

**Universidad Autónoma Metropolitana.
Unidad Iztapalapa.
División de Ciencias Básicas e Ingeniería.
Departamento de Química.**

**“ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO DE LA TRIOSA
FOSFATO ISOMERASA HUMANA.”**

Tesis que presenta

Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

Para la obtención del grado de
Maestro en Ciencias.

México Noviembre de 1997.

Universidad Autónoma Metropolitana.
Unidad Iztapalapa.
División de Ciencias Básicas e Ingeniería.
Departamento de Química.

**“ESTUDIO DEL DESPLEGAMIENTO DE LA
TRIOSA FOSFATO ISOMERASA HUMANA.”**
TESIS QUE PRESENTA:
CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA.
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN QUÍMICA

México D.F. Noviembre de 1997.

Esta tesis se realizó en el área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Arturo Rojo Domínguez.

Dedicatorias:

Agradezco a DIOS todas las oportunidades
que me ha brindado.

A mi mamá y a mi abuelita, porque a ustedes les
debo todo lo que soy y lo que no soy.
Gracias por dedicarme estos veintitantos años de su vida.

A Heriberto gracias por tu amor, ayuda, apoyo y comprensión.

Te respeto, admiro y amo muchísimo.

Agradecimientos.

Agradezco el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, a través de la Beca de maestría con número de registro 94713.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por sus donaciones de muestra para la realización de este trabajo, y especialmente a la Dra. Georgina Garza Ramos por su apoyo en la purificación de la enzima.

A los profesores del Departamento de Química.

A todos los miembros del área de Biofísicoquímica por el infinito apoyo que me han brindado.

A mis amigos Salvador T. y Verónica V.

Al Dr. Andres Hernández Arana por sus valiosas aportaciones y comentarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Arturo Rojo Domínguez a quien expreso mi respeto y admiración, le agradezco su dirección y apoyo.

A todos mis amigos que directa e indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo.

Índice.

I Generalidades	1
1.1 Introducción.	2
1.2 Objetivos.	10
II Parte Experimental.	12
2.1 Reactivos.	13
2.1.1 Triosa fosfato isomerasa humana.	13
Purificación.	13
Determinación de cantidad de proteína.	14
Ensayo de Actividad.	15
2.1.2 Otros reactivos.	15
2.2 Técnicas Experimentales.	15
2.2.1 Dicroísmo circular.	15
2.2.2 Fluorescencia.	19
2.3 Obtención de curvas de transición.	20
2.4 Experimentos cinéticos.	21
2.5 Glóbulo fundido.	21
III Tratamiento de los datos.	23
3.1 Estudios de desplegamiento en equilibrio	24
Modelo reversible de dos estados para proteínas monoméricas.	24
Modelo reversible de tres estados para proteínas diméricas.	27
Modelo reversible de dos estados para proteínas diméricas.	28
3.2 Estudios de desplegamiento fuera del equilibrio.	29
Modelo cinético de dos estados.	30
Modelo cinético de tres estados sin disociación.	32
Modelo cinético de tres estados con disociación.	34

IV Resultados y discusión.	36
4.1 Irreversibilidad del desplegamiento térmico de hTIM.	37
4.2 Curvas de transición.	39
4.3 Valores termodinámicos aparentes.	41
4.4 Curvas Cinéticas.	42
4.5 Gráficas de Arrhenius.	45
4.6 Glóbulo fundido.	47
4.7 Posibles mecanismos.	48
V Conclusiones y Perspectivas.	54
VI Bibliografía.	56

Generalidades.

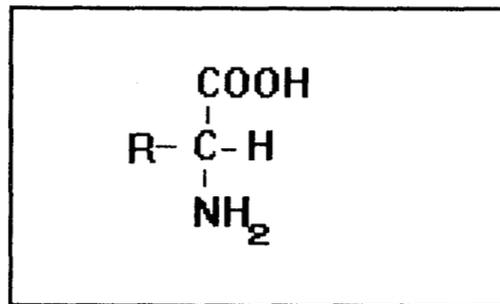
I GENERALIDADES.

1.1 Introducción.

El nombre proteína proviene de la palabra griega *proteios*, que significa "lo primero". Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células, constituyendo más del 50% de su peso seco. Se encuentran en todas los organelos de cada célula, ya que son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celulares. Existen muchas clases de proteínas, cada una de ellas especializada en una función biológica diferente; por ejemplo, la expresión de la información genética es controlada en su mayor parte por proteínas.

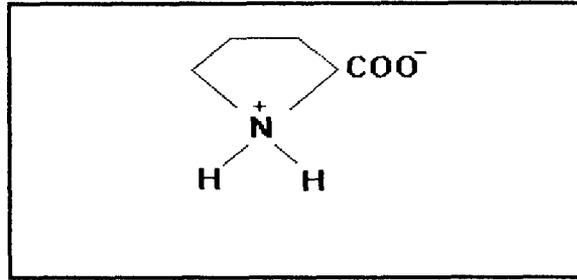
Todas las proteínas contienen multitud de átomos de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno y casi todas contienen azufre; en algunas de ellas es posible encontrar algunos elementos adicionales, particularmente: fósforo, hierro, zinc y cobre. Químicamente las proteínas caen bajo la clasificación general de heteropolímeros lineales, en este caso los monómeros son 20 diferentes α aminoácidos (ácidos alfa amino carboxílicos).

De los 20 aminoácidos que construyen las proteínas, 19 tienen una estructura general, y difieren solamente en la estructura química de la cadena lateral "R" (Fig. 1.1).



(Fig. 1.1) Esquema general de un aminoácido.

La prolina el aminoácido natural restante, es similar pero tiene su cadena lateral unida a un átomo de nitrógeno, formando un iminoácido (Fig. 1.2).

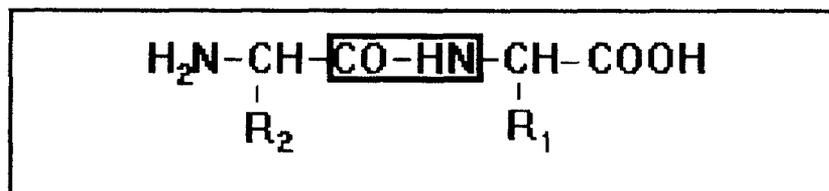


(Fig. 1.2) Aminoácido prolina.

A excepción de la glicina, en donde la cadena lateral es simplemente un átomo de hidrógeno, el átomo de carbono α es quiral y siempre en isómero L (Lehninger., 1990).

En las proteínas, los residuos de aminoácidos se hallan unidos entre sí de manera covalente a través de uniones amida sustituidas, que se denominan enlaces peptídicos (Fig. 1.3).

Las proteínas son mucho más complejas que el resto de los polímeros, que generalmente están formados por un número de monómeros diferentes mucho menor y ordenados de manera aleatoria al igual que la longitud de sus cadenas. Por el contrario las proteínas tienen una composición química específica, longitud y masa molecular precisas y una secuencia exacta; además una de sus características más importantes es que tienen la propiedad de adquirir una conformación tridimensional específica, responsable de su función biológica.



(Fig. 1.3) Enlace peptídico entre dos aminoácidos.

El término conformación se refiere a cada uno de los diferentes arreglos tridimensionales no superponibles que son interconvertibles solamente por rotaciones de los enlaces, sin necesidad de romper las uniones covalentes ni cambiar la quiralidad de los átomos, que de lo contrario producirían distintas configuraciones (Thornton, 1992).

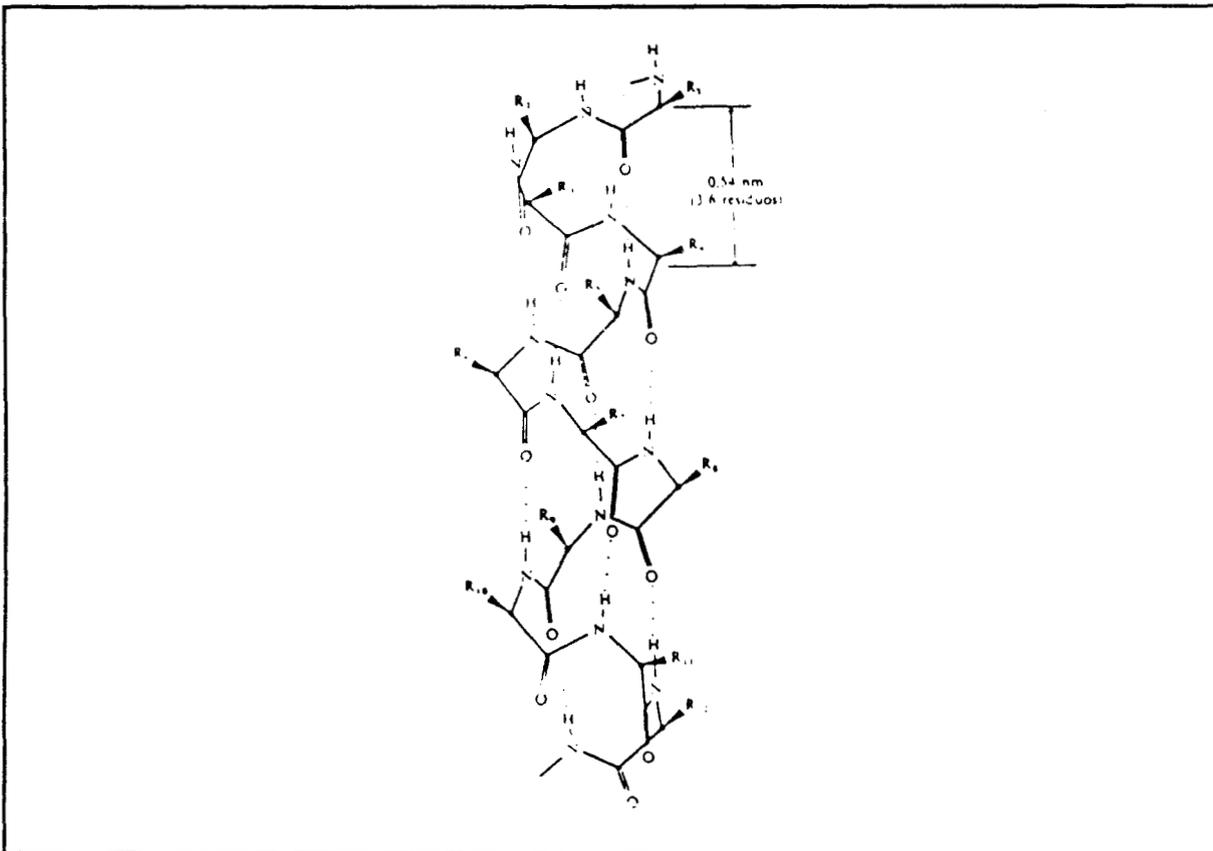
La descripción y estudio de la estructura de las proteínas se ha dividido en varios niveles de organización, cada uno de estos niveles recalca un aspecto diferente de la compleja conformación proteica y depende de distintos tipos de interacciones. Por lo general se describen cuatro de dichos niveles: primario, secundario, terciario y cuaternario (Battaner, 1985).

Por estructura primaria se entiende la secuencia, o sucesión lineal específica de los aminoácidos en una determinada cadena polipeptídica. La estructura secundaria se refiere al arreglo local que adquiere la cadena principal del polipéptido. Existen básicamente dos tipos de estructura secundaria regular: las hélices α y las hojas β .

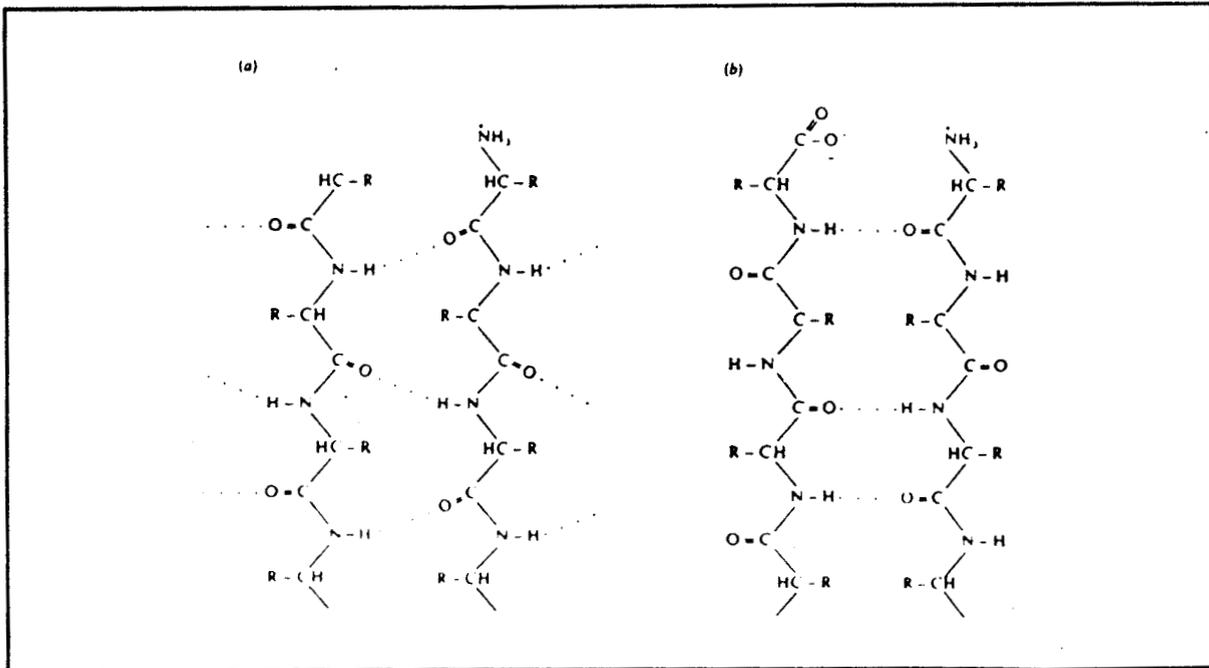
La hélice α tiene las siguientes características: se forma un puente de hidrógeno entre el grupo amino de un residuo aminoácido n y el oxígeno del carbonilo del residuo $n-4$. Una vuelta completa de la hélice contiene 3.6 residuos (Fig. 1.4).

Por otro lado, una cadena polipeptídica que forma una estructura β , no está completamente extendida, sino que se pliega (Fig. 1.5). Una hoja β está formada por dos o más cadenas polipeptídicas unidas por puentes de hidrógeno. Existen dos formas de hoja β : paralela y antiparalela. La dirección relativa en la que corren las cadenas que forman las láminas le confiere a cada tipo su nombre. Las redes de los puentes de hidrógeno son diferentes en cada tipo de hoja.

Los continuos avances en la comprensión de la estructura, el plegamiento, y la evolución de las proteínas han hecho necesaria la definición de dos niveles estructurales adicionales, intermedios entre la estructura secundaria y terciaria. Un agrupamiento estable de varios elementos de estructura secundaria se conoce a veces como estructura supersecundaria. El término se utiliza para describir arreglos particularmente estables que se observan en muchas proteínas. El dominio es un nivel de estructuración en cierto modo más elevado. Un dominio es una región compacta, que puede incluir entre 40 y 400 aminoácidos y constituye una unidad estructural particular en el ámbito de una cadena polipeptídica mayor.



