpresión y purificación de la enzima recombinante	
6.2.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA PROTEOLIZADA	29
6.2.1.- Digestión proteolítica bajo diferentes relaciones molares	
6.2.1.1.- Electroforesis desnaturalizante	
6.2.1.2.- Electroforesis nativa	30
6.2.2.- Secuenciación de amino terminales	
6.2.3.- Escalamiento de la digestión proteolítica	31
6.2.4.- Separación cromatográfica de intercambio aniónico por HPLC	
6.2.4.1.- Electroforesis nativa y desnaturalizante	
6.2.5.- Determinación de la actividad específica por fracción	32
6.2.6.- Digestión proteolítica bajo diferentes relaciones molares	
6.2.6.1.-Análisis densitométrico de la electroforesis nativa	34
6.2.6.2.- Análisis densitométrico de la electroforesis desnaturalizante	
6.2.7.- Digestión proteolítica en curso temporal	35
6.2.7.1.- Electroforesis de doble dimensión	37
6.3.- Determinación de los cambios a nivel de estructura secundaria	38
6.3.1.- Dicroísmo circular en el UV lejano (<i>DC</i>)	
6.4.- Caracterización de cambios a nivel de estructura terciaria	40
6.4.1.- Fluorescencia intrínseca (<i>FI</i>)	
6.4.1.1.- Diferencias espectrales en HuTIM control, P2, P3 y P4	
6.4.2.- Dicroísmo circular en el UV cercano (<i>DC</i>)	41
6.4.3.- Termoestabilidad ó desnaturalización térmica (<i>Tm</i>)	43
6.5.- Escalamiento de la digestión proteolítica de la HuTIM	44
6.6.- Doble dimensión cromatográfica de la HuTIM	
6.7.- ANÁLISIS FUNCIONAL	45
6.7.1.- Determinación de la actividad residual de la Proteinasa K	
6.7.2.- Parámetros cinéticos de la HuTIM control y P3	46
6.8.- Desamidación en la HuTIM	48
6.8.1.- Curso temporal de desamidación en la HuTIM	
6.8.2.- Proteólisis limitada posterior a la desamidación de la HuTIM	49
6.9.- Desnaturalización-renaturalización de monómeros y formación de dímeros a partir de la asociación de monómeros intactos resistentes a la hidrólisis del P2 vs P3	50
6.9.1.- Hidrólisis de monómeros resistentes a la primera proteólisis del P3 vs P4	52
7.- DISCUSIÓN	54
8.- CONCLUSIONES	57
9.- PERSPECTIVAS	59
10.- BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

Figura N°		Página
1	Monómero de la TIM mostrando la estructura barril α/β	4
2	Pasos de reacción en la catálisis de la TIM	5
3	Estructura primaria y secundaria en la subunidad de la HuTIM	12
4	Pasos de purificación de HuTIM recombinante (electroforesis desnaturizante)	28
5	Peptidos generados en la enzima proteolizada (electroforesis desnaturizante)	29
6	Formación de una nueva especie con mayor movilidad (electroforesis nativa)	30
7	Amino-terminal de los peptidos generados por corte en la secuencia de la HuTIM	30
8	Análisis estructural de la HuTIM proteolizada y fraccionada por cromatografía	32
9	Proteólisis con diferentes relaciones molares de proteinasa K vs HuTIM	33
10	Electroforesis nativa, desnaturizante y análisis densitométrico	35
11	Patrón de proteólisis en curso temporal (relación molar 1 a 0.75)	36
12	Generación de especies electroforéticas (de la proteólisis en curso temporal rel. mol. 1 a 0.75)	36
13	Doble dimensión electroforética del Pico 3 de la HuTIM	37
14	Doble dimensión electroforética comparativa (relaciones molares 1:0.75 y 1:5)	38
15	Curso temporal de desamidación en la HuTIM	48
16	Proteólisis comparativa de la HuTIM sin y con desamidación	50
17	Electroforesis desnaturizante y nativa después de proteólisis de la HuTIM en conjunto con fracciones de HPLC de intercambio aniónico	51
18	Electroforesis nativa y desnaturizante del Pico 3 después de desnaturización con Gdn/HCl	51
19	Exclusión de peptidos del monómero cortado y Gdn/HCl del Pico 3 (mediante columna de desalación de "Penefsky")	52
20	Proteólisis comparativa entre HuTIM Pico 2 y Pico 3 con enzima renaturalizada y con monómeros intactos (electroforesis desnaturizante y nativa)	53
Gráfica		
1	Actividad e hidrólisis bajo diferentes relaciones molares	29
2	Perfiles de retención cromatográfica de la HuTIM proteolizada	31
3	Espectros de Dicroísmo circular (DC) en el UV lejano	39
4	Espectros de emisión de <i>I.F. máx.</i>	41
5	Espectros de Dicroísmo circular (DC) en el UV cercano	42
6	Estabilidad térmica (<i>T_m</i>)	43
7	Doble dimensión cromatográfica (intercambio aniónico vs exclusión molecular)	45
8	Cinética enzimática de Pico 3 vs la HuTIM wt	47
Tabla		
1	Enfermedades e indicadores de la deficiencia de la HuTIM	2
2	Parámetros cinéticos y de estabilidad estructural de la HuTIM	3
3	Sitios de corte en las TIM's proteolizadas con subtilisina	14
4	Programa de HPLC analítica para fraccionar las especies de la HuTIM proteolizada	21
5	Rendimiento del método de purificación de HuTIM	28
6	Actividades específicas antes y después de proteolizar la HuTIM	32
7	Estructura secundaria seguida por DC en el UV lejano	39
8	Espectros de emisión de <i>IF máx.</i>	40
9	Actividad residual de la Proteinasa K	46
10	Parámetros cinéticos	47
11	Curso temporal de desamidación (actividad residual)	49
12	Actividad e hidrólisis comparativa entre HuTIM nativa y HuTIM desamidada	50

ABREVIATURAS

(<M)	Menor movilidad electroforética
(>M)	Mayor movilidad electroforética
(Δ temp)	Incremento de temperatura
(Δ D.O.)	Incremento de densidad óptica
AAPFpN	N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilida
α -GDH	α -Glicerol fosfato deshidrogenasa
α -hélice	Hélice alfa
β -beta	Hoja beta
BCA	Ácido bicinconinico
BSA	Albumina serica bovina
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino) propano-1-sulfónico
CD	Dicroísmo circular
Control HuTIM	wt HuTIM
D.O.	Densidad óptica
Da	Daltones
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
FD	Fracción desnaturalizada (subunidades desplegadas)
<i>FI</i>	Fluorescencia intrínseca
FN	Fracción nativa (subunidades plegadas)
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
Gdn/HCl	Cloruro de guanidina
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HuTIM	Triosafosfato isomerasa de humano
ϵ	Coefficiente de extinción molar
<i>I.F.</i> máx	Intensidad de fluorescencia máxima
IPTG Kpb	Isopropil β -tiogalactopiranosido
Kpb	Kilopares de bases
k_{cat}	Constante catalítica
kDa	Kilodaltones
K_m	Constante micheliana
K_{cat}/K_m	Eficiencia catalítica
λ máx	Longitud de onda de fluorescencia máxima
LB	Medio de cultivo bacteriano Luria Bertani
M	Molaridad (concentración molar)
MPMH	Marcador de pesos moleculares altos
Mr	Masa relativa
P1	Pico 1 HuTIM
P2	Pico 2 HuTIM
P3	Pico 3 HuTIM
P4	Pico 4 HuTIM
pI	Punto isoeléctrico

PK ó Prot. K	Proteínasa K
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
Psi	Unidad de presión en libras por pulgada cuadrada
PVDF	Membrana de transferencia de polivinildifluorobenceno HyBond-P
Red shift	Inversión al rojo lejano
Rel. mol.	Relación molar
RSM	Espectro de resonancia magnética
SCM	Centro espectral de masas
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SNP's	Polimorfismos de un solo nucleótido
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
TIM ó TPI	Triosafosfato isomerasa
<i>T_m</i>	Temperatura media de desnaturalización ó termoestabilidad
u.a.	Unidades arbitrarias
UTR	Región no traducida
yTIM	Triosafosfato isomerasa de levadura

RESUMEN

La triosafosfato isomerasa (TIM ó TPI) es una enzima de la vía glucolítica que cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DAHP). El gen de la TIM de humano tiene 3.5 kpb y consta de 7 exones y 6 intrones. El RNA mensajero presenta un UTR 5' de 50 nt y un UTR 3' de 448 nt.

La TIM de humano (HuTIM) es un dímero con 248 residuos aminoácidos por monómero; cada una de sus subunidades contiene todos los residuos que constituyen al sitio activo independiente. Su participación en la glucólisis es determinante en la producción de energía a partir de la glucosa. Su eficiencia catalítica es muy alta y se encuentra prácticamente limitada por la velocidad de difusión del sustrato en el medio.

Los defectos en la HuTIM producen anemia hemolítica crónica, incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas, defectos del crecimiento y deterioro de los sistemas muscular y nervioso. La TIM ha sido objeto de estudios para caracterizar los procesos involucrados en fenómenos de recambio proteico y se ha demostrado que algunas modificaciones postraduccionales, como el grado de desamidación, inician tales eventos. Sin embargo, el mecanismo de degradación por proteólisis no está bien entendido en la HuTIM.

En este trabajo abordamos el estudio de la estabilidad estructural y funcional en la HuTIM recombinante mediante la técnica de proteólisis limitada, que ha sido empleada para estimar la estabilidad en otras enzimas. Los resultados mostraron que al llevar a cabo la proteólisis bajo la relación molar 1:0.75 de HuTIM vs Proteinasa K (18.8 vs 13 μM), el 25% de los monómeros se hidrolizaron, con pérdida de actividad similar ($\pm 30\%$). Cursos temporales de proteólisis de HuTIM bajo diferentes relaciones molares mostraron la existencia de especies con diferente punto isoeléctrico (pI), las cuales se enriquecieron al aumentar la concentración de la proteasa.

A partir de una muestra de HuTIM hidrolizada a una relación molar de 1:0.75, se aislaron las especies con distintos pI utilizando cromatografía de intercambio aniónico. Se obtuvieron cuatro especies cromatográficas. (P1).- proteína cortada extensivamente; (P2).-intacta; (P3).- cortada en un monómero y (P4).-cortada en ambos monómeros. La caracterización de (P3) mostró incremento de movilidad electroforética en geles nativos. La fracción P3 se identificó a diferentes rel. mol. alcanzando a enriquecerse de un 13 % hasta un 37 %. La secuenciación de los NH-terminales de esta fracción mostró que los cortes fueron entre T139/E140 y A176/T177. Mediante electroforesis bidimensional y cromatografía analítica de exclusión molecular se evaluó la integridad en su estructura cuaternaria confirmándose que el cambio en el pI se debió probablemente a cambios en la exposición de cargas al solvente y no por la pérdida de masa.

La evaluación de la estructura secundaria por *DC* en UV lejano en la enzima hidrolizada mostró variaciones leves en α -hélices. El análisis en la estructura terciaria por *FI* y *DC* en UV cercano destacó algunos cambios importantes, como fue el desplazamiento del SCM por 5.6 nm hacia el rojo lejano y el cambio en exposición al solvente en los fluoróforos cercanos a los sitios de corte. Así mismo, su estabilidad térmica disminuyó 2.5°C. La afinidad del (P3) por el sustrato no se modificó ($K_m = 0.44 \text{ mM}$). Sin embargo, la $V_{m\acute{a}x}$ disminuyó aproximadamente un 50% (de 4090 a 1680 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). El Pico 4 conservó estructuración cuaternaria, con los mismos sitios de corte detectados en P3 pero ahora en ambos monómeros y con la pérdida total de la actividad catalítica e incremento cumulativo en alteraciones de su estructura secundaria y terciaria.

El P3 y P4 se proponen como pasos intermediarios estables y obligados en la degradación proteolítica de la HuTIM. Este patrón de corte y generación de intermediarios se ve afectado cuando la enzima tiene alguna modificación estructural vinculada con el envejecimiento, por ejemplo la desamidación.

Palabras clave: *Triosafosfato isomerasa de humano; proteólisis limitada; proteinasa K; estabilidad estructural y funcional; intermediarios estables.*

ABSTRACT

Triosephosphate isomerase (TIM or TPI) is an enzyme from the glucoytic pathway that catalyzes the interconversion between (GAP) glyceraldehyde 3-phosphate and (DHAP) dihydroxiacetone phosphate. The gene of human TIM has 3.5 kpb and it is composed by 6 introns and 7 exons. The mRNA contains a 5' UTR of 50 nucleotides, and a 3'UTR of 448 nt.

TIM from human (HuTIM) is a dimer with 248 residues per monomer in which is contained all the catalytic residues, constituting independent active sites. Its participation occupies a critical roll on the energy production that can be obtained from the glucose metabolism. The catalytic efficiency of HuTIM is very high, limited only by the diffution rate of its substrates.

HuTIM deficiencies promote chronic hemolytic anahemia, increasing of bacterial infections sensitivity, defects in growth, and impairment of muscular and nervous systems. TIM has been subject of studies to investigate process that are involved in protein re-change; on this line, it has been demonstrated that some post-tranlational changes as deamidation start such events. The HuTIM degradation mechanism by proteolysis, however, still remains not completely understand.

In this work, we determined the structural and functional stability of recombinant HuTIM by using limited proteolysis method, which it has been used to estimate enzyme stability from several organisms. The results showed that, when proteolysis was carried out at molar ratio of 1:0.75 HuTIM vs Proteinase K (i.e., 18.8 vs 13 μ M), a 25 % of monomers were hidrolized and a similar percentage of enzyme activity was lost (30 %). The kinetic of HuTIM proteolysis under different molar ratios showed the existence of several species with different isoelectric point (Ip), which they were riched as protease was increased.

We isolated the species with different Ip by using anionic exchange chromatography from a sample of hydrolyzed HuTIM at molar ratio of 1:0.75. It was obtained four species: (P1).-protein nicked extensively; (P2).-intact protein; (P3).-nicked protein only in one monomer, and (P4).-nicked protein in both monomers. Characterization of (P3) showed an increment of electrophoretic movility in native gels. The (P3) fraction was observable at different molar ratio, and was enriched from 13 % to 37 %. Determination of its NH-terminal sequence showed two cuts, one of them between T139/E140 and the other between A176/T177. Integrity of 3-D structure from (P3) was confirmed by using size exclusion chromatography and two-dimentional electrophoresis; the results confirmed that changes in pl are probably by solvent exposition of charges, instead of lost of mass.

We evaluated the secondary structure from hidrolized HuTIM by using *CD* at far UV, the results showed subtle variations in the α -hélices content. In contrast, tertiary structure analysis by *IF* and *CD* at near UV showed important changes, as a red shift of 5.6 nm in SCM, and a solvent exposition change in the fluorophores close by the nick sites. Beside, its thermal stability decreased 2.5°C. The affinity of (P3) by its substrate was not modified ($K_m = 0.44$ mM); however, V_{max} decreased around 50 % (4090 to 1680 μ mol \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$). The (P4) enzyme conserved its quaternary structure, showing the same nick sites detected as in (P3); however, both monomers were nicked. Concomitantly, the enzyme lost all the catalytic activity and showed substantial changes in its secondary and tertiary structure.

We propose (P3) and (P4) as obligated stable intermediates of the proteolytic degradation path of HuTIM. Such pattern of cut and intermediates generation can be affected when enzyme has some structural modifications that are related to ageing, as example, deamidation process.

Key words: *Triosephosphate isomerasa of human; proteolysis limited; proteinase K; structural and functional stability; intermediate stable.*

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Características del gen de la HuTIM

El gen de la HuTIM se encuentra localizado en el cromosoma 12p13. El gen presenta una longitud total de 3.5 kpb y consta de 7 exones y 6 intrones. Debido a splicing alternativo existen al menos 4 productos diferentes. El RNA mensajero tiene una región codificante de 1250 pb y presenta un (UTR) 5' de 50 nt y un UTR 3' de 448 nt (Brown y cols., 1985).

Su promotor contiene cajas TATA y CCAAT putativas y es rico en residuos de G y C (76%). Existen pseudogenes del gen funcional que se encuentran en el cromosoma 5 y contienen mutaciones que excluyen la síntesis de la enzima activa evidenciando la presencia de un solo gen funcional, (Daar y cols., 1985).

1.2.- Defectos en el gen de la HuTIM

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) río arriba en el gen disminuyen la cantidad de mRNA y río abajo generan en la proteína alteraciones que promueven estados patológicos.

Se han reportado 34 SNP's en el gen de HuTIM. De este total 24 SNP's corresponden a la región del gen transcrito mRNA (1250 pb) 10 de estos se localizaron en intrones, 14 se ubican en exones; de este total hay 8 no codificantes localizados en el exón 7. Para el mensajero maduro de 744 pb se presentan en la TIM 6 SNP's (5 son SNP's no sinónimos) solo 1 de estos es sinónimo.

Es necesario reconocer que no todos los SNP's se encuentran validados y la información que existe con referencia a cada uno es heterogénea, no presentan frecuencias y algunas de las alteraciones estudiadas en pacientes se originan a partir de estos SNP's y combinaciones de estos, generando así diversos haplotipos, que son característicos de grupo étnico y cuando se presentan homocigos para estas alteraciones son una condición letal incompatible con la vida.

1.3.- Importancia de la HuTIM

La importancia de la HuTIM radica en que interconvierte sustratos entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehido 3-fosfato (GAP) en la glucólisis. En la enzima cuando se

encuentra afectada por disminución del número de copias del mensajero, ó bien, cuando se generan proteínas con anomalías derivadas de (SNP's), estos polimorfismos favorecen la inestabilidad estructural y hacen en algunos casos a la enzima termosensible. Otras veces afectan su catálisis promoviendo la acumulación de sustrato en forma de DHAP, que se encuentra normalmente en proporción de 20:1 con respecto a GAP (sustrato que continua en la vía glucolítica). La acumulación de DHAP promueve la intoxicación celular a causa del metilglioxal y se elimina así la producción neta del ATP de la vía glucolítica.

1.4.- Referencias bibliográficas relacionadas con la deficiencia de la HuTIM (TPI1)

La búsqueda de información bibliográfica relacionada a la deficiencia de TPI1 en PUBMED de NCBI resultó asociada a diferentes enfermedades, (ver tabla 1).

Enfermedad	Score	Articulos	IDs: PubMed
Enzimopatía	94.23	4	16086671 (1), 8579052 (1), 8629088 (1)
Anemia hemolítica congénita	76.52	3	
Anemia hemolítica	62.33	13	10782327 (1), 12023819 (1), 1959537 (1), 2339591 (1)
Deficiencia enzimática	54.35	6	11196750 (1), 12023819 (1), 8244340 (1)
Miopatías mitocondriales	17.49	2	
Enfermedad metabólica	14.22	4	9125215 (1), 9850739 (1)
Mononucleosis infecciosa	14.18	2	
Hemólisis	12.58	4	
Enfermedad del sistema nervioso	12.55	5	10655478 (3), 10782327 (1), 12023819 (1)

Tabla 1.- Enfermedades e indicadores de la deficiencia de la TIM en el humano.

El principal indicador de deficiencia de TPI es la anemia hemolítica (16 artículos publicados), después le siguen la deficiencia enzimática y enfermedades asociadas a sistema nervioso con 6 y 5 respectivamente y con 4 las enzimopatías, hemólisis y enfermedades metabólicas. Finalmente para miopatías mitocondriales y mononucleosis infecciosa, cada una con 2.

1.5.- Características de la enzima triosafosfato isomerasa (HuTIM)

La HuTIM es una enzima homodimérica que ha sido extensivamente caracterizada estructuralmente (Banner y cols., 1975; Lolis y cols., 1990; Brändén, 1991; Wierenga y cols., 1992) y cinéticamente (Knowles, 1991; Komives y cols., 1991).

La estructura tridimensional de la HuTIM se ha resuelto cristalograficamente a 2.8Å (Mande y cols., 1994) y a 2.2 Å (Kinoshita y cols., 2005). Se han determinado los parámetros cinéticos y se tienen reportes del proceso de desnaturalización y renaturalización en la enzima recombinante (Mainfroid y cols., 1996), (ver tabla 2 y Fig. 1).

K_m (GAP)(mM)	0.49
k_{cat} (min^{-1})	2.7×10^5
k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)	5.5×10^5
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)*	2.4×10^8
K_i (2-PG) (μM)	7.4
K_{Diss}	32.1×10^{-12}

Tabla 2.- Parámetros cinéticos y de estabilidad estructural de la HuTIM. (Mainfroid y cols., 1996). (*)Extraído de Voet, 1999.

Actualmente se cuenta con estructuras cristalinas pertenecientes a 22 diferentes organismos, *Gallus gallus* (Banner y cols., 1975; Alber y cols., 1981); *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis y cols., 1990); *Trypanosoma brucei* (Wierenga y cols., 1991), *Escherichia coli* (Noble y cols., 1993); *Homo sapiens* (Mande y cols., 1994); *Bacillus stearothermophilus* (Delboni y cols., 1995); *Plasmodium falciparum* (Velanker y cols., 1997), *Vibrio marinus* (Álvarez y cols., 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado y cols., 1998), *Leishmania mexicana* (Williams y cols., 1999), *Thermotoga maritima* (Maes y cols., 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden y cols., 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero y cols., 2002); *Oryctolagus cuniculus* (Aparicio et al., 2003); *Caenorhabditis elegans* (Symersky y cols., 2003); *Thermoproteus tenax*, (Walden y cols., 2004); *Thermus thermophilus* (Yamamoto y Kunishima, 2005) *por publicarse*; *Schistosoma mansoni*, (modelo teórico Rajiniraja M, 2005; *por publicarse*); *Methanocaldococcus jannaschii*, (Gayathri y cols., 2007); *Giardia lamblia*, (Reyes-Vivas y cols., 2007); *Tenebrio monitor*, (Schmidt y cols., 2007; *por publicarse*) y *Helicobacter pylori* (Chu y cols., 2008).

La HuTIM pesa 54 kDa y tiene 248 residuos aminoácidos por monómero ó subunidad (Lu et al., 1984; Maquat y cols., 1985). Cada homodímero está compuesto por dos subunidades idénticas con masa relativa (M_r) de 26750 Da. Ambas subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Cada monómero contiene un sitio activo completo, localizado cerca de la interfase de la subunidad (Lu y cols., 1984).

Al igual que en el resto de las TIM's, cada monómero de HuTIM presenta una estructura de barril α/β , a partir de la repetición de una asa - hoja β - asa - α -hélice. Las ocho hojas- β paralelas forman un barril interno llamado barril β rodeado por las 8 α -hélices (Farber y Petsko 1990;

Brändén, 1991). Las hojas- β son numeradas de β -1 a β -8 y las α -hélices de α -1 a α -8. Las ocho asas que siguen de las hojas- β son funcionalmente importantes y pueden ser referidas como asas 1 a 8 (Lu y cols., 1984).

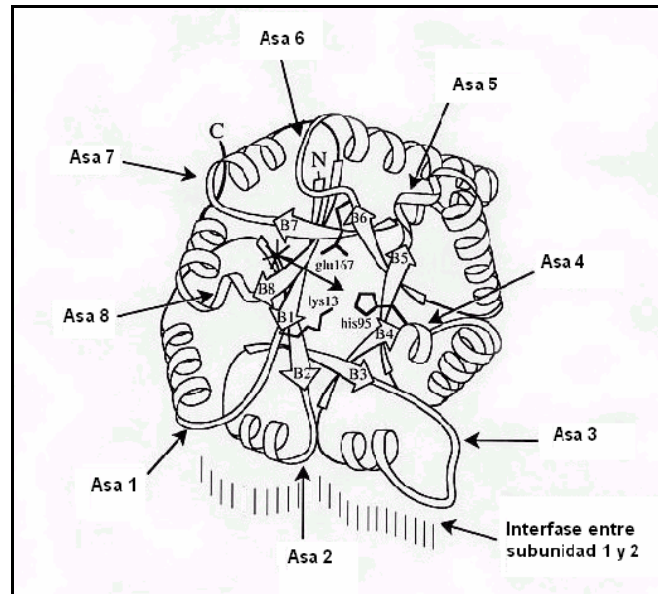


Figura 1.- Vista superior de un monómero de TIM mostrando la clásica estructura barril $\alpha\beta$. Las 8 asas que conectan a las 8 hojas β con las 8 hélices α se muestran numeradas (extraído de Wierenga, 2001).

