



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA

**PAPEL DEL RESIDUO CONSERVADO Cys126 EN LA
CATÁLISIS Y ESTABILIDAD DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
*Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S
Q U E P R E S E N T A:
EDITH GRACIELA GONZÁLEZ MONDRAGÓN
P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E
DOCTOR E N C I E N C I A S (Q U Í M I C A)

JULIO DEL 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD: IZTAPALAPA

DIVISIÓN: CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA


GRADO: DOCTORADO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

TÍTULO DEL TRABAJO: PAPEL DEL RESIDUO CONSERVADO Cys126 EN LA
CATÁLISIS Y ESTABILIDAD DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Saccharomyces cerevisiae.

NOMBRE DEL PARTICIPANTE: IBQ EDITH GRACIELA GONZÁLEZ
MONDRAGÓN

NOMBRE DE LOS ASESORES:

DR. RAFAEL A. ZUBILLAGA LUNA DR. ANDRÉS HERNÁNDEZ ARANA



FIRMA



FIRMA

LUGAR Y FECHA DE LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO: DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA, AREA DE BIOFISICOQUÍMICA, SEPTIEMBRE 1999 A JULIO 2004

El presente trabajo fue realizado en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría de los Drs. Rafael A. Zubillaga Luna y Andrés Hernández Arana.

Para la realización de éste trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT a través de la Beca de Doctorado con el número de registro 130442.

DEDICATORIAS

A Dios, que es mi mayor fuente de inspiración para tener la fuerza de luchar por lo que creo.

A mi familia, por que gracias a su apoyo y amor incondicional he podido realizar este nuevo logro tan importante en mi vida.

A la memoria de mi abuelita Loretito, quien seguirá siendo mi mayor ejemplo de una enorme fuerza de voluntad y de amor a los demás.

A la memoria de Oscar, quien me alentó y apoyó para continuar esta etapa de mi vida profesional.

Soy una persona afortunada al contar con el apoyo y aprecio de muchas personas, y por que no quisiera ser ingrata al dejar de mencionar a alguna de ella, hago extensiva mi gratitud a cada una de ella:

“Gracias por la aventura de escalar acompañada cada barrera que la ruta me ha marcado, pues yo solo soy la suma de todo lo que he pasado”

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Zubillaga Luna, por aceptarme y confiar en mí para desarrollar el proyecto. Agradezco la dedicación, la crítica constructiva y el trato cordial que me permitió realizar un trabajo de calidad.

Al Dr. Andrés Hernández Arana, por aceptar asesorarme durante la tesis doctoral y compartir su amplia experiencia en la investigación, contribuyendo en el desarrollo de la misma. Agradezco el ambiente de respeto y de confianza que hubo durante la realización del trabajo.

Para ambos, el más sincero de los reconocimientos como científicos por su interés de realizar investigación de calidad, así como mi gratitud por todo el apoyo personal y económico recibido de su parte para la conclusión de ésta etapa de mi vida profesional.

A los miembros del jurado: Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Andrés Hernández Arana, Dr. Alejandro Fernández Velasco, Dra. Jaqueline Padilla Zúñiga y el Dr. Michel Picquart, por el tiempo invertido en la revisión de la tesis y por sus valiosos comentarios para mejora de la misma.

A la Dra. Jaqueline Padilla Zúñiga y al Dr. Arturo Rojo Domínguez, por su invaluable colaboración en la parte de la Simulación de la Dinámica Molecular, gracias por todo su apoyo incondicional y por su amistad.

A los Profesores del Área de Biofísicoquímica: Dra. Silvia Solís, Dr. Salvador Tello, Dr. Alfonso Arroyo y Dr. Horacio Gutiérrez, por el apoyo brindado siempre que lo requerí, gracias.

Al Dr. Ruy Pérez Montfort, así como a su grupo de trabajo, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y a la Dra. Ma. Elena Chánez Cárdenas, por su apoyo y asesoría en la expresión e inducción de las enzimas de la TIM de levadura.

Al Dr. Alejandro Fernández Velasco y al Dr. Hugo Nájera Peña, de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como a la Dra. Ma. Elena Chánez Cárdenas, por asistirme en la purificación de las enzimas empleadas para la realización de éste trabajo.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, del Instituto de Química de la UNAM, por la facilidad y asesoría técnica del Calorímetro de Titulación Isotérmica. A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, de ésta misma Institución, por ayudarme en la diálisis de las proteínas con el sistema AMICON y también por su asesoría en el manejo del Calorímetro.

A la Dra. Georgina Garza, de la Facultad de Medicina de la UNAM, por el asesoramiento en la medición de la actividad de la TIM con la dihidroxiacetona fosfato así como por el apoyo con los reactivos requeridos.

A mis amigos: Noé Zúñiga, Claudia Benítez, Olivia Campos, Araceli Vega, Ezequiel Gutiérrez, Favio Salinas, Maricela Neria, Adriana Aquino, Francisco Villaseñor, Verónica Albiter, Celia Flores, Agustino López y José Antonio Rocha, por estar conmigo hasta el final y por ese apoyo que solo un amigo puede dar. Gracias por su amistad.

A todos mis compañeros y nuevos amigos del Área de Biofísicoquímica, así como de otras Áreas del Departamento de Química y del Departamento de Biotecnología, que me apoyaron en la culminación de este proceso.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	3
1.1 Residuos conservados en proteínas	3
1.2 Patrones de sustitución de aminoácidos	4
1.3 Papel de la Cys en las proteínas	5
1.4 Triosafosfato Isomerasa (E.C. 5.3.1.1.)	7
1.4.1 Estructura	7
1.4.2 Catálisis	10
1.4.3 Residuo estrictamente conservado: Cys126	13
CAPÍTULO II: OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Construcción de las mutantes de Cys126	17
3.2 Expresión y purificación	17
3.3 Determinación de la concentración de proteína	18
3.4 Determinación de los parámetros cinéticos	19
3.5 Espectroscopía de fluorescencia	20
3.6. Titulación fluorométrica	20
3.7 Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)	21
3.8 Método cinético	23
3.9 Espectroscopía de dicroísmo circular	23

3.10 Cinéticas de desplegamiento	24
3.11 Cinéticas de replegamiento	24
3.12 Digestión proteolítica	25
3.13 Efecto de la dilución en la estabilidad de la ScTIM y sus mutantes de Cys126	26
3.14 Simulación de la dinámica molecular de la ScTIM y sus mutantes de Cys126	26
3.14.1 Generación de las mutantes C126A y C126S <i>in silico</i>	27
3.14.2 Simulación de la dinámica molecular	27
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	29
4.1 Expresión y purificación de las enzimas mutantes	29
4.2 Propiedades estructurales de las enzimas mutantes	29
4.3 Catálisis	29
4.4 Parámetros de unión con el PGA	31
4.4.1 Titulación fluorométrica	31
4.4.2 Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)	33
4.4.3 Método cinético	35
4.5 Transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento	36
4.6 Cinéticas de desplegamiento	37
4.7 Cinéticas de replegamiento	39
4.8 Susceptibilidad a la proteólisis	43
4.9 Efecto de la dilución en la estabilidad de la ScTIM y sus mutantes de Cys126	44
4.10 Simulación de la dinámica molecular en vacío de las enzimas ScTIM, C126A y C126S	47

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	53
5.1 Catálisis	53
5.2 Estabilidad	56
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	64
APÉNDICE I Alineamiento de la secuencia de TIM de 108 especies	69
APÉNDICE II Determinación fluorométrica de la constante de unión Proteína-Ligando	75
APÉNDICE III Parámetros cinéticos de TIM de diferentes especies	78

ABREVIATURAS

C126A y C126S	La TIM de <i>S. cerevisiae</i> en la cuales la Cys126 se reemplazó por Ala o Ser
CTI	Calorimetría de Titulación Isotérmica
D	Estado desplegado
DC	Dicroísmo circular
DGAP	D-gliceraldehído-3 fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
ET	Estado de transición
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
α -GDH	α -Glicerofosfato deshidrogenasa
ΔG_u	Energía libre de unión
ΔH_u	Entalpía de unión
IF	Intensidad de fluorescencia
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
k_{cat}	Número de recambio
k_d	Constante cinética de desplegamiento
K_I	Constante de inhibición
K_M	Constante de Michaelis
k_r	Constante cinética de replegamiento
K_u	Constante de unión

MMTS	Metilmetano tiosulfonato
N	Estado nativo
NAD	Dinucleótido de nicotinamina adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamina adenina reducido
PGA	2-fosfoglicolato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ScTIM	TIM de <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
ΔS_u	Entropía de unión
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
Tris	Tris(hidroximetil)aminoetano

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la importancia del residuo estrictamente conservado Cys126, perteneciente al sitio activo de la triosafosfato isomerasa (TIM), en la catálisis y estabilidad de la enzima. Para tal efecto, utilizamos dos enzimas mutantes de TIM de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM), construidas mediante mutagénesis dirigida; en una se sustituyó la Cys por Ser (C126S) y en la otra por Ala (C126A), siendo estas sustituciones dos de las más frecuentes para este tipo de residuo. Las tres enzimas mencionadas fueron purificadas usando el método previamente reportado para la TIM recombinante de levadura, lográndose purificar a homogeneidad. Los rendimientos de la C126A y C126S fueron menores (1.0 y 3.0 mg L⁻¹, respectivamente) que el conseguido para la ScTIM (13.0 mg L⁻¹). Todos los resultados de las enzimas mutantes fueron comparados con los obtenidos para la ScTIM.

Primeramente, se determinó que las mutaciones no provocaron cambios estructurales significativos a juzgar por los espectros de dicroísmo circular (DC) tanto en la región del UV lejano (estructura secundaria) como en el UV cercano (estructura terciaria), así como por los de fluorescencia (estructura terciaria). Por otro lado, cuando las proteínas se incubaron con subtilisina, una enzima capaz de proteolizar a la TIM, se observó el mismo patrón de lisis para las tres enzimas, asimismo, no se observó proteólisis para ninguna de las variantes en presencia de papaína, quimotripsina y tripsina, por lo que podemos decir que las mutaciones no promueven nuevos sitios de proteólisis ante estas proteasas.

Para estudiar el papel de la Cys126 en la catálisis, se determinaron los parámetros cinéticos utilizando los dos sustratos de la TIM: dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y D-gliceraldehído-3 fosfato (DGAP). Con este último, tanto la C126S como la C126A presentaron una disminución de K_M^- (3.7 y 1.3 veces) y de k_{cat}^- (4.3 y 1.5 veces), respectivamente; en el caso de DHAP, la C126S mostró una disminución de 3.5 (K_M^+) y de 8.3 (k_{cat}^+) veces, respecto a la enzima silvestre. Ya que tanto k_{cat} como K_M disminuyen, la eficiencia catalítica (K_M/k_{cat}) de las enzimas mutantes es semejante a la encontrada en la ScTIM. Los valores de la constante de unión (K_u) para el análogo de sustrato 2-fosfoglicolato (PGA), determinados por tres métodos diferentes (cinético, titulación fluorométrica y microcalorimetría de titulación isotérmica), dejaron ver una mayor afinidad por el PGA por parte de las enzimas mutantes, lo que concuerda con lo observado para la K_M ; tal incremento fue de 1.4 a 3.0 veces respecto a la ScTIM. El análisis termodinámico de la unión muestra que la mayor afinidad de las mutantes por el PGA se debe principalmente a una contribución entrópica menos desfavorable, lo que pudiera ser explicado con una mayor desolvatación cuando las mutantes unen al sustrato.

La importancia del residuo 126 en la estabilidad de la TIM se exploró por desnaturalización térmica; los perfiles de desplegamiento por DC de las enzimas C126A y C126S mostraron un corrimiento de la T_m aparente de 9 y 13 °C, respectivamente, comparada con el valor de la ScTIM. Además, sólo se replegaron en un 65–70% en las mismas condiciones donde la TIM silvestre se replegó más del 95%. Las constantes cinéticas de desplegamiento (k_d) y de replegamiento (k_r) se determinaron por DC a diferentes temperaturas a pH 7.4 y 8.5. A partir de estos datos estimamos que, a 25 °C, la C126A y la C126S son menos estables que la ScTIM por aproximadamente 5.0 y 9.0 kcal mol⁻¹, respectivamente.