(Fig. 1.4) Hélice α de una proteína. Dentro de la hélice se forman puentes de hidrógeno entre los grupos amino (NH) y los oxígenos de los grupos carbonílicos (CO). Estos puentes se indican en la figura mediante líneas punteadas. Las cadenas laterales de los distintos aminoácidos se indican con R_n.



(Fig. 1.5) Estructura laminar B, con disposición a) paralela y b) antiparalela. Las líneas punteadas denotan puente de hidrógeno.

La estructura terciaria es la arquitectura global tridimensional de la cadena polipeptídica. El término estructura cuaternaria pone de manifiesto cómo se disponen en el espacio las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena.

El proceso mediante el cual una cadena polipeptídica adquiere su estructura tridimensional específica, la forma nativa, que es la única con actividad biológica se denomina plegamiento.

El mecanismo de plegamiento de las proteínas es hoy en día un problema sin resolver. Experimentalmente se ha observado que la secuencia de aminoácidos contiene al menos una cantidad sustancial de la información necesaria para dirigir el plegamiento de la cadena polipeptídica (folding code), si bien, *in vivo* este proceso puede no ser espontáneo, y requerir de la participación de moléculas coadyuvantes

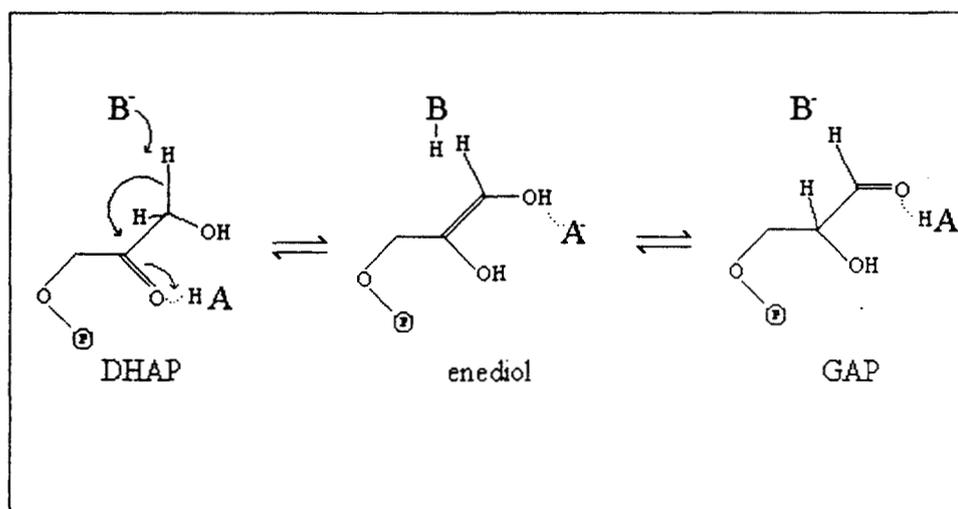
entre las que destacan las chaperonas y algunas enzimas y ligandos como carbohidratos.

Existen dos corrientes ó explicaciones para el plegamiento proteico, las de control cinético, donde se plantea que la conformación plegada no es la de más baja energía libre, sino que es la conformación cinéticamente accesible más estable; desde el punto de vista del control termodinámico, la conformación nativa debe ser aquella que tenga la menor energía.

La estructura nativa de las proteínas es marginalmente estable y se ve alterada por el proceso denominado desplegamiento, que puede ser inducido por cambios en el pH, temperatura, fuerza iónica, presión o por la presencia de sales o disolventes orgánicos. El proceso de desplegamiento puede estudiarse observando los cambios que ocurren en diferentes propiedades de la proteína, como características espectroscópicas o actividad biológica.

Uno de los principales propósitos de estudiar el plegamiento y desplegamiento de las proteínas es entender en detalle los principios que dictan la formación de la estructura nativa, y de ahí determinar el mecanismo del plegamiento. Esto es de particular interés debido a la característica tan notable de las proteínas que a pesar del número astronómicamente grande de conformaciones posibles, adoptan sólo una conformación específica (la forma nativa) que les confiere propiedades como catalizadores biológicos. Estudiando las características termodinámicas y cinéticas de las reacciones de plegamiento y desplegamiento, podemos determinar si existen intermediarios parcialmente plegados, y si pueden ser determinadas sus características estructurales. Por ejemplo una posibilidad es que las hélices α o las estructuras β se formen fácilmente en ciertas regiones de la cadena desplegada, y estas estructuras sean centros de nucleación a partir de los cuales se construye el resto de la estructura.

La proteína que es objeto de estudio del presente trabajo de tesis es la triosa fosfato isomerasa (TIM) de humano (hTIM). Esta enzima participa en la glucólisis, glucogénesis y en la síntesis de los triglicéridos. La enzima es necesaria para todas las especies y está presente en todos los tejidos (Gracy et al., 1994). La TIM cataliza la isomerización reversible del gliceraldehído-3-fosfato y el fosfato de dihidroxiacetona, a través de un intermediario cis-enediol (Fig. 1.6); la velocidad de la isomerización es esencialmente controlada por la difusión, esto significa que la evolución de la TIM como enzima la ha llevado a una función prácticamente perfecta (Knowles., 1991).



(Fig. 1.6) Reacción catalizada por la enzima triosa fosfato isomerasa (TIM). A y B representan a los grupos catalíticos en sus formas ácida y básica respectivamente.

Se ha demostrado que la deficiencia de esta enzima en el ser humano incrementa los niveles de fosfato de hidroxiacetona, así mismo, causa anemia crónica y debilitamiento neuromuscular; además debido a su importancia en la ruta glucolítica, se considera como un blanco atractivo en el diseño de fármacos contra parásitos que tienen la habilidad de vivir en la sangre de los mamíferos alimentándose de la glucosa contenida en ella, algunos de los ejemplos más serios son los parásitos causantes de las enfermedades como la tripanosomiasis (enfermedad del sueño) y la malaria (Mande et al, 1994). Estas enfermedades son

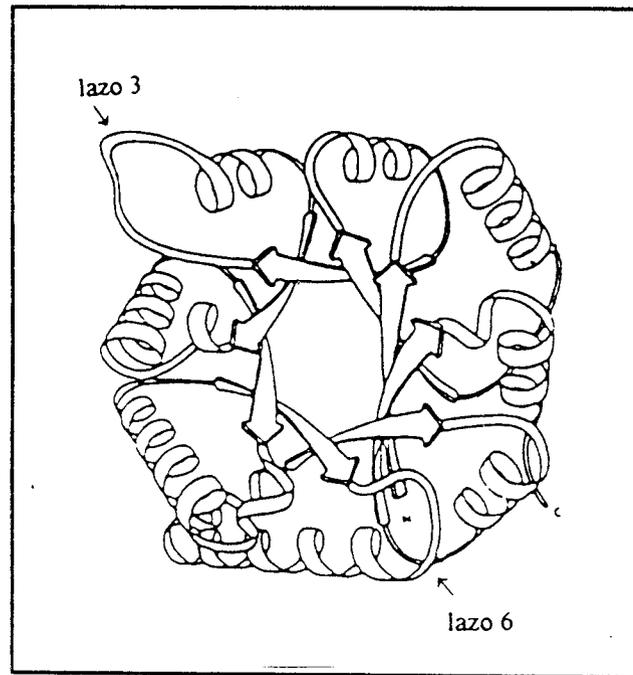
muy comunes en las zonas tropicales; especialmente la tripanosomiasis que se presenta con frecuencia en el sureste de nuestro país, y hasta el momento es incurable y mortal.

La TIM ha sido extensamente estudiada, sus propiedades catalíticas se conocen en detalle. Así mismo, está bien caracterizada estructuralmente, hasta el momento se conocen las estructuras cristalográficas de 7 especies: pollo (Banner et al., 1975), levadura (Alber et al., 1981), *Trypanosoma brucei* (Wierenga et al., 1991), *Escherichia coli* (Noble et al., 1993), humano (Mande et al., 1994). *Bacillus stearothermophilus* (Delboni et al., 1995) y *Plasmodium falciparum* (Velanker et al., 1997) así como la secuencia de aminoácidos de varias decenas de especies.

Estructuralmente, la TIM es un homodímero de aproximadamente 54 kDa con alrededor de 250 residuos en cada una de las subunidades (Mainfroid et al., 1996); no requiere ningún ion metálico o cofactor para realizar su función biológica. Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Ambos monómeros tienen un sitio activo completo, localizado cerca de la interfase entre las subunidades, pero sólo la especie dimerica presenta actividad biológica, lo que podría indicar que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad o la estabilidad del sitio activo de la otra subunidad. Los monómeros adoptan un plegamiento de barril α/β , donde 8 cadenas paralelas en conformación plegada β constituyen la parte interna del barril rodeado por 8 hélices α (Mande et al., 1994; Fig. 1.7).

En el centro catalítico, tres aminoácidos son particularmente importantes: lisina 13, histidina 95 y ácido glutámico 165, que unen al sustrato. El glutámico 165 actúa como el nucleófilo catalítico que atrae el protón del sustrato iniciando la isomerización. Los residuos 166 a 176 (lazo 6) forman una especie de tapa que se abre y cierra sobre el sitio activo durante la catálisis, esto con el objeto de mantener

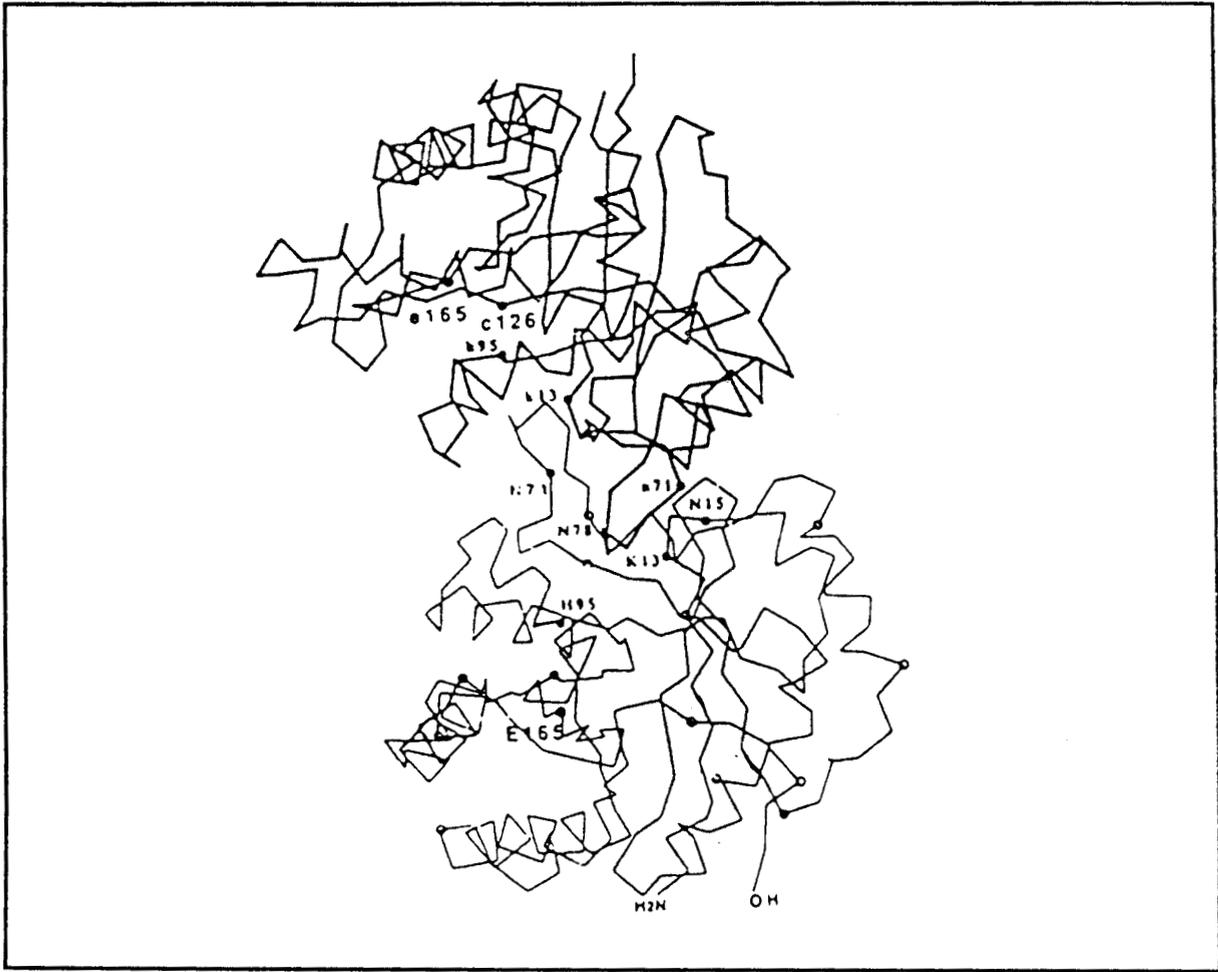
un entorno hidrofóbico para el sustrato. Otra característica estructural importante es el lazo 3 formado por los residuos 71 a 78 que se extiende desde una subunidad hasta la otra, estableciendo la mayoría de las interacciones no covalentes que mantienen unidos a los monómeros (Gracy et al, 1994; Fig. 1.8).



(Fig. 1.7) Esquema del homodímero de la TIM.

1.2 Objetivos.

Tomando en cuenta lo anterior se plantean como objetivos del presente trabajo de tesis, obtener datos del desplegamiento de la enzima triosa fosfato isomerasa por distintas técnicas, y así proponer un mecanismo ya sea termodinámico o cinético que describa la transición.



(Fig. 1.8) Estructura de TIM. Se presentan los residuos de interés que se mencionan en el texto, o que permiten seguir las cadenas. Cada subunidad está representada por líneas de diferente grosor.

Parte
experimental.

II PARTE EXPERIMENTAL.

2.1 Reactivos.

2.1.1 Triosa fosfato isomerasa humana.

Purificación de hTIM.

La muestra que se utilizó en el presente trabajo de tesis fue obtenida en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, mediante la inserción del gen de TIM humano en un vector de expresión sobreexpresado en la bacteria *E. coli*. Posteriormente la enzima se purificó hasta homogeneidad mediante la técnica que se describe a continuación montada por la Dra. Georgina Garza Ramos:

El centrifugado de 2 litros de células cultivadas en medio "Luria" se resuspendió en 80 ml de solución amortiguadora "A" (TRIS/HCl 20 mM, EDTA 0.2 mM, NaN₃ 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, pH 8.0), y se pasó 3 veces por la prensa de French para romper las membranas celulares. El prensado se centrifugó a 18000 g. por 20 minutos, descartando el sobrenadante. A la fracción obtenida, denominada extracto crudo, se le tomó una alícuota para determinar la concentración de proteína, y ensayar la actividad biológica. Después, la muestra se precipitó con sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 60%, dejando un día de reposo en refrigeración. El precipitado se centrifugó nuevamente 20 minutos a 29000 g., esta vez se descartó la pastilla. Al sobrenadante se le adicionó el sulfato de amonio necesario para alcanzar una saturación del 90%, (partiendo del 60% inicial), nuevamente se permitió un día de reposo en refrigeración.