La mayoría de los contactos de interfase son mediados por el asa 3 también referida como el asa de interfase (residuos 65 a 79 en HuTIM), (ver Fig. 1 y 3), que se extiende desde una subunidad dentro de una cavidad cercana al centro catalítico a la segunda subunidad. Algunos residuos del asa 3 interactúan a través de contactos de van der Waals con los residuos del sitio activo de la otra subunidad (Lolis y cols., 1990, Wierenga y cols., 1991, 1992). La tapa del asa 3 (residuos 74 a 77) forma una región hidrofóbica alrededor del residuo de Met-14 de la subunidad adyacente. La TIM sólo es activa como dímero y los residuos de la interfase son cruciales para mantener la integridad de las interacciones entre ambas subunidades (Zabori y cols., 1980; Casal y cols., 1987; Garza-Ramos y cols., 1992).

HuTIM cataliza la interconversión reversible entre el D-gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) con un equilibrio de 1:20, respectivamente (Rose, 1975). Su eficiencia catalítica es muy alta y se encuentra prácticamente limitada por la velocidad de difusión del sustrato en el medio (Albery y Knowles, 1976), (ver Fig. 2).

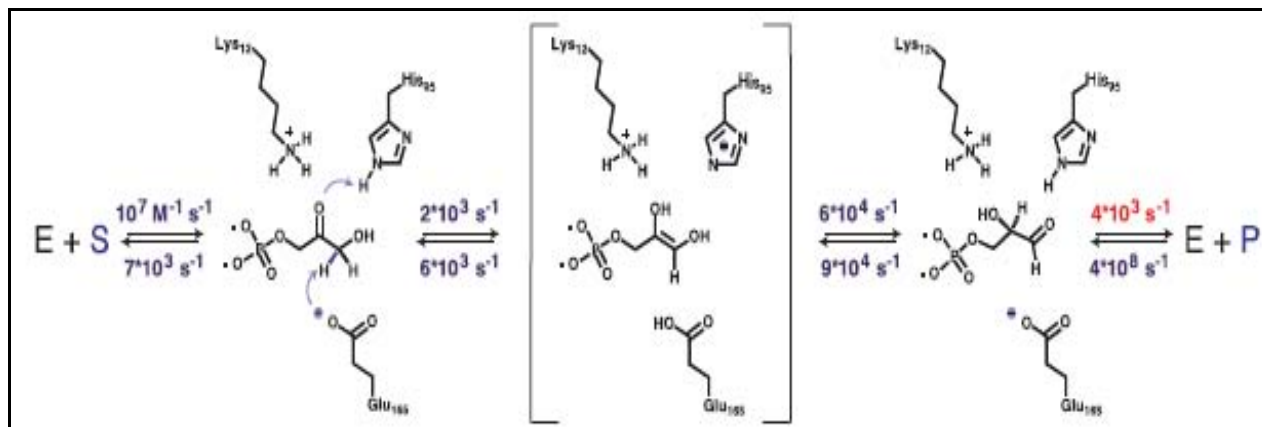


Figura 2.- Pasos de reacción en la catálisis de la TIM.

1.6.- Condiciones que generan la variación electroforética en la triosafosfato isomerasa

Las TIM's existen como formas electroforéticas múltiples. Las bases moleculares de estas isoenzimas se han investigado desde hace más de 40 años bajo diferentes perspectivas, tanto en humanos como en otros organismos, éstas se ha atribuido a diversas causas.

Desde 1966, Burton y Waley describieron en la enzima la separación electroforética de TIM dentro de tres componentes activos. Los resultados obtenidos por Kaplan y cols., (1968) con extractos de eritrocitos humanos fueron similares; así mismo, Scopes (1964 y 1968) encontró estos mismo tres componentes en músculo de conejo y cerdo.

Schneider y cols., (1965 y 1968) reportaron que estas formas electroforéticas múltiples resultaron en tres fracciones catalíticamente activas con diferentes puntos isoeléctricos (pI) que nombró:

Componente I.- presentó sólo el 5% de la actividad y tuvo un pI de 6.7.

Componente II.- El mayor, con pI de 6.5 que comprendió alrededor del 70 a 75% del total de la actividad enzimática. Este componente presentó diferencias en la composición de los residuos aminoácidos de los monómeros que conforman un dímero designándolo así como **heterodímero**.

Componente III.- representó del 20 a 25% del total de la actividad con pI de 6.1.

Kaplan y cols., (1968) sugirieron que las variantes electroforéticas con mayor carga negativa y el componente II desaparecen en pacientes con deficiencia de la TIM. Se mostró que el componente

III y el componente **II** fueron afectados por mutación en la subunidad B dejando sólo al componente **I** totalmente activo.

Al disociar y reasociar estos monómeros de los componentes **II** y **III**, se **generó un heterodímero** AB con la subunidad B anormal y un homodímero BB con subunidades inactivas. La inactivación de la enzima en pacientes con deficiencia de TIM (sólo 1 a 5% de la actividad normal) fue producto de un homodímero con ambas subunidades BB.

Sin embargo, al llevar a cabo la disociación del componente **II** y al ser reasociado se formaron en la misma proporción los tres componentes. La proporción (5:70:25%) de estas tres isoenzimas en eritrocitos humanos, se explicó por la gran afinidad de la subunidad A por la B para constituir un heterodímero. Además, es posible que esta proporción sea el reflejo de diferentes estabilidades *in vivo* en ambas subunidades ya que los eritrocitos humanos no poseen síntesis activa de proteínas. Sin embargo para la TIM de músculo de conejo fue de 1:2:1 (Lee y cols., 1971).

Krietsch y cols., en 1970; obtuvieron los mismos resultados con TIM aislada del músculo y del hígado de conejo. Krietsch y cols., (1970a), llevaron a cabo experimentos de hibridación; el análisis de perfiles de péptidos obtenidos por cromatografía demostró que el patrón electroforético fue causado por la existencia de heterodímeros. En las isoenzimas de TIM de conejo purificadas, denominadas α , β y γ , la forma α mostró migración lenta hacia el ánodo. Las isoenzimas α y γ permanecieron sin cambios en su patrón electroforético y además emergieron de la forma β tres isoformas con la misma movilidad electroforética observada en las isoenzimas α , β y γ . En una mezcla quimérica de TIM de conejo y levadura los monómeros difirieron en la composición de aminoácidos; mostraron un patrón de corte diferente por digestión con tripsina. Los heterodímeros se hidrólizaron en 67 péptidos, mientras que un homodímero únicamente 34.

Una posible explicación a las múltiples isoenzimas de TIM descritas en eritrocitos de humano (Kaplan y cols., 1968), en músculo de cerdo (Scopes., 1968) y en hígado de conejo (Krietsch y cols., 1970), fue que las isoenzimas del dímero de TIM en estas especies estaban compuestas de dos cadenas polipeptídicas diferentes, codificadas en dos cistrones.

Sawyer y cols (1972) observaron por isoelectroenfoque en la TIM de eritrocitos humanos que algunas posibilidades de tal multiplicidad incluyen la desnaturalización parcial, oxidación de grupos sulfhídricos, artefactos del sistema electroforético, disociación, agregación, variación diferencial de desamidación ó modificación covalente. Por lo que, la existencia de dos diferentes cadenas polipeptídicas se consideró como una causa de la multiplicidad isoenzimática que dió origen a los tipos de dimeros AA, AB y BB.

Fue hasta 1981, cuando Decker y Mohrenweiser mostraron evidencia de que las isoenzimas de la TIM son la expresión de un simple locus estructural. Este grupo encontró una variante electroforética aún sin reportar. Encontraron que la isoenzima TIM-B se expresó en células rojas y linfocitos y se expresó también la isoenzima TIM-A de linfoblastos estimulados por mitógeno.

Eber y cols., (1991) describieron en una niña de 8 años de edad con anemia hemolítica crónica, una nueva variante de HuTIM que denominaron como TIM Hamm. Encontraron que la concentración de DHAP intracelular era significativamente elevada. Este resultado se interpretó como que la actividad de la HuTIM en esta paciente presentaba una actividad muy baja. Como consecuencia, el DHAP se acumuló y la vía glucolítica se bloqueó provocando un daño general en el abastecimiento de energía celular. **La desamidación acelerada fue responsable del patrón electroforético alterado característico de esta variante, ya que es el paso inicial en el catabolismo normal de la enzima durante el envejecimiento del eritrocito.**

Yamaji y cols., en 2004 encontraron que la TIM fue inducida como una proteína de estrés a la hipoxia en una línea de células endoteliales de mamífero. Las células aumentaron la actividad de TIM alrededor de 1.5 veces, mientras que las cantidades de esta enzima se elevaron alrededor de tres veces. Después de 12 h de exposición a condiciones hipóxicas, la actividad decayó y se observaron dos ó más isoformas con diferentes valores de pI originadas a consecuencia de modificaciones post-traduccionales (Snapka y cols., 1974; Kester y Gracy, 1975).

En esta línea celular, las isoformas de TIM mostraron pI de 7.3, 6.9 y 6.3; de estas la isoforma más básica fue la más abundante. Las isoformas con pI de 7.3 y 6.9 presentaron baja actividad. Concluyeron que la hipoxia incrementó principalmente las isoformas básicas y menos activas; en contraste con la isoforma más ácida que fue la más activa.

1.7.- Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones post-síntesis *in vivo* que presentan las proteínas incluyen rompimiento de cadena, uniones cruzadas, desamidación, glucosilación, oxidación, fosforilación, racemización y otros procesos enzimáticos y no enzimáticos (Robinson y Robinson, 2004). En la TIM de mamíferos, la multiplicidad electroforética en la enzima a causa de la desamidación *in vivo* es uno de los primeros pasos del catabolismo programado de la enzima (Kester Gracy, 1975; Yuan y cols., 1981 y Lu y cols., 1984).

1.7.1.- Desamidación en la TIM

La TIM es una proteína que ha involucrado dos tipos específicos de alteraciones que pueden iniciar el recambio de la proteína. Yuan y cols., (1979) aislaron dos grupos de isoenzimas de TIM de placenta humana (A y B) y mostraron que la isoenzima A, junto con otras subformas acídicas, se forman por la desamidación específica y espontánea de la isoenzima B. Observaron que estas isoformas se generaban *in vitro* preferencialmente bajo condiciones ácidas ó básicas débiles.

Estudios físicos y químicos han indicado que la desamidación tiene gran impacto sobre la estructura de la TIM de mamíferos produciendo que las interfases se abran y expongan su superficie al solvente. Consecuentemente, la susceptibilidad proteolítica en esta enzima se incrementa significativamente (Zhang Y. et al., 1995).

En la TIM de conejo y de humano la existencia de formas electroforéticas múltiples *in vivo* e *in vitro* es debida a la desamidación específica en la enzima (Gracy, 1982; Furth y cols., 1974). En la HuTIM, la desamidación se realiza en N71 y N15 (Yuan y cols., 1981). Estos residuos se encuentran en segmentos formados por **hojas β reversas**, residuos 13 a 16 (L-M-N-G) y 70 a 73 (T-N-G-A) (Chou y Fasman, 1977) y se localizan en la interfase (Banner y cols., 1975; Alber y cols., 1981). Los estudios de Lu y cols., (1984) sugirieron que las desamidaciones específicas espontaneas dan origen a isoenzimas inestables que pueden ser pasos iniciales de recambio normal de esta enzima.

Estudios recientes de dinámica molecular (Konuklar y cols., 2005), identificaron la desamidación por una red de movimientos vinculados a la catálisis en la TIM a partir de los sitios catalíticos. El

empaquetamiento de los residuos en las regiones cercanas a los sitios de desamidación en la interfase mostró correlación positiva entre fluctuaciones en movimientos de los residuos alrededor del sitio de desamidación primaria y la cercanía del centro catalítico. Estas fluctuaciones locales pueden afectar los movimientos de la estructura global y sugiere la existencia de una red de movimientos cooperativos asociados a la actividad en proteínas.

1.7.2.- Oxidación en la TIM

Rietveld y Ferreira (1996) no observaron desamidación con la TIM de conejo; la heterogeneidad energética en sus dímeros fue escasa. Concluyeron que la variación conformacional de las enzimas dependía de la presencia y proporción de subpoblaciones que reflejaron un proceso de oxidación diferencial al incrementar el tiempo postsíntesis en la enzima.

Zubillaga y cols., (1994) exploraron la oxidación experimental en la TIM de levadura y conejo con la Cloramina-T. Determinaron su efecto sobre la actividad y estructura; fue más sensible en conejo y se mostró inactivación total. La oxidación de las cisteínas por el efecto la Cloramina-T mostró la formación de isoformas ácidas; que fueron distinguidas como bandas de proteína con mayor movilidad hacia el ánodo en la electroforesis nativa a pH 8.0 (Tang y cols., 1990).

La incubación con una relación de 50 moléculas de Cloramina-T por monómero en la TIM de levadura, generó cuatro isoformas cargadas negativamente y activas. Sin embargo, en la TIM de conejo cuando se realizó este experimento, la Cloramina-T provocó la oxidación de metioninas con alteraciones extensivas en la estructura, observándose desaparición de isoformas cargadas negativamente y la aparición de un barrido de la proteína en la electroforesis nativa.

La TIM de pollo posee una lisina que sustituye a la N71 en HuTIM excluyendo así el sitio de desamidación presentado en la TIM de mamífero. En la enzima de pollo encontraron tres isoformas causadas por oxidación específica de la C126 que fueron revertidas a una sola isoforma en presencia de más de 15 mM de DTT ó 50 mM de 2-mercaptoetanol (Tang y cols., 1990). Las isoformas de la TIM de pollo generadas por oxidación mostraron baja actividad y mayor susceptibilidad a la desnaturalización y a la proteólisis que en la enzima nativa, similar a las isoformas desamidadas de mamíferos que se acumulan *in vivo* durante el envejecimiento.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- La triosafosfato isomerasa como objeto de estudio

La TIM ha sido objeto de estudios para caracterizar los procesos involucrados en estos fenómenos de recambio protéico (Sun y cols., 1992a, 1993; Vögel y Chmielewski, 1994; Ray y cols., 1999; Reyes Vivas y cols., 2002) y se ha demostrado que algunas modificaciones postraduccionales como la desamidación inician tales eventos (Robinson y Robinson, 2004).

Los defectos reportados que producen estados patológicos a partir de la HuTIM, que en conjunto son conocidos como deficiencia de la TIM, son el resultado de mutaciones puntuales derivadas a partir de SNP's. Estas mutaciones pueden presentarse río arriba y alteran la cantidad de mRNA que se traduce a proteína a partir del número de copias del mRNA maduro. Otras mutaciones inciden directamente sobre la estabilidad estructural y sobre su actividad catalítica.

El mecanismo de degradación por proteólisis no está completamente entendido en la HuTIM. Sin embargo, se ha visto que las mutaciones generan enzimas susceptibles a la destrucción proteolítica teniendo implicaciones relacionadas al diagnóstico de varios estados de deficiencia en enzimas (Beutler, 1983). Es importante señalar también que dentro de las estructuras de las proteínas, las regiones de alta flexibilidad son más sensibles y son las primeras que se degradan proteolíticamente (Gracy y cols., 1990; Kim y cols., 1992; Sun y cols., 1992, 1995).

El recambio de proteínas *in vivo* es un fenómeno fisiológico vinculado al desarrollo, maduración y envejecimiento característicos de cada proteína (Gracy y cols., 1990; Kim y cols., 1992; Sun y cols., 1992, 1995).

Las proteínas oligoméricas son importantes para conocer las estructuras cuaternarias (Jones y Thornton, 1985; Jaenicke, 1987). La mayoría de los estudios tienen como objetivos el conocer como es que estas proteínas pueden ser disociadas dentro de monómeros y el determinar las propiedades de sus monómeros aislados.

La determinación de la estabilidad de proteínas mediante el monitoreo de cambios conformacionales inducidos por la desnaturalización térmica y química con técnicas biofísicas como el dicroísmo circular y la espectroscopia de fluorescencia es un paso esencial en el estudio de la estructura, plegamiento e ingeniería de proteínas. En principio, cualquier prueba que pueda monitorear la fracción de proteína desplegada en función del agente perturbante puede utilizarse para medir su estabilidad. (Chiwook y Marqusee, 2005).

La proteólisis acoplada con electroforesis ha sido reconocida como un método efectivo para distinguir conformaciones plegadas de las desplegadas (Chiwook y Marqusee, 2005).

Una de las propiedades de HuTIM que se desea determinar es su estabilidad estructural mediante proteólisis limitada, técnica que ha sido empleada para estimar la estabilidad en otras enzimas (Novotný y Braccoleri, 1987).

2.2.- Proteólisis limitada en la TIM

La proteólisis limitada se ha utilizado como método de sondeo estructural para determinar las zonas más susceptibles en estas enzimas a la hidrólisis enzimática (sitios móviles, exposición al solvente e interacciones locales) (Hubbard y cols., 1994). Gracy y cols., (1998) reconocieron que la TIM ha sido un modelo para explorar el marcaje terminal y los pasos iniciales de degradación de proteínas. La TIM es la enzima mejor caracterizada; las formas modificadas relacionadas a la edad se encuentran en todos los tejidos y células. En mamíferos, las isoformas modificadas de TIM que se acumulan con el envejecimiento, son el resultado de la desamidación específica en N71 en cada subunidad; posteriormente se produce la desamidación de la N15 localizada a sólo 5 Å de distancia en la subunidad vecina, (ver Fig. 3).

Un requisito para que la TIM lleve a cabo la catálisis es la apertura y cierre de la tapa de bisagra (residuos 167-176) en el centro catalítico. Esta tapa excluye el agua del sitio activo y previene la hidrólisis de los sustratos, transformándose en metilglioxal un compuesto altamente tóxico. Se ha observado que los cambios conformacionales asociados con la apertura y cierre de la tapa de bisagra son transmitidos al asa tres (de interdigitación) en la interfase de la subunidad, esto incrementa la probabilidad de desamidación de N71. Lo anterior induce la pérdida de sitios de

contacto entre subunidades iniciando, así, el segundo grupo de desamidaciones en N15 de la subunidad vecina yuxtapuesta (Yuan y cols., 1981).

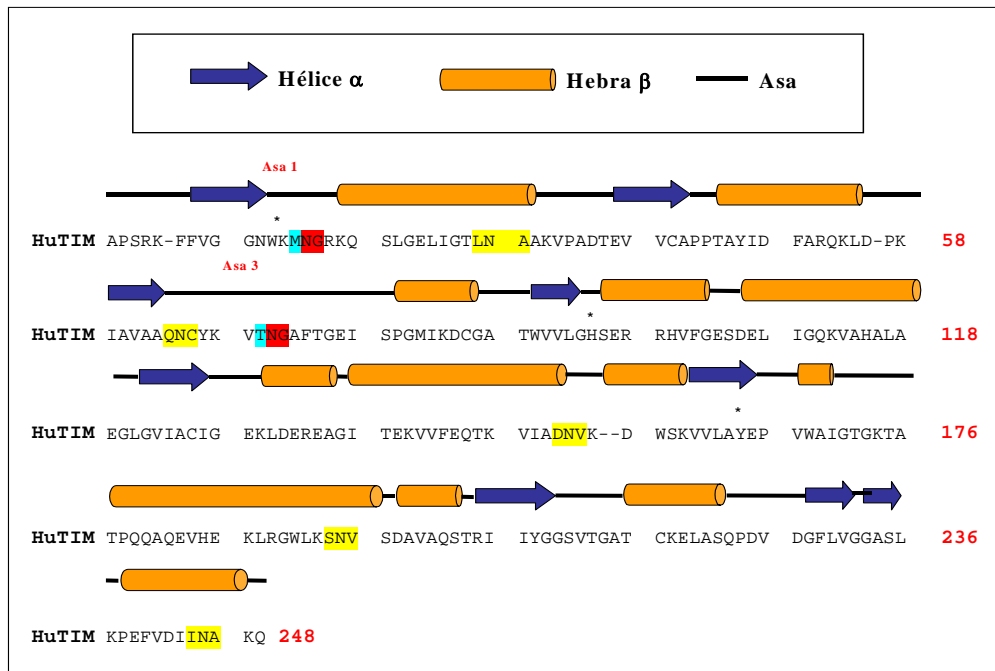


Figura 3.- Estructura primaria y secundaria en una subunidad de la HuTIM. Los residuos marcados con amarillo muestran las Asn en la enzima, con rojo se marcan las Asn desamidantes. Los (*) muestran los residuos del sitio activo en la enzima.

La introducción de dos cargas negativas dentro de la interfase hidrofóbica provoca cambios conformacionales en la subunidad exponiendo así, áreas hidrofóbicas (Sun y cols., 1992b; 1995).

Es claro que las proteínas desamidadas u oxidadas son más fácilmente desplegadas y son mejores sustratos para proteasas. Por ejemplo, la TIM desamidada se corta fácilmente en sitios específicos por proteasas citosólicas. El corte proteolítico inicial de la enzima de mamífero ocurre entre la unión de T139 y E140 localizado cerca del asa catalítica (Sun y cols., 1992a, 1992b y 1993). Estos sitios de corte están cercanos al punto medio de la cadena polipeptídica y contribuyen a la concepción general de que los cortes proteolíticos iniciales se dan mayormente en asas flexibles (Hubbard y cols., 1994). La desamidación en la TIM generó sitios de corte adicionales, cercanos al carboxilo terminal de la cadena polipeptídica (Sun y cols., 1995).

Actualmente no se ha explorado el comportamiento de HuTIM mediante proteólisis limitada y es importante determinar el grado de susceptibilidad y/o degradación, así como su estabilidad y resistencia proteolítica.

Este sondeo estructural ya se ha llevado a cabo en la TIM de *T. brucei brucei* y *T. cruzi* utilizando una serín proteasa similar a la proteinasa K. En ambas enzimas se observaron diferencias sustanciales en el grado de susceptibilidad proteolítica a pesar de que presentan un 68% de identidad en sus secuencias de aminoácidos.

De acuerdo con Ray y cols., (1999) y Reyes-Vivas y cols., (2002); la proteólisis limitada puede generar TIM's que presentan diferentes cortes con pérdida de actividad pero conservando su estructura. Sun y cols., (1993) mostraron que la TIM de levadura fue resistente a varias proteasas. La proteólisis limitada de TIM de levadura con subtilisina (en una proporción molar 100:1 de TIM vs proteasa, a 37°C por 5-7 h) arrojó una TIM cortada pero unida no covalentemente y catalíticamente activa. La secuenciación mostró que el sitio de proteólisis primaria para la TIM de levadura fue entre L174 y A175, región que forma parte de la oquedad que se cierra sobre el centro catalítico. El resultado fue una reducción en la afinidad de unión al sustrato. Esta TIM cortada mostró valores de K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m altos que no fueron explicados.

Reyes-Vivas y cols., (2002) mostraron la susceptibilidad a la subtilisina de Carlsberg en la TIM de *T. brucei* y *T. cruzi*. En experimentos de incubación en proporción molar de 4 dímeros de TIM por monómero de subtilisina (4:1) durante 36 h a 30°C, se obtuvo una TcTIM con hidrólisis extensiva, pérdida de actividad y grandes alteraciones estructurales. En contraste, la TbTIM bajo las mismas condiciones sólo presentó dos sitios de corte y el porcentaje de monómero cortado fué alrededor del 50%. Cuando se realizaron cursos temporales de hidrólisis este 50 % de monómero cortado se preservó durante un gran intervalo de tiempo. El análisis de esta enzima en geles nativos mostró que TbTIM estuvo constituida por dos especies con diferente movilidad electroforética. Una especie mostró el dímero intacto, mientras que la otra fracción estaba constituida por la mitad de monómeros intactos y la mitad de monómeros cortados. Ésta última fracción se logró aislar y caracterizar cinética y estructuralmente. Los resultados mostraron que la enzima presentaba la masa molecular del dímero, pero con un monómero cortado y otro intacto. Su k_{cat} con gliceraldehído 3-fosfato (α -GDH) fue la mitad de la TbTIM nativa, sin cambios en la K_m .

La fluorescencia intrínseca de la TbTIM cortada se desplazó 5 nm hacia el rojo lejano, mientras que la asociación entre subunidades no se afectó. Estos datos se interpretaron como cambios estructurales que se podrían presentar equivalentemente en ambos monómeros o, alternativamente, que el cambio estructural en una subunidad por proteólisis afectaba a la otra subunidad.