Finalmente, a partir de la comparación de las dinámicas moleculares de la ScTIM y las dos mutantes de Cys126, pudimos observar que en el caso de la C126A los residuos catalíticos mantienen interacciones y distancias parecidas a las presentes en la ScTIM, lo que no sucedió con la C126S. En el caso de las interacciones con moléculas de agua, nuevamente la C126S presenta menos interacciones que la ScTIM, lo que pudiera ser indicio de mayor movilidad de

dichas moléculas que daría como resultado una enzima más deshidratada al unir el sustrato, lo que apoyaría el aumento en la entropía de unión del PGA (ΔS_u) observado para dicha mutante.

Si la TIM trabaja *in vivo* en condiciones lejanas a la saturación, como ha sido reportado, y con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos decir que la Cys126 es requerida tanto para la estabilidad como para el plegamiento eficiente de la TIM más que para su catálisis.

INTRODUCCIÓN

1.1 Residuos conservados en proteínas

Las proteínas (de la palabra griega *proteios*, que significa “de primera clase”) desempeñan papeles clave en prácticamente todos los procesos biológicos, tales como: catálisis enzimática, transporte y almacenamiento, movimiento coordinado, soporte mecánico, protección inmune, generación y transmisión de los impulsos nerviosos, control del crecimiento y diferenciación, etc. (Stryer, 1995). Sus unidades estructurales básicas son los L-aminoácidos unidos entre sí por medio del enlace peptídico. Al estudiar a las proteínas se hace mención de cuatro niveles básicos de estructuración:

1. Estructura primaria: se refiere a la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, está determinada genéticamente y es única para cada proteína.
2. Estructura secundaria: es el arreglo local de la cadena polipeptídica originando estructuras como las hélices α , hojas β y otras.
3. Estructura terciaria: se refiere al ordenamiento espacial de los residuos de aminoácidos así como a la asignación de enlaces disulfuro en su caso.
4. Estructura cuaternaria: La presentan las proteínas que poseen más de una cadena polipeptídica o subunidad, y se refiere al ordenamiento espacial de tales subunidades.

Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de proteínas que tienen la misma función pero que provienen de diferentes organismos, se puede obtener información sobre su relación filogenética; las similitudes entre ellas (aminoácidos conservados) pueden ser algún indicativo de un antepasado común. Asimismo, una diferencia puede reflejar la adaptación de proteínas íntimamente emparentadas frente a diferentes presiones de selección (evolución divergente) (Pettersson, 1992; Nagano y col., 2002).

Las proteínas que han evolucionado de un ancestro común se denominan homólogas. Dicha homología puede ser tocante a uno, o varios, de los siguientes aspectos: su secuencia de aminoácidos, topología, especificidad catalítica, cinética de plegamiento, mecanismo de desnaturalización o estabilidad; esta última puede variar dependiendo de las peculiaridades fisiológicas del organismo del que proviene. Cabe mencionar que la clasificación de las proteínas en familias se basa en la homología de sus secuencias así como en su función.

La teoría de la evolución por selección natural sugiere que los residuos de aminoácido que están conservados entre los miembros de una familia son más importantes funcionalmente, como los que se presentan en los sitios activos, en comparación con aquellos residuos no conservados. Algunos autores observaron que si bien las enzimas son sensibles a la sustitución de residuos conservados (Palzkill y Botstein, 1992; Poteete y col., 1992), estos no son los únicos importantes funcionalmente (Zubillaga y col., 1994; Gómez-Puyou y col., 1995).

Las regiones más propensas a cambios son las constituidas por residuos no relacionados directamente a una función y que están presentes en la superficie de las proteínas, donde los átomos vecinos pueden expandirse o contraerse para acomodar una mayor o menor cadena lateral (Bordo y Argos, 1992). Por el contrario, los núcleos hidrofóbicos al interior de las proteínas presentan un número menor de cambios, presumiblemente porque alteran interacciones de empacamiento que son críticas para la estabilidad conformacional de la molécula (Silverman y col., 2001).

Mirny y Shakhnovich (1999) hicieron un análisis de la evolución molecular de diferentes estructuras terciarias para poder distinguir las razones para la conservación de aminoácidos: históricas (tiempo de evolución insuficiente para divergir), funcionales, presión evolutiva hacia el plegamiento rápido, quizás para exceder alguna velocidad mas allá del umbral en el cual la agregación y/o la proteólisis de un grupo de especies plegadas puede presentar un problema. Los resultados del análisis del barril (α/β)₈, que es una de las estructuras terciarias más comúnmente observada en infinidad de proteínas con marcadas diferencias en estructuras primarias y función (Nagano y col., 2002), determinó que los factores físicos relacionados con la estabilidad de varias proteínas han sufrido considerable optimización evolutiva hacia un rápido plegamiento, aunque no necesariamente el más rápido.

1.2 Patrones de sustitución de aminoácidos

Se llama sustitución al hecho de cambiar un nucleótido del ADN (ácido desoxirribonucleico) por otro diferente, la más probable es aquella en la que se cambia solamente un nucleótido (mutación puntual). Las sustituciones de nucleótidos se clasifican de acuerdo a su efecto en la proteína en “sinónimas” y “no sinónimas”; en las primeras el codón alterado codifica para el mismo aminoácido y en las segundas si se modifica el aminoácido.

Por la naturaleza del código genético las sustituciones “no sinónimas” ocurren en la primera y en la segunda posición de los codones y las “sinónimas” principalmente en la tercera posición; en las sustituciones “no sinónimas” las más frecuentes son las de la primera posición (László, 1999).

Sin embargo, en las proteínas también se observan algunos cambios entre aminoácidos químicamente similares como por ejemplo: Tyr por Trp y Phe por Trp, en los que se requiere cambiar dos bases nitrogenadas; lo cual quiere decir que los patrones que pueden ser propios del código genético son distintos a los patrones de las similitudes químicas de los aminoácidos. Ambos patrones de sustitución son impuestos principalmente por selección natural contra cambios drásticos y a favor de la similitud de las funciones de los residuos de los nuevos aminoácidos en la conformación tridimensional de las proteínas. Algunas de las propiedades claves de un residuo de aminoácido que determinan su papel y mutabilidad son: tamaño, forma, polaridad, carga eléctrica, y su capacidad para formar interacciones hidrofóbicas, puentes salinos, de hidrógeno o disulfuro.

A partir de un análisis estadístico entre proteínas homólogas (George y col., 1990), se observó que residuos como Asn, Ser o Ala mostraron mayor grado de mutabilidad que Trp, Tyr, Phe o Cys. La relativa inmutabilidad de este último se explicó por el hecho de que es el único aminoácido que puede formar puentes disulfuro. También se observó que la mayoría de las mutaciones fueron el resultado de sustituciones de una sola base nitrogenada. Sin embargo, el 20% de las mutaciones fueron por aminoácidos cuyos codones difirieron por más de un nucleótido. Las mutaciones favorecidas fueron aquellas en las que los aminoácidos químicamente similares se reemplazaron unos con otros; se propusieron los siguientes grupos: alifático (Met, Ile, Leu, Val); aromático (Phe, Tyr, Trp); básico (Arg, Lys); ácido-amida (Asn, Asp, Glu, Gln) y aminoácidos hidroxílicos (Ser, Thr). Los residuos que no fueron incluidos en ninguno de los grupos mencionados son la Cys, por su capacidad de hacer puentes disulfuro; la Gly y Pro que suelen ser sustituidos por Ala; His, la cual es reemplazada generalmente por Arg o Asn (George y col., 1990).

1.3 Papel de la Cys en las proteínas

La Cys tiene la capacidad de aparecer en diez diferentes estados de oxidación in vivo (tioles, tiolatos, disulfuros, como ácidos sulfénico, sulfinico y sulfónico, entre otros)

exhibiendo cada uno su propia especificidad química y propiedades bioquímicas tales como estabilidad, comportamiento redox, unión de metales, actividad catalítica, etc. (Giles y col., 2003). Sólo la forma reducida de la Cys puede participar en la sustitución nucleofílica, o transferencia de iones metálicos, protones, átomos de hidrógeno o átomos de oxígeno (Giles y col., 2003).

Las Cys son importantes en la estabilidad de algunas proteínas por la formación de puentes disulfuro (razón por la cual se cree son insustituibles) o por su sensibilidad al proceso de oxidación. Respecto a la catálisis, los residuos de Cys también han mostrado ser significativos, por ejemplo, en las zinc- β -lactamasas II dicho residuo no está directamente involucrado en la catálisis pero actúa como ligando para el metal formando de esta manera el complejo zinc/azufre; en algunas endopeptidasas cisteínicas la Cys del sitio activo actúa como un potente nucleófilo donador de un par electrónico; en el mecanismo hidrolítico de algunas proteasas cisteínicas, como la papaína, también está involucrada una Cys perteneciente al sitio activo (Giles y col., 2003; Lipton y col., 2002; Nath y Peterson, 2001; Urade y col., 1995).

Un aspecto al que se le ha dado poca atención es la capacidad de la Cys de formar enlaces de hidrógeno, ya que su grupo sulfhidrilo puede actuar como donador o aceptor de enlaces de hidrógeno. Dichos enlaces son más largos que aquéllos donde se involucran nitrógeno u oxígeno, debido al gran tamaño del azufre; además los enlaces entre $-SH$ y oxígenos de grupos carbonilo son particularmente numerosos en las proteínas (Gregoret y col., 1991).

Por otro lado, se sabe que el primer paso en la degradación de la mayoría de las proteínas es el marcado covalente o modificación de alguno de sus aminoácidos. Este evento no ocurre al azar ya que cada proteína posee uno o más sitios específicos para el marcado y degradación inicial de la misma. Estos sitios pueden tener profunda influencia en la estabilidad y otras propiedades biológicas de las proteínas (Gracy, 1992).

La oxidación de aminoácidos que contienen azufre fue uno de los primeros tipos de modificaciones reconocidas en afectar la estabilidad de las proteínas. Estell y colaboradores (1985) observaron que al mutar el residuo Met222, ubicado cerca del sitio activo de la subtilisina, por Ser, Ala o Leu, las tres mutantes fueron resistentes a la inactivación por H_2O_2 mientras que la mutante M222C fue rápidamente inactivada al igual que la enzima silvestre. En algunos casos se ha observado la presencia de proteínas modificadas durante la madurez y desarrollo del individuo. Tal es el caso de la fosfoglicerato quinasa de la cual se han

encontrado proteínas modificadas en varios tejidos de ratas viejas, incluyendo músculo, hígado, cerebro y corazón (Cook y Gafni, 1988).

Construyendo enzimas mutantes del residuo de interés es posible determinar su importancia en ciertas funciones como la catálisis, estabilidad, plegamiento, etc. En el caso de proteínas de las que se tiene información de distintos tipos, se facilita conocer más en detalle las interacciones que determinan tales funciones. En este sentido, la triosafosfato isomerasa (TIM) es un excelente modelo de estudio por toda la información que se ha generado de ella. Es de nuestro interés estudiar el residuo conservado Cys126 de TIM.

1.4 Triosafosfato Isomerasa (E.C. 5.3.1.1.)

La triosafosfato isomerasa es una enzima que participa en la glucólisis, gluconeogénesis y en la síntesis de los triglicéridos; es necesaria para todas las especies y está presente en todos los tejidos (Gracy y col., 1994); se encuentra en grandes cantidades en el músculo esquelético, en el cerebro y tumores malignos. El papel de la enzima durante la glucólisis es esencial ya que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído-3-fosfato (DGAP), a través de un intermediario enodiol. Solamente el DGAP puede continuar la ruta glucolítica hacia la fase de síntesis de ATP (Fig. 1.1), por ello la TIM ha sido considerada como un blanco atractivo en el diseño de fármacos que puedan actuar contra la enzima de parásitos que tienen por hábitat la sangre de mamíferos donde consumen la glucosa presente causando enfermedades tales como la malaria y la tripanosomiasis (Gómez-Puyou y col., 1995; Ray y col 1999; Téllez-Valencia y col., 2002; Parthasarathy y col., 2002).

1.4.1 Estructura

Se conoce la estructura primaria completa de la TIM de más de cien especies. Nosotros comparamos 108 secuencias (Apéndice I), obtenidas de la base de datos Swiss Prot, y determinamos que sólo 11 residuos están estrictamente conservados en todas ellas: Lys12, Gly72, Thr75, His95, Cys126, Glu165, Pro166, Ile170, Gly171, Gly209 y Gly228; dichos residuos están localizados en la zona C-terminal del barril de estructura $(\alpha/\beta)_8$, donde se encuentra el sitio activo (Fig. 1.2).