En este caso el precipitado al 90 % se dividió en dos partes, una de las mitades se almacenó en refrigeración y con la mitad restante se siguió el proceso de purificación. Así, esta última fracción se centrifugó nuevamente durante 20 minutos a 29000 g. se descartó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla en aproximadamente 5 ml de solución reguladora "B" (TRIS/HCl 20 mM, EDTA 0.2

mM, NaN_3 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, NaCl 0.1 M, pH 8.0), se dializó contra la misma solución, llevándose a cabo 2 cambios de solución reguladora. También en este punto se realizaron las determinaciones de cantidad de proteína y de actividad.

Posteriormente la muestra se aplicó a una columna de filtración en gel, utilizando como fase estacionaria "Sephadex G-100", y como fase móvil la solución "B". Se colectaron las fracciones en que coincidieron los valores altos de concentración de proteína y actividad; después se concentró la muestra con el sistema "Centriprep 10", y el concentrado se dializó contra solución reguladora "B" con un cambio de amortiguador

A continuación, se aplicó la muestra a una columna de intercambio iónico "Q-Sepharose (fast flow)", el eluyente fue la solución "C" (TRIS/HCl 20 mM, EDTA 0.2 mM, NaN_3 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, pH 8.3). De igual modo se realizaron pruebas de actividad y concentración de proteína, y se colectaron las fracciones en que los valores altos de estas medidas coincidieron. Después se concentró la muestra con el sistema "Amicon", con agitación muy lenta y en refrigeración. Se volvió a medir actividad y concentración de proteína. Finalmente para verificar la homogeneidad se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, y se obtuvo una sola banda detectable.

Determinación de cantidad de proteína.

Durante las diferentes etapas de purificación, la concentración de proteína fue determinada por los métodos de Lowry y por absorbancia a 280 nm. En los estudios de actividad, dicroísmo circular y fluorescencia la cantidad de proteína se calculó a partir de la absorbancia de sus soluciones a 280 nm ($\epsilon^{1\%} = 13.0$ en celdas de 1 cm de recorrido óptico).

Ensayo de actividad.

La actividad enzimática de la triosa fosfato isomerasa humana se determinó espectrofotométricamente, midiendo la velocidad de formación del fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), que se convierte a α -glicerofosfato (α -GP) por acoplamiento con la enzima α -glicerofosfato-deshidrogenasa (α -GDH). Esta reacción consume un mol de NADH por cada mol de DHAP reducido. Con un exceso de la deshidrogenasa, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la velocidad de oxidación del NADH, que se midió por la disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm ($\epsilon = 6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las unidades de actividad enzimática se expresan en μ moles de sustrato transformado por minuto. La actividad específica se refiere a las unidades de actividad enzimática por miligramo de enzima.

La actividad se midió en 1 ml de solución que contenía TEA 100mM, EDTA 10 mM, pH 7.4 (Buffer D), gliceraldehído-3-fosfato (G3P) 1 mM, NADH 0.2 mM y 20 μ g de α -GDH . Todas las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente. La reacción se inició con la adición de 4 ng de hTIM, luego de hacer la dilución apropiada en buffer D.

2.1.2 Otros reactivos.

El ANS (sal de amonio del ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico) se adquirió de Sigma Chemical Co. El resto de los reactivos utilizados fueron grado analítico y se obtuvieron de las compañías Bio-Rad, Sigma ó Merck.

2.2 Técnicas Experimentales.

2.2.1 Dicroísmo circular.

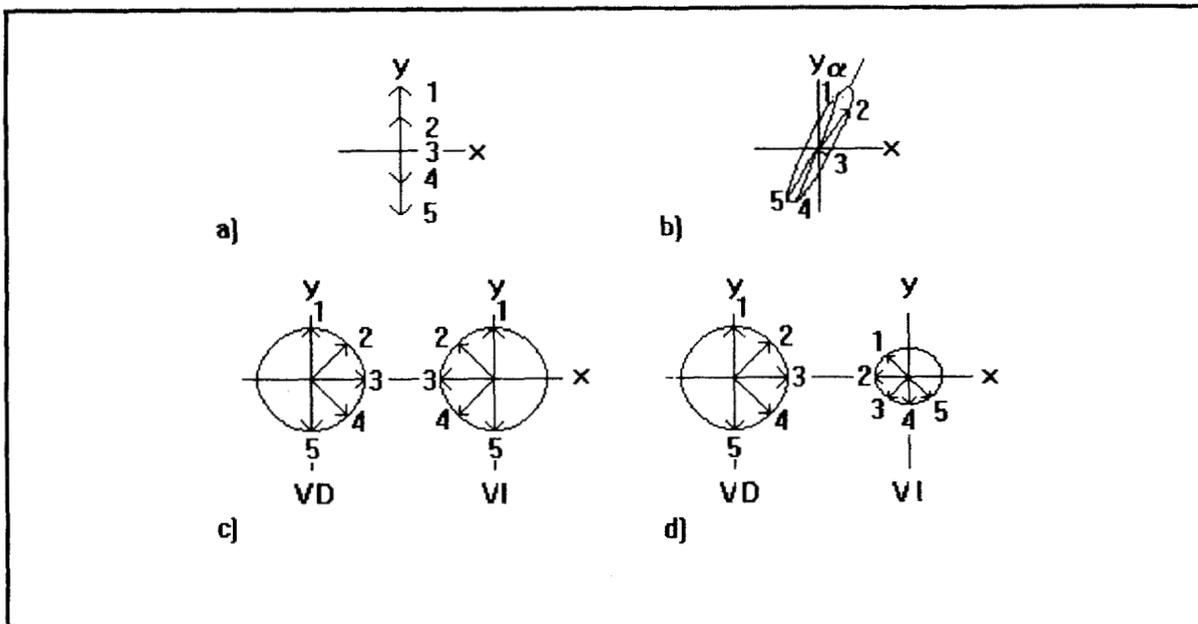
Un haz de radiación electromagnética monocromática (de una sola longitud de onda) está formado comúnmente por ondas luminosas que oscilan en todos los planos paralelos a la dirección de propagación. Cuando esta radiación

electromagnética pasa a través de cristales o medios polarizadores, emerge un haz que está formado por ondas que oscilan en uno solo de estos planos; se dice que la radiación electromagnética está polarizada en un plano o plano polarizada. Este tipo de radiación puede describirse matemáticamente como la suma de dos componentes de igual intensidad: un haz circularmente polarizado hacia la derecha y otro hacia la izquierda (cuyos vectores eléctricos son llamados VD y VI respectivamente). Cuando la radiación plano polarizada interactúa con una molécula estructuralmente asimétrica, se pueden observar dos fenómenos: la dispersión óptica rotatoria (ORD) y el dicroísmo circular (DC). Estos fenómenos se deben a las siguientes causas:

1.- Los vectores VD y VI viajan a diferentes velocidades a través de la muestra. Esta diferencia en el índice de refracción origina la rotación óptica, la rotación del plano de polarización medida en grados de rotación. ORD es la dependencia de esta rotación con la longitud de onda.

2.- La absorción de radiación electromagnética circularmente polarizada a la izquierda (VI) es diferente a la del otro componente (VD). Al salir de la muestra, cada uno de ellos es aún circularmente polarizado pero con diferentes intensidades de sus vectores eléctricos. A la diferente absorción de luz para cada componente se le conoce como dicroísmo circular (DC). La suma de los dos componentes de la radiación emergente producirá luz elípticamente polarizada, siendo así el dicroísmo circular expresado en medidas de elipticidad (Fig. 2.1).

La técnica de DC es más usada que ORD, debido a la instrumentación más confiable que existe para la medición de DC.



(Fig. 2.1) Efecto de una muestra ópticamente activa en la radiación plano polarizada. (a) Vector eléctrico de la radiación plano polarizada. (b) El vector describe una elipse al salir de la muestra ópticamente activa. (c) La suma de los dos componentes de la luz circularmente polarizada se encuentran en un plano. (d) Cada componente es absorbido en diferente intensidad y la suma de ellos ya no se encuentra en un plano.

El fenómeno de DC de proteínas puede dividirse en dos regiones: en el ultravioleta lejano (180-250 nm), zona de los enlaces amida, donde la señal se origina por la interacción entre los enlaces peptídicos; y en el ultravioleta cercano (250-300 nm), donde las bandas se deben al entorno asimétrico de los aminoácidos aromáticos, por lo que cada región aporta diferente tipo de información. Los espectros en la zona de las amidas deben su forma e intensidad a la estructura secundaria de las proteínas; en particular las hélices α exhiben un espectro fuerte y característico en el ultravioleta lejano. En el ultravioleta cercano los espectros son sensibles al entorno asimétrico de las cadenas laterales aromáticas que pueden estar relativamente inmóviles en una proteína plegada; en caso de cambios estructurales, los cambios de este entorno asimétrico modifican significativamente las señales de DC en esta región del UV.

La diferencia en absorbancia de la luz circularmente polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda de una muestra proteica es generalmente muy pequeña,

en el ultravioleta lejano está en el rango de 10^{-4} a 10^{-6} unidades de absorbancia, en muestras con una absorbancia total de alrededor de 1.0. La diferencia de absorbancia representa del 0.03% al 0.3% del total de la señal detectada por el instrumento. Por esta razón para obtener resultados exactos y reproducibles se requiere de equipo altamente sensible y una muy cuidadosa preparación de la muestra.

Los datos en dicroísmo circular pueden reportarse como $[\theta]$, la elipticidad molar por residuo, o como $(\epsilon_T - \epsilon_D)$, la diferencia entre los coeficientes de extinción molar de cada componente de la luz plano polarizada. Las dos medidas son proporcionales:

$$[\theta] = 3300(\epsilon_T - \epsilon_D) \quad (2.1)$$

la elipticidad molar o por residuo se define como:

$$[\theta]_{\lambda} = \{(\theta)_{obs} \cdot 100 \cdot PMR\} / d \cdot c \quad (2.2)$$

donde: λ es la longitud de onda; $(\theta)_{obs}$ es la elipticidad observada en grados; el peso; PMR es el peso molecular promedio por residuo; c es la concentración de la muestra en miligramos por mililitro; y d es la longitud de la trayectoria óptica en centímetros (Schmid, 1989).

En este trabajo fue utilizado un espectropolarímetro JASCO modelo J500 A, con celdas de cuarzo de 0.05 cm de trayectoria óptica. Los espectros se obtuvieron de 180 a 250 nm y las cinéticas con longitud de onda constante de 220 nm. Así mismo, para experimentos que requerían calentar gradualmente la muestra, a una velocidad aproximada de 1 °C/min, o para llevar a cabo cambios súbitos de temperatura se empleó un portaceldas con camisa de circulación de agua y un baño con termostato y bomba recirculadora.

2.2.2 Fluorescencia.

La fluorescencia es la emisión de radiación que ocurre cuando una molécula en estado electrónico excitado regresa a su estado basal. Dado que siempre hay pérdida de energía por procesos no radiativos, la energía emitida es menor que la de la luz absorbida, y el espectro de emisión está desplazado hacia la zona del infrarrojo con respecto al espectro de excitación. La emisión de fluorescencia es mucho más sensible a los cambios de ambiente de los fluoróforos que la absorción de luz, debido a que el tiempo de vida del estado excitado es relativamente largo (10^{-6} a 10^{-9} segundos) una amplia gama de interacciones o perturbaciones pueden influir en este estado y por lo tanto en la fluorescencia. Por lo anterior esta técnica es excelente para investigar los cambios conformacionales de las proteínas.

La fluorescencia en proteínas se origina por la presencia de aminoácidos como fenilalanina, tirosina y triptofano. Sin embargo, para las proteínas que contienen los tres tipos de aminoácido la fluorescencia observada se debe básicamente al triptofano; aminoácido que presenta fuerte emisión y que prácticamente no transfiere energía a otros grupos aromáticos en contraste con la fenilalanina y la tirosina (Schmid, 1989). La hTIM contiene 5 residuos de triptofano en cada monómero, en las posiciones 12, 90, 167, 178 y 201 (Mande et al, 1994), por ello es posible seguir con alta sensibilidad los cambios conformacionales de la enzima durante su desplegamiento.

En este trabajo de tesis se utilizó un espectrofluorómetro marca ISS, modelo PC1, con celdas de cuarzo de 1 cm de trayectoria óptica. Los espectros se obtuvieron de 300 a 400 nm de emisión y las cinéticas con longitud de onda constante a 322.3 nm, ambas con excitación a 280 nm. Así mismo para experimentos que requerían calentar gradualmente la muestra a una velocidad de aproximadamente 1 °C/min., o para llevar a cabo cambios súbitos de temperatura de la muestra se empleó un

portaceldas con camisa de circulación de agua y un baño con termostato y bomba recirculadora.

2.3 Obtención de curvas de transición.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en buffer TRIS/acetatos 50 mM (pH 8.0) con concentraciones de proteína de 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Para seguir los cambios ocurridos durante el desplegamiento, la temperatura de la muestra fue incrementada con el auxilio de un baño térmico a una velocidad aproximada de 1 $^{\circ}\text{C}$ por minuto. Durante los calentamientos se obtuvieron espectros de fluorescencia de manera continua a intervalos de 2 min aproximadamente. Con la técnica de DC se siguieron los cambios conformacionales de una longitud de onda fija. Una vez alcanzada una temperatura preestablecida (305, 318, 325, 338, 343 K) la muestra se enfrió para intentar inducir su replegamiento.

Al final de los experimentos se llevaron a cabo ensayos de actividad de las muestras sometidas a calentamiento, para cuantificar el grado de irreversibilidad del proceso de desplegamiento.

Las curvas de transición se ajustaron (mediante el paquete computacional Origin versión 1.16; MicroCal, Inc) a una ecuación exponencial del siguiente tipo (Rojo-Domínguez et al., 1990):

$$K_D = \exp[(\Delta H_m/RT_m - \Delta C_p/R)(1 - T_m/T)](T/T_m)^{\Delta C_p/R} \quad (2.3)$$

Donde K_D es la constante de equilibrio, T_m la temperatura media, ΔH_m el cambio de entalpia a la temperatura media y el ΔC_p el cambio de capacidad calorífica, todos asociados al desplegamiento; R representa la constante de los gases y T la temperatura (Sección 3.1).

2.4 Experimentos cinéticos.

Otro tipo de experimentos llevados a cabo, consistió en someter a la muestra a aumentos súbitos de temperatura: la muestra concentrada se diluyó en solución reguladora que se encontraba previamente estabilizada a la temperatura del experimento, con el objetivo de que la muestra alcanzara rápidamente esa temperatura. Los cambios conformacionales originados por el aumento abrupto de temperatura se siguieron a lo largo del tiempo, con las técnicas de fluorescencia y dicroísmo circular, utilizando en el caso de fluorescencia una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión de 322.3 nm, y en el caso de dicroísmo circular la longitud de onda utilizada fue 220 nm. Los experimentos se detuvieron cuando ya no se observaban cambios en la señal espectroscópica.

Las concentraciones de proteína utilizadas fueron: 10 $\mu\text{g/ml}$ para la técnica de fluorescencia y 100 $\mu\text{g/ml}$ para dicroísmo circular, ambas en buffer TRIS/acetatos 50 mM (pH 8.0).