Tanto en TcTIM como en TbTIM, la subtilisina hidrolizó la unión del péptido entre Q181-Q182. Por otra parte, la TcTIM presentó dos cortes adicionales entre T130-N131 y entre N131-E132; en el caso de TbTIM, se observó un solo corte adicional entre T139-A140. Al examinar las posiciones de los sitios de corte en la estructura cristalográfica de TcTIM y TbTIM, se encontró que los cortes se localizaban en la α hélice 5, la cual se encuentra dividida en el centro por un asa corta. La TcTIM se cortó antes de esta asa, mientras que TbTIM se hidrolizó al final del asa. Con lo anterior, los autores sugirieron que las grandes diferencias en sensibilidad a subtilisina en TcTIM y TbTIM pudieron deberse a los diferentes sitios de corte en la misma región y promovieron diferencias dramáticas a cada enzima. Alternativamente, se sugirió que la TcTIM presenta intrínsecamente mayor flexibilidad y movilidad conformacional en solución que la TbTIM y por tanto, la enzima de *T. cruzi* fue más susceptible a la proteólisis.

El efecto de la subtilisina en varias TIM's mostró que todas las enzimas fueron cortadas pero en cada caso existieron marcadas diferencias en el sitio de corte. En la siguiente tabla se muestran los sitios de corte en la enzima de conejo (Vögel y Chmielewski, 1994; Sun y cols., 1992a), levadura (Sun y cols., 1993), *Plasmodium falciparum* (Ray y cols; 1999) y entre *T. cruzi* y *T. brucei* (Reyes-Vivas y cols., 2002), (ver tabla 3). Por tanto, realizar una predicción del comportamiento que una enzima adoptará por el corte hidrolítico de una proteasa, es aún incierta.

Especie	N° de cortes	Ubicación
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	3	A31-K32 + L93-G94 + T139-E140
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	S52-L53 + L174- A175
<i>Plasmodium falciparum</i>	2	V124-V125 + I161-L162
<i>Trypanosoma cruzi</i>	3	T130-N131-E132 + Q182-Q183
<i>Trypanosoma brucei</i>	2	T139-A140 + Q181-Q183

Tabla 3.- Sitios de corte en las TIM's hidrolizadas con Subtilisina.

3.- JUSTIFICACIÓN

Poco se conoce sobre el efecto de la proteólisis limitada sobre la actividad y estructura de la HuTIM. La generación de un modelo de proteólisis en la HuTIM recombinante nos proporcionaría información de cómo podría ser el proceso de degradación en esta enzima y cómo es que una modificación post-traducciona, como es la desamidación, podría alterar potencialmente a tal proceso. Este trabajo sienta las bases para que se realicen estudios sobre proteólisis limitada de las mutantes reportadas en las deficiencias de HuTIM y se aporte información sobre el efecto en el envejecimiento.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General:

Caracterizar el mecanismo de degradación proteolítica de la HuTIM recombinante tratada con Proteinasa K *in vitro*.

4.2.- Objetivos particulares:

- Optimizar el protocolo de purificación para HuTIM recombinante.
- Determinar el efecto de la proteólisis limitada sobre HuTIM ante distintas relaciones molares de proteinasa K *vs* HuTIM.
- Caracterizar estructuralmente a los productos de la degradación proteolítica de la HuTIM generados mediante el uso de proteinasa K (electroforesis, secuenciación del NHterminal, dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca).
- Caracterizar funcionalmente a los productos de la degradación proteolítica de la HuTIM.
- Estimar el efecto del tiempo post-purificación de HuTIM ante la digestión proteolítica.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1.- Sobreexpresión y purificación de la enzima recombinante

Basado en el métodos descrito por Mande y cols., (1994), la enzima recombinante se sobreexpresó y purificó. A partir de células de bacterias *E. coli* cepa BL21(DE) pLys transformadas con el vector de sobre-expresión *pET3a* conteniendo el gen de la HuTIM, se cultivaron en 2.5 L de medio LB a 37°C con 100 mg/L de ampicilina. Posteriormente, se sobreexpresó con 0.4 mM de isopropil β -tiogalactopiranosido (IPTG) a la enzima recombinante de la HuTIM. Cuando el valor de Δ D.O. a 600 nm fue cercano a uno, el cultivo se incubó a 30°C con agitación constante a 250 RPM toda la noche. El cultivo se concentró por centrifugación a 5000 RPM por 10 min. El botón bacteriano se resuspendió en amortiguador de lisis pH 8.5 (Tris 50 mM, EDTA 0.2 mM, NaN₃ 0.1 mM y PMFS 0.1 mM). Las bacterias se lisaron a 4°C mediante 6 intervalos de sonicación de 45 segs con descansos de 1:30 min en un sonicador ultrasónico (Branson).

Las células lisadas fueron ultracentrifugadas a 45,000 RPM durante 1 h a 4 °C y el sobrenadante se conservó. Este sobrenadante se precipitó posteriormente con (NH₄)₂SO₄ al 40% y se almacenó por 3 h a 4°C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 9000 RPM por 30 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante; a este sobrenadante se le adicionó (NH₄)₂SO₄ al 90% y se almacenó a 4°C toda la noche. Al día siguiente, este precipitado se centrifugó a 9000 RPM por 30 min a 4°C. El botón de proteína que se obtuvo fue resuspendido en amortiguador “A” (Tris 20 mM, EDTA 0.2 mM, NaN₃ 0.1 mM a pH 8.5) para después dializarse contra el amortiguador “A” en 500 mL por 2 ocasiones: (1^a diálisis por 3 h y la 2^a toda la noche). La enzima dializada se concentró por ultrafiltración (Amicon, Millipore) con filtros de celulosa regenerada YM con paso de corte de 10 kDa, (Fig. 4 y tabla 5).

Con la enzima recién purificada se llevaron a cabo los experimentos. Una parte fue almacenada en amortiguador conteniendo de Na₂HPO₄ 100 mM, EDTA 10 mM, NaN₃ 0.1 mM a pH 7). Todos los experimentos se llevaron a cabo inmediatamente después de dializar a la enzima en buffer TEA (Trietanolamina 100 mM y EDTA 10 mM a pH 7.4). La HuTIM se obtuvo con una pureza mayor al 90 %. La proteinasa K (*SIGMA*) se obtuvo comercialmente.

5.1.1.- Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por su absorbencia a 280 nm. El coeficiente de extinción molar (ϵ_{280}) se calculó de acuerdo con Pace y cols. (1995). Para la HuTIM el $\epsilon_{280} = 32595 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y el ϵ_{280} de la proteinasa K es $33380 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Alternativamente, se utilizó el método del ácido bicinoninico BCA (*PIERCE*), ver (Bradley et al., 2007).

5.2.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL

5.2.1.- Digestión proteolítica de la HuTIM

La HuTIM nativa [1 mg/ml] fue incubada a diferentes proporciones molares de HuTIM vs proteinasa K (2000:1 y hasta 1:5). Los ensayos se hicieron por triplicado y se llevaron a cabo cursos temporales bajo la proporción molar de 1:0.75, en amortiguador TEA a 30 °C. Las proteólisis se detuvo incubando éstas mezclas de 15 μl durante 10 min a 30°C con una concentración final de 5 mM de Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (SIGMA) disuelto en 0.062% de DMSO (MERCK).

5.2.2.- Digestión proteolítica bajo diferentes relaciones molares

Se llevaron a cabo ensayos de digestión proteolítica de la HuTIM [1 mg/mL] bajo diferentes relaciones molares HuTIM:Proteinasa K [1:0.0005 a 1:5] incubando por 36 h a 30°C; posteriormente, la proteinasa K se inactivó con 5 mM de PMSF. (**Gráfica 1 y Figs. 10 y 11**).

Estos experimentos nos permitieron obtener los siguientes resultados:

- 1) Determinar la sensibilidad de la HuTIM a la proteinasa K.
- 2) Determinar la pérdida de monómero intacto por hidrólisis, así como el efecto de la hidrólisis sobre la actividad residual.
- 3) Confirmar mediante electroforesis nativas la presencia de la fracción correspondiente al Pico 3 frente a las distintas relaciones molares exploradas.

5.2.3.- Escalamiento de la digestión proteolítica

El escalamiento se refiere a la obtención de una mayor cantidad de HuTIM proteolizada que se llevó a cabo para enriquecer las fracciones con distinto pI. La digestión proteolítica se realizó con 10 mg de proteína total de HuTIM a una concentración final de 1 mg/mL y una relación molar de

1:0.75 (HuTIM:Proteínasa K). La incubación se llevó a cabo en amortiguador de TEA 100 mM, EDTA 10 mM, a pH 7.4 durante 36 h a 30°C. La reacción se detuvo al adicionar 5 mM de PMSF a la muestra e incubar 10 min a 30°C. Posteriormente, la HuTIM se concentró hasta 10 mg/mL.

5.3.- Digestión proteolítica en curso temporal

La condición para la cinética de hidrólisis de HuTIM por proteínasa K se describe a continuación. La relación utilizada de HuTIM:proteínasa K fue de 1:0.75. La HuTIM [1mg/mL] se incubó con proteínasa K a distintos intervalos de tiempo (cada 4 h hasta las 36 h) a 30°C, en 30 µl de una mezcla de reacción conteniendo TEA a pH 7.4. Al término de la incubación, la reacción se detuvo con 5 mM de PMSF y una incubación adicional de 10 min a 30°C (**Figs. 12 y 13**).

5.4.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL

Después de la proteólisis, se llevó a cabo el análisis estructural de la HuTIM mediante distintas técnicas que a continuación se describen.

5.4.1.- Electroforesis desnaturalizante

La proteólisis se analizó utilizando geles desnaturalizantes conteniendo 16 % de Poliacrilamida – Dodecilsulfato de sodio, (SDS-PAGE, 85 × 75 × 0.75 mm), (Schägger y von Jagow, 1987). La corrida se llevó a cabo en cámara vertical (Hoëfer SE 250 de *Amersham Biosciences*). El tiempo de corrida, fue con 30 min a 90 *volts* constantes y después por 3 h a 15 *mAmp* constantes, (**Fig. 5**).

5.4.2.- Electroforesis nativa

La hidrólisis se evaluó también al correr las muestras en electroforesis no desnaturalizante, en geles nativos (85 × 75 × 0.75 mm, o bien 85 × 75 × 1.5 mm, conteniendo 7.5% de acrilamida) descritos por McLellan, (1982). Se utilizó un amortiguador de corrida con Tris 12 mM y glicina 96 mM, pH 8.5. Debido al pI de HuTIM (7.1) y de Proteínasa K (9.1), el cátodo fue ubicado en la parte inferior de los geles; por tanto, las fracciones más básicas de proteína presentaron mayor movilidad en el gel, (**Fig. 6**).

5.4.3.- Doble dimensión electroforética

La electroforesis de doble dimensión se llevó a cabo realizando la electroforesis nativa de las muestras de HuTIM hidrolizada; posteriormente, las bandas obtenidas de esta primera electroforesis se separaron y se aplicaron a un gel desnaturizante. (Figs. 13 y 14).

5.5.- Documentación de geles y análisis densitométrico

La tinción de los geles se llevó a cabo con azul de Coomassie R-250 (SIGMA) y se analizó densitométricamente. Se usó un programa de software (LabWorks) PC2 para documentación, digitalización y procesamiento para el análisis de imágenes y determinar, así, el porcentaje de densidad óptica (% D.O.) de las bandas del hidrolizado de los geles. Estos datos se confirmaron por densitometría óptica de la banda/carril obtenida directamente en un espectrofotómetro (Beckman DU-650) a 542 nm.

5.6.- Secuenciación del NH-terminal de los péptidos

Para conocer los sitios de corte en la HuTIM hidrolizada con la proteinasa K, los fragmentos de la HuTIM fueron transferidos desde geles desnaturizantes (16 % acrilamida, 85 × 75 × 1.5 mm) hacia membrana de PVDF (polivinildifluorobenceno HyBond-P) (*Amersham Pharmacia Biotech*). La transferencia se llevó a cabo utilizando el método de Yuen y cols., (1988) en 10 mM de ácido 3-(ciclohexilamino) propano-1-sulfónico (CAPS) a pH 11 en 10 % de metanol. La transferencia se llevó a cabo con 60 *mAmp* ctes. durante 3.5 h a temperatura ambiente en cámara de transferencia horizontal *Pharmacia*.

Los péptidos transferidos se tiñeron con azul de Coomassie-R al 0.1 % en 50 % de metanol. La determinación del NH-terminal se llevó al cabo utilizando un secuenciador de proteínas en fase gaseosa que emplea el método automatizado de degradación de Edman. (LF-3000, Beckman instruments) equipado con un sistema Beckman gold (sistema HPL). El HPLC incluyó una bomba modelo 126 y un detector de arreglo de diodos puesto a 268 y 293 nm para señal y referencia, respectivamente. La columna de HPLC fue una Beckman Spherosa Micro PTH (2x150 mm). Se utilizaron reactivos estándar de secuenciación Beckman, (Fig. 7).

5.7.- Separación por HPLC

5.7.1.- Cromatografía de intercambio iónico

Para comprobar si la diferencia de la subpoblación generada por proteólisis se debió a un cambio en la carga, se procedió a aplicar la muestra de HuTIM proteolizada (10 mg) en una columna cromatográfica de intercambio aniónico de grado analítico *Q-Resource* de 1 mL (Amersham Biosciences), previamente equilibrada con amortiguador de Tris 20 mM, EDTA 0.2 mM y 0.1 mM de NaN_3 a pH. 8.5.

La enzima digerida se inyectó a la columna a temperatura ambiente y fue eluída en un gradiente lineal con NaCl 0.5 M de 0-100 % y flujo constante de 1 mL/min durante 38 min. Este método permitió separar cuatro picos ó fracciones, (**gráfica 2**). Los perfiles de elución se determinaron por la señal de absorbencia a 280 nm en un detector de señal acoplado al cromatógrafo líquido de alta presión HPLC (*Perkin Elmer*) de forma continua.

Paso	Tiempo (min.)	Flujo (ml/min)	A (%)	B (%)	Curva	Presión máxima (Psi)
0	1	1	0	100	=	200
1	3	1	0	100	=	//
2	20	1	13	87	1	//
3	5	1	20	80	0	//
4	5	2	100	0	0	//
5	5	2	0	100	0	//

Tabla 4.- Programa utilizados para obtener las diferentes especies a partir de la HuTIM hidrolizada, separadas por carga (A = amortiguador + NaCl 0.5 M) (B = amortiguador sin NaCl).

5.7.2.- Concentración de las fracciones obtenidas a partir de la columna Q Resource

Las fracciones eluídas fueron concentradas por ultrafiltración en Amicon, con membranas de celulosa regenerada YM10 con Mr de 10,000 de paso de corte y se determinó la concentración de proteína a 280 nm, basados en el coeficiente de adsorividad de la enzima ($1.3 \Delta\text{D.O.} = 1 \text{ mg/mL}$). Después, se hicieron las electroforesis desnaturizantes y nativas para seleccionar la fracción a estudiar. A las fracciones del hidrolizado con incremento en movilidad electroforética se le determinó cambios en su estructura terciaria y secundaria mediante fluorescencia intrínseca (*FI*) y dicroísmo circular (*DC*).

5.7.3.- HPLC de exclusión molecular

Las muestras de HuTIM previamente fraccionadas por columna de intercambio aniónico fueron inyectadas en una columna de exclusión molecular Superdex-75 de grado analítico, previa calibración con estándares de peso molecular y equilibrada en TEA a pH 7.4 y 150 mM de NaCl. Esta columna analítica se utilizó para corroborar la integridad a nivel de la estructura cuaternaria de las fracciones (HuTIM Control, Picos 3 y 4); se incluyeron 20 µg de proteína a [1 mg/mL]. (Gráfica 7 recuadro superior derecho).

5.8.- Cambios estructurales inducidos por la proteólisis

5.8.1.- Caracterización de la estructura secundaria del Pico 3 y Pico 4

5.8.1.1.- Dicroísmo circular en UV lejano

Los espectros de dicroísmo circular se corrieron en un espectropolarímetro (JASCO J-810). Se usó una celda de cuarzo de paso de luz de 0.1 cm. La elipticidad molar $[\theta]$ se midió en el UV lejano (260 - 190 nm) utilizando un ancho de banda de un 1.0 nm. Los espectros se realizaron con 5 repeticiones utilizando una concentración de proteína de 100 µg/mL a 25°C. Las enzimas se dializaron vs el amortiguador conteniendo 25 mM de NaH₂PO₄ a pH 7.4, a cada experimento se le sustrajo la señal del amortiguador (blanco), (tabla 7 y gráfica 3).

Para calcular los valores de elipticidad molar, se determinó la concentración de proteína a 280 nm. El contenido de hélices- α , hojas- β , asas y estructura desordenada fueron calculados con el programa para PC CDProt, (Sreerama y cols., 1999).

La elipticidad molar ($[\theta]$) se obtuvo con la ecuación:

$$[\theta] = [(\theta_{\text{obs}} \times \text{MRW}) / C / \times l] \times 100$$

Donde: $[\theta]$ = Elipticidad molar en grados

θ_{obs} = Media de la elipticidad en grados

MRW = Media del peso molecular de los residuos

100 = Factor que se origina de la conversión de la concentración molar a dmol/cm²

C = Concentración de proteína en mg/mL

l = Paso de luz en la celda 0.1 cm ó 1 cm

5.8.2.- Caracterización de la estructura terciaria del Pico 3 y Pico 4

5.8.2.1.- Fluorescencia Intrínseca (*FI*)

Para determinar la estructura terciaria de las fracciones antes mencionadas, se hizo un análisis de *FI* de las mismas. La fluorescencia de una proteína se obtiene por las señales de emisión los residuos de triptofano y tirosina al excitarse por un haz de luz a 280 nm. La señal de fluorescencia por los residuos de W fue separada de la emitida por Y. Estas señales dependen del ambiente inmediato que los rodea (cambios en la exposición al solvente), por lo que es posible evaluar alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína por perturbaciones en su patrón de fluorescencia (Pain, 2004a).

La señal de fluorescencia se obtuvo a partir de los espectros con un barrido de emisión a una longitud de onda (λ) de 310 a 500 nm al ser excitados por un haz de luz a λ 280 nm ó 295 nm. Las muestras se corrieron con cinco repeticiones cada una. Los experimentos se llevaron a cabo con enzimas dializadas en amortiguador de NaH_2PO_4 25 mM a pH 7.4 a 25°C con una concentración de proteína de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A los valores de los espectros de emisión de cada muestra se le sustrajo el blanco (amortiguador), (tabla 8 y gráfica 4).

Para calcular el centro espectral de masas SCM se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{SCM} = \Sigma (\lambda \times \mathbf{I}) / \Sigma (\mathbf{I})$$

Donde: (λ) = Longitud de onda utilizada
(\mathbf{I}) = Intensidades obtenidas a cada longitud de onda.

5.8.2.2.- Dicroísmo circular en UV cercano

Además de la determinación de la *FI*, otra técnica utilizada para estudiar la estructura terciaria de una proteína es a partir de la obtención de su espectro de DC en el UV cercano (λ 350-250 nm). En este caso los cromóforos son los residuos aromáticos y puentes disulfuro; la señal es sensible al total de la estructura terciaria de la proteína (Pain, 2004).

El UV cercano es muy sensible y detecta cambios locales de exposición al solvente cercanos a los fluoróforos. Cambios en las señales de λ 250-270 nm son atribuidas a los residuos de F, de λ 270-290 nm se atribuyen a Y y de λ 280-300 nm son atribuidas a W.

Para determinar los cambios en la estructura terciaria se corrieron los espectros de dicroísmo circular en UV cercano (DC) de las muestras dializada contra amortiguador de NaH_2PO_4 25 mM a pH 7.4 y previamente desnaturalizadas por incubación con 6 M de cloruro de guanidina (Gdn/HCl) a 25°C durante 24 h (Paine, 2004). La elipticidad molar $[\theta]$ se midió en el UV cercano (310 - 240 nm). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado para cada muestra de proteína con 2 mL a $[500 \mu\text{g}/\text{mL}]$ a 25°C. Los espectros se obtuvieron del promedio de 5 repeticiones para cada muestra; a todos los espectros se les sustrajo la señal del amortiguador (blanco), (**gráfica 5**).

5.8.2.3.- Termoestabilidad ó desnaturalización térmica (T_m)

Para los experimentos de desnaturalización o estabilidad térmica, las fracciones de la HuTIM se dializaron contra amortiguador de NaH_2PO_4 25 mM a pH 7.4. Las muestras se corrieron a λ 222 nm para obtener el espectro de DC, a concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un volumen final de 350 μl en celdilla de cuarzo con paso de luz de 0.1 cm, en un rango de temperatura de 40-80°C, (**ver gráfica 6**). El incremento de temperatura (ΔTemp) de las muestras fue de 1°C/2.5 min. El proceso de desnaturalización fue irreversible en todas las muestras. Cada muestra fue corregida por sustracción del blanco (amortiguador), corrido bajo la misma condición. La fracción aparente de subunidades desnaturalizadas (f_D) se obtuvo utilizando la ecuación: $f_D = (Y_N - Y) / (Y_N - Y_D)$.

Donde:

Y_N y Y_D son los valores de elipticidad característica de las subunidades plegadas y desplegadas, respectivamente. Los dos parámetros fueron extrapolaciones lineales para la porción inicial y final de la curva vs temperatura. Para obtener la temperatura media de desnaturalización (T_m), los datos se analizaron con ajuste no lineal a la ecuación de crecimiento sigmoidal y función de Boltzman:

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp [(x - x0) / dx])$$

Donde: Valor inicial: $A1 = 0$

Valor final: $A2 = 1$

Centro: $x0 = 0$

Tiempo constante: $dx = 1$

5.9.- Caracterización de la estructura terciaria del Pico 3 y Pico 4

5.9.1.- HPLC analítica de exclusión molecular (Doble dimensión cromatográfica).

Después de la separación cromatográfica de intercambio iónico por HPLC y la obtención y caracterización de la fracción correspondiente al control de HuTIM, Pico 3 y 4, se llevó a cabo la cromatografía de exclusión molecular con estas muestras, mediante corridas isocráticas en donde obtuvimos los tiempos de retención de las enzimas. Los cambios en la estructura de la enzima nativa serán detectados como modificaciones en su perfil de elución en la columna Superdex G-75 (*Pharmacia Biotech*). Así, las diferencias en la migración cromatográfica de estas fracciones de la HuTIM por digestión mostraron el reflejo de perturbaciones en su estructura cuaternaria.

5.10.- ANÁLISIS FUNCIONAL

5.10.1.- Determinación de la actividad residual de la proteinasa K

Se llevaron a cabo experimentos para determinar la actividad específica de la proteinasa K bajo las condiciones experimentales en las que se lleva a cabo la hidrólisis de la HuTIM y, así, determinar si la proteinasa K se inactiva totalmente con 5 mM de PMSF. La proteinasa K [0.375 mg/mL] se incubó en amortiguador de TEA a pH 7.4, esta enzima se incubó con HuTIM a una relación molar de 1:0.75 (HuTIM:Proteinasa K) a 30°C. La actividad de proteasa se midió al tiempo inicial y a las 40 h de incubación, en ausencia y presencia de 5 mM de PMSF. El ensayo de actividad se realizó siguiendo el incremento de absorbancia a 412 nm a 37°C debido a la hidrólisis del sustrato artificial N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (AAPFpN). La actividad se midió con 166 ng/mL ó con 3.33 µg/mL de proteinasa K para la condición de antes y después de añadir PMSF, respectivamente. La mezcla de reacción contenía 50 mM Tris/HCl, CaCl₂ 2 mM a pH 9 y 0.5 mM de AAPFpN, cuyo $\epsilon_{412} = 8,484 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Kulakova y cols., 1999), (tabla 9).

5.10.2.-Ensayos de actividad de la HuTIM y determinación de sus parámetros cinéticos

La determinación de actividad de la HuTIM se realizó mediante un sistema acoplado en dirección de GAP hacia DHAP a 25°C mediante técnicas espectrofotométricas (Garza-Ramos y cols., 1996), utilizando un espectrofotómetro Cary 100. La mezcla de reacción a pH 7.4 (0.6 mL) contuvo 1 mM de GAP (excepto para determinar constantes catalíticas con 0.02 hasta 3.5 mM), 0.9 U de α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GDH), NADH 0.2 mM, y 2.5 ó 5 ng de la HuTIM.

La actividad se calculó midiendo el decremento de la absorbencia del NADH a 340 nm con este sistema acoplado, (tabla 10).