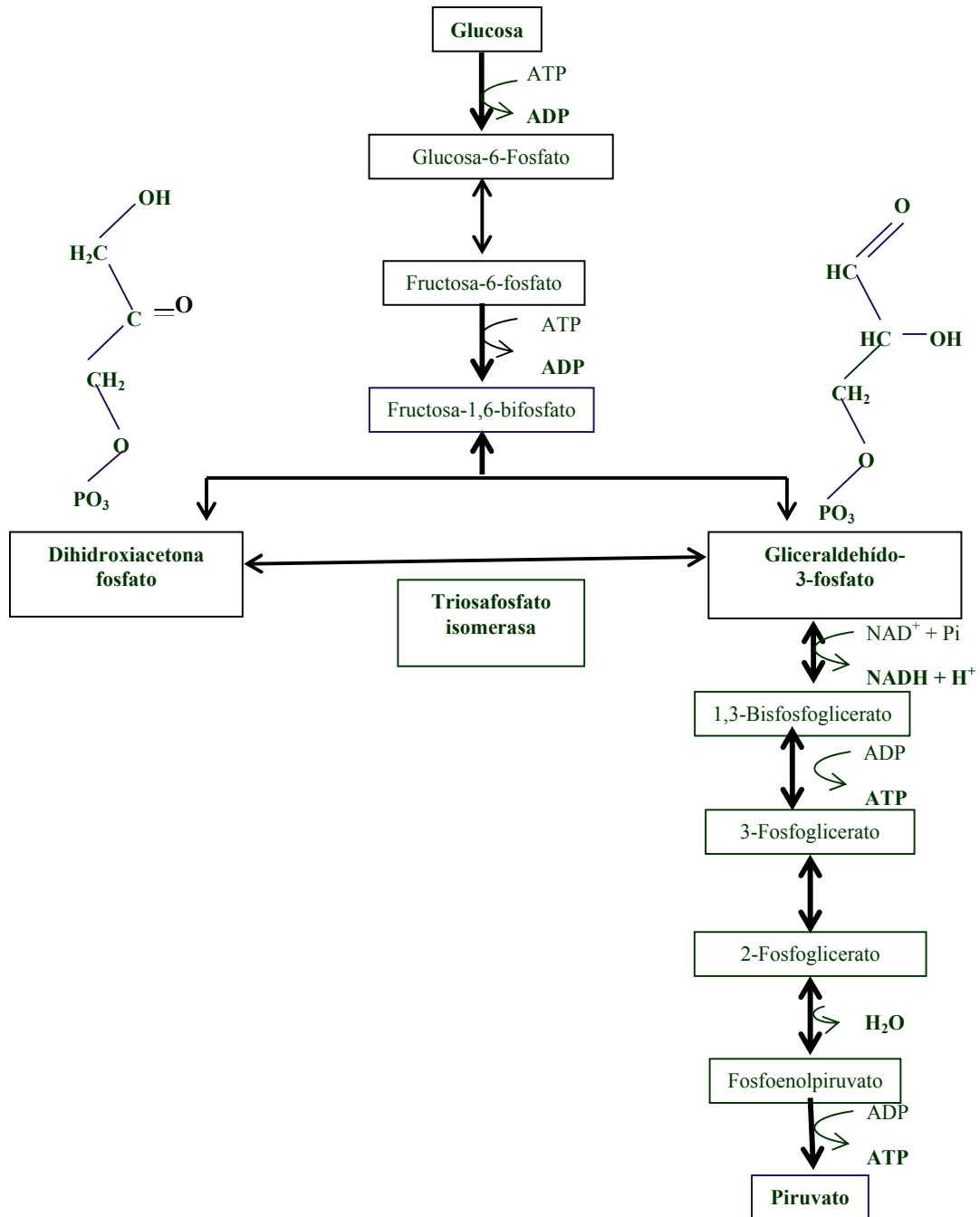


Figura 1.1 La vía de la glucólisis

A la fecha se ha reportado la estructura cristalográfica de 14 especies: *Gallus gallus* (Banner y col., 1975), *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis y col., 1990), *Trypanosoma brucei* (Wierenga y col., 1991), *Escherichia coli* (Noble y col., 1993), *Homo sapiens* (Mande y col., 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni y col., 1995), *Thermotoga maritima* (Russel y Tylor, 1995), *Plasmodium falciparum* (Velanker y col., 1997), *Vibrio marinus* (Alvarez y col., 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado y col., 1998), *Leishmania mexicana* (Williams y col., 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden y col., 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero y col., 2002) y *Caenorhabditis elegans* (Symersky y col., 2003).

En el presente trabajo se utilizó la TIM de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM). Esta enzima es un homodímero de 26.7 kDa con 248 residuos de aminoácidos en cada cadena (Fig. 1.2) (Lolis y col., 1990). Las asas 1, 2, 3, y 4 forman la interfase del dímero donde las subunidades se unen. Cada subunidad oculta un área de superficie de 1600 Å² en la dimerización, lo que se cree contribuye significativamente a la estabilidad de la proteína. El asa 3 (residuos 71-78) (Fig. 1.2), es conocida como asa interdigitante por ensamblarse entre las asas 1 y 4 de la otra subunidad. Tiene importancia relevante en la estabilización de la estructura (Wierenga y col., 1991).

Cada monómero tiene un sitio activo completo y está localizado cerca de la interfase, no hay cooperatividad entre ellos lo que implica que no interactúan cuando unen al sustrato. Los aminoácidos que conforman el sitio activo son: Asn10, Lys12 (residuo considerado como parte de la interfase del dímero (Wierenga y col., 1991)), His95, Ser96, Glu97, Cys126 y Glu165 (Lolis y col., 1990).

El asa 6 ó asa catalítica (residuos 167-176) forma una especie de tapa que sufre cambios conformacionales cuando se une el ligando, induciéndose una conformación cerrada en la cual el asa 6 se posiciona sobre el sitio activo para mantener un ambiente hidrofóbico y evitar de esta manera la pérdida del fosfato del sustrato (Lolis y Petsko, 1990). Respecto al Trp168, perteneciente a esta asa, Sampson y Knowles (1992) demostraron que es el residuo que mayor aportación tiene en el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la TIM de levadura cuando la enzima se une al ligando (Fig. 1.2).

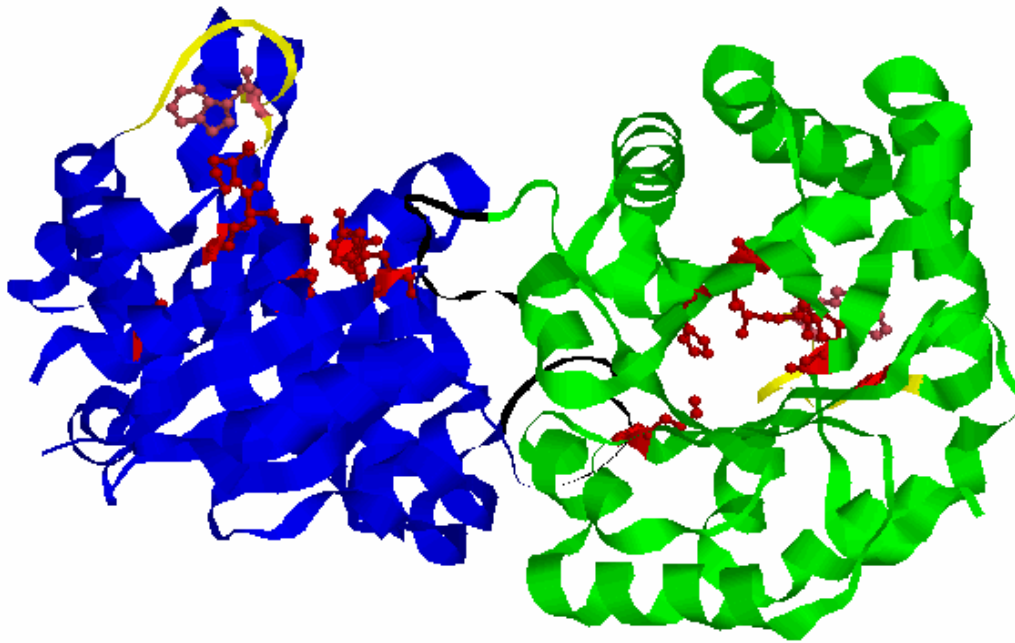


Figura 1.2 Estructura tridimensional del dímero de la TIM de levadura. Se muestra cada uno de los monómeros en color azul y verde. En rojo están señalados los residuos estrictamente conservados en todas las secuencias de TIM conocidas. De igual manera se ilustran el asa 3 (negro), el asa catalítica (amarillo) y Trp168 (rosa). Archivo tomado del Protein Data Bank (PDB): 1YPI (Lolis y col., 1990).

1.4.2 Catálisis

Se han realizado diversos estudios para determinar las propiedades catalíticas de la TIM, la cual está considerada como una "enzima perfecta" debido a que su velocidad de reacción para transformar el sustrato está limitada por difusión únicamente (Albery y Knowles, 1976; Blacklow y col., 1988; Knowles, 1991). Los factores que influyen para dicha difusión son la temperatura, la viscosidad y la fuerza iónica del medio; este último factor es indicativo de la influencia que tienen las interacciones electrostáticas en enzimas con sustratos cargados eléctricamente (Cudd y Fridovich, 1982). La enzima muestra un comportamiento completamente michaeliano. La TIM es solamente activa como dímero (Waley, 1973; Casal y col., 1987; Garza-Ramos y col., 1992). Se ha demostrado que un dímero formado por un monómero activo y un monómero bloqueado covalentemente con un inhibidor, exhibe la

mitad de la actividad catalítica del dímero intacto (Schnackerz y Gracy, 1991). Esto sugiere que la asociación de los monómeros induce la adquisición de actividad catalítica o que la interfase del dímero es indispensable para la catálisis.

Para la TIM se han hecho estudios de resonancia magnética nuclear (Harris y col., 1998), cristalografía, mutaciones dirigidas, y simulaciones computacionales de la reacción catalizada, empleando tanto sustancias análogas al sustrato DGAP: 2-(N-formil-hidroxi)-aminoetil fosfato (IPP) (Kursula y col., 2001); como análogos al estado de transición: 2-fosfoglicolato (PGA), algunos autores lo han considerado también como análogo del sustrato (Cambell y col., 1978; Lolis y Petsko, 1990), 2- fosfoglicolohidroxamato (PGH) (Hartman y col., 1975; Zhang y col., 1994, 1999), 3-fosfonopropionato (Noble y col., 1991). Recientemente Jogl y colaboradores (2003) reportaron la estructura cristalográfica de la TIM de levadura con DHAP a 1.2 Å de resolución. Sus observaciones concordaron completamente con las estructuras de TIM-ligando previamente reportadas.

A partir de los estudios anteriores se ha establecido que Lys12, His95 y Glu165 son los residuos involucrados directamente en la reacción de catálisis (Fig. 1.3). El Glu165 ha sido identificado como la base catalítica y es el responsable de sustraer un protón del C1 de la DHAP para producir DGAP, ó del protón del C2 del DGAP para producir DHAP, iniciando de esta manera la catálisis. La His95 es un electrófilo que tiene un papel cinético crucial ya que transfiere los protones entre los oxígenos de los intermediarios enodiolatos. La Lys12 tiene el papel de crear un ambiente cargado positivamente para atraer al sustrato cargado negativamente hacia el sitio activo.

Existen otros residuos que no son estrictamente conservados pero que se han considerado importantes para la catálisis de la TIM, como la Ser96, que se cree interviene en el posicionamiento apropiado del Glu165; sin embargo, la eficiencia catalítica de la mutante S96T de TIM de pollo no mostró diferencia significativa, respecto a la enzima sin modificar (Blaklow y col., 1991). La Asn10 actúa como posible proveedor de un potencial electrostático estabilizando un estado intermediario o de transición de la reacción (Kursula y col., 2001). Una molécula de agua, presente en ambas subunidades, forma enlaces de hidrógeno con Nε2 (3.0 Å) de His95 y Nδ2 (3.3 Å) de Asn10. Esta molécula de agua es desplazada cuando el sustrato o inhibidor se une al sitio activo.