2.5 Glóbulo Fundido.

El glóbulo fundido es una conformación proteica compacta, que tiene un contenido de estructura secundaria similar a la proteína nativa, pero con estructura terciaria pobremente definida. Bajo condiciones particulares es un estado estable en algunas proteínas y puede considerarse como un intermediario cinético en el plegamiento proteico (Creighton y Ewbank., 1991). Este tipo de intermediario se describe generalmente como un núcleo hidrofóbico solvatado, que en presencia de ANS lo acumula en sus sitios de unión apolares, inaccesibles originalmente en la conformación nativa. La señal de fluorescencia del ANS depende fuertemente de la hidrofobicidad de su entorno, es por ello que la prueba del ANS es muy útil para estimar los cambios del contenido de región apolar accesible al solvente que ocurren durante el desplegamiento y para detectar si existen intermediarios del tipo glóbulo fundido (Martin et al., 1991).

En este trabajo de tesis se llevó a cabo un experimento utilizando el colorante ANS a una proporción 50 veces mayor a la de la enzima, es decir 9.25×10^{-6} M de ANS en buffer TRIS/acetatos 50 mM (pH 8.0). La muestra se sometió a un calentamiento súbito para que alcanzara rápidamente la temperatura del experimento (322 K) y se obtuvo su señal de fluorescencia a lo largo del tiempo; en estos experimentos la longitud de onda de excitación fue de 350 nm y la emisión se siguió a 465 nm.

Tratamiento de los datos.

III TRATAMIENTO DE LOS DATOS.

3.1 Estudios de desplegamiento en equilibrio.

Modelo reversible de dos estados para proteínas monoméricas.

Habiendo encontrado las condiciones de reversibilidad es posible estudiar el proceso de desnaturalización en el equilibrio; el modelo más sencillo es el mecanismo de dos estados.

Si el ambiente es modificado hacia condiciones que favorezcan el desplegamiento de la conformación nativa cambia inicialmente muy poco: es decir; puede haber cambios locales pero la estructura global se conserva. Después, al continuar la inducción del desplegamiento ocurre una transición abrupta en un intervalo muy limitado de condiciones. Cuando el grado de desplegamiento se puede medir por diferentes técnicas y en todas ellas se determina la misma curva de transición, se puede proponer que el desplegamiento es un fenómeno de dos estados donde sólo el estado nativo y el desplegado existen en equilibrio, esto también sugiere que el proceso es cooperativo. En otras palabras la estabilidad de cada parte de la estructura es dependiente de las otras partes, las estructuras parcialmente plegadas deberían de ser inestables con respecto a las estructuras nativas y completamente desplegadas; así que la reacción en la presencia de agente desnaturalizante o elevadas temperaturas, puede describirse por la ecuación:



Para una transición de dos estados la constante de equilibrio puede medirse directamente a partir del promedio del grado de desplegamiento

$$K_D = [D]/[N] \quad (3.2)$$

Si la fracción de especies desnaturalizadas se puede medir con técnicas biofísicas o espectroscópicas, y se define al parámetro "y" como el observable que es utilizado para seguir la desnaturalización. El valor de ese parámetro debe modificarse con los cambios en la conformación molecular, y de esa manera es posible medir indirectamente la transición; las muestras en estado nativo así como

en estado desplegado poseen sus propios valores del parámetro observable "y", siendo y_N y y_D respectivamente. Estos valores dependen de la concentración de agente desnaturizante, lo que hace necesaria su extrapolación lineal a cualquier punto de la transición. Así mismo se definen f_N y f_D , como las fracciones de proteína nativa y desnaturizada respectivamente, de acuerdo a un simple balance de masa se tiene:

$$f_N + f_D = 1 \quad (3.3)$$

y de igual modo:

$$y = y_N f_N + y_D f_D \quad (3.4)$$

de las ecuaciones anteriores, puede obtenerse el valor f_D :

$$f_D = (y - y_N) / (y_D - y_N) \quad (3.5)$$

Esto implica que en cualquier punto de la transición es posible conocer la fracción de proteína desnaturizada a partir del valor del parámetro "y", y de la extrapolación lineal de los valores de y_N y y_D , así mismo pueden calcularse la constante de equilibrio K_D y el cambio de energía libre del proceso (ΔG).

$$K_D = [D] / [N] = f_D / f_N = f_D / (1 - f_D) \quad (3.6)$$

$$K_D = \exp(-\Delta G / RT) \quad (3.7)$$

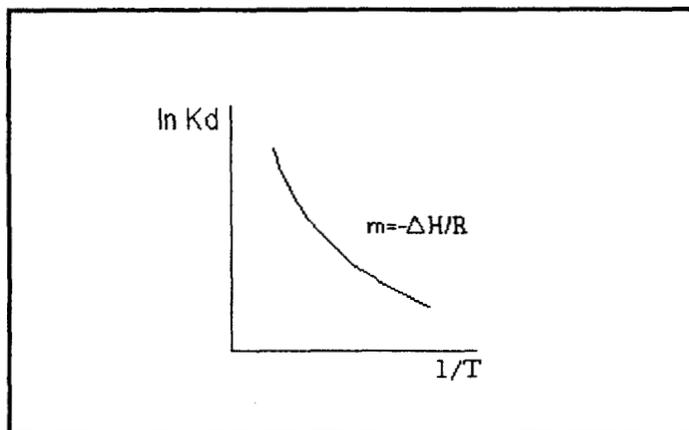
sustituyendo las ecuaciones 3.3, 3.4 y 3.5 en la ecuación 3.6, se obtiene:

$$K_D = (y_N - y) / (y - y_D) \quad (3.8)$$

Los estudios del desplegamiento térmico son importantes porque a través de ellos es posible obtener los parámetros termodinámicos de la transición

Utilizando la curva de van't Hoff ($\ln K_D$ contra $1/T$; Fig. 3.1) se puede conocer el cambio de entalpía del proceso de desplegamiento, sabiendo que la pendiente de dicha curva es:

$$m = -\Delta H / R. \quad (3.9)$$



(Fig. 3.1) Curva de van't Hoff.

Si este último valor es evaluado a la temperatura que corresponde a la mitad de la transición (T_m), en la que el valor de $K_D = f_D/f_N = 1$ y por lo tanto el valor del cambio de energía libre es cero, es posible estimar el cambio de la entropía durante la reacción de desplegamiento debido a que a la T_m :

$$\Delta S_m = \Delta H_m / T_m \quad (3.10)$$

El cambio de la capacidad calorífica del proceso ΔC_p está dado por la derivada parcial de ΔH con respecto de la temperatura.

Conociendo el cambio en la capacidad calorífica, es posible conocer tanto el cambio entálpico, como el entrópico de la transición, parámetros que son altamente dependientes de la temperatura. En el rango de temperaturas en el que la capacidad calorífica no varía con la temperatura, la dependencia del cambio de entalpia y de entropía se expresa por:

$$\Delta H(T) = \Delta H_m + \Delta C_p(T - T_m) \quad (3.11)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S_m + \Delta C_p \ln(T/T_m) \quad (3.12)$$

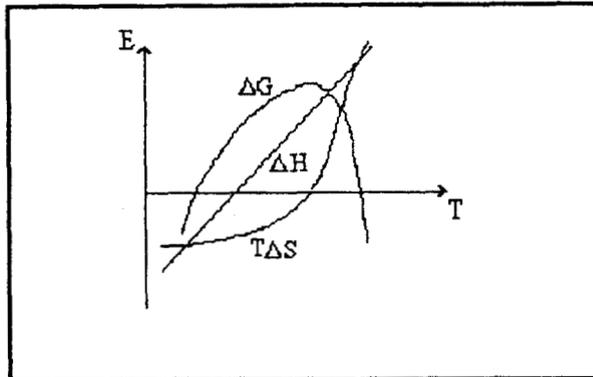
así mismo la dependencia de ΔG con la temperatura es:

$$\Delta G = \Delta H_m - T\Delta S_m + \Delta C_p[T - T_m - T \ln(T/T_m)] \quad (3.13)$$

Derivando esta función, y obteniendo su valor máximo en:

$$T^* = T_m \exp(-\Delta S_m / \Delta C_p) \quad (3.14)$$

Este valor de temperatura T^* representa el de estabilidad más alta de la estructura nativa, alguna variación en la temperatura, ya sea que aumente o disminuya puede alterar la conformación de la proteína (Fig. 3.2).



(Fig. 3.2) Representación esquemática de ΔH , ΔG , y $T\Delta S$ con respecto a la temperatura.

Modelo reversible de tres estados, para proteínas diméricas.

En el caso de proteínas diméricas, las interacciones entre las cadenas pueden contribuir de manera significativa a la estabilidad conformacional de toda la proteína. Al parecer es difícil encontrar dímeros completamente desplegados; por tal razón para describir el desplegamiento de enzimas diméricas (u oligoméricas) se han propuesto dos tipos de modelos: los que involucran 3 estados (el dímero nativo, los monómeros de conformación muy cercana a la nativa, y los monómeros completamente desplegados) y los modelos que sólo consideran 2 estados, en los que la disociación y desplegamiento ocurren prácticamente de manera simultánea.

A continuación se describe un modelo general que involucra la disociación y el posterior desplegamiento de una proteína dimérica.



que equivale a:



donde:

$$K_1 = [I]^2 / [N_2] \quad (3.17)$$

$$K_2 = [D] / [I] \quad (3.18)$$

Cada reacción está descrita por una constante de equilibrio distinta, y por conveniencia se usa sólo I para representar el intermediario monomérico. La constante de disociación $K_{dis} = ([N]^2 / [N_2])$, que se obtiene por dilución, se asume que es equivalente a K_1 , pero en realidad el equilibrio puede ser más complejo dependiendo de la magnitud de K_2 . La constante de equilibrio global de la reacción de desnaturalización $K_D = K_1 K_2^2$ y el cambio de energía libre global ΔG puede dividirse en dos términos: $\Delta G = \Delta G_1 + 2\Delta G_2$

Las proteínas con valores K_1 considerablemente más grandes que de K_2 deben su estabilidad conformacional global en mayor medida a las interacciones que estabilizan su estructura secundaria y terciaria, con respecto a las interacciones entre sus cadenas. Es importante considerar que la estructura del intermediario monomérico puede ser distinta a la conformación de las subunidades en el dímero nativo, pero es probable que este intermediario conserve una gran parte de su estructura secundaria y terciaria nativa.

Modelo reversible de dos estados para proteínas diméricas.

Muchas proteínas diméricas siguen un desplegamiento de dos estados a pesar de las interacciones cuaternarias, este es un caso particular de la ecuación 3.16 en donde K_2 es significativamente mayor que K_1 . Es decir la disociación origina especies intrínsecamente inestables, cuya concentración sería prácticamente indetectable en condiciones de equilibrio; por esto el modelo se reduce a dos estados y sus parámetros termodinámicos se pueden estimar de manera similar a las proteínas monoméricas.



En este caso los dos estados son el dímero nativo N_2 y el monómero desplegado D . De manera similar al caso de los monómeros, la fracción de proteína desplegada puede medirse espectroscópicamente. Pero la constante de equilibrio está dada por la ecuación 3.20.

$$K_D = [D]^2/[N_2] = 2Pt[f_D^2/(1-f_D)] \quad (3.20)$$

Esta última ecuación muestra la dependencia de K_D con la fracción de proteína desplegada f_D y la concentración total de proteína Pt . Como ya se ha mencionado este tratamiento se aplica cuando en la ruta de desplegamiento no existe una concentración significativa de intermediario monomérico; es decir, las interacciones cuaternarias son necesarias para la estabilidad de la molécula. Sin embargo es probable que exista transitoriamente un monómero parcialmente estructurado, o un dímero desplegado observable por mediciones cinéticas (Neet et al., 1994).

3.2 Estudios de desplegamiento fuera del equilibrio.

El modelo reversible de dos estados es un tratamiento matemático aplicable a un parámetro observable " y ", que depende de la conformación proteica, y a partir del cual pueden obtenerse datos termodinámicos, como la temperatura media de la transición (T_m), el cambio de la energía libre de Gibbs del proceso de desplegamiento (ΔG), así como el cambio de entalpía (ΔH), de entropía (ΔS) y de capacidad calorífica (ΔC_p) para dicha transición. Cuando este tratamiento se aplica en los casos en los que el mecanismo de desplegamiento se aparta del comportamiento reversible de dos estados, los valores termodinámicos que se obtienen sólo son aparentes. No obstante, la obtención de estos parámetros es útil porque por medio de la T_m aparente podemos comparar como se desplaza la temperatura a la que ocurren las transiciones, y el ΔH aparente nos da una idea cualitativa de la cooperatividad del proceso de desplegamiento.

Adicionalmente al tratamiento en equilibrio para la obtención de datos termodinámicos, se pueden realizar experimentos cinéticos. Estos estudios nos permiten obtener información complementaria, analizando la dependencia con el tiempo del proceso de desplegamiento. El desplegamiento de las cadenas polipeptídicas son procesos intramoleculares, por lo que la cinética de estas reacciones siempre se describe en términos de ecuaciones de primer orden. Por otra parte el plegamiento de especies multiméricas puede requerir la asociación de moléculas independientes y ser descrita por ecuaciones cinéticas de orden superior.

Modelo cinético de dos estados.

Se asume que inicialmente la muestra consiste de exclusivamente proteína nativa y que al someterla a un aumento súbito de temperatura se induce el desplegamiento molecular. De esta forma se origina una mezcla de especies conformacionalmente diferentes cuyas proporciones cambian con el tiempo.

Para la reacción:



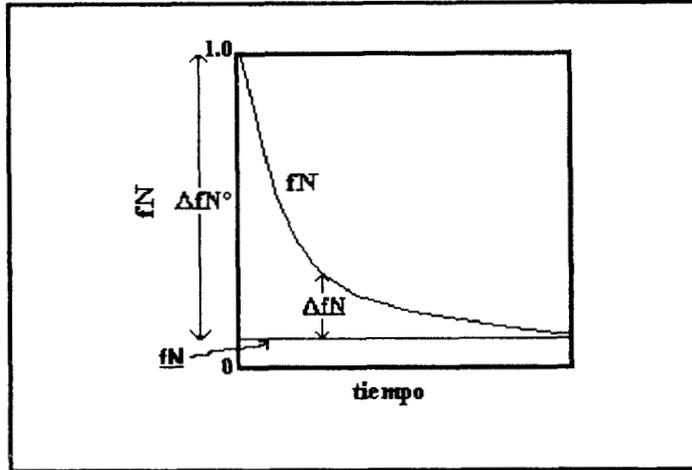
la velocidad de reacción es:

$$-d[N]/dt = k_1[N] - k_{-1}[D] \tag{3.22}$$

$$-df_N/dt = k_1f_N - k_{-1}f_D \tag{3.23}$$

definiendo " $f_N = \underline{f}_N + \Delta f_N$ " y " $f_D = \underline{f}_D + \Delta f_D$ ", donde \underline{f}_N y \underline{f}_D denotan las fracciones de equilibrio finales (y constantes), haciendo la sustitución en la ecuación 3.23, se obtiene (Fig. 3.3):

$$-d\Delta f_N/dt = (k_1 + k_{-1})\Delta f_N \tag{3.24}$$



(Fig. 3.3) Esquema de la dependencia de f_N contra tiempo. Ilustrando los parámetros discutidos en el texto.