5.10.2.1.- K_m (constante de afinidad en la enzima por el sustrato)

Esta constante se obtuvo a partir de la cinética de la HuTIM incubada y sin incubar con proteinasa K. Los datos fueron procesados con la fórmula $(V \cdot x)/(K+x)$ por análisis no lineal, donde V = ordenada al origen, K =pendiente y x = concentración del sustrato. La gráfica se ajustó a una hipérbola con la velocidad máxima (V_{max} de actividad expresada en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) y la K_m (que representó $\frac{1}{2}$ de $V_{m\acute{a}x}$ en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), (gráfica 8 y tabla 10).

5.10.2.2.- K_{cat} (constante catalítica)

Esta constante se obtuvo para el dímero y el monómero y se expresaron en $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. A partir de la fórmula: $(V_{m\acute{a}x})/[(\text{peso molecular de la enzima})(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1})]$, (gráfica 8 y tabla 10).

5.11.- Desamidación en la HuTIM

5.11.1.- Curso temporal de desamidación en la HuTIM

La desamidación se llevó a cabo utilizando el método descrito anteriormente (Yüksel y cols., 1986 y Sun y cols., 1992). A continuación se describe la técnica. La HuTIM [4 a 5 mg/mL] se dializó en amortiguador de borato de sodio 50 mM a pH 9.5 por 7 h (2 veces en 500 mL del amortiguador durante 3.5 h a 4°C). Posteriormente, se determinó la concentración de proteína a 280 nm y se ajustó a 1 mg/mL. Posteriormente, la enzima se incubó a 37°C en curso temporal hasta las 24 h, en esta condición se obtuvo una rápida desamidación. El progreso de la desamidación fue monitoreado en geles nativos de poliacrilamida; paralelamente, se determinó la actividad específica durante el curso temporal, (Fig. 15). La desamidación espontánea que se obtuvo por el almacenamiento a 4°C en buffer TEA, pH 7.4 durante 67 días también se evaluó.

5.11.2.- Proteólisis limitada posterior a la desamidación en la HuTIM

Medimos la proteólisis de una HuTIM desamidada por incubación en amortiguador de boratos durante 37 h a 37°C. La proteólisis se llevó a cabo incubando la HuTIM desamidada [1 mg/mL] con la proteinasa K a una relación 1:0.75 por 37 h bajo las condiciones descritas anteriormente.

Posteriormente, se realizaron ensayos de electroforesis nativa y desnaturizante para determinar el porcentaje de hidrólisis del monómero y el patrón de proteólisis, (tabla 11 y Fig. 16).

5.12.- Desnaturalización y renaturalización de la HuTIM a partir de la asociación de monómeros intactos resistentes a la hidrólisis

Para llevar a cabo el experimento comparativo entre dos lotes de enzima del Pico 3 (con 255 días postpurificación y recién purificada), a partir de enzima hidrolizada conteniendo la fracción de heterodímero por corte asimétrico, se desnaturizó en 7.3 M de Gnd-HCl al Pico 3 a una concentración de 290 $\mu\text{g/mL}$, durante 2 h a 37°C. Después se separó por filtración en columna de Penefsky (Penefsky, 1977) con resina G-25 fina (Amersham Biosciences) equilibradas previamente en amortiguador TEA, a pH 7.4. A los monómeros desnaturizados se les renaturalizó por exclusión del desnaturizante y reasociación por concentración en la enzima. Después se corroboró en geles nativos y desnaturizantes el cambio de carga y la exclusión de péptidos correspondientes al monómero cortado, (tabla 12 y Figs. 17, 18 y 19).

5.12.1.- Hidrólisis con dimeros resistentes de la HuTIM Pico 3

Los experimentos se llevaron a cabo con 2 muestras de proteína una almacenada por 255 días en y otra recién purificada ambas en amortiguador TEA a pH 7.4. Después de confirmar por electroforesis nativa el cambio de carga por regresión a su pI inicial y mediante electroforesis desnaturizante solo a la banda de monómero intacto; se llevó a cabo la digestión proteolítica con dimeros resistentes a la proteinasa K, nuevamente bajo las mismas condiciones que generaron al Pico 3 (rel. mol. de 0.75 a 1 vs HuTIM por 36 h a 30°C en TEA a pH 7.4), (Fig. 20).

6.- RESULTADOS

6.1.- Sobreexpresión y purificación de la enzima recombinante

Después de cosechar y romper las bacterias, la HuTIM recombinante se purificó mediante pasos sucesivos de precipitación con sulfato de amonio, centrifugación y cromatografía; (ver Fig. 4 y tabla 5). Después de la purificación, se obtuvieron 17 mg de proteína y se dializó contra amortiguador de TEA a pH 7.4. Se obtuvo una pureza >90 % a una concentración de 2.461 mg/mL, en un volumen final de 6.93 mL.

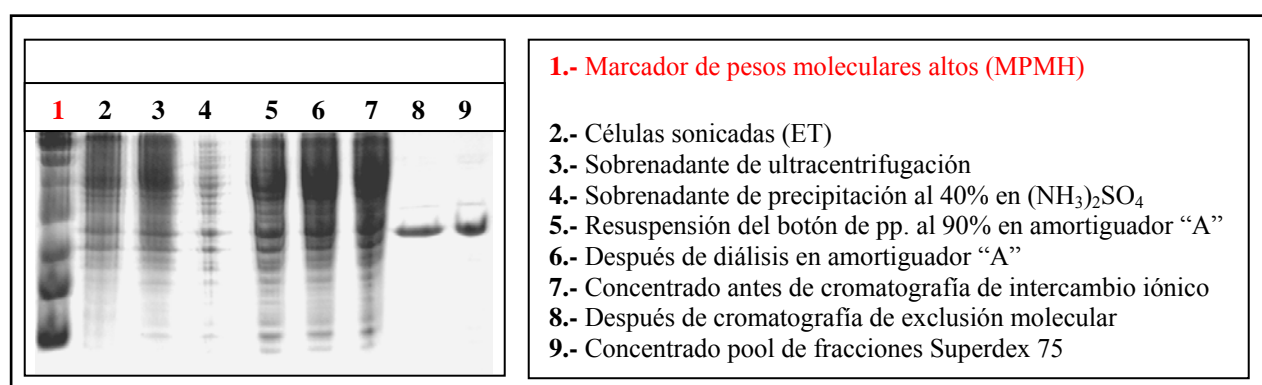


Fig. 4.- Electroforesis desnaturalizante mostrando los pasos de purificación de la HuTIM recombinante.

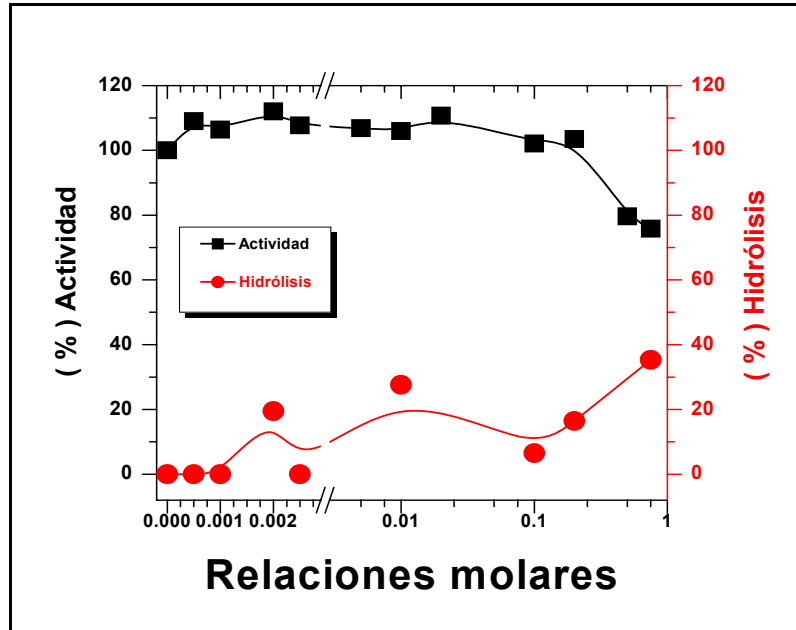
Fracción	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	Actividad Total (μmol·min ⁻¹)	Rendimiento (%)
Extracto total (ET)	126	2021.2	2.54x10 ⁵	100
Sobrenadante (SN) después de ultracentrifugación del ET	95.2	2434	2.32x10 ⁵	91.3
SN después de precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 40%	49	4328.6	2.12x10 ⁵	83.5
Precipitado con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 90%	39.6	5667.2	2.24x10 ⁵	88.2
Después de cromatografía de intercambio aniónico	30.51	2190.5	0.668x10 ⁵	27.1
Después de cromatografía de exclusión molecular	17.05	4685.3	0.8x10 ⁵	31

Tabla 5.- Rendimiento del método de purificación de la HuTIM.

6.2.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA PROTEOLIZADA

6.2.1.-Digestión proteolítica de la HuTIM bajo diferentes relaciones molares

La digestión de HuTIM se llevó a cabo bajo diferentes relaciones molares Proteinasa K vs HuTIM (0.0005:1 a 0.75:1). Se analizó actividad residual y porcentaje de hidrólisis (ver gráfica 1).



Gráfica 1.- Actividad residual e hidrólisis con diferentes relaciones molares de proteinasa K vs HuTIM.

6.2.1.1.- Electroforesis desnaturalizante

El análisis por SDS-PAGE mostró el monómero sin cortar y la generación de 3 péptidos de diferentes PM = 14.9, 7.7 y 3.96 kDa, (ver Fig. 5).

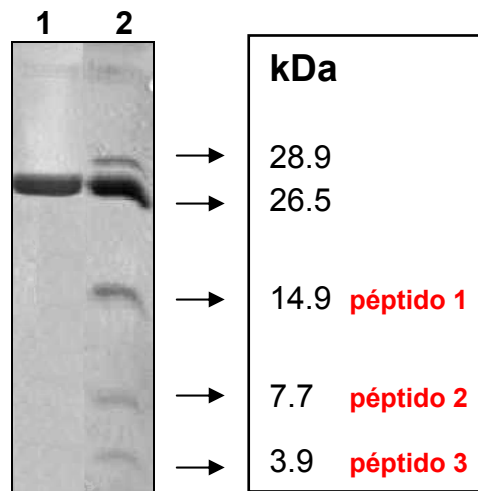


Fig. 5.- Electroforesis desnaturalizante, péptidos generados en la enzima proteolizada.

- 1) HuTIM incubada por 36 h a 30°C en ausencia de proteinasa K (control, 4µg)
- 2) HuTIM incubada por 36 h a 30°C en presencia de proteinasa K, rel. molar 1:0.75 (digerido 4µg)

Por medio de geles nativos se analizó la estructura cuaternaria de la HuTIM hidrolizada. Se observó una población con características similares a la HuTIM sin cortar y una subpoblación que cambió su carga eléctrica (*), (ver Fig. 6).

6.2.1.2.- Electroforesis nativa

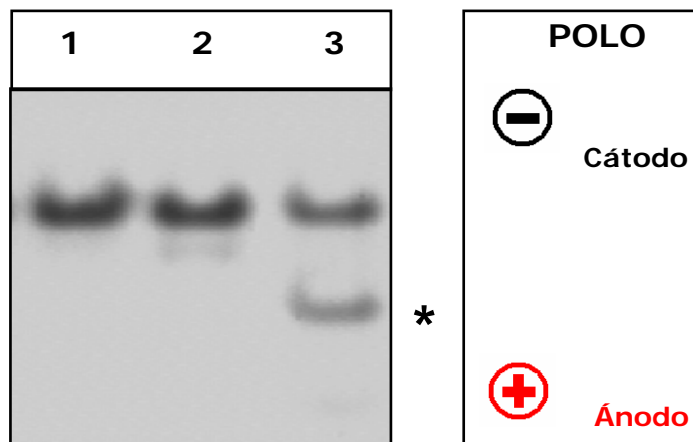


Fig. 6.- Electroforesis nativa en la que se aprecia la formación de una nueva especie con mayor movilidad.

- 1) HuTIM refrigerada a 4°C (control refrigeración, 4µg)
- 2) HuTIM incubada por 36h a 30°C en ausencia de proteinasa K (control del experimento, 4µg)
- 3) HuTIM de enzima incubada por 36 h a 30°C en presencia de proteinasa K, rel. molar 0.75:1 (digerido 4µg)

6.2.2.-Secuenciación del amino terminal de los péptidos generados.

Los fragmentos de la digestión de HuTIM se transfirieron desde los geles desnaturizantes hacia membranas de PVDF. Cada péptido presentó distinta secuencia (ver Figs. 5 y 7).

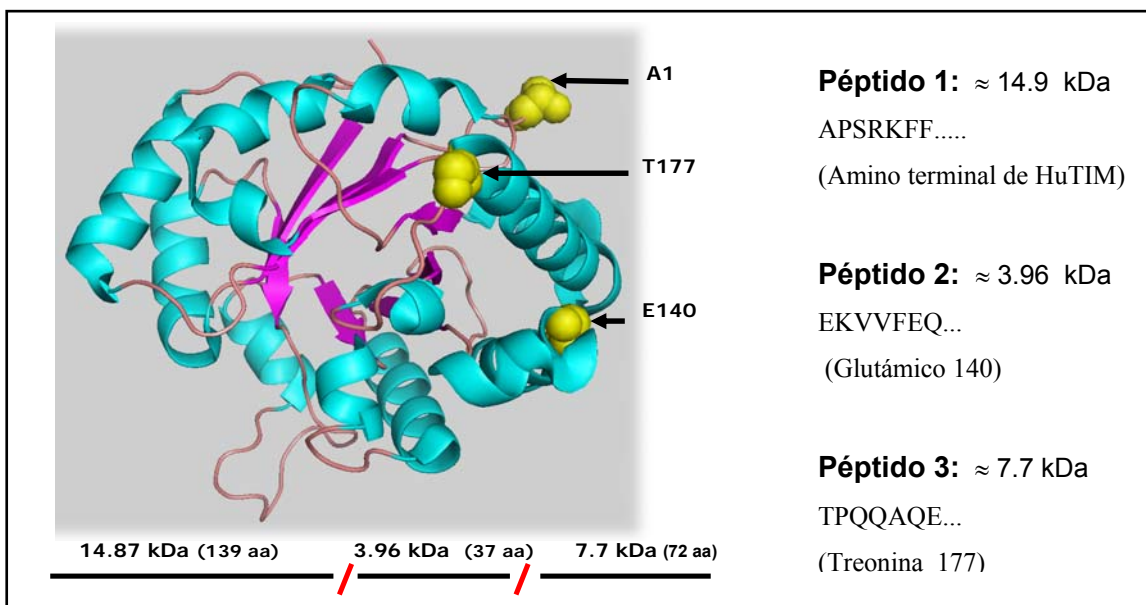


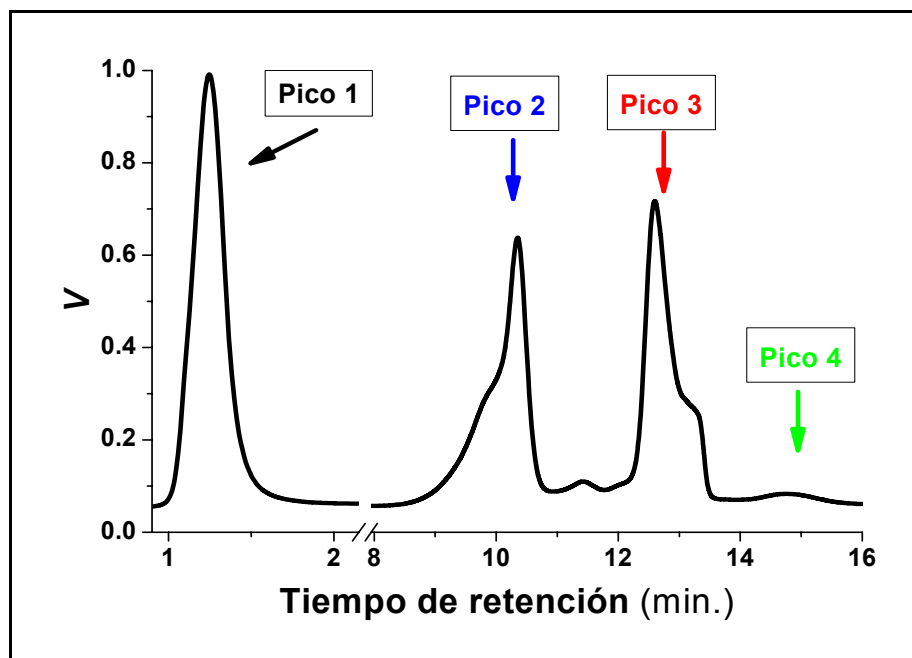
Fig. 7.- Panel izquierdo: Monómero representado en Pymol mostrando los sitios de corte en la secuencia de la HuTIM. **Panel derecho:** Amino terminales de los péptidos obtenidos a partir de la secuenciación por el método de degradación de Edman.

6.2.3.-Escalamiento de la digestión proteolítica

Se llevó a cabo el escalamiento de la digestión de HuTIM con la finalidad de purificar, mediante cromatografía de intercambio aniónico, las especies observadas en los geles nativos y confirmar si los cortes en la HuTIM son simétricos (en ambos monómeros) ó si sólo se localizan en uno de los monómeros (corte asimétrico).

6.2.4.-Separación cromatográfica de intercambio aniónico por HPLC

Aproximadamente el 63 % de la proteína hidrolizada se recuperó en cuatro fracciones ó picos de retención: **1)** 1.73 mg, 27.5%; **2)** 1.51 mg, 24%; **3)** 2.9 mg, 46.11% y **4)** 0.15 mg equivalentes a 2.38%. La primera de estas fracciones (Pico 1) no fue retenida en la columna. Las otras tres fracciones (Pico 2, Pico 3 y Pico 4) fueron retenidas; su posterior elución mostró una separación de tiempo de alrededor de 2 min entre éstas, (ver gráfica 2). Cada fracción se concentró por separado en un sistema de ultrafiltración. La concentración de proteína se determinó a 280 nm.



Gráfica 2.- Perfil de retención que muestra las especies cromatográficas obtenidas a partir de la HuTIM hidrolizada con proteinasa K bajo la relación molar 1:0.75 a su paso por HPLC analítica de intercambio aniónico.

6.2.4.1.-Electroforesis nativa y desnaturalizante

A partir de la enzima digerida, separada por cromatografía y concentrada, se llevó a cabo la caracterización mediante electroforesis nativa y desnaturalizante. La electroforesis nativa mostró

que las diferentes poblaciones de HuTIM con distintas cargas pudieron aislarse completamente (ver Fig. 8, panel superior). En el gel desnaturalizante se mostró y analizó la composición de cada una de las fracciones separadas en la cromatografía, (ver Fig. 8, panel inferior).

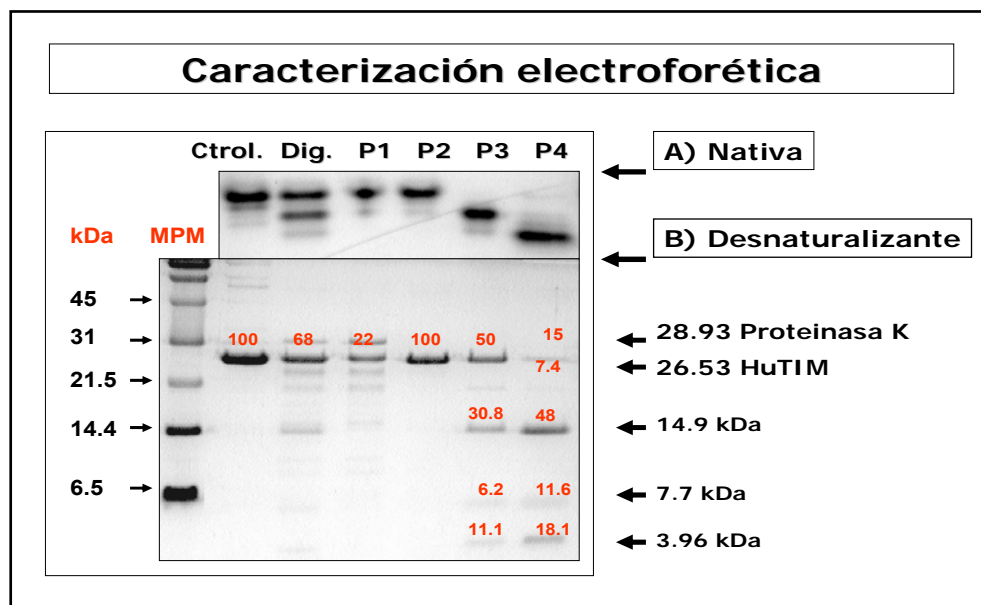


Fig. 8.- Análisis estructural de la HuTIM digerida y fraccionada por cromatografía. Panel superior: A) electroforesis nativa. **Panel inferior: B)** electroforesis desnaturalizante de HuTIM control, digerida y Picos de retención obtenidos de la cromatografía de intercambio aniónico. Asimismo, se muestra en rojo el porcentaje de D.O. de la banda de monómero/carril y de los peptidos generados.

6.2.5.-Determinación de la actividad específica en las fracciones

Posteriormente a la determinación de la concentración de proteína, en cada fracción se determinó la actividad específica y se comparó con la del control sin digestión, (ver tabla 6).

Fracción	Actividad ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Actividad (%)	Hidrólisis (%)
HuTIM Control	5403.9	100	0
Digerida	3780	72.74	11.37
Pico 1	1300	25	96.8
Pico 2	5176.8	99.63	0
Pico 3	2958.2	56.9	48.17
Pico 4	123	2.3	>95

Tabla 6.- Actividad específica antes y después de proteolizar la enzima (fracciones de cromatografía de exclusión molecular). Se incluyen el porcentaje de actividad e hidrólisis por fracción.

6.2.6.-Digestión proteolítica bajo diferentes relaciones molares

Los resultados de la hidrólisis de la HuTIM con diferentes relaciones molares de proteinasa K mostraron una disminución progresiva de monómero. La pérdida del monómero por la hidrólisis fue significativamente mayor que la pérdida de la actividad residual de la enzima. Además, se observó que en las relaciones molares más bajas (1:0.0005 de HuTIM:Proteinasa K) los cortes en la HuTIM incrementaron su actividad enzimática hasta un 20 % con respecto al valor inicial, (**Fig. 9, paneles superior e inferior**).

Los péptidos generados por la hidrólisis se llegaron a observar a partir de la relación molar 1:0.2; relaciones molares más bajas no permitieron observar péptidos (**Fig. 9, panel inferior**). La actividad residual se abolió de igual forma que el monómero intacto bajo la relación molar 1:5 (**ver Fig. 9, panel inferior**).

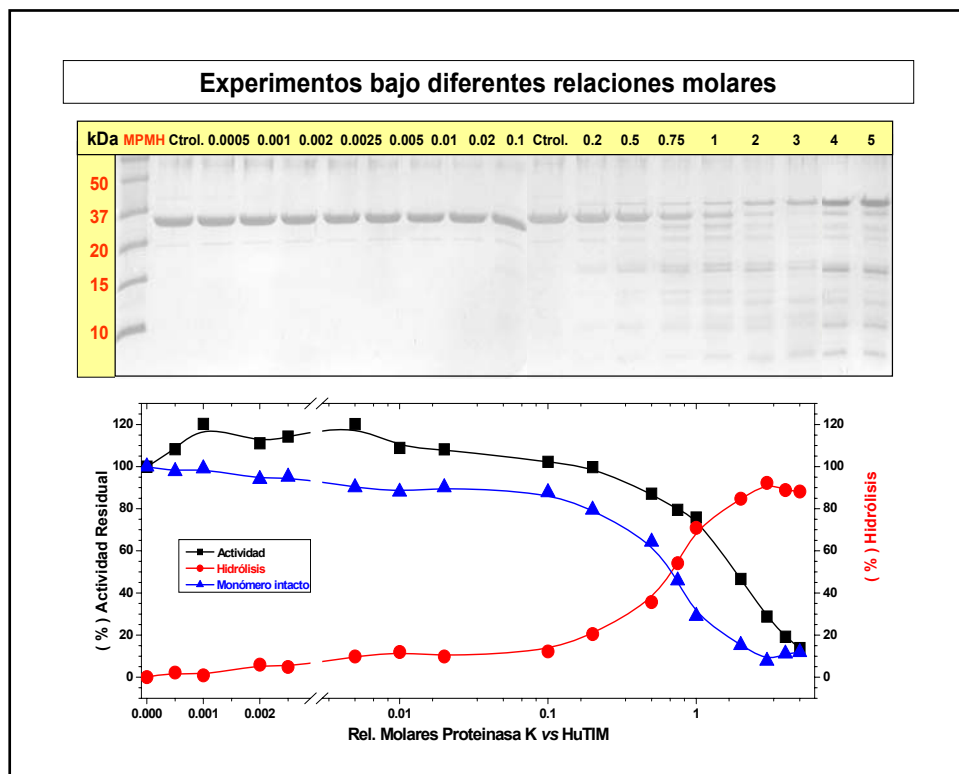


Fig 9.- Hidrólisis con diferentes relaciones molares de proteinasa K vs HuTIM.