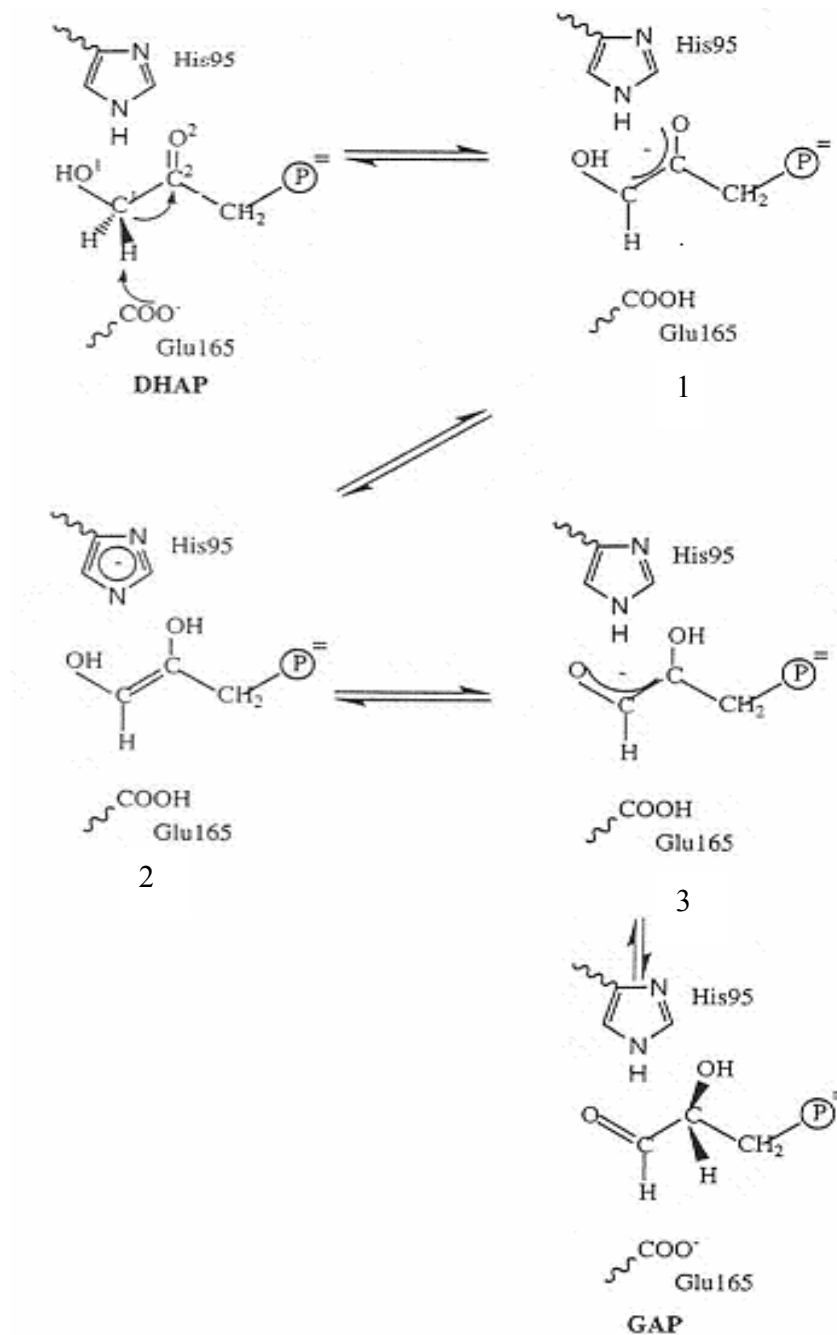


Figura 1.3. Mecanismo de la reacción catalizada por la TIM para la interconversión entre DHAP y DGAP. Primeramente se transfiere un protón de DHAP al Glu165 para formar un enediolato (1), después se genera un enediol (2) por transferencia de un protón de y para His95, finalmente se transfiere un protón del Glu165 a un enediolato (3) para formar DGAP (Albery y Knowles, 1976; Cui y Karplus, 2001).

1.4.3 Residuo estrictamente conservado: Cys126

Como se mostró en el punto 1.4.1, de los siete residuos que son considerados del sitio activo, únicamente Lys12, His95, Glu165 y Cys126, son residuos estrictamente conservados (Fig. 1.4). La importancia de los tres primeros en la catálisis ya ha sido comentada. Respecto a la Cys126, se sabe que no tiene contacto directo con el sustrato pero sí establece contacto de van der Waals con el Glu165. En la conformación abierta de la TIM la distancia entre $O\epsilon(165)$ - $S\gamma(126)$ es de 4.2 Å, distancia que se mantiene en la conformación cerrada. También se ha observado cercanía del azufre con el O de Ile124 (4.3 Å) y el O de Leu93 (3.8 Å), lo que sugiere que el protón enlazado a $S\gamma$ de la Cys126 está unido por enlace de hidrógeno a estos dos oxígenos (Kursula y col., 2003).

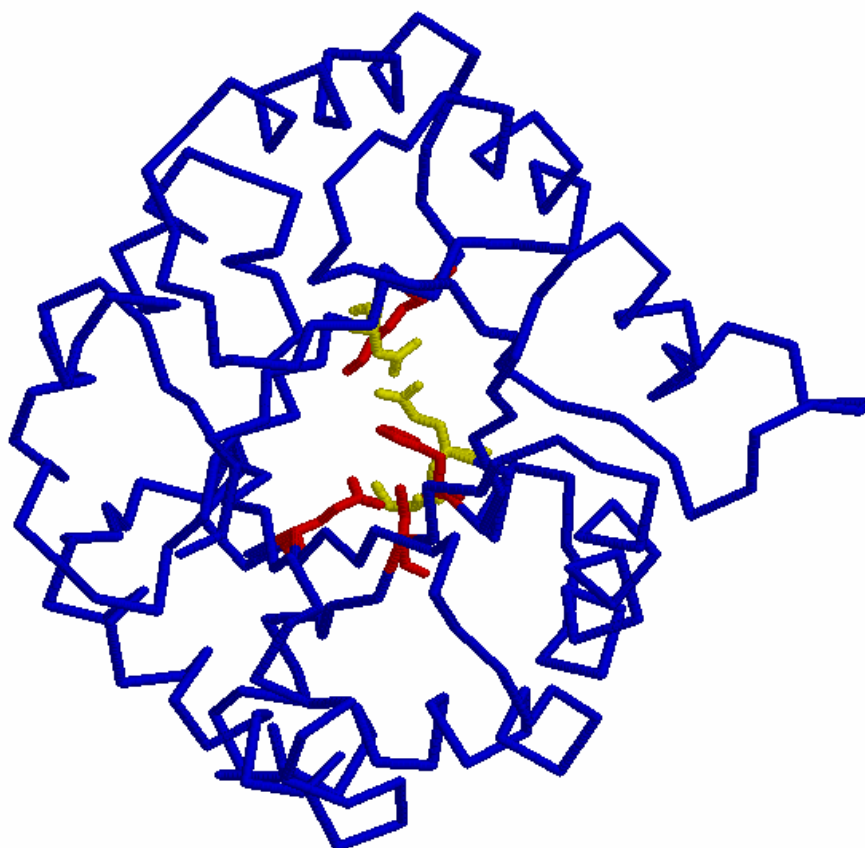


Figura 1.4 Residuos del sitio activo. Monómero de la TIM de levadura; en amarillo se muestran los residuos del sitio activo y en rojo los que están estrictamente conservados en la TIM de más de cien especies. Archivo tomado del Protein Data Bank (PDB): 1YPI (Lolis y col, 1990).

Por otro lado, Tang y colaboradores (1990) reportaron que la oxidación de la Cys126 de TIM de pollo funciona como un marcador de degradación proteolítica *in vivo* y que las isoformas oxidadas también se acumulan durante la madurez y desarrollo de las células. Las proteínas modificadas pueden retener actividad funcional pero con propiedades fisicoquímicas, catalíticas o de estabilidad alteradas. Estos estudios se realizaron oxidando la Cys126 con glutatión y exponiendo la enzima modificada a la acción de proteasas, concluyéndose que hay un aumento de la susceptibilidad de la enzima cuando dicho residuo está oxidado comparado con la proteína sin tratar (Tang y col., 1990). También se observó que la oxidación de este residuo no conduce a una inactivación completa de la enzima (Zubillaga y col., 1994; Tang y col., 1990).

Recientemente se reportaron los resultados de la mutación de la Cys126 en TIM de levadura por Val (C126V) y se observó una disminución de la actividad de 13 veces, con respecto a la enzima silvestre, empleando extractos crudos celulares (Silverman y col., 2001). Estos autores proponen que la aparente pérdida de actividad *in vivo* resultaría en una reducción en la estabilidad o velocidad de plegamiento de la proteína, o en un aumento en los niveles de proteólisis. Este mismo grupo cuantificó la perturbación energética resultante de mutar las dos Cys de TIM de levadura, 41 y 126, empleando la técnica de MPAX (Misincorporation Proton-Alkil Exchange) (Silverman y Harbury, 2002). Construyeron la mutante C41V además de una doble mutante C41V/C126A. La doble mutante se desestabilizó ampliamente ($\Delta\Delta G = 5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) lo que no sucedió con la C41V.

Utilizando el alineamiento de las secuencias de TIM antes mencionado y localizando en cada una de ellas las posiciones con Cys, determinamos el porcentaje de permutación de Cys por los 19 aminoácidos restantes (Tabla 1.1). Se observó que el cambio más frecuente de Cys fue por Ala (UGU→GCU) y Val (UGU→GUU) (13 %). Con respecto a la mutación Cys→Ala, las mutaciones intermedias pueden ser Gly (GGU) o Ser (UCU), representando esta última el 7% del total de cambios (Tabla 1.1); en caso de Cys→Val, las mutaciones intermedias pueden ser Ile (AUU) y también Gly (GGU).

En el presente trabajo se hizo un estudio detallado del papel que juega el residuo conservado Cys126 en la catálisis y estabilidad de la triosafosfato isomerasa; para ello se usaron la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM) y dos variantes con mutaciones puntuales en este residuo. En una se sustituyó la Cys126 por Ala (C126A), eliminándose en

este caso el átomo de azufre; en la otra se sustituyó el residuo de Cys por Ser (C126S), es decir, sólo se cambió un átomo de azufre por otro de oxígeno.

La estrategia que se siguió fue, primeramente, comprobar si las mutaciones promovieron cambios en la estructura nativa comparando los espectros de dicroísmo circular tanto en la región del UV lejano (estructura secundaria) como en la del UV cercano (estructura terciaria), así como los espectros de fluorescencia (estructura terciaria). Se determinaron las propiedades catalíticas, K_M (constante de Michaelis) y k_{cat} (número de recambio), para ambos sustratos de la TIM, así como la constante de inhibición (K_i) para un análogo del sustrato (PGA). También se comparó la estabilidad de las tres enzimas mediante el estudio de su desplegamiento y replegamiento inducidos térmicamente, la susceptibilidad a proteólisis y disociación por dilución. Finalmente, se realizó una dinámica molecular de la ScTIM y sus mutantes de Cys126 para tratar de explicar a nivel molecular los efectos de las mutaciones en la estructura.

Residuo	% de frecuencia de cambio de Cys por el residuo:
Ala, Val	13
Ile	11
Leu	8
Ser	7
Lys	6
Glu	5
Thr, Arg, Pro	4
Gln, Gly, Asn, Met, Phe, Asp, Tyr	3
His	2
Trp	1

Tabla 1.1 Resultados del análisis estadístico del cambio de Cys por los demás residuos, determinados sobre un alineamiento de TIM de 108 especies.

Objetivo General

Determinar el papel del residuo conservado Cys126 en la triosafosfato isomerasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a través de un estudio comparativo de las propiedades de ScTIM y de sus mutantes C126A y C126S.