En general se mide la propiedad física "y" que se considera aditiva:

$$y = f_N y_N + f_D y_D \quad (3.25)$$

Definimos

$$(k_1 + k_{-1}) = \lambda \quad (3.26)$$

y es conveniente trabajar con la variable Δy , donde:

$$\Delta y = y - y^0 = y_N \Delta f_N + y_D \Delta f_D \quad (3.27)$$

$$\Delta y = (y_N - y_D) \Delta f_N^0 \exp^{-\lambda t} \quad (3.28)$$

$$\Delta y = \Delta y^0 \exp^{-\lambda t} \quad (3.29)$$

donde Δy^0 es el cambio del valor "y" desde $t=0$ hasta su valor de equilibrio " y^0 ".

La ecuación 3.29 indica que la gráfica de: " $\ln(\Delta y / \Delta y^0)$ vs t " debe ser lineal donde la pendiente de la recta es independiente de las condiciones iniciales de la propiedad medida.

En el caso de un proceso irreversible, k_{-1} es despreciable y por lo tanto $\lambda = k_1$.

Finalmente con una conjunto de valores experimentales de $\lambda = k_1$ obtenidos a diferentes temperaturas y utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$k_1(T) = A \exp^{(-E_a/RT)} \quad (3.30)$$

es posible conocer la energía necesaria para alcanzar el estado de transición del proceso de desplegamiento, Ea , el estado de transición es la conformación de mayor energía para pasar del estado nativo al desplegado.

Modelo cinético de tres estados sin disociación.

Las cinéticas bifásicas se pueden describir mediante el esquema:



Este esquema involucra un intermediario en la ruta entre el estado nativo y el desplegado. Las ecuaciones de velocidad están dadas por:

$$-d[N]/dt = k_1[N] - k_{-1}[X] \tag{3.32}$$

$$d[D]/dt = k_2[X] - k_{-2}[D] \tag{3.33}$$

Análogamente al caso de dos estados se hacen las manipulaciones y sustituciones necesarias, y se obtienen formas alternativas de las ecuaciones anteriores:

$$-d\Delta f_N/dt = (k_1 + k_{-1}) \Delta f_N + k_{-1} \Delta f_D \tag{3.34}$$

$$-d\Delta f_D/dt = k_2 \Delta f_N + (k_2 + k_{-2}) \Delta f_D \tag{3.35}$$

Las ecuaciones 3.34 y 3.35 son ecuaciones diferenciales simultáneas lineales. La forma general de solución de dichas ecuaciones es asumir que las soluciones son del tipo:

$$\Delta f_N = C \exp^{-\lambda t} \tag{3.36}$$

$$\Delta f_D = C' \exp^{-\lambda t} \tag{3.37}$$

Donde C , C' y λ son constantes. Sustituyendo las ecuaciones 3.36 y 3.37 en las ecuaciones 3.34 y 3.35 se obtiene:

$$0 = (k_1 + k_{-1} - \lambda) \Delta f_N + k_{-1} \Delta f_D \tag{3.38}$$

$$0 = k_2 \Delta f_N + (k_2 + k_{-2} - \lambda) \Delta f_D \tag{3.39}$$

Estas ecuaciones simultáneas se resuelven mediante un sistema de determinantes:

$$\begin{vmatrix} k_1+k_{-1}-\lambda & k_{-1} \\ k_2 & k_2+k_{-2}-\lambda \end{vmatrix} = 0 \quad (3.40)$$

Al resolver este sistema, se obtienen dos raíces de λ : λ_1 y λ_2 , que al sustituir cada una en las ecuaciones 3.36 y 3.37, se obtiene 4 constantes: C_1 , C_2 , C_3 y C_4 llegando así a la solución general del sistema:

$$\Delta f_N = C_1 \exp^{-\lambda_1 t} + C_2 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (3.41)$$

$$\Delta f_D = C_3 \exp^{-\lambda_1 t} + C_4 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (3.42)$$

Análogamente al caso sin intermediarios, si el proceso es irreversible:

$$\lambda_1 = k_1 \quad (3.43)$$

$$\lambda_2 = k_2 \quad (3.44)$$

Donde k_1 y k_2 representan las constantes de velocidad de cada una de las reacciones que se describen en la ecuación 3.31. Finalmente de manera similar al caso de dos estados, mediante la teoría de Arrhenius, es posible obtener las energías de activación para cada una de las reacciones (Cantor y Schimmel, 1980).

Generalmente se mide la propiedad física “y”, cuya dependencia con el tiempo se da por la expresión:

$$\Delta y / \Delta y^0 = A_1 \exp^{-\lambda_1 t} + A_2 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (3.45)$$

Donde $A_1 + A_2 = 1$.

Modelo cinético irreversible de tres estados con disociación.

Las cinéticas bifásicas irreversibles con disociación se pueden describir mediante el esquema:



Este esquema involucra un intermediario disociado en la ruta entre el estado nativo y el desplegado. Las ecuaciones de velocidad están dadas por:

$$-d[N]/dt = k_1[N] \quad (3.47)$$

$$d[X]/dt = k_1[N] - k_2[X] \quad (3.48)$$

$$d[D]/dt = k_2[X] \quad (3.49)$$

Análogamente al caso de dos estados se hacen las manipulaciones y sustituciones necesarias, y se obtienen formas alternativas de las ecuaciones anteriores:

$$-d\Delta f_N/dt = k_1 \Delta f_N + k_1 \underline{f}_N \quad (3.50)$$

$$-d\Delta f_D/dt = k_2 \Delta f_X + k_2 \underline{f}_X \quad (3.51)$$

Las ecuaciones 3.50 y 3.51 son ecuaciones diferenciales simultáneas lineales. La forma general de solución de dichas ecuaciones es asumir que las soluciones son del tipo:

$$\Delta f_N = C \exp^{-\lambda t} \quad (3.52)$$

$$\Delta f_D = C' \exp^{-\lambda t} \quad (3.53)$$

Donde C , C' y λ son constantes. Sustituyendo las ecuaciones 3.52 y 3.53 en las ecuaciones 3.50 y 3.51 se obtiene:

$$0 = (\lambda - k_2) \Delta f_D - 2k_2 \Delta f_N \quad (3.54)$$

$$0 = (\lambda - k_1) \Delta f_N \quad (3.55)$$

Estas ecuaciones simultáneas se resuelven mediante un sistema de determinantes:

$$\begin{vmatrix} \lambda - k_2 & -2k_2 \\ 0 & \lambda - k_1 \end{vmatrix} = 0 \quad (3.56)$$

Al resolver este sistema, se obtienen dos raíces de λ : λ_1 y λ_2 , donde:

$$\lambda_1 = k_1 \quad (3.57)$$

$$\lambda_2 = k_2 \quad (3.58)$$

Donde k_1 y k_2 representan las constantes de velocidad de cada una de las reacciones que se describen en la ecuación 3.46. Al sustituir cada valor de λ en las ecuaciones 3.52 y 3.53, se obtiene 4 constantes: C_1 , C_2 , C_3 y C_4 llegando así a la solución general del sistema:

$$\Delta f_N = C_1 \exp^{-\lambda_1 t} + C_2 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (3.59)$$

$$\Delta f_D = C_3 \exp^{-\lambda_1 t} + C_4 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (3.60)$$

Finalmente de manera similar al caso de dos estados, mediante la teoría de **Arrhenius**, es posible obtener las energías de activación para cada una de las reacciones (Cantor y Schimmel, 1980).

Generalmente se mide la propiedad física “y”, cuya dependencia con el tiempo se da por la expresión:

$$\Delta y / \Delta y^o = A_1 \exp^{-\lambda_1 t} + A_2 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (3.61)$$

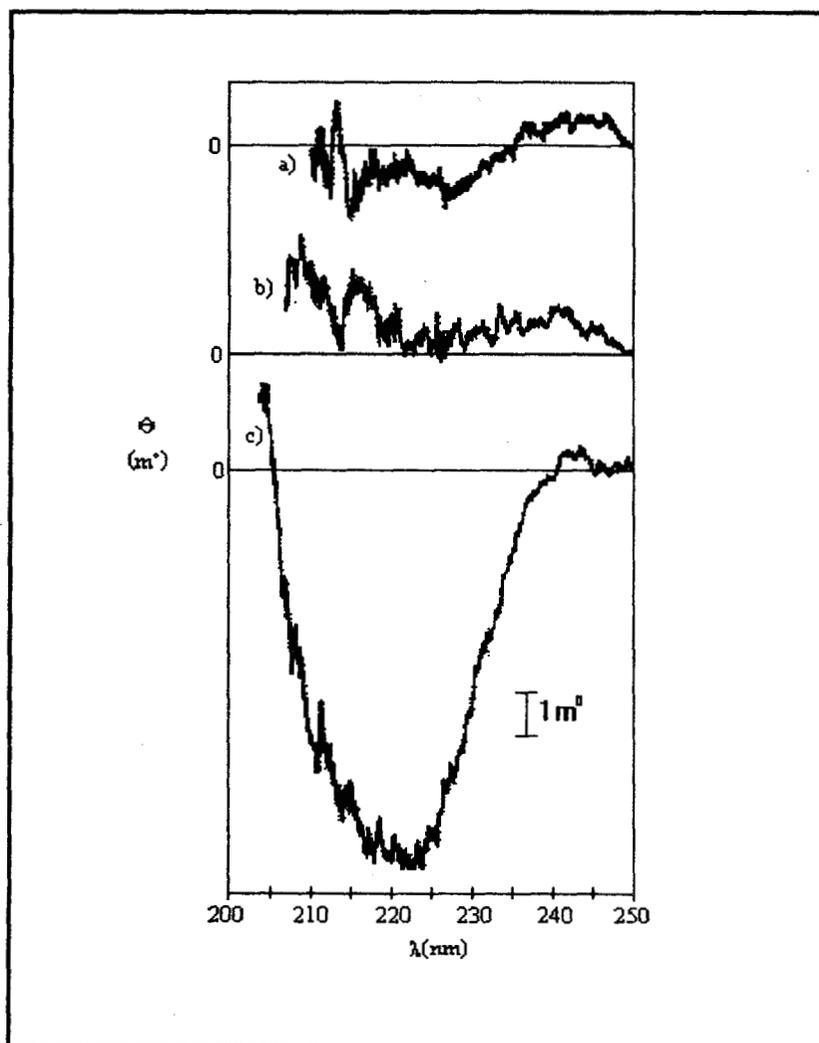
Donde $A_1 + A_2 = 1$.

Resultados y discusión.

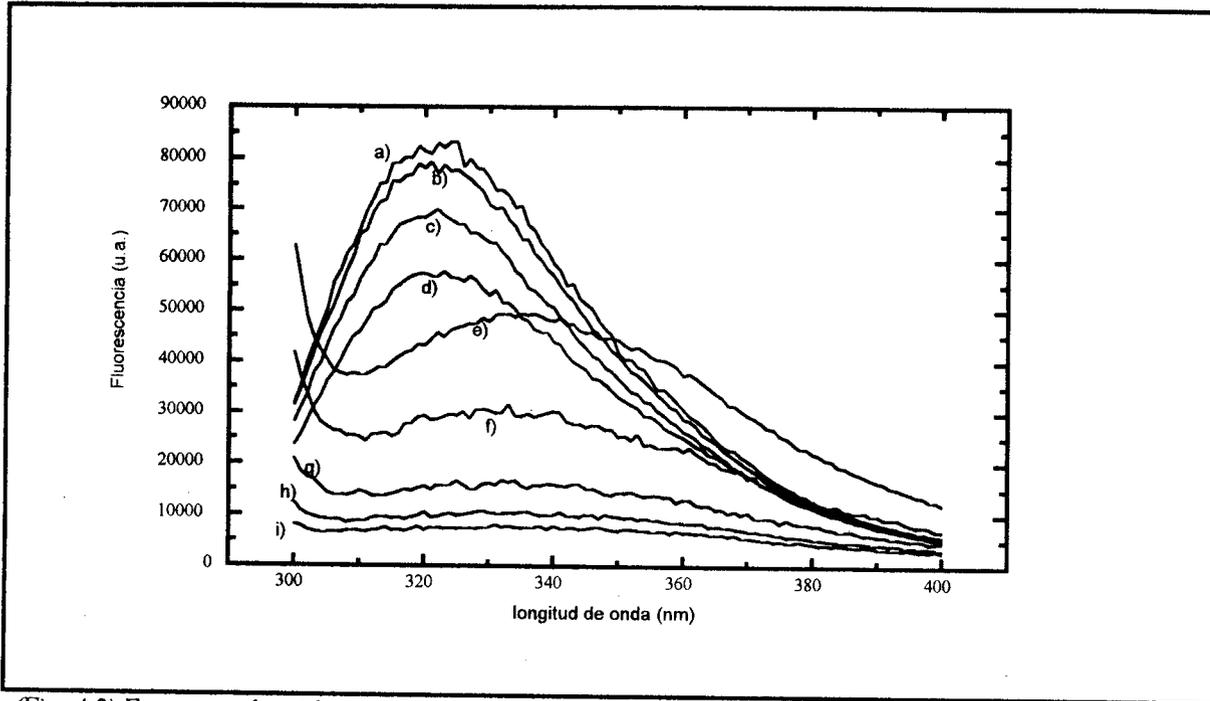
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Irreversibilidad del desplegamiento térmico de hTIM.

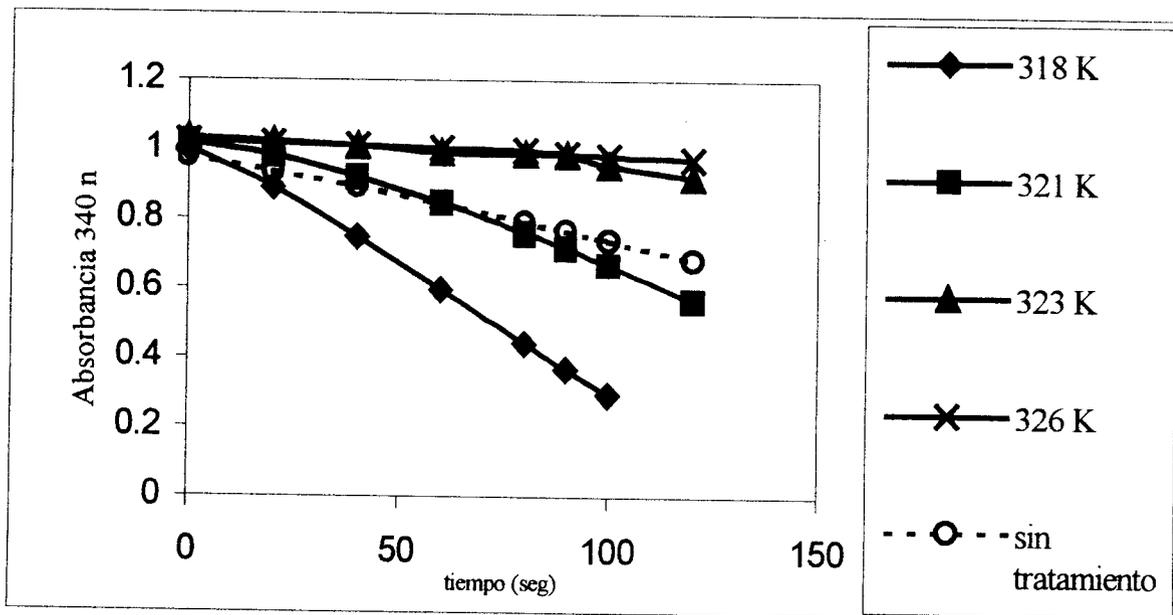
El proceso de desplegamiento térmico de hTIM a pH 8.0 y en ausencia de sales, es irreversible. Esto puede apreciarse de manera notoria en los espectros obtenidos por dicroísmo circular (Fig. 4.1) y por fluorescencia (Fig. 4.2) de la muestra nativa, y de la sometida a calentamiento y posterior enfriamiento. También los resultados del ensayo de actividad biológica (Fig. 4.3) dan clara muestra de la irreversibilidad del proceso de desplegamiento (Tabla 4.1).