Panel superior, electroforesis desnaturalizante con diferentes relaciones molares (1:0.0005 a 1:5 de HuTIM vs Proteínasa K respectivamente). el incremento de la hidrólisis de la HuTIM por pérdida de monómero intacto se aprecia al incrementar las relaciones molares de proteínasa K.

Panel inferior, gráfico que nos muestra los porcentajes de: (■) Actividad residual; (♦) Hidrólisis; (▲) Monómero intacto remanente. Nota: los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, en la gráfica se muestran los promedios para cada relación molar.

6.2.6.1.-Análisis densitométrico de la electroforesis nativa

El análisis densitométrico de los geles nativos evidenció un incremento progresivo de la banda correspondiente al corte asimétrico a partir de la relación molar 1:0.1 y hasta 1:5; el enriquecimiento de esta banda seguido por D.O. fue desde un 11 % hasta un 38.2 %. Con la relación molar 1:1, el análisis mostró que la banda perteneciente a la enzima nativa se conservó al 52 %, mientras que la banda del corte asimétrico y la banda de corte simétrico presentaron, respectivamente, valores del 37 % y 10.5 % (ver Fig.10, panel superior).

6.2.6.2.- Análisis densitométrico de la electroforesis desnaturizante

Las muestras incubadas con distintas relaciones molares también se corrieron en geles desnaturizantes y sus D.O. fueron determinadas. La muestra incubada a una relación molar de 1:1 mostró un 31.9 % de monómero sin cortar. Adicionalmente, esta muestra presentó tres principales bandas cuyos PM fueron de 14.9, 7.7 y 3.9 kDa; los valores densitométricos para cada banda fueron de 7.3 %, 11 % y 7 %, respectivamente.

En la relación molar 1:1, a partir del monómero intacto (31.9%). El 25.3% de D.O. se encuentra representado por monómeros intactos del Pico 3 (si la enzima se encuentra cortada en uno de sus monómeros y sabemos que la suma de D.O. de los péptidos de este representan el 25.3%), entonces tenemos otro 25.3% correspondiente al monómero resistente a la digestión proteolítica del Pico 3 (por lo tanto, la D.O. del Pico 3 ó heterodímero corresponde a 50.6%), (ver Fig.10, panel inferior).

Al menos el 37.5 % de la HuTIM hidrolizada representó al heterodímero, al correlacionarlo con la D.O. total del Pico 3 en gel nativo. Sin embargo, en el gel desnaturizante el **Pico 3 contribuyó con 50.6% de D.O. en ambos monómeros** (25.3% x 2, monómero cortado y monómero intacto), más **monómero intacto restante no heterodímero con 6.6%** (que se obtuvo a partir de la resta de 31.9% monómero intacto – 25.3% que correspondió a la D.O. de los péptidos del monómero cortado del heterodímero) y **la fracción correspondiente a otros péptidos que no son heterodímero con 42.8%** de D.O de la muestra bajo esta relación molar.

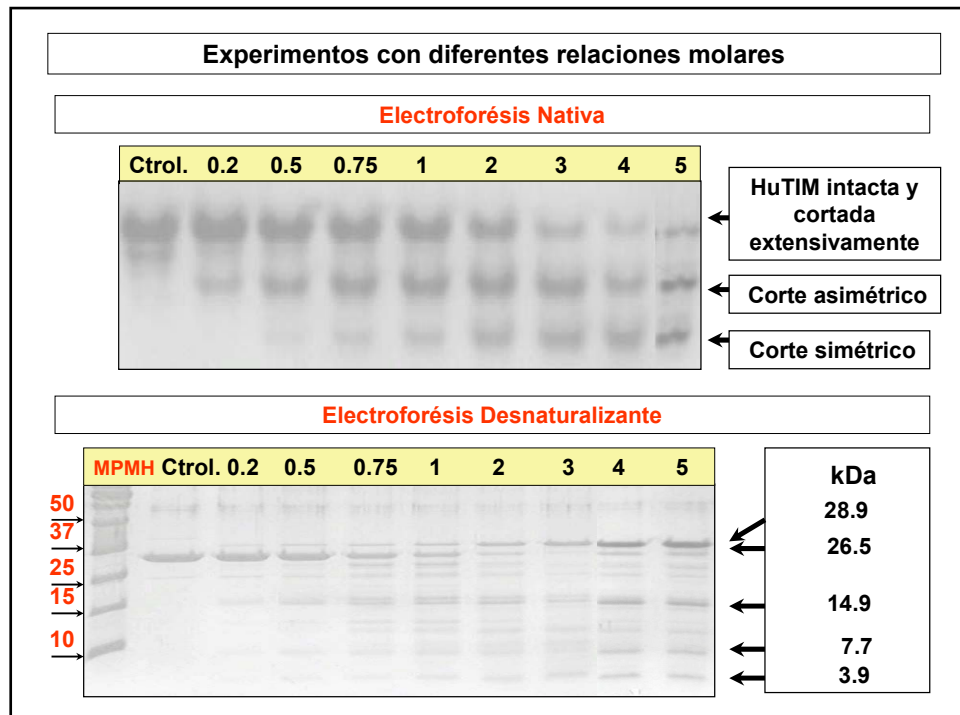


Fig.10.- Experimentos con diferentes relaciones molares: (1:0.2 hasta 1:5) de la Proteínasa K vs HuTIM. Electroforesis nativa y desnaturalizante. Panel superior, gel nativo que nos muestra la banda de menor movilidad correspondiente a la enzima intacta y cortada extensivamente; la sig. banda (Pico 3) representa a la especie con corte asimétrico ó heterodímero y por último la especie de mayor movilidad y corte simétrico con ambos monómeros cortados (Pico 4). **Panel inferior,** gel desnaturalizante en el que se resaltan los péptidos de 14.9, 7.7, y 3.9 kDa y otros péptidos con PM diferentes > y < a 15 kDa.

6.2.7.- Digestión proteolítica en curso temporal

La hidrólisis de HuTIM se analizó también bajo cursos temporales a una relación molar de 1:0.75. Esta relación molar se seleccionó debido a que nos permitió estudiar con precisión al dímero asimétricamente cortado. Los resultados mostraron que en los 60 primeros minutos se obtiene el máximo de hidrólisis, donde la banda del monómero pierde de un 55 a un 60 % de D.O. Este valor se conservó durante el resto del curso temporal (ver Fig. 11). El patrón de corte en las primeras 24 h es complejo observándose un número abundante de bandas con distinto PM. Durante las siguientes 12 h, las bandas de 14.9, 7.7 y 3.9 kDa se enriquecen y simultáneamente, desaparecen el resto de los demás péptidos.

Interesantemente, el comportamiento de la actividad enzimática fue muy diferente al patrón de corte observado. La actividad enzimática aumentó un 20 % sobre el valor control; este incremento se conservó hasta las 24 h de incubación. Posteriormente, la actividad disminuyó paulatinamente hasta quedar en un 80 % a las 36 h (Fig. 11, panel inferior).

El curso temporal de proteólisis limitada de la HuTIM se estudió también con gels nativos (ver Fig. 12). Los resultados mostraron que, bajo las condiciones de proteólisis señaladas (rel. molar 1:0.75; 30°C), la especie asimétricamente cortada se presenta desde las 4 h de incubación conservándose hasta el final del experimento (36 h).

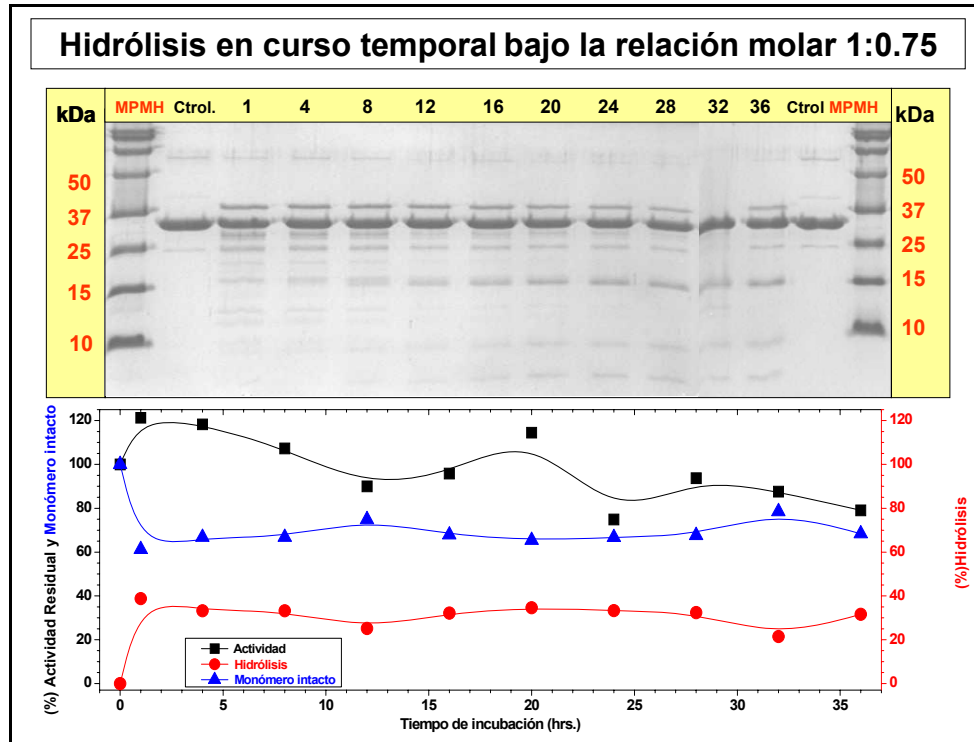


Fig. 11.- Curso temporal de hidrólisis en HuTIM vs proteínasa K bajo la relación molar 1 a 0.75 (1-36 h). **Panel superior**, nos muestra el patrón de digestión proteolítico observado a partir de la electroforesis desnaturalizante. **Panel inferior**, grafica (%): (■) Actividad residual vs (◆) Hidrólisis de monómero intacto y (▲) Monómero intacto remanente.

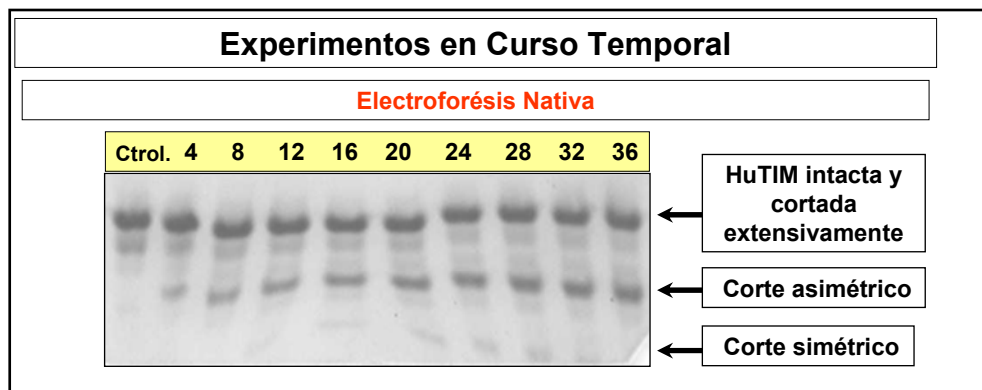


Fig. 12.- Curso temporal de hidrólisis bajo la relación molar 1 a 0.75 de la HuTIM vs Proteínasa K. (movilidad de las especies obtenidas en el gel nativo: banda de baja movilidad (HuTIM intacta y cortada extensivamente), la siguiente banda corresponde al heterodímero (Pico 3) y la banda de mayor movilidad corresponde a la especie con cortes en ambos monómeros (Pico 4).

6.2.7.1.-Electroforesis de doble dimensión

La electroforesis de doble dimensión nos permitió corroborar que los cortes después de la proteólisis en la HuTIM se localizaron en uno solo de los monómeros. En un gel nativo se corrieron simultáneamente la HuTIM nativa (P2) y la que se denominó como cortada asimétricamente (P3) (**Fig. 13A**) obtenidos de la cromatografía de intercambio iónico. Las bandas obtenidas en el gel nativo se aislaron y se corrieron en un gel desnaturalizante (**Fig. 13B**). La segunda dimensión de la muestra P2 únicamente mostró una banda de 26.6 kDa perteneciente al monómero íntegro. En contraste, la muestra P3 mostró una banda perteneciente al monómero y tres bandas adicionales cuyos PM fueron de 14.9, 7.7 y 3.96 kDa. El análisis densitométrico mostró que la banda del monómero presentaba cerca del 50 % de enriquecimiento del total de bandas; el otro 50 % correspondía a la suma de las D.O. de las otras tres bandas de péptidos. Este dato sugirió nuevamente que la muestra P3 correspondía a una HuTIM con un corte asimétrico, en la cual un monómero contiene los cortes mientras que el otro monómero permanece intacto.

La población del Pico 3 pudo diferenciarse por un cambio de carga propiciado por el corte haciendo hincapié en que esta propiedad nos permitió aislarla de manera eficiente y caracterizarla estructuralmente.

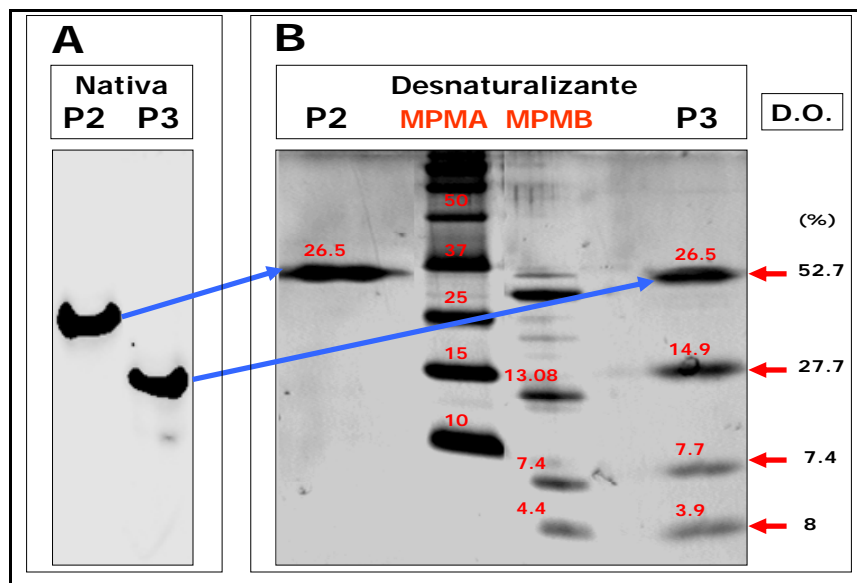


Fig. 13.- Doble dimensión electroforética. (P2) Pico 2 y (P3) Pico 3 obtenidos a partir de la cromatografía analítica de intercambio aniónico. **Panel izquierdo, electroforesis nativa. Panel derecha, electroforesis desnaturalizante:** En los carriles MPMA y MPMB se muestran pesos moleculares de interés, estos se encuentran señalados arriba de cada banda. En la parte derecha se muestra el (%) D.O. obtenida para cada banda en P3.

La electroforesis de doble dimensión también se realizó a partir de dos muestras que fueron previamente hidrolizadas a relación molar de 1:0.75 y 1:5. Después de detener la proteólisis con PMSF, las muestras se aplicaron a un gel nativo (ver Fig. 14, panel A). Como se esperaba, ambas muestras presentaron tres bandas, una de baja, una de intermedia y una de alta migración. Las bandas de media y alta migración se aislaron y se corrieron en condiciones desnaturalizantes (ver Fig. 14, panel B). El resultado mostró que la banda intermedia contenía un 50 % de monómero; el otro 50 % de D.O. estaba distribuido en tres bandas de aprox. 14.9, 7.7 y 3.9 kDa. En el caso de la banda de alta migración, la cantidad de monómero fue casi imperceptible mientras que las bandas de 14.9, 7.7 y 3.9 kDa prevalecieron.

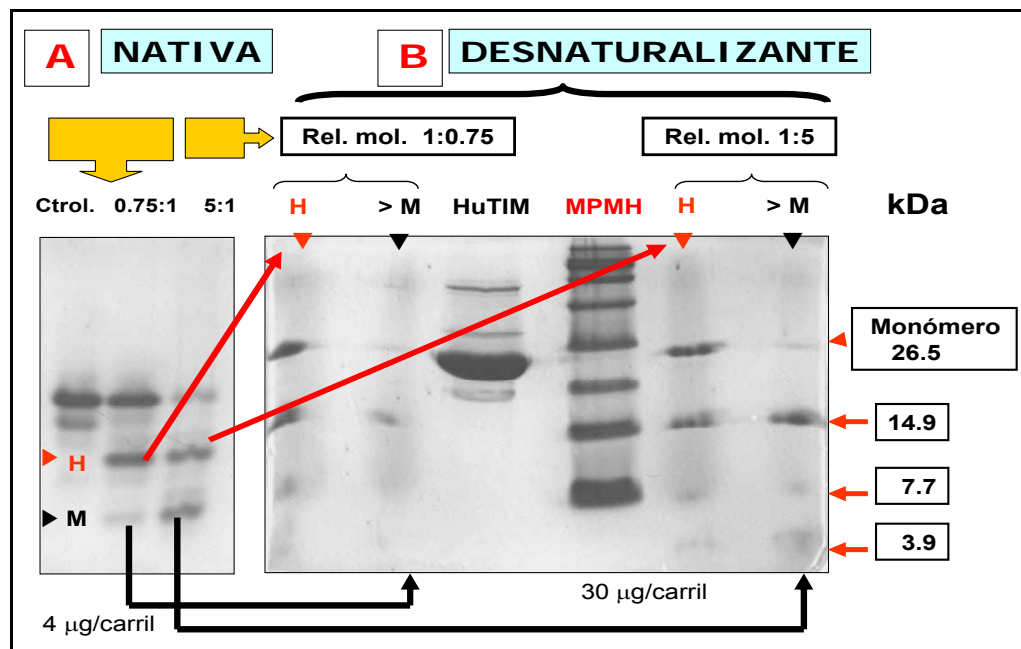


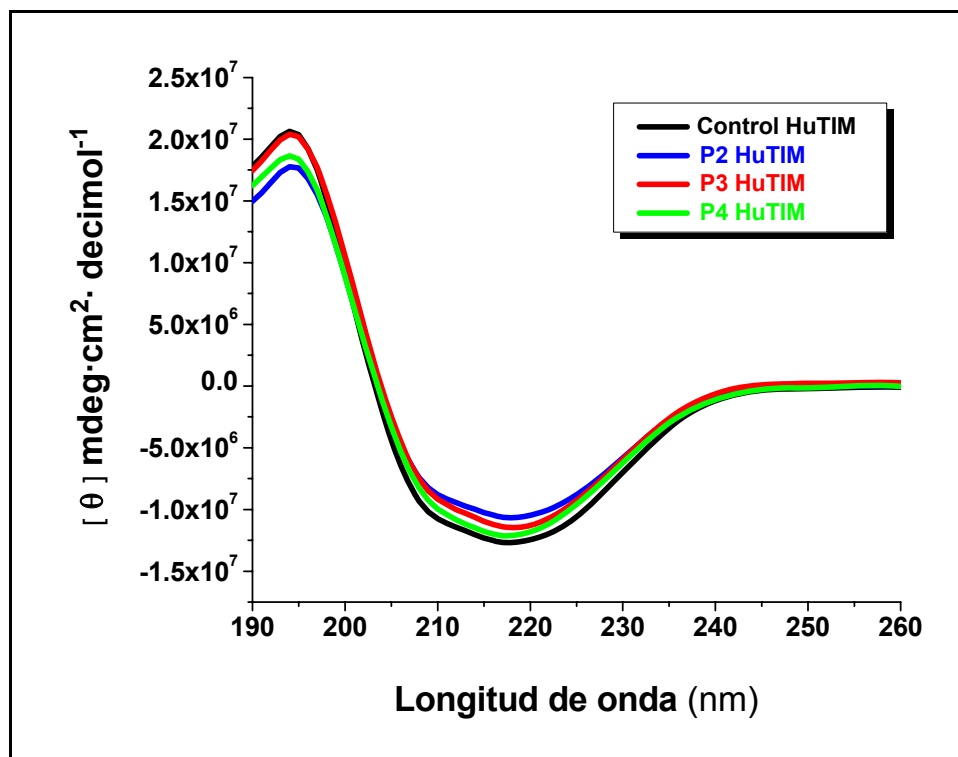
Fig. 14.- Doble dimensión electroforética comparativa entre dos relaciones molares (1:0.75 y 1:5). Caracterización de la banda de **H heterodímero** ó (Pico 3) y **>M banda de mayor movilidad** (Pico 4 con péptidos ≤ 14.9 kDa) en ambas relaciones molares a partir de la digestión. **A) Panel izquierdo, electroforesis nativa. B) Panel derecha, electroforesis desnaturalizante: HuTIM y MPMH.** En los carriles de la izq. H (Pico 3). Se muestran los pesos moleculares de interés, estos se encuentran señalados arriba de cada banda. En la parte derecha se muestra el (%) D.O. obtenida para cada banda en el P3.

6.3.- Determinación de los cambios a nivel de estructura secundaria

6.3.1.-Dicroísmo circular en UV lejano (DC)

Para estimar cuantitativamente el efecto de los cortes y caracterizar los cambios sobre la estructura secundaria en el Pico 3 y 4 de la HuTIM, se obtuvieron los espectros de (DC) de los Picos 2, 3, 4 y de la HuTIM control (Pain, 2004), (ver gráfica 3 y tabla 7).

Los datos procesados con el programa *CDProt* mostraron que la fracción P3 presentó una disminución marginal de hélices- α con respecto al control. El P2 presentó un ligero aumento en hojas- β ; la estructura desordenada se mantuvo constante en todas las fracciones (ver tabla 7).



Gráfica 3.- Espectros de DC en UV lejano en HuTIM Control, Pico 2, Pico 3 y Pico 4.

	Hélices- α	Hojas- β	Asas	Estructura desordenada
	(%)	(%)	(%)	(%)
HuTIM Control	35.8	16.5	19.0	28.8
P 2	31.9	19.3	20.1	28.7
P 3	29.3	21.0	20.9	28.7
P 4	30.6	21.3	20.1	28

Tabla 7.- Porcentaje de estructura secundaria (hélices- α , hojas- β , asas y estructura desordenada) de HuTIM Control, P2, P3 y P4. Los datos se obtuvieron con CdProt, estos se muestran en porcentaje de estructura secundaria.

6.4.- Caracterización de cambios a nivel de estructura terciaria y termoestabilidad

6.4.1.- Fluorescencia Intrínseca (FI)

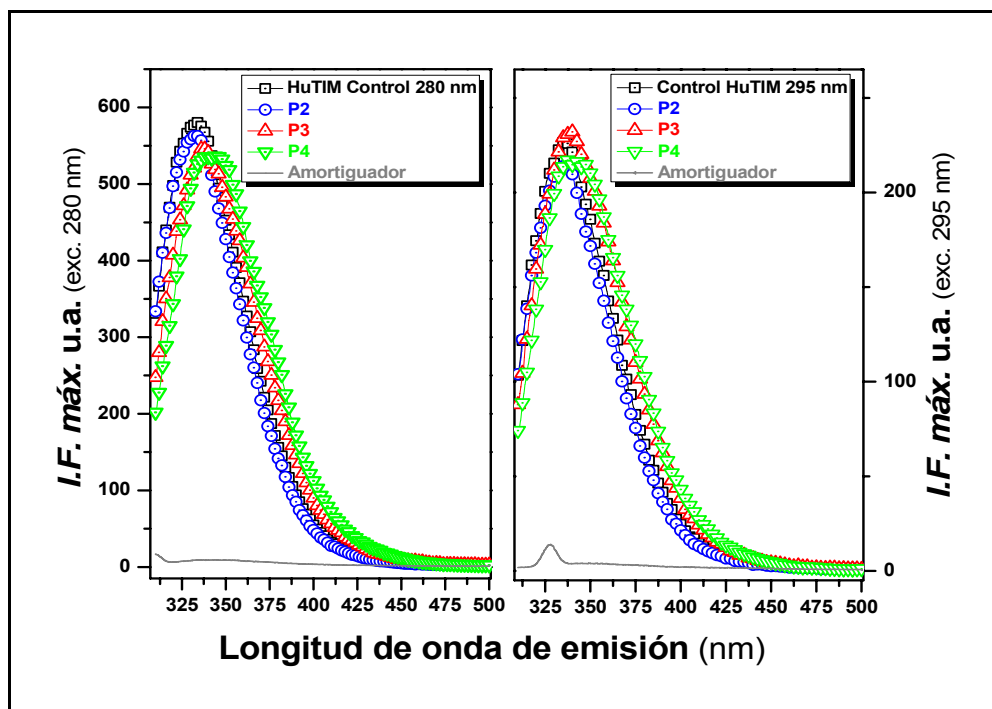
Para cada fracción se determinó el centro espectral de masas (SCM) y longitud de fluorescencia máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$) a partir del espectro de emisión obtenido por excitación a 280 nm y a 295 nm, (ver tabla 8).