Objetivos Específicos

1. Expresar y purificar las enzimas mutantes de Cys126: C126A y C126S
2. Determinar los parámetros cinéticos K_M y k_{cat} con ambos sustratos de TIM (DGAP y DHAP).
3. Evaluar la constante de unión (K_u) con el PGA utilizando titulación fluorométrica, calorimetría de titulación isotérmica (CTI) y un método cinético.
4. Establecer las contribuciones entálpicas y entrópicas a la energía libre de unión (ΔG_u) a partir de experimentos de CTI.
5. Determinar mediante DC si las mutaciones afectaron la estabilidad térmica de la TIM así como su capacidad de replegamiento.
6. Medir las constantes cinéticas del desplegamiento (k_d) y replegamiento (k_r) y establecer los parámetros termodinámicos que describen estos procesos: $\Delta H^{N \rightarrow ET}$, $\Delta H^{2D \rightarrow ET}$, $\Delta G^{2D \rightarrow N}$, $\Delta C_p^{2D \rightarrow N}$, $\Delta H^{2D \rightarrow N}$, $T\Delta S^{2D \rightarrow N}$.
7. Determinar si las mutaciones cambian la susceptibilidad de la TIM al ataque proteolítico.
8. Analizar el efecto de la dilución de la enzima en la estabilidad.
9. Realizar un análisis comparativo de la dinámica molecular de las enzimas mencionadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Construcción de las mutantes de Cys126

Las variantes de ScTIM (C126S y C126A) fueron construidas por la Dra. Emma Saavedra y la M. en C. Lorena Ruíz Paniagua, en el Laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La sustitución del residuo de Cys en la posición 126 en TIM de *S. cerevisiae* (ScTIM) por Ser o Ala fue realizada por mutagénesis dirigida (Sambrook y Russell, 2001) con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos mutagénicos fueron 5'-GTCATCTTGTCCATCGGT-3' (C126S directo), 5'-ACCGATGGACAAGATGAC-3' (C126S complementario); 5'-GTCATCTTGGCGATCGGT-3' (C126A directo) y 5'-ACCGATCGCCAAGATGAC-3' (C126A complementario). En ambos casos los oligonucleótidos T7 promotor y T7 terminador fueron usados como cebadores flanqueantes (flanking primers) para amplificar el gene completo. Los genes mutados fueron clonados en el vector de expresión pET3a (pET System, Novagen); los plásmidos fueron usados para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Los genes completos se secuenciaron para confirmar cada mutación.

3.2 Expresión y purificación

La purificación de ScTIM y sus mutantes se realizó aplicando el protocolo establecido por Vázquez-Contreras y colaboradores (2000). La expresión se llevó a cabo a 37 °C en medio Luria-Bertani suplementado con 0.1 mg mL⁻¹ de ampicilina. La sobreproducción de la proteína se promovió con la adición del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM, cuando D.O.₆₀₀ (1 cm) fue aproximadamente de 0.8–1.0. El crecimiento celular se continuó por 12 h más. Se realizó una centrifugación a 5000 r.p.m. por 10 min, el paquete celular así obtenido se resuspendió en amortiguador de tris(hidroximetil)aminoetano (Tris) 10 mM, pH 8, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.2 mM y se lisaron las células por cambio de presión en una prensa de French (1500 psi, 4 °C, 3 veces). El lisado se centrifugó a 45,000 r.p.m. a 4 °C por 1 h. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 64% de saturación, en frío. Se realizó una nueva centrifugación a 12,000 r.p.m. a 4 °C por 15 min. El sobrenadante se llevó a un 90% de saturación de (NH₄)₂SO₄, sometiéndola a centrifugación nuevamente. Se resuspendió el precipitado en amortiguador A:

trietanolamina (TEA) 10 mM, EDTA 1 mM y ditioneitol (DTT) 1 mM, pH 7.6, y se dializó contra el mismo regulador.

La muestra dializada se aplicó a una columna de Sephacryl S-300, previamente equilibrada con amortiguador A y controlada por un equipo de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Pharmacia (Piscataway, NJ). A las fracciones obtenidas se les determinó la concentración de proteína por su absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática (los métodos se detallan más adelante), se juntaron las fracciones con mayor actividad para la siguiente columna cromatográfica de intercambio aniónico (MonoQ HR 10/10), equilibrada con amortiguador A. La TIM se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio (NaCl) de 10–100 mM. Se cuantificó la concentración de proteína espectrofotométricamente a 280 nm y la actividad catalítica a las fracciones obtenidas. Las fracciones con mayor actividad enzimática se mezclaron y dializaron contra regulador A, pH 8.0.

La siguiente columna de intercambio iónico (MonoQ HR 10/10) se equilibró con regulador A, pH 8.0 y se inyectó la solución de proteína. La TIM se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0–100 mM. A las fracciones obtenidas se les cuantificó proteína por su absorbancia a 280 nm y se determinó su actividad enzimática. Las fracciones con mayor actividad de esta última etapa se dializaron contra regulador B (TEA 100 mM, EDTA 10 mM, 1 mM DTT, pH 7.4, fuerza iónica de 0.16). La homogeneidad de este dializado se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con proteína nativa y desnaturalizada (Native-PAGE y SDS-PAGE; Pharmacia). Finalmente la solución de TIM homogénea se almacenó a 4 °C.

3.3 Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteína se realizó en forma directa y mediante el microensayo de Bio-Rad, (Bradford, 1976). El método directo consistió en medir la absorbancia a 280 nm utilizando un $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 10.0$ (Norton y Hartman, 1972). El microensayo de Bio-Rad permitió cuantificar concentraciones de 1.0 a 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína. La curva estándar se construyó a partir de una solución de ScTIM de concentración conocida por el método directo. La cuantificación de la proteína se verificó previamente a cada estudio de actividad enzimática.

3.4 Determinación de los parámetros cinéticos

La actividad de isomerasa de la TIM medida espectrofotométricamente en la dirección de gliceraldehído-3-fosfato (DGAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) fue determinada por el método que se basa en la medición de la velocidad de transformación del DGAP a DHAP, la cual se convierte a su vez a α -glicerofosfato por acoplamiento con la enzima α -glicerofosfato deshidrogenasa (α -GDH). La reacción acoplada consume un mol de NADH por mol de DHAP que reacciona. Con un exceso de α -GDH, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la velocidad de oxidación del NADH, la cual se mide por disminución de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon_{NADH}^{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Rozacky y col., 1971). La actividad enzimática se expresó en μ moles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$). El volumen total de reacción fue de 1.0 mL, conteniendo amortiguador C (TEA 100 mM, EDTA 10, pH 7.4, fuerza iónica de 0.16); 0.2 mM NADH; 0.019 mg α -GDH. Para determinar K_M^- y k_{cat}^- la concentración del DGAP se varió en un intervalo de concentraciones de 0.050 a 4.0 mM. La reacción se inició con la adición de TIM (3.0 ng de ScTIM o C126A y 15 ng en el caso de la mutante de Ser). Los ensayos se realizaron a 25 °C, regulando la temperatura de la celda mediante un baño de circulación de agua.

Los parámetros cinéticos para la reacción inversa (K_M^+ y k_{cat}^+) fueron determinados también por un ensayo acoplado a 25 °C utilizando 0.2–10 mM de DHAP como sustrato en un volumen de reacción de 0.7 mL, conteniendo amortiguador B; 1.0 mM de NAD; 4.0 mM de arsenato; 0.120 mM de DTT y 1 unidad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Hernández-Alcántara y col., 2002). Todos los reactivos utilizados fueron preparados con amortiguador C. La reacción fue iniciada con la adición de la TIM (25 ng para ScTIM y 50 ng para la C126S).

Los valores de actividad específica obtenidos a diferentes concentraciones de DGAP o DHAP fueron ajustados empleando la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 3.1).

$$v = \frac{V_{MÁX} [S]}{K_M + [S]} \quad (3.1)$$

donde v es la velocidad inicial, $V_{MÁX}$ la velocidad máxima, K_M la constante de Michaelis y $[S]$ la concentración de sustrato.

3.5 Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas a 25 °C en un espectrofluorómetro PC1 de ISS (Champaign, IL, USA) equipado con un portaceldas con camisa de circulación de agua y baño con termostato para el control de la temperatura. Todos los experimentos fueron hechos en amortiguador D (50 mM de TEA, 5 mM de EDTA, pH 7.4) filtrado antes de cada experimento, y una concentración inicial de TIM en la celda de 0.050 mg mL⁻¹. Las condiciones para la obtención de los espectros fueron las siguientes: longitud de onda de excitación de 280 nm, empleando un ancho de banda de 4 nm, y el intervalo de longitud de onda de la emisión fue entre 300 y 400 nm, con un ancho de banda de 16 nm.

3.6 Titulación fluorométrica

Esta técnica se basa en el cambio que sufre la fluorescencia intrínseca de la enzima al unir un ligando no fluorescente. El apagamiento de la fluorescencia en TIM se debe principalmente al Trp168, ubicado en el asa del sitio catalítico, que se aproxima al ligando cargado durante el movimiento de cerrado que sufre esta asa (Sampson y Knowles, 1992).

Las titulaciones se realizaron en las mismas condiciones utilizadas para la determinación de los espectros de fluorescencia (apartado 3.5), adicionando alícuotas sucesivas de una solución concentrada de 2-fosfoglicolato (PGA) para obtener concentraciones finales en un intervalo de concentraciones de 0.008–1.5 mM; el total del volumen adicionado fue siempre menor al 5% del volumen final. Después de cada adición la intensidad de fluorescencia (IF) se registró a 320 nm por 3 min y fue corregida restandole la IF del amortiguador, la excitación se mantuvo a 280 nm para cada adición de ligando. La ecuación 3.2 representa una función que relaciona la fluorescencia de una solución de proteína con la concentración total de inhibidor (x); se obtuvo a partir de la definición de K_I y de asumir que las IF de la enzima libre (F_E) y del complejo enzima-inhibidor (F_{EI}) son aditivas (ver Apéndice II).

$$Y = \left(\frac{a}{2E_t} \right) \left[(E_t + x + K_I) - \sqrt{(E_t + x + K_I)^2 - 4xE_t} \right] \quad (3.2)$$

donde $Y = 1 - F/F_t$, F es la fluorescencia de la solución de enzima con inhibidor, F_t la fluorescencia de la proteína sin inhibidor, $a = 1 - F_{EI}/F_E$, la constante de apagamiento (valor asintótico al cual tiende Y a altos valores de x), K_I la constante de disociación del complejo

enzima-inhibidor, E_t la concentración total de sitios de unión y x es la concentración total de inhibidor en la celda.

El ajuste de los datos experimentales con esta ecuación mediante una regresión no lineal, usando el programa Origin (MicroCal, Inc. Northampton, MA, USA), permitió determinar simultáneamente el valor de los parámetros K_t , E_t y a . Finalmente, para calcular la constante de unión (K_u), sacamos el inverso del valor de K_t .

3.7 Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)

Esta técnica se basa en la medición del calor liberado o absorbido cuando se titula con un reactivo una solución que contiene las otras sustancias necesarias para la reacción, a temperatura constante, por lo que las interacciones proteína-ligando pueden ser estudiadas por este método.

El procedimiento es el siguiente, antes de iniciar el experimento todos los componentes del calorímetro están en equilibrio térmico y con la primera inyección del ligando la solución de proteína exhibe efectos de calor creados por la dilución y la asociación proteína-ligando. El flujo de calor entre la celda y el sumidero de calor es medido por detectores térmicos, generándose un voltaje de salida (monitoreado por una computadora) que es directamente proporcional a la diferencia de temperatura a través de las caras de los detectores térmicos. Esta diferencia de temperatura, a su vez, es proporcional a la potencia térmica (velocidad de transferencia de calor (cal s^{-1})) entre la celda y el sumidero de calor. En la ausencia de compensación de potencia, el área bajo la curva de esta velocidad de transferencia de calor es el calor total de reacción producido en la celda por la inyección.

Para los experimentos de CTI se empleó un calorímetro de titulación VP-ITC (Microcal, Inc.) que es capaz de medir calores de asociación del orden de las microcalorías. Las soluciones de la ScTIM y sus mutantes fueron dializadas exhaustivamente contra amortiguador D, filtradas y desgasificadas con agitación y al vacío; posteriormente se les cuantificó la concentración de proteína por el método directo. La concentración final de TIM en la celda del calorímetro varió en el intervalo de 0.022 a 0.095 mM de monómeros. La titulación se realizó empleando una solución concentrada de PGA (1.5 o 3.0 mM) y una secuencia automatizada de 25 o 28 inyecciones consecutivas de 3.0–8.0 μL , con un intervalo de tiempo de 4 min entre cada inyección. Para determinar el calor de dilución del inhibidor, se

tituló con PGA amortiguador bajo idénticas condiciones que para las soluciones de TIM. Estos valores fueron restados de los calores medidos para la unión de la enzima con el inhibidor. La entalpía de unión (ΔH_u), K_u y el número de sitios (n) fueron determinados por una regresión no lineal de los datos de la titulación normalizados usando la expresión que corresponde al modelo de sitios de unión idénticos e independientes (Ec. 3.3) (Wiseman y col., 1989).

$$\frac{1}{V_o} \left(\frac{dQ}{dX_{tot}} \right) = \Delta H_u \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - ((1+r)/2) - (X_r/2)}{(X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \right] \quad (3.3)$$

donde X_{tot} es la concentración total de ligando, V_o el volumen de la celda de reacción, Q el calor absorbido o liberado, ΔH_u el calor molar de unión, $X_r = X_{tot}/M_{tot}$, $1/r = c = M_{tot} K_u$, M_{tot} es la concentración total de proteína y K_u es la constante de unión.