(Fig. 4.1) Espectros obtenidos por DC. a) muestra sometida a calentamiento hasta 343 K. b) muestra sometida a calentamiento hasta 343 K y posterior enfriamiento. c) muestra sin tratamiento térmico.



(Fig. 4.2) Espectros obtenidos por fluorescencia, calentando gradualmente hasta las siguientes temperaturas: a) 290.5 K. b) 303 K. c) 311 K. d) 320 K. e) 331.1 K. f) 337.3 K. g) 340 K. i) 345.2 K. h) espectro de la muestra después del enfriamiento.



(Fig. 4.3) Ensayos de Actividad. En el caso de la muestra sin tratamiento térmico (línea punteada), se realizó utilizando 4 ng totales de proteína. El resto de los ensayos se realizaron con 400 ng totales de proteína en la celda. Las temperaturas indicadas son a las que se sometió la muestra en cada caso con su posterior enfriamiento.

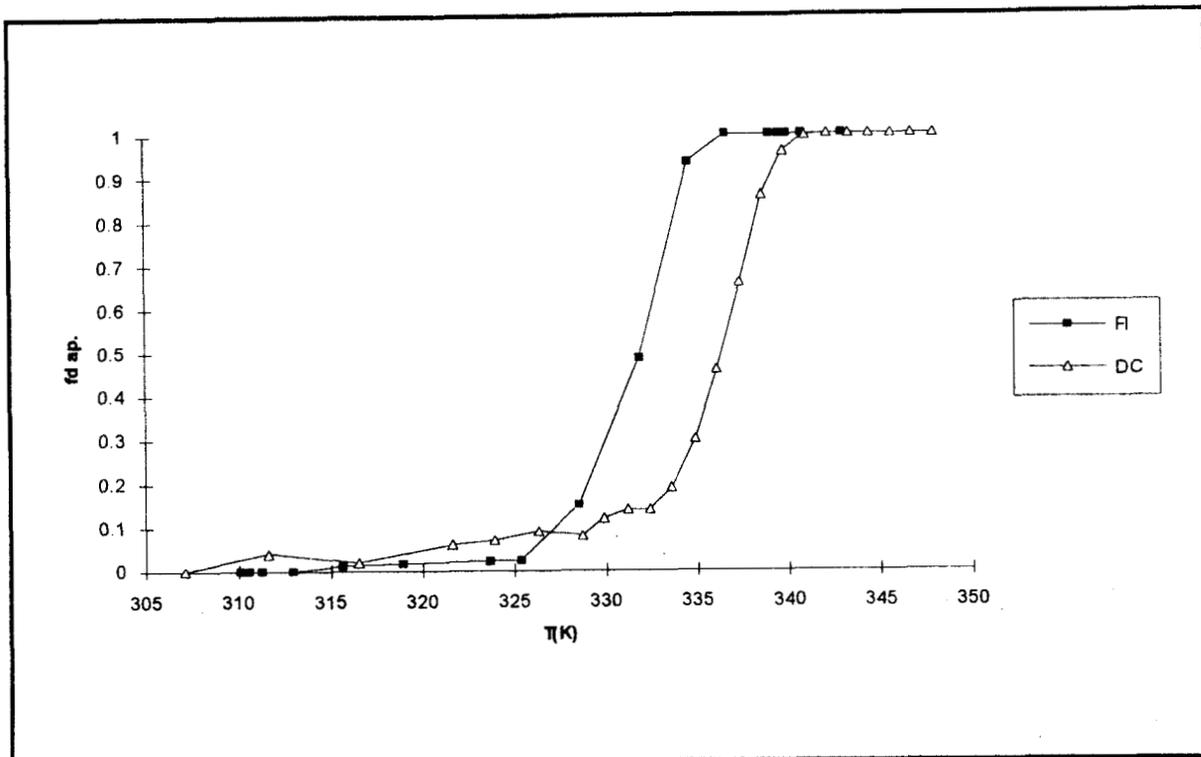
Muestra	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Sin tratamiento térmico	6880
318 K	180
321 K	120
323 K	40
326 K	20
333 K	1
338 K	No hay actividad detectable
343 K	No hay actividad detectable
345 K	No hay actividad detectable

Tabla 4.1. Resultados que ilustran la pérdida de actividad biológica ante el tratamiento térmico.

Del mismo modo se encontró evidencia de la presencia de al menos un intermediario (Sección 4.2). Debido a estos resultados no es posible la aplicación del modelo reversible de dos estados descrito previamente en el capítulo III, tan sólo es posible la obtención de datos termodinámicos aparentes.

4.2 Curvas de transición.

Las curvas de transición obtenidas con las técnicas de dicroísmo circular y fluorescencia, bajo las mismas condiciones experimentales no coinciden (Fig. 4.4), lo que sugiere la presencia de al menos un intermediario detectable. La transición observada por fluorescencia ocurre a temperatura más baja que la de dicroísmo circular.

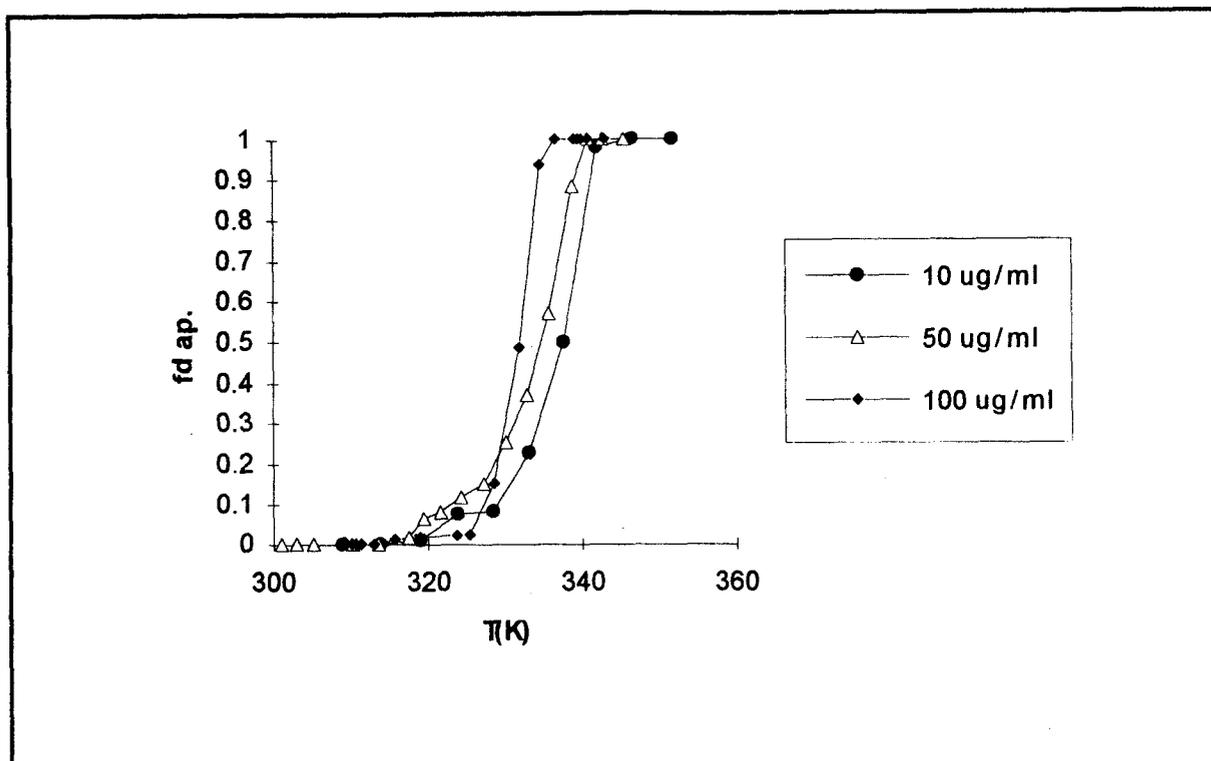


(Fig. 4.4) Curvas de transición aparentes obtenidas por DC y fluorescencia (FI). La concentración de ambas muestras es $100\mu\text{g/ml}$.

Se ha mencionado previamente que la técnica de fluorescencia nos aporta información acerca del entorno de los grupos aromáticos de la proteína; mientras que el dicroísmo circular (en el intervalo de longitud de onda utilizada) nos permite seguir cambios en la estructura secundaria.

Dado lo anterior, puede concluirse que el entorno de los grupos aromáticos se modifica a temperaturas más bajas de las necesarias para inducir cambios en la estructura secundaria.

Las curvas obtenidas en fluorescencia muestran una dependencia con la concentración de hTIM (Fig. 4.5): a mayor concentración de enzima las transiciones se alcanzan a temperaturas menores. Este resultado es opuesto a lo esperado para un mecanismo de dos estados. La variación en la posición de las curvas es consistente en este caso, con la agregación de los productos del desplegamiento térmico.



(Fig.4.5) Curvas de transición aparentes obtenidas por fluorescencia a diferentes concentraciones.

4.3 Valores termodinámicos aparentes.

En la tabla 4.2 se muestran los datos termodinámicos aparentes (Tabla 4.2) obtenidos para las curvas de transición presentadas anteriormente. Es importante recordar que estos valores no tienen un significado real, pero como se ha mencionado en el capítulo III la obtención de estos parámetros es útil, porque por medio de la Tm aparente podemos comparar la estabilidad relativa de dos curvas al medir el desplazamiento con la temperatura a la que ocurren las transiciones, y el ΔH aparente nos da una idea cualitativa de la cooperatividad del proceso de desplegamiento.

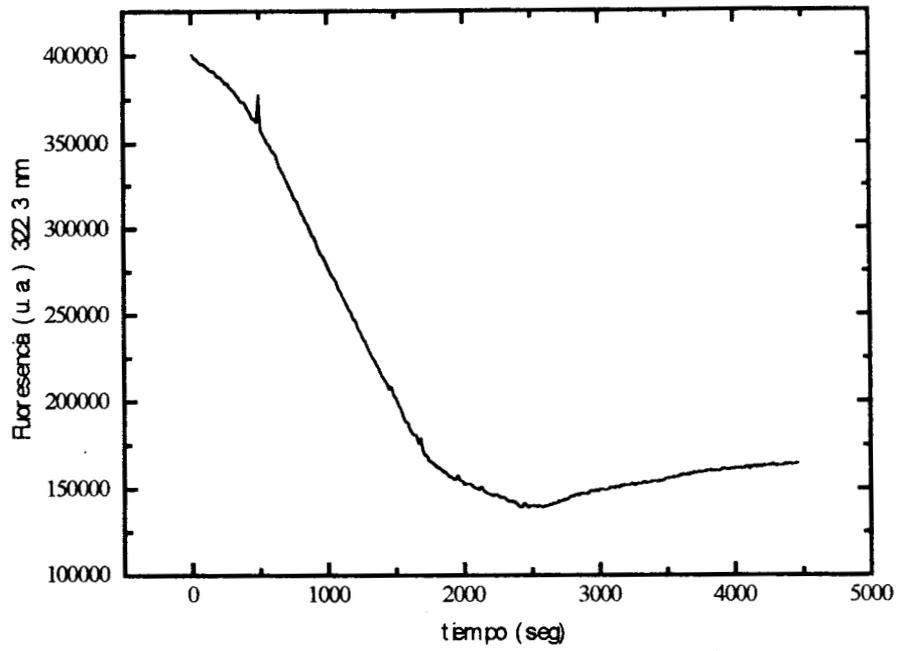
Curva	ΔH (cal/mol)	T_m (K)	ΔC_p (cal/molK)
10 $\mu\text{g/ml}$ fluorescencia	88900 ± 12300	$340. \pm 0.42$	4200 ± 1400
50 $\mu\text{g/ml}$ fluorescencia	72700 ± 5800	334.0 ± 0.30	2900 ± 600
100 $\mu\text{g/ml}$ fluorescencia	153500 ± 9300	331.0 ± 0.11	9800 ± 1500
100 $\mu\text{g/ml}$ DC	128100 ± 10200	336.0 ± 0.17	6900 ± 1000

Tabla 4.2. Parámetros termodinámicos aparentes del desplegamiento térmico de hTIM a diferentes concentraciones. Las incertidumbres corresponden a la estimación de una desviación estándar

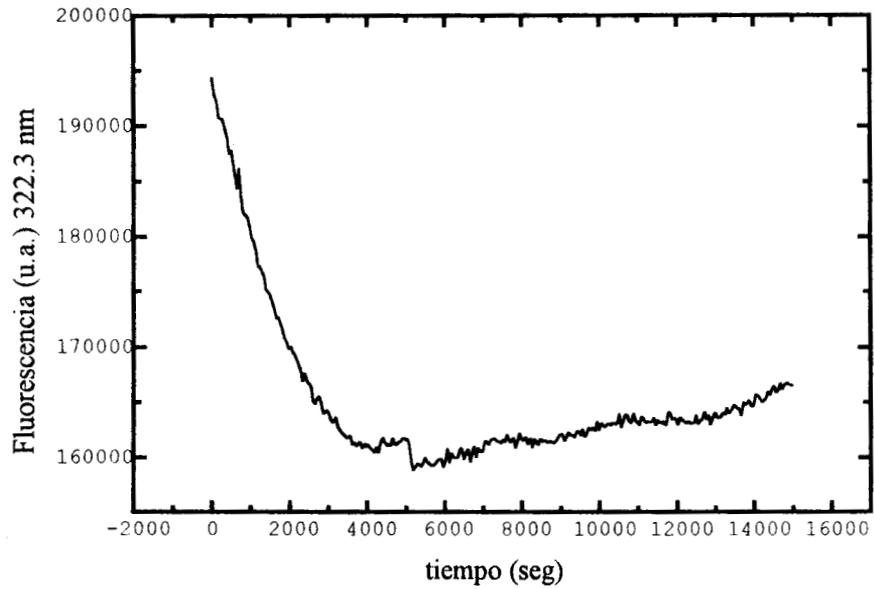
4.4 Curvas cinéticas.

Por otro lado los aumentos súbitos de temperatura seguidos por ambas técnicas originan curvas cinéticas de más de una fase (Fig 4.6 y 4.7). Estos resultados nos indican que el mecanismo de desplegamiento térmico de la hTIM, se lleva a cabo en varias etapas.