Excitación (λ)	Muestra	SCM	Desplazamiento al rojo lejano (nm)	I.F.máx. (u. a.)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	I.F.máx. (%)
280 nm	HuTIM					
	Control	345.8	0	579.2	331.7	100
	P2	345.3	-0.5	565	331.5	97.5
	P3	351.3	5.6	546.9	336.1	94.4
	P4	354.8	9	537.5	341.5	92.8
295 nm	HuTIM					
	Control	347.9	0	215.5	332.7	100
	P2	347.1	-0.8	216.2	334.5	100.5
	P3	351.8	3.9	231.9	340	102
	P4	354.4	6.5	217.1	337.5	101.4

Tabla 8.- Fluorescencia intrínseca (FI) a partir de los espectros de emisión de fluorescencia con excitación a 280 y 295 nm en HuTIM Control, Pico 2, 3 y 4, respectivamente.

6.4.1.1.-Diferencias espectrales en HuTIM Control, Pico 2, 3 y 4

Cuando las muestras se excitaron con una longitud de onda de 280 nm el P3 mostró una disminución de la fluorescencia intrínseca (**I.F. máx.**) del 6 % respecto al valor del control, mientras que el P4 mostró una disminución del 7 %, (ver tabla 8 y gráfica 4, panel A). El SCM del P3 y P4 tuvo un corrimiento significativo hacia el rojo lejano (5.6 y 9 nm, respectivamente). Los valores de **I.F. máx.**, de las muestras excitadas a 295 nm no mostraron cambios significativos con respecto al control. Sin embargo, los SCM de P3 y P4 exhibieron nuevamente desplazamientos importantes hacia el rojo lejano (3.9 y 6.5 nm, respectivamente). Estos resultados sugieren que los cortes afectaron el ambiente cercano a los residuos aromáticos haciéndolo más polar y confirmó que las alteraciones de la HuTIM por proteólisis limitada fueron a nivel local de su estructura.



Gráfica 4.- Espectros de emisión de *I.F.máx* en unidades arbitrarias (u.a.) de cada muestra con λ onda de excitación a 280 y 295 nm, respectivamente. Panel izq. λ de excitación a 280 nm. Panel derecho λ de excitación a 295 nm.

6.4.2.-Dicroísmo circular en UV cercano

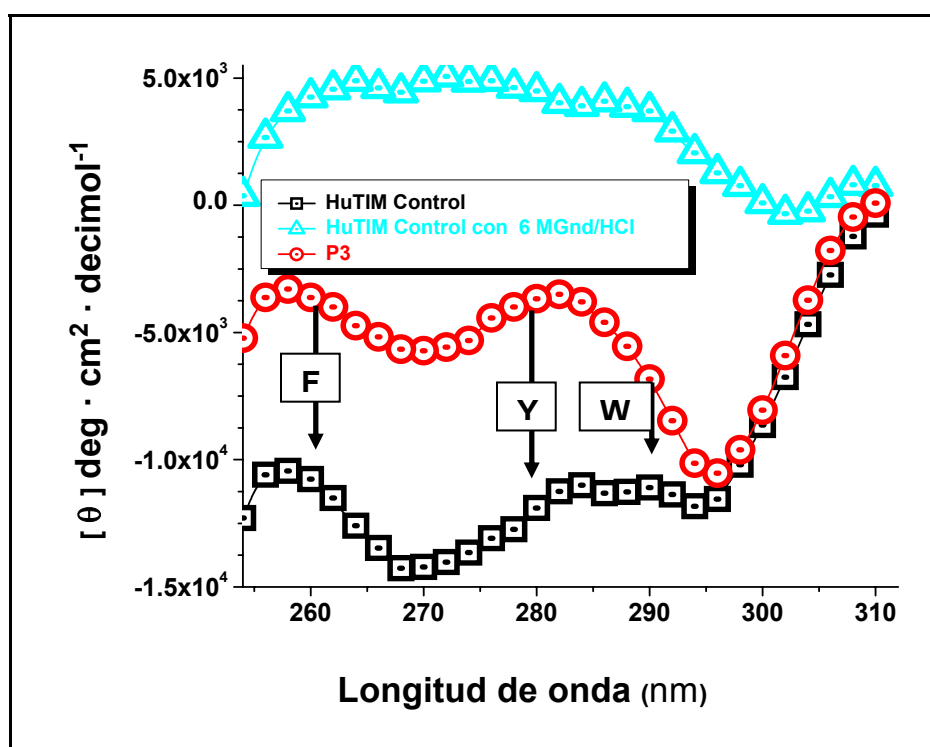
Una de las técnicas para estudiar la estructura terciaria de una proteína es la obtención de su espectro de DC en el UV cercano (λ 350-250 nm). En este caso, la información que se obtiene es de cromóforos tales como los residuos aromáticos y puentes disulfuro; su señal es altamente sensible a cambios en la estructura terciaria de una proteína.

El UV cercano es muy sensible y detecta cambios locales de exposición al solvente cercanos a los fluoróforos. Por lo tanto, cambios en las señales de λ 250-270 nm son atribuidas a los residuos de fenilalanina (F), de λ 270-290 nm a (Y) y de λ 280-300 nm a (W).

Para determinar la existencia de cambios en la estructura terciaria, se corrieron los espectros de dicroísmo circular en UV cercano (DC) en la HuTIM control y de los Picos 1, 2, 3. Además, una muestra de HuTIM corrió después de incubarse por 24 h en 6 M de cloruro de guanidina (Gdn/HCl), (ver gráfica 5).

En el Pico 3 se observaron cambios en el patrón de emisión de los fluoróforos a λ de 290-250 nm. Los cambios por el corte asimétrico (ver Figs. 5, 6 y 7) alteraron las condiciones de accesibilidad al solvente cerca a los aminoácidos F, Y y W, (ver gráfica 5). Adicionalmente, se analizó el control de HuTIM desnaturalizado con 6 M de Gdn/HCl. Observamos mayor accesibilidad al solvente por el incremento en la señal de elipticidad molar hacia valores positivos.

En el Pico 1 se observó un patrón de elipticidad molar similar al del control, excepto entre λ de 280-295 nm (*dato no mostrado en el gráfico*). Observamos que, a pesar de ser una fracción cortada extensivamente en ambos monómeros, ésta se encuentra estructurada. Uno de los cambios importantes que se encontró en esta fracción, es el cambio en la señal de los triptofanos. Este dato correlaciona con el hecho de que uno de los sitios de corte (entre T175 y A176) se localiza aproximadamente a 6 Å de distancia del W168 y del W208. Con respecto al corte entre la T139 y el E140, éste se encuentra al rededor de 6 Å de la F144.

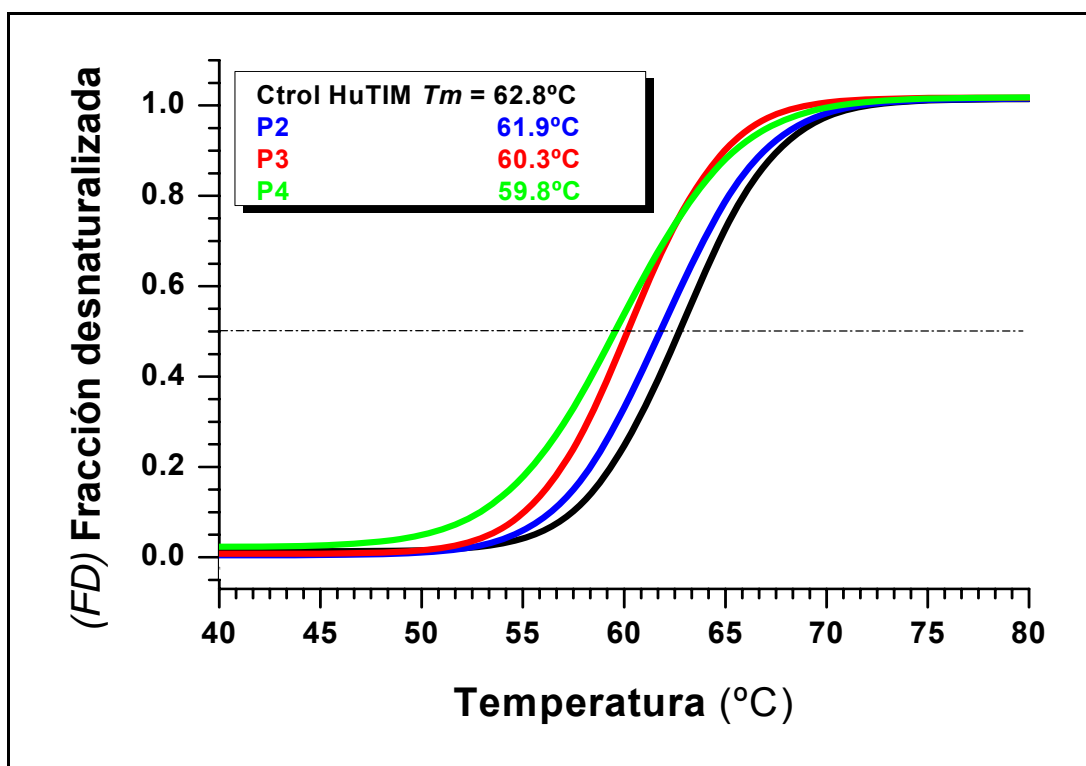


Gráfica 5.- Espectros de DC en el UV cercano de λ 310-250 nm expresados en elipticidad molar $[\theta]$ para HuTIM control nativa y desnaturalizada así como el Picos 3. Las flechas conteniendo los recuadros F, Y y W muestran las diferencias observadas en accesibilidad al solvente asociada a (F) fenilalaninas), (Y) tirosinas y (W) triptofanos en cada muestra, respectivamente.

6.4.3.-Termostabilidad ó desnaturalización térmica (T_m)

Los resultados de los experimentos de desnaturalización térmica para el Pico 3 mostraron disminución de solo 2.5°C en su T_m (62.8 a 60.3°C). La explicación para tan escasa disminución de la T_m en una enzima cortada es debido a que estos cortes se encontraron localizados lejos de la interfase de HuTIM y que, además, estos pueden ser estabilizados por interacciones no covalentes que mantienen a la enzima unida. Por lo tanto, su T_m prácticamente se mantiene igual a la del control, (ver gráfica 6).

El resultado de la desnaturalización térmica en el Pico 4 nos mostró que, si bien la enzima se encuentra cortada en ambos monómeros, estos cortes que son simétricos no afectan fuertemente la estabilidad de la proteína, ya que su T_m sólo disminuyó 0.5°C y 3°C comparado con el Pico 3 y la enzima control, respectivamente.



Gráfica 6.- Estabilidad térmica (T_m) de HuTIM control, Pico 2, 3 y 4 a λ de 222 nm, con [100 μ g/mL] con un ΔT_{emp} de 1°C/2.5 min. con un rango de temperatura de 40-80°C, El proceso de desnaturalización fue irreversible. Cada muestra fue corregida al restarle el blanco (amortiguador).

6.5.-Escalamiento de la digestión proteolítica de la HuTIM

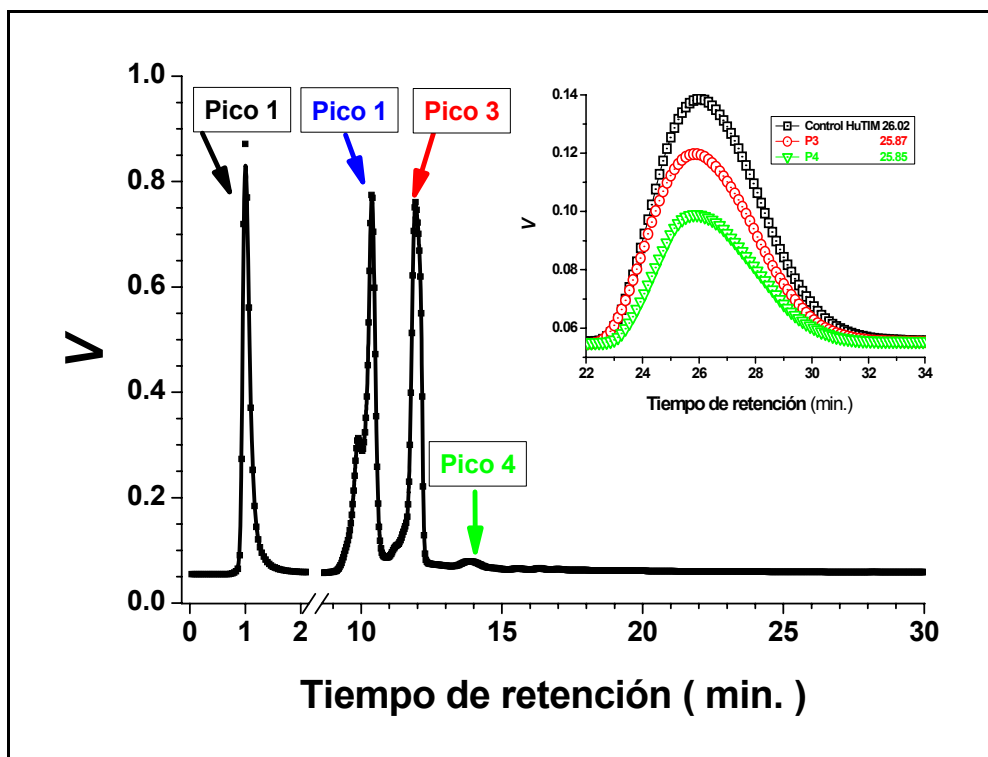
El escalamiento de la hidrólisis se llevó a cabo para obtener fracciones enriquecidas de la HuTIM y continuar con la caracterización estructural del Pico 3. La digestión proteolítica se realizó con 10 mg de proteína total de HuTIM a [1 mg/mL] vs Proteínasa K (bajo la relación molar 1:0.75).

La incubación se llevó a cabo en amortiguador de TEA a pH 7.4 durante 36 h a 30 °C. La reacción se detuvo al adicionar 5 mM de PMSF e incubar a 30°C por 10 min. La cromatografía de intercambio iónico nos permitió separar tres picos ó fracciones, (ver **gráfica 7, panel principal**). Después de la obtención de las diferentes especies cromatograficas, el Pico 3 y a la HuTIM control se les dializó contra amortiguador de TEA a pH 7.4 para realizar la cromatografía de exclusión molecular.

Una vez corridas las muestras en la columna de filtración en gel (S-75 de grado analítico) previamente equilibrada con amortiguador TEA a pH 7.4, con 20 µg a [1 mg/mL] se obtuvieron el solapamiento de los perfiles de retención de las muestras; (ver **gráfica 7, recuadro derecho**).

6.6.- Doble dimensión cromatográfica de la HuTIM

Los resultados obtenidos mostraron tiempos de retención similares en ambas muestras, la enzima HuTIM control (26.02 min.) vs el Pico 3 (25.87 min.) y Pico 4 (25.87 min.). La diferencia fue sólo de 0.16 min, (ver **perfiles cromatográficos del recuadro superior derecho en la gráfica 7**).



Gráfica 7.- Doble dimensión cromatográfica del Pico 3 y 4 vs wt HuTIM. Panel principal, cromatografía de intercambio iónico a partir del hidrolizado de HuTIM a [1 mg/mL] con proteinasa K bajo la relación molar 1:0.75. En la gráfica se muestra el perfil de retención del hidrolizado y separación de las fracciones. Recuadro superior der., Cromatografía de exclusión molecular de la HuTIM control vs Pico 3 y 4.

6.7.-ANÁLISIS FUNCIONAL

6.7.1.-Determinación de la actividad residual de la proteinasa K

Los resultados demostraron que la actividad de la proteinasa K en presencia de la HuTIM al tiempo cero (t_0), eleva su actividad residual hasta 182% con respecto al control. Con 40 h de incubación, la actividad residual de la proteinasa K en ausencia de la HuTIM baja un 90%, esto es importante ya que la proteasa en ausencia de sustrato sufrió autodigestión, (ver tabla 9).

La actividad residual en presencia de HuTIM por 40 h se mantiene con 67.3% con respecto al control al t_0 , en tanto que a las 40 h la actividad de la proteasa en presencia de HuTIM es 6.7 veces más alta que en su ausencia, (ver tabla 9).

Uno de los problemas principales de trabajar con la proteinasa K es la eficiencia que tiene el PMSF para inactivarla. Los datos de actividad después de incubar a la proteinasa K con 5 mM de PMSF, mostraron que ésta aún presenta actividad. Para ver el efecto de la inactivación en el tiempo, se almacenaron a 4°C unas muestras de HuTIM con Proteinasa K previamente incubada, con PMSF, (ver tabla 9, muestra E y F). Los resultados mostraron que la proteinasa K no se inactivó totalmente; la muestra (E) conservó 0.37% de actividad residual. Para ver el efecto del SDS sobre la actividad residual de la Proteinasa K previamente incubada con PMSF, se incubó esta enzima con 1% de SDS en la mezcla de reacción. La actividad residual de la proteasa bajó únicamente a la mitad ($0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) con respecto a la muestra sin SDS, (ver tabla 9).

Muestra	t (I)		t (II)		t (III)	
	Actividad (%)	Actividad [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Actividad (%)	Actividad [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Actividad (%)	Actividad [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
A	100	89	-	-	-	-
B	100	87	10	9.1	-	-
C	182	157	67	58.8	-	-
D	0	0	-	-	-	-
E	-	-	-	-	0.4	0.3
F	-	-	-	-	0.2	0.2

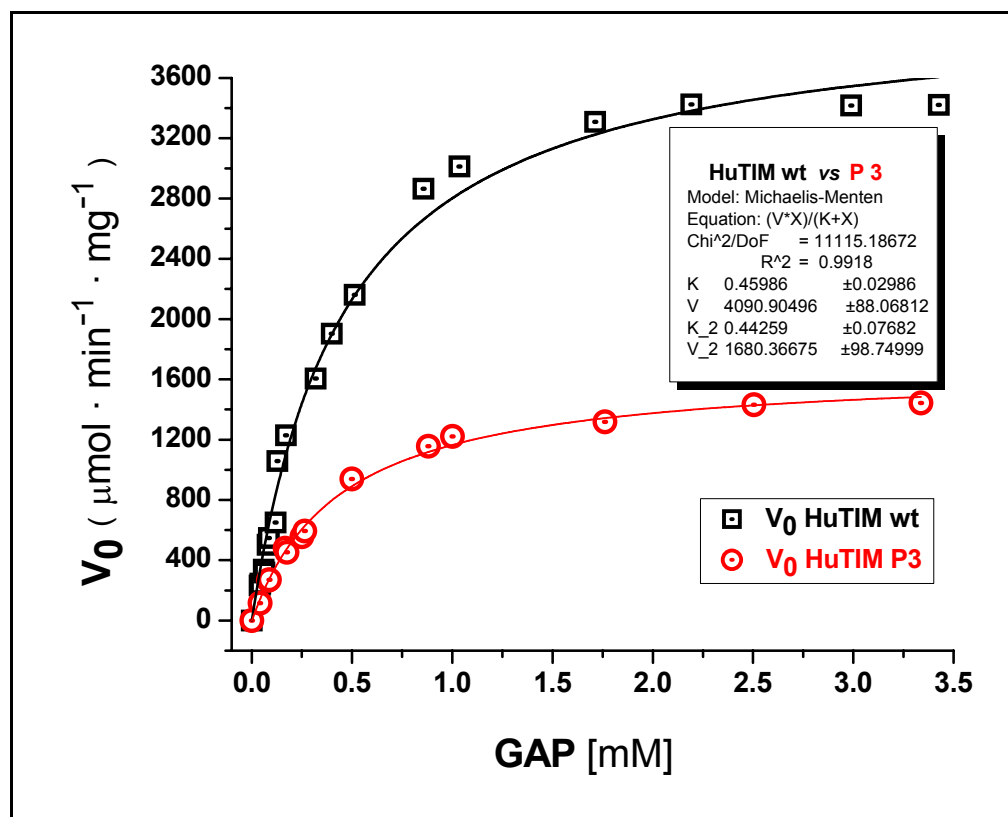
Tabla 9.- Resultados de la actividad de Proteinasa K obtenidos bajo las siguientes condiciones experimentales con (rel. molar 1:0.75 de HuTIM vs Proteinasa K).

<p>I) Inicio del experimento (t0) II) Incubación por 40 h a 30°C (t1) III) Después de inactivación y almacenamiento por 48 h a 4°C (t2).</p> <p>Condición: A = Proteinasa K refrigerada a 4°C B = Control (+) Proteinasa K a [0.375 mg/mL] C = Proteinasa K + HuTIM a [1 mg/mL] D = Control (-) solo HuTIM a [1 mg/mL] E = HuTIM + Proteinasa K + 4 mM PMSF F = HuTIM + Proteinasa K + 4 mM PMSF + SDS al 1%</p> <p>Nota: Lecturas de actividad en I y II con [166 ng/mL]. Lectura en III con [3.33 $\mu\text{g/mL}$] de Proteinasa K.</p>
--

6.7.2.- Parámetros cinéticos de la HuTIM wt y Pico 3

Las constantes cinéticas se determinaron en dirección hacia la formación de DHAP en la HuTIM control y en el Pico 3. En experimentos por duplicado los resultados mostraron la misma afinidad por el sustrato en ambas enzimas (K_m Ctol. = $0.46 \text{ mM} \pm 0.03$, K_m P3 = $0.44 \text{ mM} \pm 0.08$). Sin embargo, la $V_{m\acute{a}x}$ del Pico 3 de HuTIM representó el 41.08% con respecto a HuTIM control

(1680.37 ± 98.75 vs $4090.9 \pm 88.07 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ del P3 y control, respectivamente), (ver gráfica 8). Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que, en la HuTIM del Pico 3, uno de los monómeros pierde su actividad mientras el monómero sin cortes es catalíticamente competente; este monómero presentó, además, la misma afinidad por el sustrato, (ver gráfica 8 y tabla 10).



Gráfica 8.- Cinética enzimática de la HuTIM Control y del Pico 3 en dirección GAP-DHAP.

Parámetro cinético	*HuTIM wt	HuTIM wt	HuTIM Pico 3
$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	*ND	4090.9 ± 88.07	1680.36 ± 98.8
K_m GAP (mM)	*0.49	0.46 ± 0.03	0.44 ± 0.08
k_{cat} monómero (min^{-1})	*ND (1.35×10^5)	1.1×10^5	4.5×10^4
k_{cat} dímero (min^{-1})	* 2.7×10^5	2.2×10^5	8.9×10^4
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	* 2.4×10^8	2.87×10^8	1.21×10^8

Tabla 10.- Parámetros cinéticos de las enzimas HuTIM wt y Pico 3 en dirección GAP-DHAP. (*) Resultados publicados por Mande y cols., 1994 para la HuTIM recombinante wt).

6.8.- Desamidación en la HuTIM

6.8.1.- Curso temporal de desamidación en la HuTIM

Los resultados del gel nativo mostraron disminución progresiva de la banda de menor movilidad con el consecuente incremento de D.O. en las bandas de alta movilidad hacia el ánodo. A las 24 h, la enzima prácticamente perdió la banda de menor movilidad e incrementó la D.O. de una 4ª y 5ª bandas de alta movilidad. Conforme transcurrió la incubación se observó una disminución progresiva de actividad (ver Fig. 15 y tabla 11). Se obtuvo una disminución inicial de actividad del 37.5% a partir del tiempo de inicio y continuó hasta perder 83% a las 24 h de incubación.