El proceso de asociación de la enzima con un inhibidor ($E + I \leftrightarrow EI$) puede describirse mediante la ecuación 3.4:

$$K_u = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (3.4)$$

donde K_u es la constante de equilibrio de unión, $[E]$ es la concentración de enzima libre, $[I]$ es la concentración del inhibidor libre y $[EI]$ es la concentración del complejo enzima-inhibidor. Determinándose K_u , puede determinarse la energía libre de unión (Ec. 3.5)

$$\Delta G_u = -R T \ln K_u \quad (3.5)$$

donde ΔG_u es la energía libre estándar de unión, R la constante general de los gases y T la temperatura absoluta. Una vez que se han determinado ΔH_u y ΔG_u , el cambio de entropía puede calcularse a partir de la siguiente relación termodinámica:

$$\Delta G_u = \Delta H_u - T\Delta S_u \quad (3.6)$$

donde ΔS_u es la entropía de unión.

3.8 Método cinético

La K_I fue calculada para ScTIM y las mutantes C126A y C126S utilizando el protocolo descrito para determinar los parámetros cinéticos con el sustrato DGAP, en presencia del inhibidor competitivo PGA, cuya concentración fue la misma para las tres enzimas (25 μM). Los datos de actividad específica en ausencia y en presencia del inhibidor fueron ajustados utilizando la ecuación 3.1, obteniendo de esta manera los valores de K_M , $V_{MÁX}$ y $K_{M,ap}$ (K_M aparente (en presencia del inhibidor)). Dichos valores se utilizaron para determinar la K_I mediante la ecuación 3.7.

$$K_{M,ap} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (3.7)$$

Esta ecuación es válida para todas las enzimas que obedecen la ecuación de Michaelis-Menten en presencia de un inhibidor competitivo (Fersht, 1999).

3.9 Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)

La técnica de dicroísmo circular (DC) es ampliamente usada en estudios de estabilidad de las proteínas. Se basa en la actividad óptica que muestran los enlaces peptídicos en el UV lejano (180-250 nm) y en el entorno asimétrico de los aminoácidos aromáticos detectado en el UV cercano (250-300 nm).

Las soluciones de ScTIM y sus mutantes de Cys126 fueron dializadas contra amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, 1.0 mM EDTA, pH 7.4. Se obtuvieron los espectros de las tres enzimas mencionadas en la región del UV lejano (250–190 nm) a 20 °C y en el UV cercano (330–245 nm) con un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc. Easton, MD) equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura y agitación magnética. La concentración de las soluciones de TIM fue de 0.10 mg mL⁻¹ contenidas en una celda de 0.100 cm de recorrido óptico para el UV lejano y 1.3 mg mL⁻¹ en una celda de 1.00 cm de recorrido óptico para el UV cercano. Cada espectro fue el promedio de tres barridos consecutivos y fueron corregidos restándoles la señal del amortiguador. Para el UV lejano la elipticidad molar $[\theta]$ por residuo se calculó utilizando una masa de 110 gramos por mol de

residuo de aminoácido. Para los espectros en el UV cercano se calculó la elipticidad molar de la enzima.

Las transiciones de desplegamiento y replegamiento térmicas fueron seguidas monitoreando los cambios de elipticidad a 220 nm, mientras que la temperatura de la muestra cambiaba a razón de 2.0 °C min⁻¹; la velocidad de calentamiento o enfriamiento fue controlada por medio del accesorio Peltier. La concentración de la solución de TIM, contenida en una celda de 1.00 cm de recorrido óptico, con agitación continua, fue de 0.010 mg mL⁻¹. Las transiciones de replegamiento se iniciaron una vez que la de desplegamiento finalizó.

3.10 Cinéticas de desplegamiento

Las cinéticas de desplegamiento de las mutantes C126S y C126A fueron realizadas siguiendo el protocolo reportado por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001). En una celda de 1.00 cm de recorrido óptico, conteniendo amortiguador (50 mM Tris, pH 8.5) previamente equilibrado a la temperatura de trabajo y con agitación constante, se adicionó una alícuota de una solución concentrada de la enzima mutante en turno, entonces se monitorearon los cambios de elipticidad a 220 nm con respecto al tiempo. Algunos experimentos se realizaron a pH 7.4 en amortiguador de Tris 20 mM. Los datos cinéticos fueron ajustados a una ecuación de decaimiento exponencial simple:

$$\theta_t = \theta_f + (\theta_o - \theta_f) \exp(-k_d t) \quad (3.8)$$

donde θ_t es la elipticidad medida al tiempo t , θ_f es el valor de la elipticidad final, θ_o representa el valor correspondiente al tiempo cero y k_d es la constante de velocidad de desnaturalización.

3.11 Cinéticas de replegamiento

Las cinéticas de replegamiento de las mutantes fueron efectuadas de acuerdo al procedimiento reportado por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001). La enzima primero fue calentada a 51 °C (C126S) o a 56 °C (C126A) durante 90 s, tiempo suficiente para desnaturalizarla más del 95%. Entonces la temperatura en el portaceldas tipo Peltier se ajustó 3.0 °C debajo de la requerida para la cinética en turno, lo que permitió un rápido enfriamiento de la solución enzimática (aproximadamente 15 °C min⁻¹). Cuando se estuvo 0.5 °C por arriba

del valor deseado, la temperatura del portaceldas se fijó a aquella requerida para el experimento. Los datos cinéticos se ajustaron a una ecuación de una reacción de segundo orden:

$$\theta_t = \theta_f + (\theta_o - \theta_f) / (2 C_o k_r t + 1) \quad (3.9)$$

donde C_o es la concentración molar total de monómeros de TIM, k_r es la constante de velocidad de replegamiento, los otros parámetros ya fueron definidos en la sección anterior. La concentración de monómeros se varió en un intervalo de 0.56 a 1.9 μM (15.1 a 51.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Los experimentos se llevaron a cabo en Tris 50 mM, pH 8.5 o en amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.4.

3.12 Digestión proteolítica

Las proteasas utilizadas fueron: subtilisina BPN', papaína, tripsina y quimotripsina. Previo a los experimentos se les determinó la actividad por el método de degradación de caseína (Arnon, 1970; Ottesen and Svendsen, 1970; Banett y col., 1998).

Primeramente se hicieron las digestiones proteolíticas empleando ScTIM y subtilisina, que es capaz de degradar a la TIM (Sun y col., 1993; Velanker y col., 1997; Ray y col., 1999; Reyes-Vivas y col., 2002) para establecer las condiciones de trabajo con las mutantes C126S y C126A. Se ensayaron diferentes relaciones molares TIM:subtilisina (100:1, 500:1 y 1000:1) a dos temperaturas, 30 y 37 °C. Se analizó el grado de proteólisis a tiempos cortos (0, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 min) y tiempos largos (1, 3, 7, 9, 12 y 24 h). La digestión proteolítica de la TIM se efectuó incubando a la ScTIM en amortiguador C, en un volumen total de reacción de 0.020 mL. La reacción fue detenida por dos procedimientos:

1) Como se ha reportado en la mayoría de los trabajos con TIM: adicionando la solución digestora (que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, mercaptoetanol y azul de bromofenol) en una relación 1:1 y poniendo la mezcla a baño maría en ebullición por 5 minutos.

2) Adicionando PMSF a una concentración final de 2–3 mM e incubando nuevamente por 10 min, aproximadamente, previo a la adición de la solución digestora (Reyes-Vivas y col., 2002).

Las muestras se analizaron por electroforesis en presencia de SDS en geles de poliacrilamida al 20%.

3.13 Efecto de la dilución en la estabilidad de la ScTIM y sus mutantes de Cys126

Las enzimas mutantes fueron incubadas en un intervalo de concentraciones de 0.001–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y la ScTIM de 0.001 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por duplicado, en regulador B a 25 °C. Se determinó la fracción de enzima dimérica cada 24 h por medio de la actividad enzimática, debido a que solamente esta forma es activa.

Un segundo experimento consistió en incubar 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la mutante C126S tanto en regulador B como en Tris 20 mM, pH 7.4, por triplicado, a 25 °C. En ambos casos se determinó la actividad enzimática cada 24 h. Conjuntamente se obtuvieron los espectros de DC en el UV lejano a 25 °C, sólo para la solución enzimática disuelta en Tris debido a que el regulador de trietanolamina presenta un blanco muy ruidoso.

La actividad catalítica de las enzimas en la dirección de DGAP a DHAP se siguió espectrofotométricamente como se detalló en el apartado 3.4 de este capítulo; en el caso de ScTIM y C126A se utilizaron 3.0 y 1.0 ng mL^{-1} y para la mutante de Ser se manejaron 15 ng mL^{-1} ó 10 ng mL^{-1} .

3.14 Simulación de la dinámica molecular de ScTIM y sus mutantes de Cys 126

La simulación de la dinámica molecular por computadora es una herramienta útil para observar el movimiento natural de una posición del sistema o de una estructura completa, a través del cálculo de la influencia que cada átomo tiene sobre todos los demás átomos presentes, con respecto al tiempo. En la simulación de macromoléculas como las proteínas, cada átomo se considera una esfera y su interacción con el resto de los átomos está descrita a través de un modelo clásico llamada Campo de Fuerzas que distingue dos tipos de contribuciones a la energía potencial de la molécula, las interacciones covalentes y no covalentes, permitiendo determinar la energía de cada conformación que la proteína adquiera a través de la suma de las contribuciones de la distorsión de cada uno de los ángulos, enlaces y torsiones alrededor de enlaces, así como las interacciones van der Waals, electrostáticas y de enlaces de hidrógeno de la molécula. En el presente trabajo se empleó el programa Biograf (Molecular Simulations, Inc.) para la visualización, la modificación y la simulación de las

estructuras de TIM. Se utilizó una computadora Silicon Graphics Índigo 2 con procesador R4000. La optimización de la geometría y los cálculos de dinámica molecular hicieron uso del campo de fuerzas Dreiding II (Mayo y col., 1990).

3.14.1 Generación de las mutantes C126A y C126S *in silico*

A la estructura de TIM de levadura a 1.9 Å de resolución (1ypi) depositada en el PDB (Protein Data Bank www.pdb.org) se le añadieron todos los hidrógenos, dada que el archivo no los contiene, por lo que fue necesaria la optimización global de la molécula para asegurar que los nuevos átomos mantuvieran posiciones relajadas. Tomando como base esta estructura se procedió a la construcción de las enzimas mutantes realizando modificaciones sobre la cadena lateral del residuo Cys126 de cada subunidad.

La construcción de las mutantes se realizó utilizando un editor del programa Biograf llamado Build. Para la C126S se requirió el reemplazo de un átomo de azufre y su enlace para construir un grupo hidroxilo. Por otro lado, la mutante C126A se obtuvo al eliminar el átomo de azufre y su enlace. Después de cada mutación se realizaron varios ciclos de minimización de energía locales, es decir, sobre la cadena lateral del residuo 126, y posteriormente minimizaciones globales para eliminar las tensiones excesivas en las moléculas y prepararlas de este modo para la simulación molecular.

3.14.2 Simulación de la dinámica molecular

El objetivo de la simulación fue observar los cambios en el comportamiento de los átomos cercanos al sitio activo, principalmente el Glu165 y la His95, debido a la mutación de la Cys126. Para los cálculos de dinámica molecular fueron consideradas todas las moléculas de agua presentes en el archivo cristalográfico original para evaluar la influencia de éstas sobre la movilidad de los grupos de interés en cada una de las enzimas estudiadas. A fin de analizar eficientemente los efectos locales de las mutaciones sobre la geometría de la molécula se decidió declarar móviles a los átomos de la zona de interés y a aquellos que se encontraran en una vecindad de 10 Å. La temperatura elegida en los cálculos de dinámica molecular fue 300 K para observar movimiento a la temperatura ambiente. El incremento de tiempo seleccionado fue de 1 femtosegundo para simular adecuadamente las oscilaciones de los átomos más ligeros. Con la finalidad de analizar los cambios conformacionales de cada proteína se

respaldaron las geometrías resultantes cada 5000 femtosegundos en las tres simulaciones. Todos los cálculos fueron hechos en vacío y los efectos del solvente fueron introducidos a través de una constante dieléctrica dependiente de la distancia que simula el apantallamiento de las interacciones electrostáticas por parte del agua. La evolución de la dinámica molecular fue monitoreada por medio de la elaboración de una gráfica de energía potencial en función del tiempo.