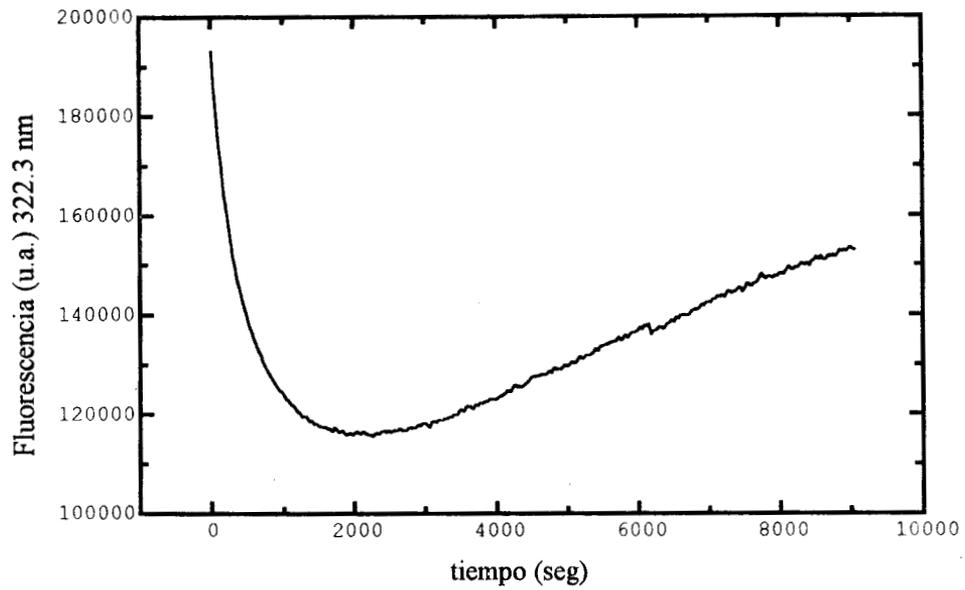
En el caso de fluorescencia las curvas cinéticas inicialmente muestran una disminución de intensidad de fluorescencia, cuya pendiente varía de acuerdo a la temperatura del experimento, subsecuentemente se observan aumentos en la señal de fluorescencia que no muestran una tendencia definida entre los experimentos a diferentes temperaturas.



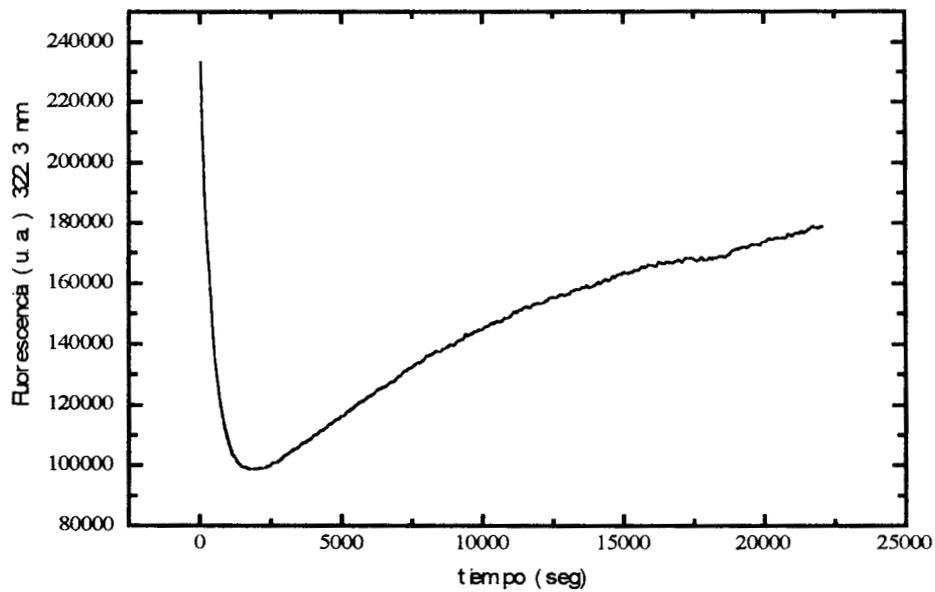
(Fig. 4.6) a) Cinética obtenida por fluorescencia 318 K. 10 µg/ml



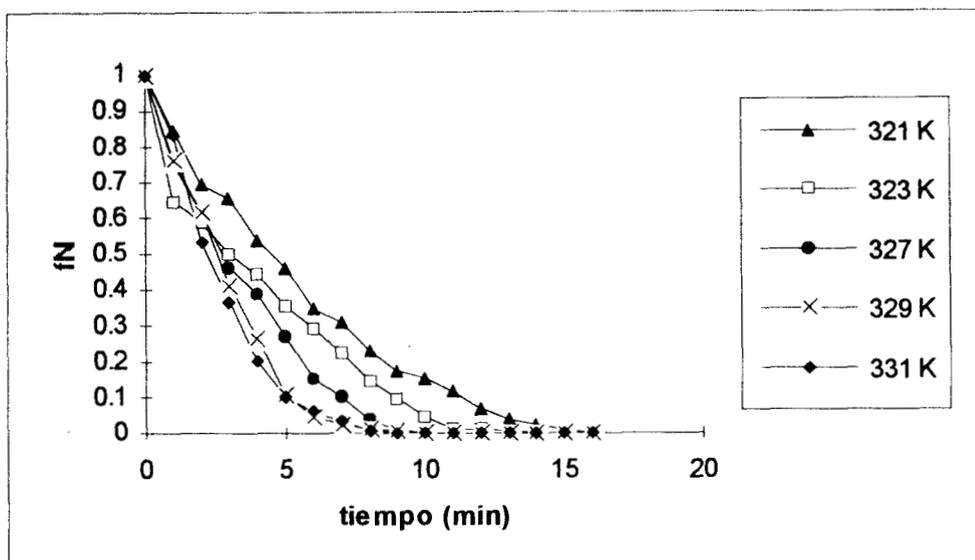
(Fig. 4.6) b) Cinética obtenida por fluorescencia 321 K. 10 µg/ml



(Fig. 4.6) c) Cinética obtenida por fluorescencia 325.2 K. 10 $\mu\text{g/ml}$



(Fig. 4.6) d) Cinética obtenida por fluorescencia 328 K. 10 $\mu\text{g/ml}$



(Fig. 4.7) Curvas cinéticas de desplegamiento obtenidas a diferentes temperaturas por la técnica de D C (longitud de onda = 220nm). La concentración de todas las muestras es 100 µg/ml.

Los resultados se ajustaron a modelos que consideraban una, dos y tres etapas unimoleculares. Sin embargo las constantes cinéticas que se obtuvieron por los diferentes modelos en ningún caso ofrecieron buena correlación con las temperaturas a las que fueron obtenidas; posiblemente debido a los pequeños valores de amplitud en las fases más lentas y al efecto de la agregación. No obstante, la primera fase de cada uno de los experimentos pudo ajustarse satisfactoriamente con un modelo de una sola etapa:

$$y = A \exp(-\lambda t) + C \quad (4.1)$$

Las constantes de velocidad, k_1 , obtenidas para cada una de las técnicas se muestran en la Tabla 4.3:

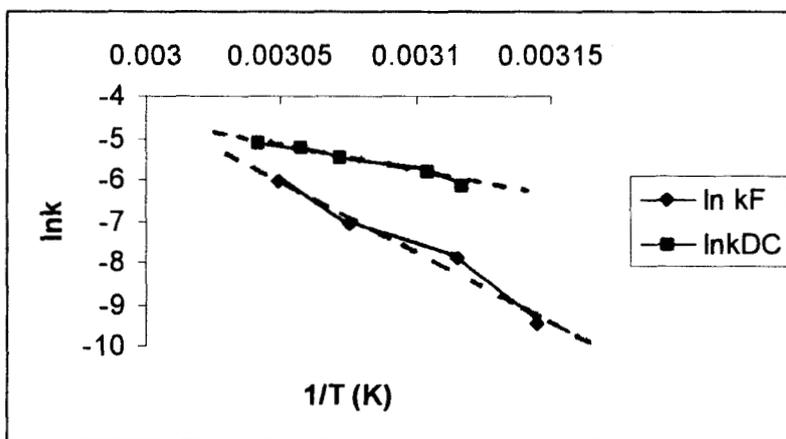
4.5 Gráficas de Arrhenius.

A partir del conjunto de constantes de velocidad y sus temperaturas correspondientes se construyó una gráfica de Arrhenius (Fig. 4.8) y su regresión

lineal. De acuerdo a lo descrito en el Capítulo III se obtienen las energías de activación para cada una de las técnicas empleadas (Tabla 4.4).

Temperatura (K)	k Fluorescencia (seg ⁻¹)	k Dicroísmo circular (seg ⁻¹)
318	$7.69 \times 10^{-5} \pm 6.5 \times 10^{-6}$	
320.8		$2.19 \times 10^{-3} \pm 1.275 \times 10^{-4}$
321	$3.77 \times 10^{-4} \pm 8.6 \times 10^{-6}$	
322.2		$3.06 \times 10^{-3} \pm 3.71 \times 10^{-4}$
325.2	$8.67 \times 10^{-4} \pm 7.9 \times 10^{-6}$	
325.6		$4.25 \times 10^{-3} \pm 2.81 \times 10^{-5}$
327.1		$5.48 \times 10^{-3} \pm 4.65 \times 10^{-4}$
328	$2.38 \times 10^{-3} \pm 5.9 \times 10^{-7}$	
328.8		$6.00 \times 10^{-3} \pm 6.00 \times 10^{-4}$

Tabla 4.3. Constantes de velocidad de desplegamiento obtenidas por fluorescencia y DC



(Fig. 4.8) Gráficas de Arrhenius. Obtenidas por DC y Fluorescencia.

	Fluorescencia	Dicroísmo circular
Ea (cal/mol)	71400 ± 4800	29400 ± 2600
coeficiente de correlación	-0.98183	-0.98544

Tabla 4.4. Valores de energía de activación para las técnicas de fluorescencia y DC.

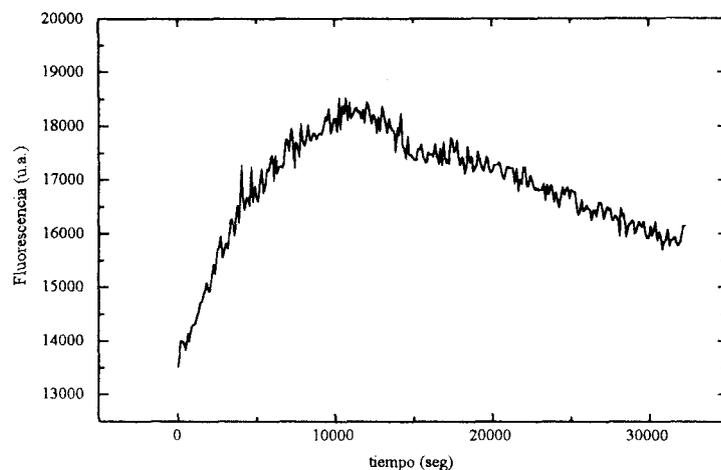
Como puede verse cada técnica espectroscópica aporta valores significativamente distintos tanto de las constantes como de las energías de activación, es decir, cada técnica nos permite seguir una etapa diferente del mecanismo de desplegamiento, con características energéticas distintas.

El valor de *Ea*, obtenido por fluorescencia es mayor que el de dicroísmo circular, lo que nos habla de un estado de transición más difícil de alcanzar. Sin embargo, de acuerdo a las curvas de transición obtenidas por cada técnica es evidente que la etapa seguida por fluorescencia ocurre a temperaturas menores.

4.6 Glóbulo fundido.

Para elucidar si la ruta de desplegamiento de la hTIM en sus primeras etapas presenta intermediarios del tipo glóbulo fundido se llevó a cabo un ensayo a 322 K en presencia de ANS como se describió en el capítulo II; se obtuvo la curva cinética de la Fig. 4.9. Como puede apreciarse esta curva al igual que el resto de las obtenidas sin colorante presenta más de una fase, confirmando una vez más que el desplegamiento se lleva a cabo en varias etapas. La primera parte de la curva muestra un aumento en la señal de fluorescencia, lo que nos indica que el colorante se encuentra en la presencia de un ambiente cada vez más hidrofóbico, es decir la proteína se despliega de manera que permite la migración y unión del ANS en sitios apolares hasta llegar a un máximo donde la intensidad de fluorescencia disminuye considerablemente, lo que hace suponer que la proteína expone la parte hidrofóbica

al solvente acuoso, perdiéndose así el ambiente hidrofóbico y por lo tanto se desprende el ANS de los sitios de unión apolares. La primera fase de la curva se ajustó a un modelo de una sola etapa (ecuación 4.1) y se obtuvo una constante de velocidad $k=1.4 \times 10^{-4} \pm 3.88 \times 10^{-5}$. Esta constante es del orden de magnitud de la obtenida a una temperatura similar en la cinética sin colorante seguida por fluorescencia.



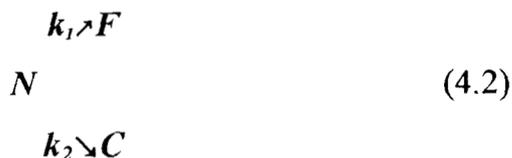
(Fig. 4.9) Prueba con ANS. Cinética obtenida por fluorescencia a 322 K.

4.7 Posibles mecanismos.

Es importante hacer notar que el mecanismo de desplegamiento de hTIM está compuesto de varias etapas incluyendo la agregación y, dada su complejidad, con la información obtenida hasta el momento no se pueden describir con detalle todas las etapas involucradas. Por otra parte la técnica de DC, puede no estar siguiendo estrictamente la reacción de desplegamiento sino la precipitación de productos agregados del mismo. Sin embargo sin considerar esto último y de acuerdo a los resultados experimentales a continuación se analizan diversos mecanismos que podrían describir los cambios espectroscópicos iniciales que ocurren en la ruta del

despliegamiento de hTIM. Estos mecanismos están compuestos por dos etapas que pueden ser simultaneas o secuenciales.

En el mecanismo simultaneo:

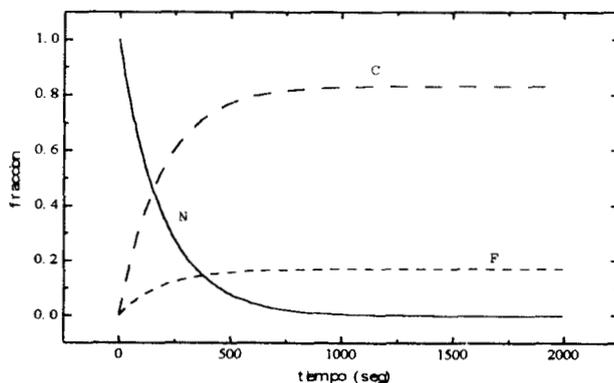


hTIM seguiría dos caminos diferentes, formando especies detectables por cambios en la señal de fluorescencia (F) o de dicroísmo circular (C); bajo este mecanismo puede deducirse que la variación con el tiempo de cada una de las fracciones de cada una de las especies está descrita por:

$$f_F = (k_1 / (k_1 + k_2)) * (1 - \exp^{-(k_1 + k_2)t}) \quad (4.3)$$

$$f_C = (k_2 / (k_1 + k_2)) * (1 - \exp^{-(k_1 + k_2)t}) \quad (4.4)$$

Este comportamiento se muestra en la figura 4.10, que ilustra la simulación de las ecuaciones 4.3 y 4.4 utilizando las constantes de velocidad de la tabla 4.3, que corresponden a 325.2 K por fluorescencia y 325.6 K por DC. Estas temperaturas fueron elegidas por su similitud entre ellas y por ser valores intermedios del intervalo de temperaturas estudiadas.