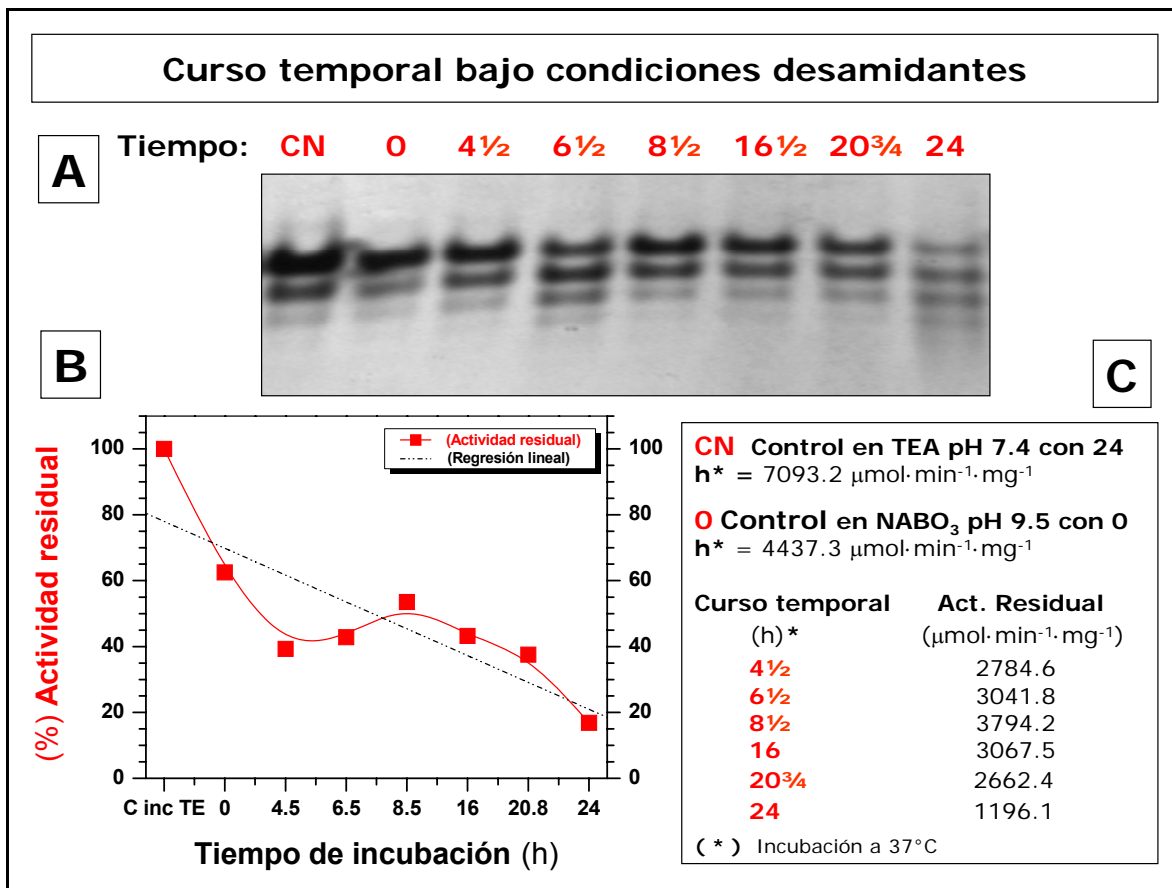


Fig. 15.- Curso temporal de desamidación en HuTIM, previa diálisis en amortiguador de borato de sodio 50 mM, pH 9.5, a 4°C e incubación por 24 h a 37°C.

En el panel A, muestra la electroforesis nativa de la HuTIM, incubada por 24 h a 37°C, el carril control (CN) y en los siguientes carriles se observó a HuTIM incubada en curso temporal de 0 a 24 h a 37°C.

En el panel B, se muestra gráficamente la disminución en el (%) de actividad respecto a CN (100%) de la HuTIM incubada por 24 h en TEA a pH 7.4. En el panel C, la actividad específica durante el tren de incubación en la enzima en desamidación.

HuTIM Tiempo (h)	Actividad Residual	
	($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	(%)
Control en TEA incubado 24 h	7093.1	100
0	4437.3	62.5
4.5	2784.6	39.2
6.5	3041.8	42.9
8.5	3794.2	53.5
16	3067.5	43.2
20.8	2662.4	37.5
24	1196.1	16.9

Tabla 11.- Actividad residual de la HuTIM en curso temporal de desamidación a 37°C por 24 h.

6.8.2.- Proteólisis limitada posterior a la desamidación en la HuTIM

Los resultados mostraron que la HuTIM desamidada y proteolizada mantuvo sólo un 10% de actividad residual ($649.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) y, concomitantemente, un 10% de monómero intacto en gel desnaturizante con respecto a la HuTIM control. Mientras que la enzima digerida sin desamidación mostró un actividad residual del 41.2% ($2752.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) y una cantidad de monómero intacto del 52 %, respecto al control de HuTIM, (ver Fig. 16 y tabla 12).

La HuTIM desamidada e hidrolizada no presentó una mayor D.O. en los péptidos observados en enzima digerida sin desamidación. En cambio, se hidrolizó extensivamente. En contraste, como describimos anteriormente, la hidrólisis en la HuTIM sin desamidación generó 3 péptidos principales de 14.9, 7.7 y 4 kDa, (ver Fig. 16 y tabla 12).

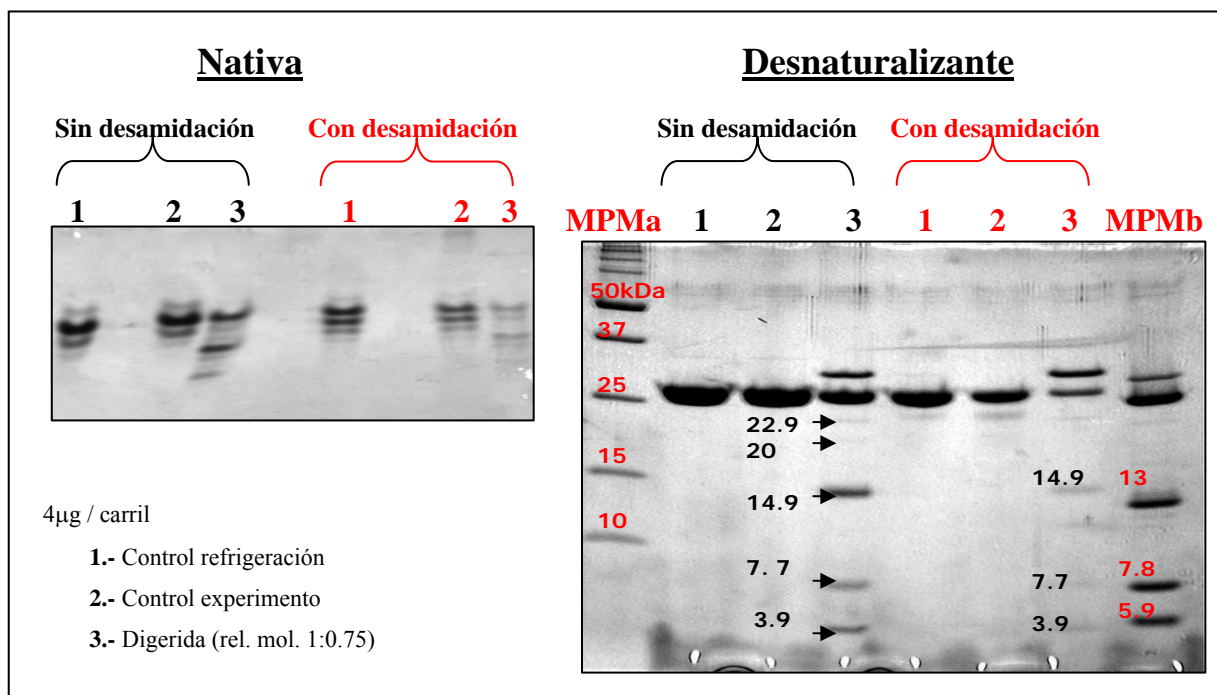


Fig. 16.- Experimento de hidrólisis sin y con desamidación en la HuTIM (previa diálisis en amortiguador de borato de sodio 50mM, pH 9.5, por 7 h a 4°C e incubación por 36 h a 37°C).

Panel izquierdo: electroforesis nativa con disminución de D.O. de las bandas en la enzima desamidada y digerida con respecto a la enzima control y digerida.

Panel derecho: electroforesis desnaturalizante. Muestras sin desamidación (**negro, 1-3**) y con desamidación (**rojo, 4-6**).

Muestra	Nativa (sin desamidación)			Desamidada		
	Actividad Residual ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Hidrólisis (%)	Hidrólisis (%)	Actividad Residual ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Hidrólisis (%)	Hidrólisis (%)
Control	6681.7	100	0	3871.4	100	0
Digerida	2752.4	41.2	52	649.5	36.6	90

Tabla 12.- Resultados comparativos (actividad vs hidrólisis) entre Control nativo de la HuTIM y HuTIM Control (t0 de incubación) previamente desamidada por 24 h a 37°C. Hidrólisis por 36 h a 30°C bajo la rel. mol. 1:0.75 de HuTIM:Proteinasa K.

6.9.- Desnaturalización-renaturalización de monómeros y formación de dímeros a partir de la asociación de monómeros intactos resistentes a la hidrólisis del Pico 3

Al Pico 3 (ver Fig. 17) se le llevó a cabo la desnaturalización con Gdn/HCl para separar los monómeros intactos (resistentes a la primera proteólisis) de los cortados. Posteriormente, los monómeros intactos se renaturalizaron. Esto se realizó haciendo pasar la proteína desnaturalizada por columnas de Penefsky para remover la guanidina de los monómeros intactos y, por tanto,

inducir su renaturalización. A los dímeros renaturalizados se les corrió por una electroforesis nativa y desnaturalizante para confirmar la exclusión de los monómeros cortados sensibles en la 1ª proteólisis y observar el comportamiento electroforético de esta nueva proteína estructurada (ver Fig. 17).

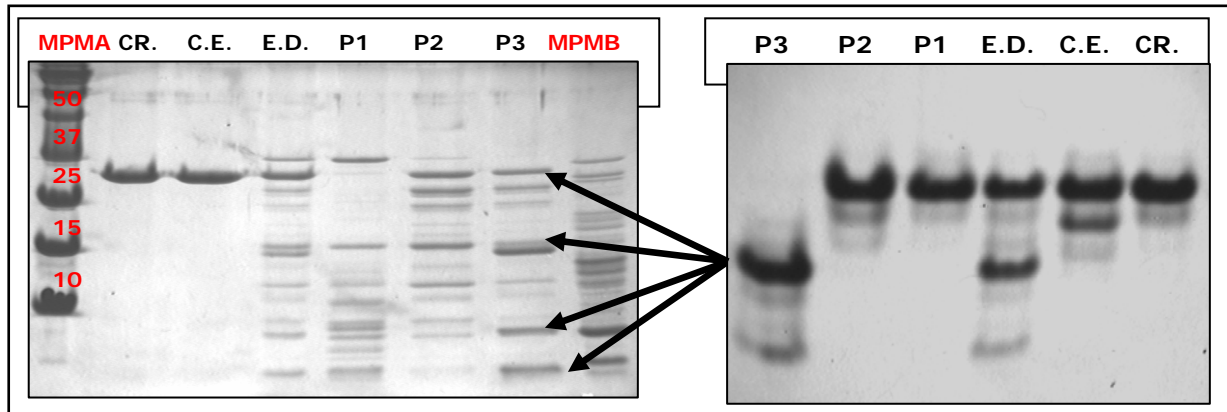


Fig. 17.- Electroforesis desnaturalizante y nativa que nos muestran las fracciones de HuTIM después de la cromatografía de intercambio aniónico de la enzima proteolizada.

Panel izq. En P3 se señalan con flechas los péptidos que corresponden al heterodímero; a partir de esta enzima se llevó a cabo la desnaturalización con Gdn/HCl 7.3 M para explorar el comportamiento ante la proteólisis en los monómeros no cortados del P3. **Paneles derecho e izq.;** **MPMA** marcador de pesos moleculares, **CR**=HuTIM control de refrigeración; **CE**=Control del experimento; **ED**= Enzima digerida; Picos 1, 2 y 3 (**P1**, **P2** y **P3**, respectivamente) y **MPMB** = péptidos de Mr conocida en *T. brucei* hidrolizada.

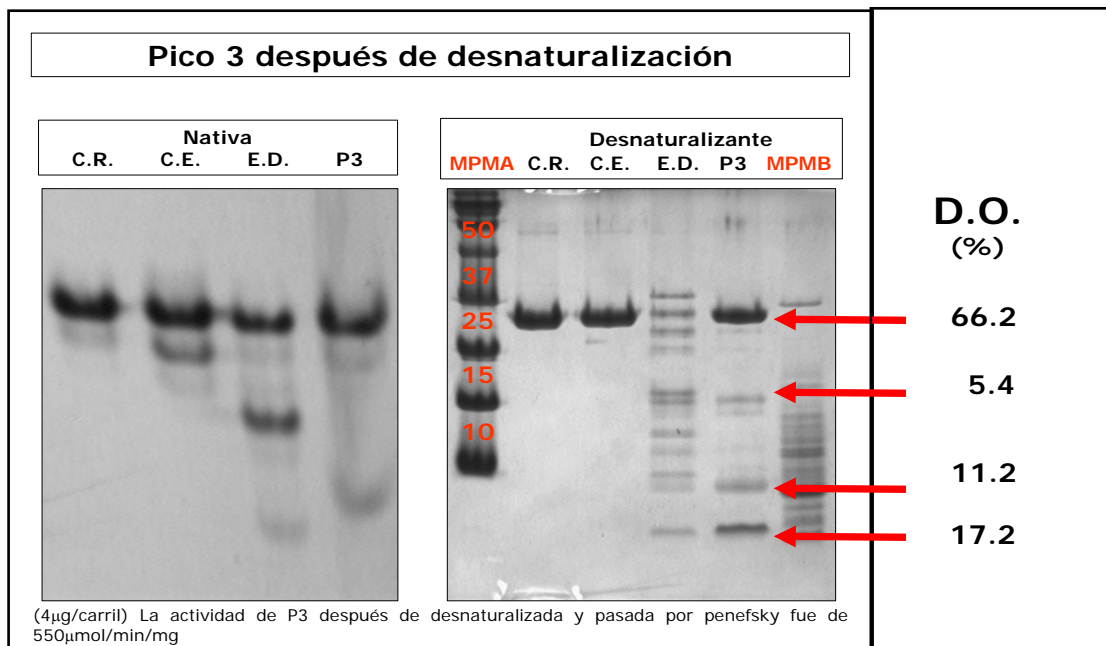


Fig. 18.- Electroforesis nativa y desnaturalizante del Pico 3 después de la desnaturalización con Gdn/HCl. En el panel izquierdo la electroforesis nativa muestra el cambio de carga de alta a baja movilidad del Pico 3. En el panel de la derecha se muestra la D.O. inicial correspondiente a los péptidos del Pico 3. **Paneles izq. y derecho:** **MPMA** marcador de pesos moleculares, **CR**=HuTIM control de refrigeración; **CE**=Control del experimento; **ED**= Enzima digerida; **P3**= Pico 3 ó Heterodímero y **MPMB** = péptidos de Mr conocida en *T. brucei*.

Los resultados mostraron que, después del ciclo de desnaturalización y renaturalización, el Pico 3 aumentó su proporción de monómero de 13.8 a 66.2%, pero disminuyó 2/3 la actividad residual. El gel nativo demostró que la fracción del Pico 3 con el ciclo de desnaturalización y renaturalización se constituyó como una especie electroforética de baja movilidad, (Fig. 18 y 19).

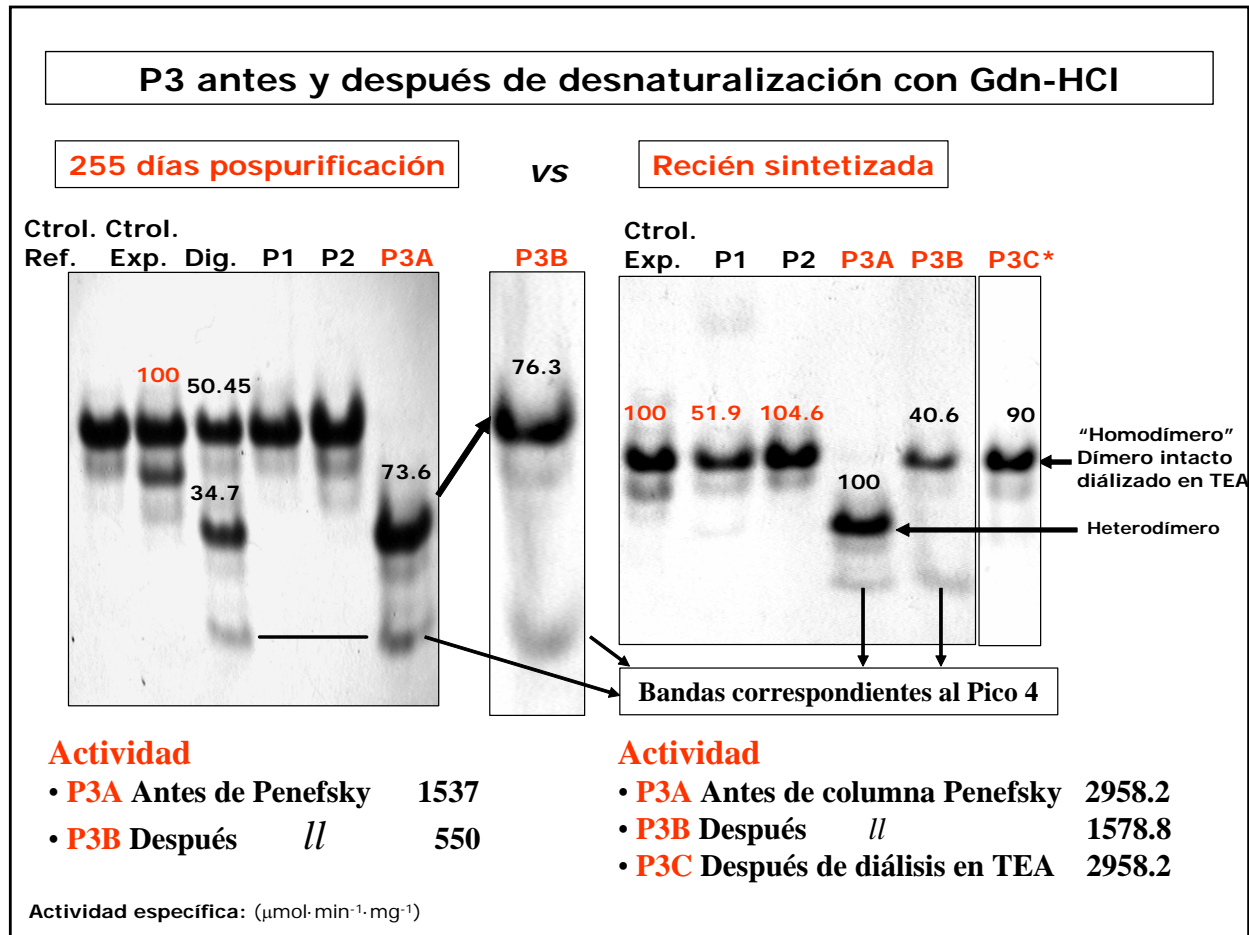


Fig. 19.- Pico 3 de la HuTIM durante el proceso de desalación mediante columna de Penefsky para eliminar los peptidos del monómero digerido y exceso de Gdn/HCl en la enzima. En la electroforesis nativa se aprecian los cambios en el patrón de migración de la enzima así como los porcentajes de D.O. correspondiente a cada banda. Se compara el procedimiento en HuTIM con 255 días pospurificación y recién sintetizada y se muestra la actividad antes y después del procedimiento de desalación.

6.9.1.- Digestión a partir de monómeros resistentes a la 1ª proteólisis del Pico 3 vs Pico 2

La digestión del Pico 2 y del Pico 3, este último sometido al ciclo de desnaturalización-renaturalización, se llevó al cabo para conocer si existía una estabilidad intrínseca y diferencial entre las subunidades de un mismo dímero, (ver Fig. 20).

Este experimento se realizó con muestras que fueron purificadas a diferente tiempo. Los resultados mostraron que la enzima del Pico 3 con el ciclo desnaturalización-renaturalización mostró el mismo patrón de corte que aquella que no presentó este ciclo. Así, la enzima perdió nuevamente la mitad de los monómeros, así como también perdió la mitad de la actividad.

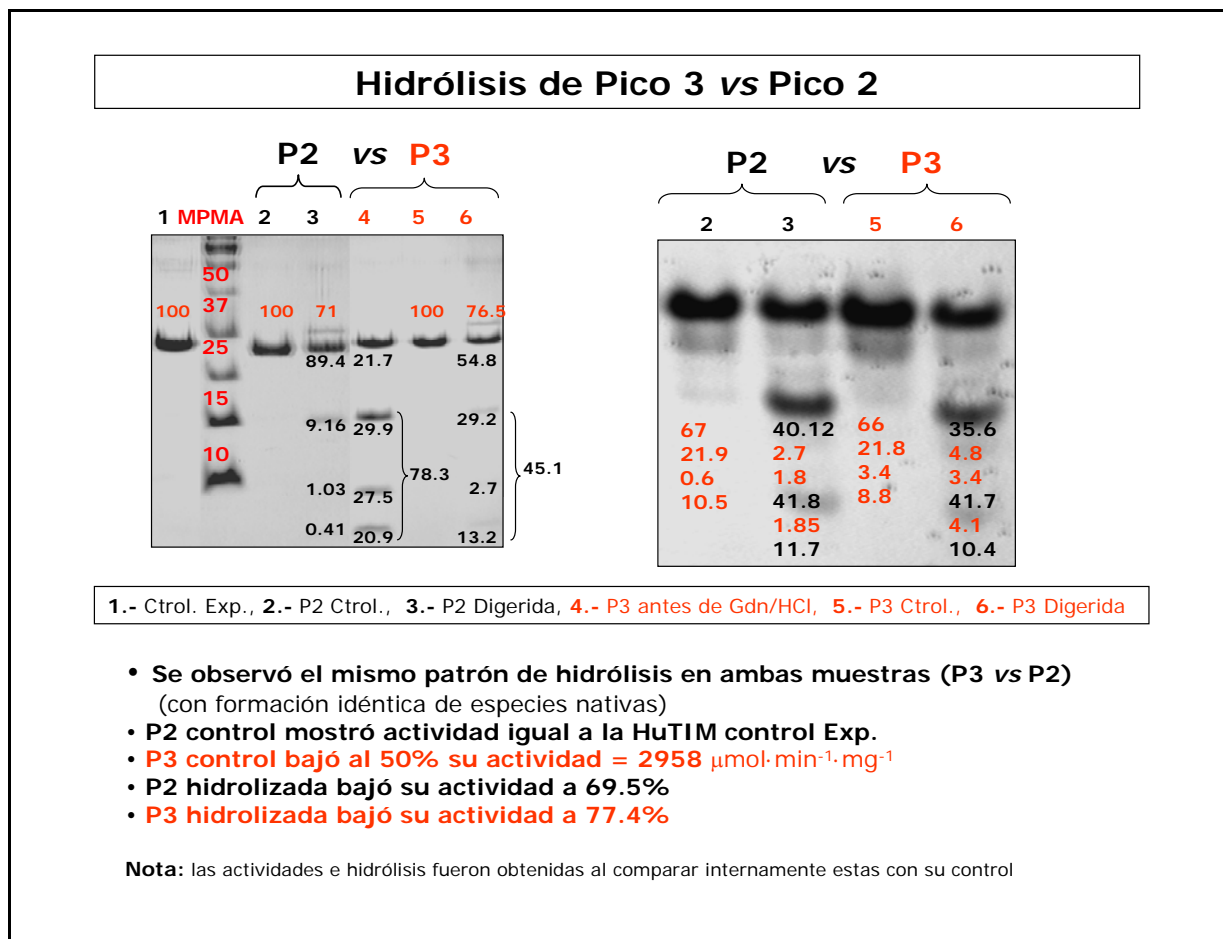


Fig. 20.- Electroforesis desnaturalizante y nativa que nos muestra la proteólisis comparativa entre HuTIM Pico 2 y 3 con ambos monómeros intactos (ver Fig. 19 P3B y P3C*). La proteólisis se llevó a cabo bajo la relación molar 1:0.75 de la HuTIM vs Proteinasa K por 36 h a 30°C. Los datos en rojo nos muestran la D.O. de la banda del monómero y los números en negro la D.O. en (%) en los peptidos generados. Los datos de D.O. de cada banda corresponden a la D.O. relativa de la banda/carril.