4. RESULTADOS

4.1 Expresión y purificación de las enzimas mutantes

Las mutantes de Cys126 fueron purificadas a homogeneidad, sin embargo, se observó que los cultivos de *E. coli*, que contienen el plásmido para la expresión de C126A o C126S, crecieron más lentamente con respecto a los cultivos bacterianos que expresan a la ScTIM. En cuanto al rendimiento de las enzimas mutantes, fueron mucho menores que el observado para la ScTIM: 3.0 y 1.0 mg por litro de cultivo (en promedio) para la mutante de Ser y Ala, respectivamente, comparado con 13 mg por litro de cultivo para la enzima del tipo silvestre.

4.2 Propiedades estructurales de las enzimas mutantes

Se pudo constatar que la mutación no provocó alteraciones significativas en las estructuras secundaria y terciaria. Lo anterior quedó evidenciado al comparar los espectros de DC en el UV lejano (Fig. 4.1A) y de fluorescencia (Fig. 4.1B) de las tres enzimas citadas. Algo similar se observó con los espectros de DC en el UV cercano (Fig. 4.1A) de la ScTIM y la C126S, ya que ambos fueron superponibles.

4.3 Catálisis

Los parámetros cinéticos de las enzimas mutantes, obtenidos con DGAP como sustrato (K_M^- y k_{cat}^-), sufrieron una disminución respecto a los mostrados por la ScTIM; dicho cambio fue más significativo en el caso de la C126S. Sin embargo, la eficiencia catalítica (k_{cat}^- / K_M^-) de las tres enzimas es semejante debido a un efecto compensatorio entre el aumento de la afinidad por el sustrato y la disminución en k_{cat}^- (Tabla 4.1). Cabe mencionar que los valores de k_{cat}^- / K_M^- a 37 °C, fueron muy parecidos a los obtenidos a 25 °C (Tabla 4.1).

Los parámetros cinéticos con DHAP (k_{cat}^+ y K_M^+) también fueron menores para el caso de la mutante de Ser, en este caso, la eficiencia catalítica disminuyó en un 50% como resultado de la mutación (Tabla 4.1).

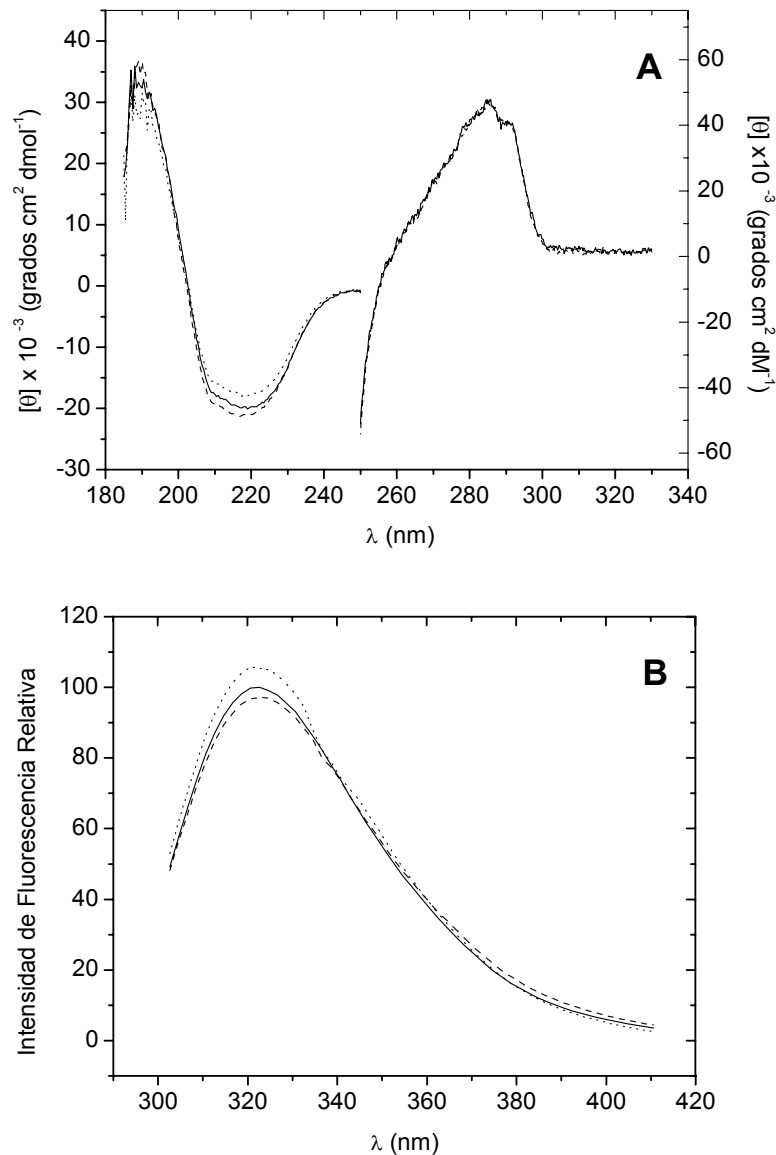


Figura 4.1. Propiedades espectroscópicas de ScTIM y sus mutantes de Cys126. Espectros de DC en las regiones del UV lejano y UV cercano (A), así como los de fluorescencia (B) de ScTIM (—), C126S (- - -) y C126A (.....). Los espectros de DC en las regiones del UV cercano y UV lejano fueron obtenidos a 20 °C, en regulador de fosfato de sodio 10 mM, 1.0 mM EDTA, pH 7.4. Se utilizaron soluciones de TIM a una concentración de 0.100 mg mL⁻¹ contenidas en celdas de 0.100 cm de recorrido óptico (UV lejano) y 1.3 mg mL⁻¹ contenidas en celdas de 1.00 cm de recorrido óptico (UV cercano). Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos a 25 °C usando soluciones de TIM de concentración de 0.050 mg mL⁻¹ en regulador de TEA 50 mM, EDTA 5.0 mM, pH 7.4.

Parámetros cinéticos (25 °C)	ScTIM	C126A	C126S
k_{cat}^- (s ⁻¹) ^a	4.7 (0.7) x 10 ³	3.1 (0.2) x 10 ³	1.1 (0.2) x 10 ³
K_M^- (mM)	1.1 (0.4)	0.8 (0.3)	0.3 (0.1)
(k_{cat}^- / K_M^-) (s ⁻¹ M ⁻¹)	4.3 x 10 ⁶	3.9 x 10 ⁶	3.7 x 10 ⁶
k_{cat}^+ (s ⁻¹) ^b	0.5 (0.01) x 10 ³	nd ^c	0.06 (0.01) x 10 ³
K_M^+ (mM)	2.1 (0.16)	nd ^c	0.6 (0.03)
(k_{cat}^+ / K_M^+) (s ⁻¹ M ⁻¹)	2.2 x 10 ⁵	—	1.0 x 10 ⁵
Parámetros cinéticos (37 °C)	ScTIM	C126A	C126S
k_{cat}^- (s ⁻¹) ^a	5.6 (0.5) x 10 ³	4.1 (0.5) x 10 ³	1.4 (0.3) x 10 ³
K_M^- (mM)	1.2 (0.4)	1.0 (0.3)	0.35 (0.1)
(k_{cat}^- / K_M^-) (s ⁻¹ M ⁻¹)	4.7 x 10 ⁶	4.1 x 10 ⁶	4.0 x 10 ⁶

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos para la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Los parámetros cinéticos fueron determinados en regulador de 100 mM TEA, 10 mM EDTA, pH 7.4 a 25 °C. Las concentraciones de los sustratos, DGAP y DHAP, variaron entre 0.05–4.0 mM y 0.02–10 mM, respectivamente. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis. ^aEl superíndice (-) indica D-gliceraldehido 3-fosfato como sustrato. ^bEl superíndice (+) indica dihidroxiacetona fosfato como sustrato. ^cNo determinado.

4.4 Parámetros de unión con el PGA

Los parámetros de la unión de PGA por ScTIM y sus mutantes de Cys126 fueron determinados por medio de las técnicas de titulación fluorométrica y calorimetría de titulación isotérmica, a 25 °C.

4.4.1 Titulación fluorométrica

En la figura 4.2 se presentan los espectros de fluorescencia para la ScTIM en ausencia y presencia del inhibidor PGA (con un grado de saturación de 0.76) y la diferencia entre ambos

espectros. La intensidad de la fluorescencia disminuye cuando la enzima se une con el análogo del sustrato, lo cual también se observó para el caso de las mutantes de Cys126. Tal efecto permitió la determinación de la K_I por titulación fluorométrica.

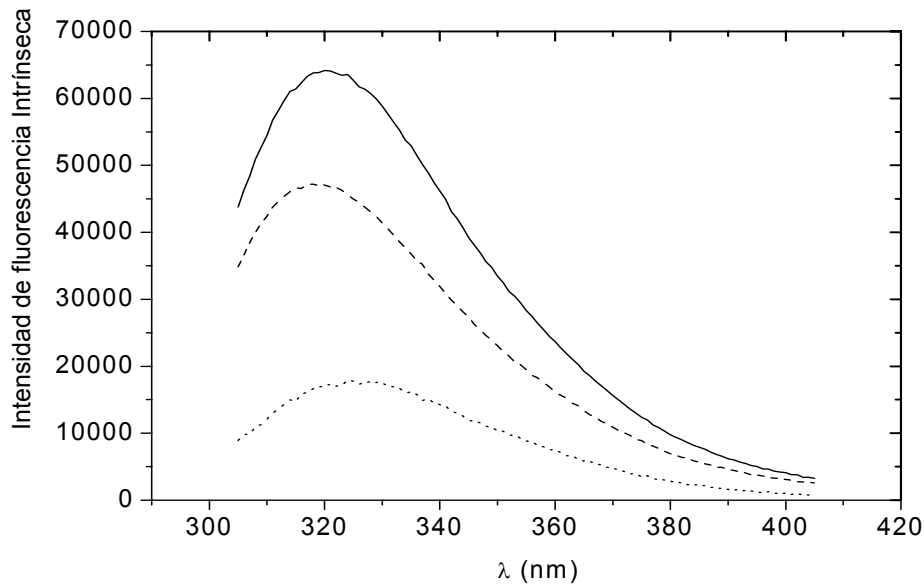


Figura 4.2. Espectros de Intensidad de Fluorescencia de la ScTIM. Los espectros de intensidad de fluorescencia intrínseca para la ScTIM en ausencia de PGA (—), saturada al 76 %, aproximadamente, con PGA (- - -) y la diferencia entre ambos espectros (.....) fueron obtenidos en amortiguador de TEA 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.4 a 25 °C.

La figura 4.3 muestra la isoterma de unión de la C126S con el PGA construida a partir de los datos de la titulación fluorométrica y el ajuste con la ecuación 3.2. Del promedio de cinco experimentos se obtuvo el valor de K_I que se utilizó para calcular K_u de cada enzima (ScTIM, C126S y C126A; tabla 4.2). Los datos muestran que las enzimas mutantes C126A y C126S son más afines por el análogo del sustrato, siendo la mutante de Ser la que muestra la mayor afinidad, lo que concuerda de alguna manera con la disminución en la K_M observada para esta mutante.