(Fig. 4.10) Simulación de las fracciones de f_F y f_C de las ecuaciones 4.2 y 4.3. Se utilizaron valores de $k_1 = 0.000867 \text{ seg}^{-1}$ y $k_2 = 0.00425 \text{ seg}^{-1}$.

Este comportamiento no es compatible con los resultados observados por cada una de las técnicas experimentales porque cada especie debería tener una constante de velocidad diferente, contrario a lo indicado en las ecuaciones 4.3 y 4.4.

Con respecto al mecanismo secuencial:



Es posible asignar los valores numéricos a las constantes de velocidad de manera que $k_1 > k_2$ o viceversa. Las ecuaciones que describirían la dependencia de las fracciones de cada especie con el tiempo son:

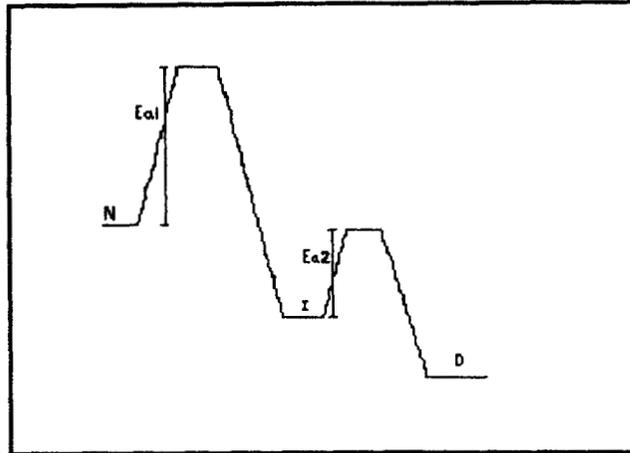
$$f_N = \exp^{-(k_1 t)} \quad (4.6)$$

$$f_D = (1 + \{k_2 / (k_1 - k_2)\} \exp^{-(k_1 t)} + \{k_1 / (k_2 - k_1)\} \exp^{-(k_2 t)}) \quad (4.7)$$

$$f_X = 1 - f_N - f_D \quad (4.8)$$

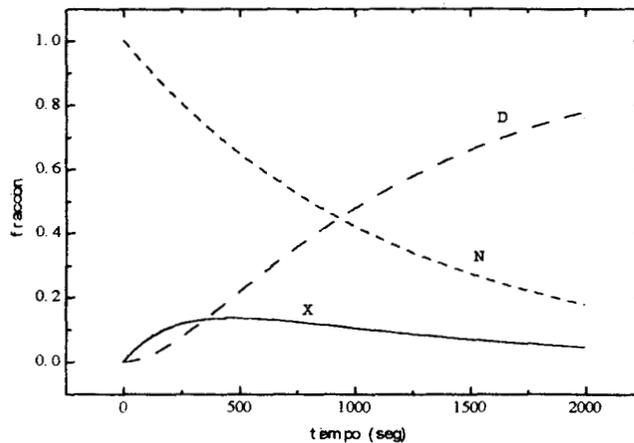
En la figura 4.4 se observa que la transición seguida por fluorescencia ocurre a temperaturas menores que la de dicroísmo circular; de ahí podría deducirse que k_1 correspondería a los cambios seguidos por fluorescencia.

Este mecanismo de dos etapas secuenciales describiría la primera de estas con una energía de activación elevada ($Ea1$). Esto daría origen a un intermediario con contactos terciarios específicos disminuidos, pero que conserva la mayor parte de su estructura secundaria. La segunda etapa con un valor menor de energía de activación que la primera ($Ea2$), que produce un estado desplegado pobre o carente de estructura secundaria (Fig. 4.11).



(Fig.4.11) Esquema del mecanismo propuesto del despliegamiento térmico de hTIM.

Del mismo modo que en el caso del mecanismo simultaneo se hicieron las simulaciones para la dependencia con el tiempo de las fracciones utilizando las ecuaciones 4.6, 4.7 y 4.8, y las mismas constantes de velocidad del caso anterior, obteniendo:



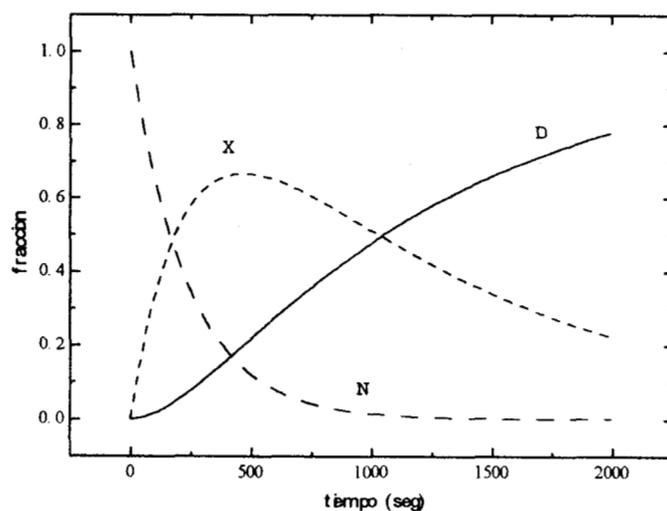
(Fig. 4.12) Simulación de las fracciones de f_D, f_X y f_N de las ecuaciones 4.6 y 4.7 y 4.8. $k_1=0.000867 \text{ seg}^{-1}$, $k_2=0.00425 \text{ seg}^{-1}$

Este mecanismo no es compatible con los resultados obtenidos porque en este caso ambas técnicas nos permitirían observar sólo la primera reacción de la

secuencia; es decir la técnica de DC no estaría controlada por k_2 , sino por la velocidad de aparición de X.

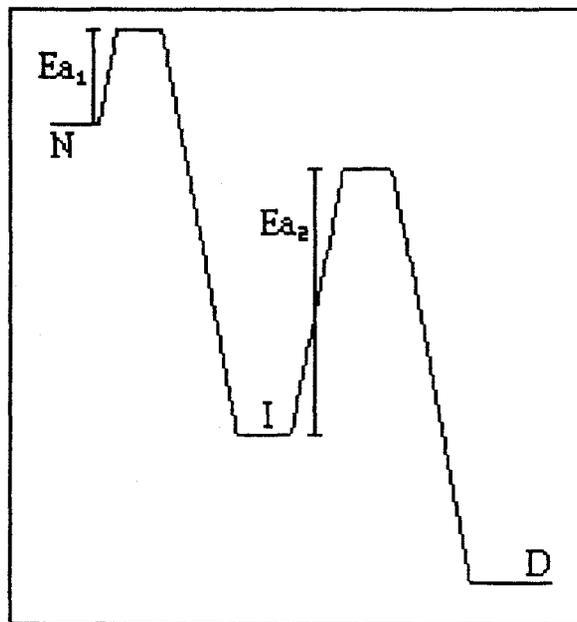
Por otro lado si k_1 se considera como la constante obtenida por DC y por lo tanto k_2 corresponde a la obtenida en fluorescencia, se describiría un mecanismo en el que la primera etapa tiene una energía de activación (Ea_1) menor. Esto da origen a un intermediario con pérdida parcial de estructura secundaria. La segunda etapa con mayor energía de activación que la primera (Ea_2), que produce un estado con total exposición de sus grupos aromáticos.

Utilizando las ecuaciones 4.6, 4.7, y 4.8 puede hacerse la simulación de las distintas fracciones, con las mismas constantes de velocidad que en los casos anteriores y se obtiene:



(Fig. 4.13) Simulación de las fracciones de f_D, f_X y f_N de las ecuaciones 4.6 y 4.7 y 4.8. $k_1 = 0.00425 \text{ seg}^{-1}$ y $k_2 = 0.000867 \text{ seg}^{-1}$

Este mecanismo concuerda satisfactoriamente con los resultados obtenidos, donde cada una de las técnicas permite observar la aparición de dos especies diferentes con constantes de velocidad y energías de activación distintas.



(Fig. 4.14) Esquema del mecanismo propuesto del desplegamiento de hTIM, que concuerda satisfactoriamente con los resultados experimentales.

Conclusiones y perspectivas

V Conclusiones y perspectivas.

El proceso de desplegamiento térmico de la enzima triosa fosfato isomerasa humana es irreversible y compuesto de al menos dos etapas. Se aparta notablemente del mecanismo reversible de dos estados, lo que contrasta con lo propuesto por Mainfroid et al. (1996).

La temperatura media de la transición depende inversamente con la concentración de hTIM. Esto puede deberse a la posible agregación de los productos del desplegamiento.

Los experimentos cinéticos por cada una de las técnicas empleadas nos han permitido describir energéticamente dos estados de transición para dos etapas del mecanismo de desplegamiento.

Así mismo los resultados de la prueba con el colorante ANS nos permite confirmar que la ruta de desplegamiento de la hTIM ocurre en varias etapas y que los intermediarios en las primeras etapas de la ruta del desplegamiento podrían ser del tipo glóbulo fundido. Para reafirmar esta última aseveración se requiere de llevar a cabo más experimentación; por ejemplo explorando diversas temperaturas.

Sería interesante profundizar en el estudio del desplegamiento de esta enzima. En particular en la naturaleza de las etapas lentas observadas en fluorescencia. Para tal efecto debería modificarse el diseño experimental. Adicionalmente podría caracterizarse el estado de agregación de las especies involucradas en el mecanismo.

Por otro lado el estudio de este sistema en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica puede mostrar detalles de la naturaleza electrostática del intermediario o de los estados activados, por lo que se propone realizar estos estudios en el futuro.

Bibliografía

VI Bibliografía.

Alber, T., Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Rivers, P.S., Wilson, I.A. (1981). On The Three-Dimensional Structure and Catalytic Mechanism of Triosephosphate Isomerase. *Philos. Trans. R. Soc.* **293**: 159-171.

Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D. Offord, R.E., Priddle, J.D., Waley, S.G. (1975). Structure of Chicken Muscle Triosephosphate Isomerase Determined Cristallographically at 2.5 Å Resolution Using Amino Acid Sequence Data. *Nature* **255**: 609-614.

Battaner, E. (1985). Estructura de las Proteínas. En Bioquímica. Herrera E. (ed.) México.

Cantor, C.R. y Schimmel, P.R. (1980). Biophysical Chemistry, Part I, pp. 1075-1107, W.H. Freeman, New York.

Creighton, T.E., (1994). The Protein Folding Problem. En *Mechanisms of Protein Folding*. Pain, R.H. (ed.) Oxford University Press. EUA. p.p. 1-25.

Creighton, T.E., (1994). Proteins. W.H. Freeman and Company. EUA.

Creighton, T.E., Ewbank, J.J. (1991). The Molten Globule Protein Conformation Probed by Disulphide Bonds. *Nature* **350**: 518, 519.

Delboni, L.F., Mande, S. C., Rentier-Derlue, F., Mainfroid, V. Turley, S., Vellieux, F.M.D., Martial, J.A., Hol, W.G.J. (1995). Crystal Structure of Recombinant Triosephosphate Isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An Analysis of Potential Thermostability Factors in Six Isomerases with Three-Dimensional Structures Points to the Importance of Hydrophobic Interactions. *Protein Sci.* **4**: 2594-2604.

Gracy, R.W., Yuksel, K.U., Gómez-Puyou, A. (1994). Deamidation of Triosephosphate Isomerase in Vitro and In Vivo. en *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and proteins*. Aswad, D.W. (ed) CRC. USA. p.p.134-152.

Hamaguchi, K. (1992). The Protein Molecule. Japan Scientific Societies Press. Japón.

Knowles, J.R. (1991). Enzyme Catalysis: Not Different, Just Better. *Nature* **350**: 121-124.

Lehninger, A.L. (1990). Bioquímica. De. Omega. España.

Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J.M., Mande, S.C., Hol, G.J., Martial, J.A., Goraj, K. (1996). Three hTIM Mutants that Provide New Insights on Why TIM is a Dimer. *J. Mol. Biol.* **257**: 441-456.

Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. y Hol, W.G.J. (1994). Crystal Structure of Recombinant Human Triosephosphate Isomerase at 2.8 Å Resolution. Triosephosphate Isomerase Related Human Genetic Disorders and Comparison with the Trypanosomal Enzyme. *Protein Sci.* **3**: 810-821.

Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L., Ulrich H. F. (1991). Chaperonin-Mediated Protein Folding at the Surface of groEL Through a "Molten Globule" Like Intermediate. *Nature* **352**: 36-42.

Neet, K.E., Timm, D.E., (1994). Conformational Stability of Dimeric Proteins. Quantitative Studies by Equilibrium Denaturation. *Protein Sci.* **3**: 2167-2174.

Noble, M.E.M., Zeelen, J.P. Wierenga, R.K., Mainfroid, V. Goraj, K. Gohimont, A.C. Martial, J.A. (1993). Structure of Triosephosphate Isomerase from *Escherichia coli* Determined at 2.6 Å Resolution. *Acta Crystallogr. D.* **49**: 403-417.

Permyakov, E.A. (1993) Luminiscent Spectroscopy of Proteins. CRC Press. E.U.A.

Privalov, P.L. (1992) Physical Basis of Stability of the Folded Conformations of Proteins. en *Protein Folding*. Creighton, T.E.(ed.) W.H. Freeman and Company. EUA 1992. p.p. 1-58

Richards, F.M. (1992). Folded and Unfolded Proteins: An Introduction. en *Protein Folding*. Creighton, T.E.(ed.) W.H. Freeman and Company. EUA. p.p. 1-58

Rojo-Domínguez, A., Zubillaga-Luna, R. y Hernández-Arana, A. (1990). Unfolding Behavior of Human α 1-Acid Glycoprotein Is Compatible with a Loosely Folded Region in Its Polypeptide Chain. *Biochemistry*. **29**: 8679-8695.

Schimd, F.X. (1989). Spectral Methods of Characterizing Protein Conformation and Conformational Changes. en *Protein Structure. A practical Approach*. Creighton T.E. (ed.) IRL Press. UK. p. p. 251-283.

Scopes, R.K. (1994). Protein Purification. Principles and Practice. Springer Verlag. 3a. edición. EUA. p.p.64,65.

Thorton, J.M. (1992). Protein Structures. The end point of the folding path way. en *Protein Folding*. Editor Creighton, T.E. W.H. Freeman and Company. EUA. p.p.1-58

Velanker, S., Ray, S. Gokhale, R., Balaram, S. Murthy, M. (1997). Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciporum*: The crystal structure provides insights into antimalrial drug design. *Structure*. **5**: 751-761.

Wierenga, R.K., Noble, M.E.M., Vried, G. Nauche, S., Hol, W.G.J. (1991). Refined 1.83 Å Structure of Trypanosomal Triosephosphate Isomerase Crystallized in The Presence of 2.4 M-Ammonium Sulphate. A Comparison of the Structure of The Trypanosomal Triosephosphate Isomerase-Glycerol-3-Phosphate Complex. *J. Mol. Biol.* **220**: 995-1015