7.- DISCUSIÓN

Encontramos la relación molar entre HuTIM y Proteinasa K (1:0.75 mol.-mol.) que nos permitió analizar el mecanismo de proteólisis antes de llegar a la degradación extensiva de la HuTIM.

Determinamos la generación de tres peptidos de diferente peso molecular en conjunto con el monómero intacto de HuTIM después de la proteólisis. Al analizar la HuTIM proteolizada en geles nativos se detectó la aparición de dos subpoblaciones que presentaron un corrimiento electroforético mayor.

Determinamos por secuenciación del NH-terminal los sitios de corte en la enzima más susceptibles proteolíticamente y fáciles de seguir (T139/E140 y A176/T177).

Estos resultados obtenidos derivaron las siguientes preguntas:

1.- ¿La subpoblación que se generó por la proteólisis difiere en peso molecular, en carga ó ambas con respecto a la población original sin proteolizar?

Las hipótesis se respondieron mediante:

- a) Separación mediante cromatografía de intercambio iónico. La característica que diferenció al Pico 3 fue por carga, de igual manera que para el Pico 4.
- b) La electroforesis en doble dimensión nos mostró que la sumatoria de pesos moleculares (PM) de los peptidos obtenidos igualó al PM del monómero.
- c) Con la 2ª electroforesis bidimensional obtuvimos la confirmación de la composición y proporción tanto del Pico 3, así como del Pico 4.

2.- ¿Los cortes generados en la HuTIM se encuentran en ambos monómeros ó en uno sólo?

Para contestar esta pregunta se plantearon:

- a) Si los cortes en el Pico 3 son simétricos (en ambos monómeros), entonces, al hacer una doble dimensión del Pico 3 en geles desnaturizantes se obtendrán peptidos de PM menor al

monómero intacto. Además, la actividad sería cercana a cero; esto se presentó únicamente en el Pico 4.

- b) Para el caso del Pico 3 encontramos que estos cortes son asimétricos (sólo en uno de los dos monómeros). En sólo uno encontramos bandas de los peptidos generados por proteólisis con la suma de PM igual al peso del monómero más la banda correspondiente al monómero intacto. Esta última banda correspondió al otro 50% de la D.O. total de todas las bandas observadas en el gel dentro del carril. Además, la actividad de esta muestra fue de 50% con respecto al control.

3.- Los resultados obtenidos confirmaron la hipótesis b) al mostrar peptidos de PM menor al monómero intacto en geles desnaturalizantes que igualaron al PM del monómero, que representó el 50% de la D.O. Los cortes en el Pico 3 fueron asimétricos (sólo uno de los monómeros de cada dímero). Además, la actividad fue aproximadamente del 50%.

4.- Para determinar si el Pico 3 y 4 difieren en peso molecular (PM), se caracterizaron hidrodinamicamente a ambas especies.

- a. Hidrodinamicamente determinamos así la integridad en su estructura cuaternaria del Pico 3 y 4 a pesar de mostrar cortes en uno ó en ambos monómeros en los mismos sitios.

La proteólisis limitada de HuTIM mostró que esta enzima se comporta como un heterodímero en su estado nativo y este componente heterodimérico en su degradación proteolítica nos permite plantear un patrón de corte que puede estar influenciado por la estructura y estabilidad de la HuTIM.

Caracterizamos la especie del Pico 3 y P4 por análisis en los cambios de su estructura secundaria y terciaria. Se logró determinar el mantenimiento e integridad de su estructura cuaternaria intacta a pesar de los cortes en uno ó en ambos de sus monómeros. También se determinó la estabilidad del Pico 3 y el Pico 4 por medio de desnaturalización térmica.

La generación de dos intermediarios resistentes y estables antes de la proteólisis extensiva (heterodímero asimétrico generado por cortes en uno de sus monómeros y homodímero cortado simétricamente en ambos monómeros) sugiere que estos pueden ser tomados como un indicio de condiciones óptimas de estabilidad estructural de la HuTIM.

La proteólisis de la enzima desamidada nos permitió reconocer un patrón de degradación diferente al de la enzima intacta, con incremento en la desaparición del monómero intacto y la eliminación parcial de los intermediarios.

En aquellos casos en los que la degradación de esta enzima no pase por estos intermediarios, se puede asumir un daño estructural. Esto se demostró con la desamidación de la enzima excluyendo ó limitando a los intermediarios que se traducen finalmente en fallas funcionales de la HuTIM.

Los resultados pueden indicar que la dimerización confiere un cambio estructural a ambos monómeros que de forma independiente son idénticos y, a pesar de ser ambos iguales e idénticos, estos al dimerizarse nuevamente generan un ambiente asimétrico (cambian la exposición al solvente de los residuos más sensibles ó susceptibles a la proteasa para ambos monómeros). Otra posibilidad es que cuando existe una modificación postraduccional como la desamidación sólo en algún monómero que conforman al dímero, se induce asimetría y, por tanto, la enzima se comporta como heterodímero.

Esta posibilidad es tal vez la explicación a la variación de especies electroforéticas encontradas, que se han reportado desde que inicialmente se describió a la enzima y puede mostrar indirectamente un estado de degradación diferencial en una población enzimática heterogénea, ya que, como se ha observado en el presente trabajo, a pesar de estar cortada la enzima su estabilidad estructural no disminuye drásticamente si los cortes que infringe la proteasa no se localizan en sitios clave de su estructura.

8.- CONCLUSIONES

- Se demostró que la degradación de la HuTIM hidrolizada en curso temporal es inmediata y que la enzima que se corta en este periodo de tiempo, genera las diferentes especies hidrolizadas modificándose en el tiempo el patrón de corte observado en la enzima digerida.
- La doble dimensión electroforética comparativa entre relaciones molares diferentes, demostró que el intermediario cortado asimétricamente (Pico 3) se incrementa con el tiempo y es independiente de la concentración de la proteinasa K. Así mismo, se genera una enzima con simetría de corte (cortada en ambos monómeros), como siguiente paso en la degradación de la enzima (Pico 4).
- El incremento de la concentración de proteinasa K y el tiempo de incubación permitió demostrar la existencia del Pico 4, una fracción con mayor movilidad electroforética en la que se cortan ambos monómeros. Los Pico 3 y 4 son pasos intermedios sucesivos hacia la degradación extensiva de la HuTIM.
- Se descartó la movilidad electroforética del Pico 3 y 4 por escisión de péptidos y se confirmó así la presencia de corte asimétrico e incremento de migración exclusiva por cambio de carga.
- Se encontraron cambios importantes en la estructura terciaria del Pico 3, así como del Pico 4, con modificación de accesibilidad del solvente pero sin efectos notables en su termoestabilidad.
- Los cambios observados por DC en UV cercano y por fluorescencia intrínseca evidenciaron cambios de accesibilidad y exposición al solvente con reestructuración local cerca de los sitios de corte. Estas diferencias en las señales dependieron principalmente del ambiente inmediato que rodeó a los fluoróforos.
- El pI disminuyó debido a la reestructuración local sin afectar la termoestabilidad de la enzima cortada.

- El efecto de la desamidación incrementó la desaparición del monómero intacto y modificó el patrón de proteólisis observado al limitar la producción de ambos intermediarios en el proceso de degradación e inactivación de la enzima. La HuTIM recombinante en su estado nativo se comporta como un heterodímero ante la proteólisis limitada a pesar de que cada subunidad proviene de un mismo gen.
- El comportamiento proteolítico de la enzima nos permitió plantear un patrón de corte probablemente influenciado por la estabilidad estructural de la HuTIM.
- Mediante la desamidación de HuTIM se demostró que los cambios estructurales y funcionales de esta enzima influyen en el patrón de corte que describimos en este trabajo. Esto es, la presencia o ausencia de los intermediarios por proteólisis podrían ser un indicador del estado estructural y funcional de esta enzima.

9.- PERSPECTIVAS

1. Explicar el efecto de la hidrólisis de la HuTIM con proteinasa K en la generación del Pico 3 mediante una dinámica molecular en la estructura tridimensional de la enzima, que también se puede hacer para el Pico 4.
2. Los cortes en uno de los monómeros pueden tener efecto sobre la estructura local inmediata al sitio de corte y, asimismo, promover el reacomodo estructural del otro monómero cubriendo de esta forma las áreas más sensibles al corte y evitando la hidrólisis extensiva de ambos monómeros. Sin embargo, la fracción que se cortó extensivamente se mantuvo estructurada y activa, por lo que será necesario la generación de un cristal para determinar a detalle los cambios en la estructura tridimensional del heterodímero generado por hidrólisis.
3. Generación de una estructura cristalina del heterodímero de la HuTIM.
4. Explorar la proteólisis con proteasas intracelulares. Esto nos permitirá reconocer si este patrón de corte, que genera a los intermediarios: heterodímero - homodímero - degradación extensiva se mantiene ó se pierde.
5. Generación de HuTIM mutantes que presenten las mutaciones descritas para la deficiencia en esta enzima en humanos y su posterior análisis, basado en los resultados de este trabajo.

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alber T, Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips D, Rivers PS, Wilson IA. 1981. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosephosphate isomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 293(1063):159-71.
2. Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D. 1998. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J Biol Chem.* 273(4):2199-206.
3. Aparicio R, Ferreira ST, Polikarpov I. 2003. Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity. *J Mol Biol.* 334(5):1023-41.
4. Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature.* 255(5510):609-14.
5. Beutler E. 1983. Selectivity of proteases as a basis for tissue distribution of enzymes in hereditary deficiencies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(12):3767-8.
6. Bradley J.S.C. Olson, John Markwell. 2007. Chapter 3 Detection and Assay Methods UNIT 3.4. Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science.* <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780471140863/cp/cpps/article/ps0304/current/pdf>
7. Brändén C.I. 1991. The most frequently occurring folding motif in proteins-the TIM barrel. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1: 205-213.
8. Brown JR, Daar IO, Krug JR, Maquat LE. 1985. Characterization of the functional gene and several processed pseudogenes in the human triosephosphate isomerase gene family. *Mol Cell Biol.* 5(7):1694-706.
9. Burton PM, Waley SG. 1966. The active centre of triose phosphate isomerase. *Biochem J.* 100(3):702-10.
10. Casal JI, Ahern TJ, Davenport RC, Petsko GA, Klibanov AM. 1987. Subunit interface of triosephosphate isomerase: site-directed mutagenesis and characterization of the altered enzyme. *Biochemistry.* 26(5):1258-64.
11. Park C, Marqusee S. 2005- Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nature Methods.* 2(3):207-12.
12. Chou PY, Fasman GD. 1977. Beta-turns in proteins. *J Mol Biol.* 115(2):135-75.
13. Chu CH, Lai YJ, Huang H, Sun YJ. 2008. Kinetic and structural properties of triosephosphate isomerase from *Helicobacter pylori*. *Proteins.* 71(1):396-406.
14. Decker RS, Mohrenweiser HW. 1981. Origin of the triosephosphate isomerase isozymes in humans: genetic evidence for the expression of a single structural locus. *Am J Hum Genet.* 33(5):683-91.
15. Delboni LF, Mande SC, Rentier-Delrue F, Mainfroid V, Turley S, Vellieux FM, Martial JA, Hol WG. 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(12):2594-604.
16. Derreumaux P, Schlick T. 1998. The loop opening/closing motion of the enzyme triosephosphate isomerase. *Biophys J.* 74(1):72-81.
17. Eber SW, Pekrun A, Bardosi A, Gahr M, Krietsch WK, Krüger J, Matthei R, Schröter W. 1991. Triosephosphate isomerase deficiency: haemolytic anaemia, myopathy with altered mitochondria and mental retardation due to a new variant with accelerated enzyme catabolism and diminished specific activity. *Eur J Pediatr.* 150(11):761-6.
18. Farber GK, Petsko GA. 1990. The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci.* 15(6):228-34.
19. Furth AJ, Milman JD, Priddle JD, Offord RE. 1974. Studies on the subunit structure and amino acid sequence of triose phosphate isomerase from chicken breast muscle. *Biochem J.* 139(1):11-22.
20. Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Gracy RW. 1992. Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur J Biochem.* 208(2):389-95.

21. Garza-Ramos G, Pérez-Montfort R, Rojo-Domínguez A, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou. 1996. A species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem.* 241(1):114-20.
22. Gayathri P, Banerjee M, Vijayalakshmi A, Azeed S, Balaram H, Balaram P, Murthy MR. 2007. Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 63(Pt 2):206-20.
23. Gracy R.W., Yüksel K.Ü., Chapman M.L., and Dimitrijevič S.D. (1990). In: **Isozymes-Structure, function and Use in Biology and Medicine** (Ogita Z-I., and Markert C.L., Eds.), pp. 787-817, Wiley-Liss, New York.
24. Gracy RW, Talent JM, Zvaigzne AI. 1998. Molecular wear and tear leads to terminal marking and the unstable isoforms of aging. *J Exp Zool.* 282(1-2):18-27.
25. Hubbard SJ, Eisenmenger F, Thornton JM. 1994 Modeling studies of the change in conformation required for cleavage of limited proteolytic sites. *Protein Sci.* 3(5):757-68
26. Jones S, Thornton JM. 1995. Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog Biophys Mol Biol.* 63(1):31-65.
27. Kaplan JC, Teeple L, Shore N, Beutler E. 1968. Electrophoretic abnormality in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 31(5):768-73.
28. Kester MV, Gracy RW. 1975. Alteration of human lymphocyte triosephosphate isomerase isozymes during blastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 65(4):1270-7.
29. Kim H, Kelly RE, Evans DR. 1992. The structural organization of the hamster multifunctional protein CAD. Controlled proteolysis, domains, and linkers. *J Biol Chem.* 267(10):7177-84.
30. Kinoshita T, Maruki R, Warizaya M, Nakajima H, Nishimura S. 2005. Structure of a high-resolution crystal form of human triosephosphate isomerase: improvement of crystals using the gel-tube method. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 61(Pt 4):346-9.
31. Knowles JR. 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature.* 350(6314):121-4.
32. Komives EA, Chang LC, Lolis E, Tilton RF, Petsko GA, Knowles JR. 1991. Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95. *Biochemistry.* 30(12):3011-9.
33. Konuklar FA, Aviyente V, Haliloğlu T. Coupling of structural fluctuations to deamidation reaction in triosephosphate isomerase by Gaussian network model. *Proteins.* 2006 62(3):715-27.
34. Krietsch WK, Pentchev PG, Machleidt W, Klingenburg H. 1970. The composition of the rabbit muscle triosephosphate isomerase isozymes of two different subunits. *FEBS Lett.* 11(2):137-139.
35. Krietsch WK, Pentchev PG, Klingenburg H, Hofstätter T, Bücher T. 1970a. The isolation and crystallization of yeast and rabbit liver triosephosphate isomerase and a comparative characterization with the rabbit muscle enzyme. *Eur J Biochem.* (2):289-300.
36. Kulakova L, Galkin A, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N. 1999. Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol.* 65(2):611-7.
37. Lee EW, Barriso JA, Pepe M, Snyder R. 1971. Purification and properties of liver triose phosphate isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 242(1):261-7.
38. Lolis E, Alber T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsko GA. 1990. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry.* 29(28):6609-18.
39. Lu HS, Yuan PM, Gracy RW. 1984. Primary structure of human triosephosphate isomerase. *J Biol Chem.* 259(19):11958-68.
40. Maes D, Zeelen JP, Thanki N, Beaucamp N, Alvarez M, Thi MH, Backmann J, Martial JA, Wyns L, Jaenicke R, Wierenga RK. 1999. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins.* 37(3):441-53.

41. Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, Frère JM, Mande SC, Hol WG, Martial JA, Goraj K. 1996. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol Biol.* 257(2):441-56.
42. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. 1998. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol.* 283(1):193-203.
43. Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WG. 1994. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci.* 3(5):810-21.
44. Maquat LE, Chilcote R, Ryan PM. 1985. Human triosephosphate isomerase cDNA and protein structure. Studies of triosephosphate isomerase deficiency in man. *J Biol Chem.* 260(6):3748-53
45. McLellan T. 1982. Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal Biochem.* 126(1):94-9.
46. Noble ME, Zeelen JP, Wierenga RK, Mainfroid V, Goraj K, Gohimont AC, Martial JA. 1993. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 49(Pt 4):403-17.
47. Novotný J, Brucoleri RE. 1987. Correlation among sites of limited proteolysis, enzyme accessibility and segmental mobility. *FEBS Lett.* 211(2):185-9.
48. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 11:2411-23
49. Pain RA. 2004. Chapter 7. Characterization of Recombinant Proteins. Unit 7.6 Determining the CD Spectrum of a Protein. *Current Protocols in Protein Science*, Suppl. 38, 7.6.1-7.6.24. <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780471140863/cp/cpps/article/ps0706/current/pdf>
50. Pain RA. 2004a. Chapter 7 Characterization of Recombinant Proteins Unit 7.7 Determining the Fluorescence Spectrum of a Protein. *Current Protocols in Protein Science*, Suppl. 38, 7.7.1-7.7.20. <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780471140863/cp/cpps/article/ps0707/current/pdf>
51. Penefsky HS. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem.* 252(9):2891-9.
52. Pérez-Montfort R, Garza-Ramos G, Alcántara GH, Reyes-Vivas H, Gao XG, Maldonado E, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. 1999. Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry.* 38(13):4114-20.
53. Rajiniraja M. 2005. Theoretical model of Rajinis's triosephosphate isomerasa of *Schistosoma mansoni* (Blood Fluke) (2a18); to be published. http://www.brendaenzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=5.3.1.1
54. Ray SS, Balaram H, Balaram P. 1999. Unusual stability of a multiply nicked form of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase. *Chem Biol.* 6(9):625-37.
55. Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Mendoza-Hernández G, López-Velázquez G, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. 2002. Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins.* 48(3):580-90.
56. 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(3):752-63.
57. Rietveld AW, Ferreira ST. 1998. Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry.* 37(3):933-7.
58. Robinson NE, Robinson AB. 2004. Amide molecular clocks in drosophila proteins: potential regulators of aging and other processes. *Mech Ageing Dev.* 125(4):259-67.

59. Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA. 2002. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 322(4):669-75.
60. Rose IA. 1975. Mechanism of the aldose-ketose isomerase reactions. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 43:491-517.
61. Sawyer L. 1972. A fourth crystal form of rabbit muscle aldolase. *J. Mol. Biol.* 71(2):503-5.
62. Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2):368-79.
63. Schmidt A, Knobeloch D, Scheerer P, Wessner H, Scholz C, Kuettner G, Krauss N, Hoehne W. Structure of Triosephosphate Isomerase of *Tenebrio molitor* To be Published
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=2I9E>
64. Schneider A.S, Valentine WN, Hattori M, Heins HL Jr. 1965. Hereditary hemolytic anemia with Triosephosphate isomerase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 272:229-35.
65. Schneider A.S., Valentine W.N., Vaughan M.A., Paglia D.E., Shore N.A., and Heins H.L. 1968. In: **Hereditary disorders of erythrocyte metabolism.** (Beutler E., ed.), Grune and Stratton, New York. p. 265.
66. Scopes RK. 1964. Detection of triosephosphate isomerase after electrophoresis. *Nature.* 29;201:924-5.
67. Scopes RK. 1968. Methods for starch-gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. An investigation of the relative mobilities of the glycolytic enzymes from the muscles of a variety of species. *Biochem J.* 107(2):139-50.
68. Snapka RM, Sawyer TH, Barton RA, Gracy RW. 1974. Comparison of the electrophoretic properties of triosephosphate isomerases of various tissues and species. *Comp Biochem Physiol B.* 49(4):733-41.
69. Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. 1999. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 8(2):370-80.
70. Sun AQ, Yüksel KU, Rao GS, Gracy RW. 1992. Effects of active site modification and reversible dissociation on the secondary structure of triosephosphate isomerase. *Arch Biochem Biophys.* 295(2):421-8.
71. Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. 1992a. Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation. *Arch Biochem Biophys.* 293(2):382-90.
72. Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. 1992b. Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *J Biol Chem.* 267(28):20168-74.
73. Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. 1993. Limited proteolysis of triose-phosphate isomerase and characterization of the catalytically active peptide complex. *J Biol Chem.* 268(36):26872-8.
74. Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. 1995. Terminal marking of triosephosphate isomerase: consequences of deamidation. *Arch Biochem Biophys.* 322(2):361-8.
75. Symersky J, Li S, Carson M, Luo M. 2003 Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 51(3):484-6.
76. Tang CY, Yüksel KU, Jacobson TM, Gracy RW. 1990. Isoforms of chicken triosephosphate isomerase are due to specific oxidation of cysteine126. *Arch Biochem Biophys.* 283(1):12-9.
77. Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaram H, Balaram P, Murthy MR. 1997. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure.* 5(6):751-61.
78. Voet D, Voet JG, and Pratt CW. 1999. **Fundamentals of Biochemistry.** John Wiley and Sons, Inc., USA pp. 930.
79. Vögel K, and Chmielewski J. 1994. Rapid and efficient resynthesis of proteolysed triosephosphate

- isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* 116:11163-11164.
<http://pubs.acs.org/cgibin/searchRedirect.cgi/jacsat/1994/116/i24/pdf/ja00103a044.pdf>.
80. Walden H, Bell GS, Russell RJ, Siebers B, Hensel R, Taylor GL. 2001. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* 306(4):745-57.
 81. Walden H, Taylor GL, Lorentzen E, Pohl E, Lilie H, Schramm A, Knura T, Stubbe K, Tjaden B, Hensel R. 2004. Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J Mol Biol.* 342(3):861-75.
 82. Webster KA. 1987. Regulation of glycolytic enzyme RNA transcriptional rates by oxygen availability in skeletal muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 77(1):19-28.
 83. Wierenga RK, Noble ME, Vriend G, Nauche S, Hol WG. 1991. Refined 1.83 Å structure 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(4):995-1015.
 84. Wierenga RK, Noble ME, Davenport RC. 1992. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* 224(4):1115-26.
 85. Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA, Lambeir AM, Wierenga RK. 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.* (3):243-50.
 86. Yamaji R, Fujita K, Nakanishi I, Nagao K, Naito M, Tsuruo T, Inui H, Nakano Y. 2004. Hypoxic up-regulation of triosephosphate isomerase expression in mouse brain capillary endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 423(2):332-42.
 87. Yamamoto, H., Kunishima, N. 2005. Crystal structure of TT0473, putative Triosephosphate Isomerase from *Thermus thermophilus* HB8. <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1YYA>
 88. Yuan PM, Dewan RN, Zaun M, Thompson RE, Gracy RW. 1979. Isolation and characterization of triosephosphate isomerase isozymes from human placenta. *Arch Biochem Biophys.* 198(1):42-52.
 89. Yuan PM, Talent JM, Gracy RW. 1981. Molecular basis for the accumulation of acidic isozymes of triosephosphate isomerase on aging. *Mech Ageing Dev.* 17(2):151-62.
 90. Yuan PM, Talent JM, Gracy RW. 1981. A tentative elucidation of the sequence of human triosephosphate isomerase by homology peptide mapping. *Biochem Biophys Acta.* 671(2):211-8.
 91. Yuen S, Hunkapiller MW, Wilson KJ, Yuan PM. 1988. Applications of tandem microbore liquid chromatography and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/electroblotting in microsequence analysis. *Anal Biochem.* 168(1):5-15.
 92. Yüksel KU, Gracy RW. 1986. *In vitro* deamidation of human triosephosphate isomerase. *Arch Biochem Biophys.* 248(2):452-9.
 93. Zabori S, Rudolph R, Jaenicke R. 1980. Folding and association of triose phosphate isomerase from rabbit muscle. *Z Naturforsch [C].* 35(11-12):999-1004.
 94. Zhang Y, Yüksel KU, Gracy RW. 1995. Terminal marking of avian triosephosphate isomerases by deamidation and oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 317(1):112-20.
 95. Zubillaga RA, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou A. 1994. Differential inactivation of rabbit and yeast triosephosphate isomerase: effect of oxidations produced by chloramine-T. *Arch Biochem Biophys.* 313(2):328-36.