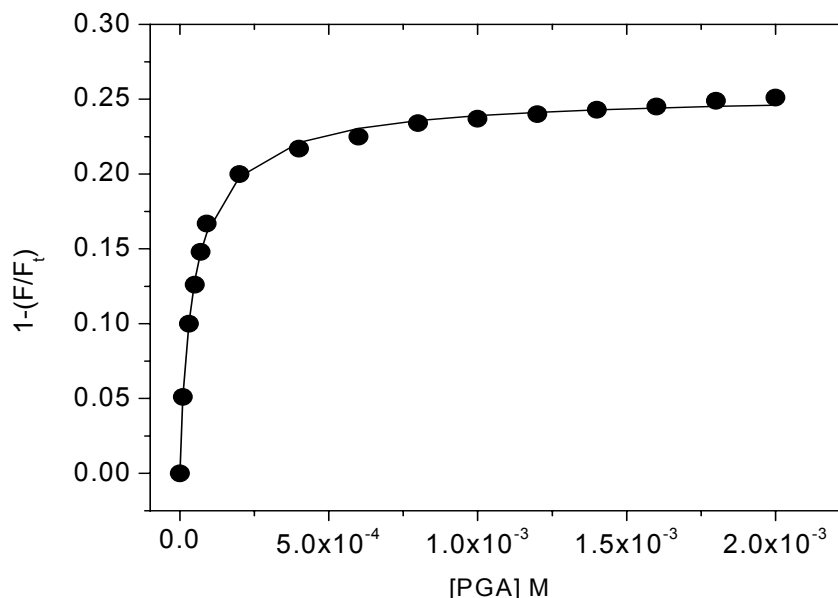


Figura 4.3. Curva de titulación fluorométrica obtenida para la mutante C126S. Cada valor de la titulación fluorométrica ($\lambda_{\text{excitación}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 320 \text{ nm}$) (●) fue obtenido a partir del promedio de la intensidad de fluorescencia obtenida a partir de cinéticas de 3 min, después de la adición de una alícuota de una solución concentrada de PGA. La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales.

4.4.2 Calorimetría de titulación isotérmica

La figura 4.4A muestra los datos sin procesar, generados por la titulación de C126S con PGA. Del sentido de los pico se puede decir que la interacción TIM-PGA es un proceso exotérmico. Los valores fueron corregidos por el calor de dilución del ligando, procesados con un programa computacional y finalmente ajustados utilizando la ecuación 3.3 (Fig. 4.4B). De esta manera se obtuvieron los valores de K_u y de ΔH_u (Tabla 4.2). Se siguió un procedimiento similar para la C126A y ScTIM. Cabe mencionar que los valores son el promedio de dos experimentos realizados en cada caso.

Los valores de K_u demostraron que el cambio de Cys por Ala o Ser aumenta la afinidad por el PGA, lo que concuerda con los datos de K_u obtenidos por fluorescencia y los valores de K_M . Finalmente, se puede decir que la asociación del PGA a la TIM es un proceso entálpicamente dirigido y entrópicamente menos desfavorable para las enzimas mutantes.

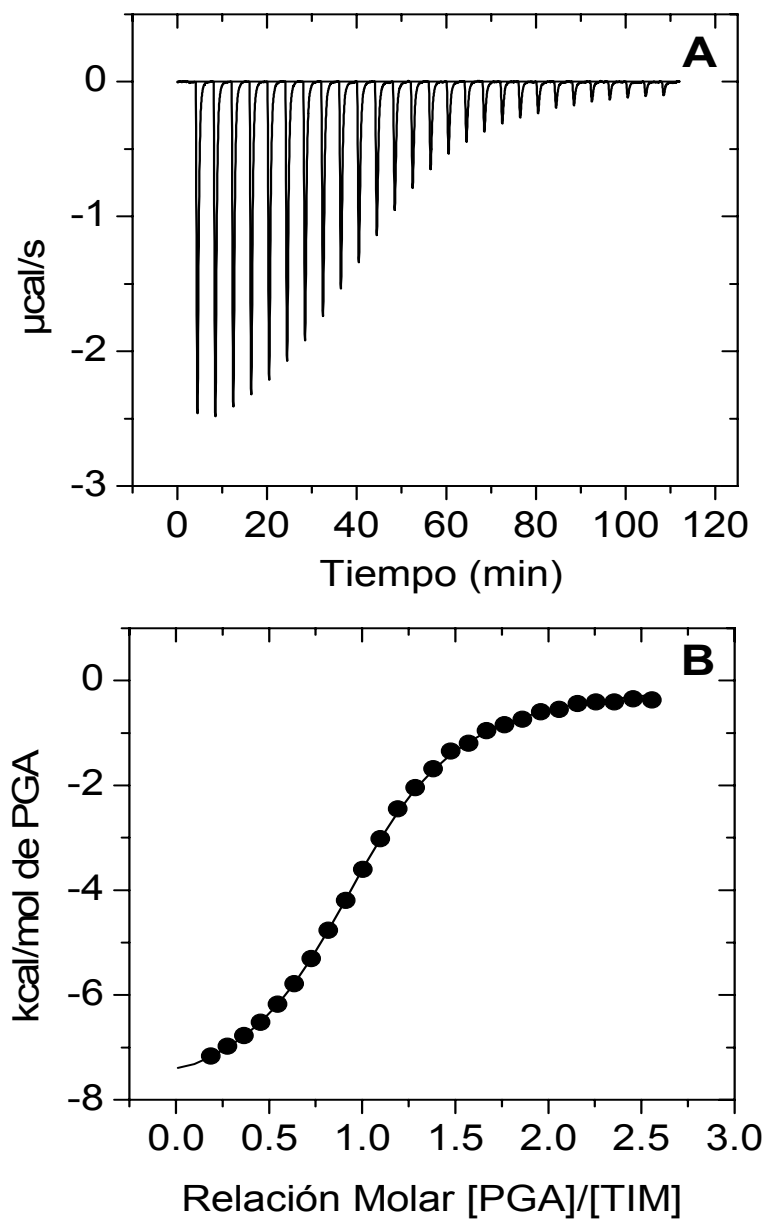


Figura 4.4. Calorimetría de titulación isotérmica para la mutante C126S titulada con PGA. En el panel (A) se muestran los datos obtenidos de la titulación calorimétrica de una solución de C126S 95 μM , con 27 inyecciones de 8.0 μL de 1.5 mM de PGA. En el panel (B) los símbolos son los valores que corresponden al calor liberado durante cada adición del inhibidor, normalizado por la cantidad de PGA adicionado. La línea continua representa el ajuste calculado con un modelo de sitios de unión idénticos e independientes. La titulación fue hecha a 25 $^{\circ}\text{C}$, en TEA 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.4.

4.4.3 Método cinético

Debido a que los valores de la K_u obtenidos por titulación fluorométrica fueron diferentes respecto a los obtenidos por CTI se decidió determinar este parámetro por un tercer método para descartar que tal diferencia fuera debida a la concentración empleada en cada uno de ellos: 0.05 mg mL⁻¹ y 0.7–2.0 mg mL⁻¹ para fluorescencia y CTI, respectivamente.

En el método cinético se utilizaron concentraciones de proteína del orden de los nanogramos por mililitro y los valores de K_u obtenidos fueron más parecidos a los datos de CTI (Tabla 4.2) con lo que se constató que la diferencia entre los valores arrojados por cada método no depende de las concentraciones de proteína utilizadas.

Parámetros de unión	ScTIM	C126A	C126S
K_u (M ⁻¹) ^a	2.6 (0.5) x 10 ⁴	3.6 (0.6) x 10 ⁴	5.2 (1.1) x 10 ⁴
K_u (M ⁻¹) ^b	4.5 (0.4) x 10 ⁴	1.0 (0.5) x 10 ⁵	1.3 (0.2) x 10 ⁵
K_u (M ⁻¹) ^c	4.1 (0.4) x 10 ⁴	1.1 (0.5) x 10 ⁵	1.2 (0.2) x 10 ⁵
ΔG_u° (kcal mol ⁻¹)	-6.3 (0.3)	-6.9 (0.3)	-6.9 (0.1)
ΔH_u° (kcal mol ⁻¹)	-8.2 (0.8)	-8.5 (0.5)	-8.1 (0.5)
$T\Delta S_u^\circ$ (kcal mol ⁻¹)	-1.9 (0.8)	-1.6 (0.5)	-1.2 (0.1)

Tabla 4.2. Parámetros de unión de TIM y sus mutantes Cys126. La constante de unión (K_u) de ScTIM y las enzimas mutantes C126A y C126S por el PGA fueron determinadas por titulación fluorométrica y calorimetría de titulación isotérmica (CTI) en regulador de TEA 50 mM con EDTA 5 mM, pH 7.4 a 25 °C. Adicionalmente se realizaron cinéticas enzimáticas en TEA100 mM con EDTA 10 mM, pH 7.4 a 25 °C, manteniendo constante la concentración de inhibidor y variando la concentración del sustrato, DGAP. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis. ^aDeterminada fluorométricamente. ^bDeterminada por un método cinético. ^cDeterminada calorimétricamente. Se muestran también los parámetros termodinámicos obtenidos por CTI.

4.5 Transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento

Siguiendo el cambio en la señal de la elipticidad de la solución enzimática a 220 nm en función de la temperatura ($2.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$), se obtuvieron las curvas de desplegamiento–replegamiento para las tres enzimas en estudio (Fig. 4.5). En todos los casos se observó la histéresis reportada en un trabajo previo sobre ScTIM (Benítez-Cardoza y col., 2001). Cabe mencionar que ambas mutantes después de un ciclo de calentamiento y enfriamiento, solamente recuperaron del 65 al 70% de la estructura nativa, a juzgar por sus espectros de DC y por la actividad enzimática recuperada después del enfriamiento; en estas condiciones la ScTIM se replegó más del 95% (Benítez-Cardoza y col., 2001).

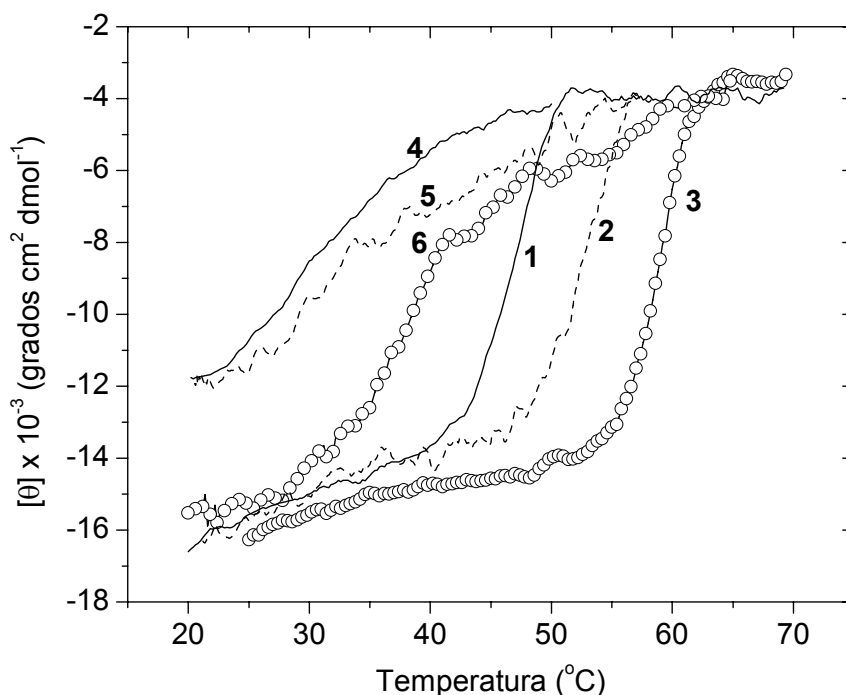


Figura 4.5. Transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Todas las transiciones térmicas fueron obtenidas a una velocidad de calentamiento o enfriamiento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a pH 8.5 en regulador de Tris 50 mM: curvas 1 y 4, C126S; curvas 2 y 5, C126A; y curvas 3 y 6, ScTIM. Las transiciones fueron monitoreadas siguiendo la señal de elipticidad a 220 nm. La concentración de las soluciones enzimáticas fue de 0.010 mg mL^{-1} contenidas en una celda de 1.00 cm de recorrido óptico, con agitación constante. Las transiciones de replegamiento se iniciaron una vez que la desnaturalización fue total.

Asimismo, quedó de manifiesto que en ambas enzimas mutantes la T_m aparente (temperatura media de transición) fue menor. La mutación de Cys a Ser desestabilizó más a la TIM disminuyendo 13 °C la T_m aparente. Benítez-Cardoza y colaboradores (2001) reportaron que para la ScTIM la T_m aparente fue poco afectada en un intervalo de pH de 7.2–9.1; en el caso de las mutantes de Cys126 el cambio del pH de 7.4 a 8.5 disminuyó la T_m aparente en 1.8 °C.

Debido a que las transiciones térmicas están lejos de representar una condición de equilibrio, no se pudo hacer un análisis tradicional de los datos para cuantificar el efecto desestabilizante de la mutación. Por lo anterior, determinamos las constantes cinéticas para la desnaturalización y el replegamiento de las mutantes de Cys126. La comparación de nuestros datos cinéticos con los reportados para la ScTIM por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001) nos permitió obtener una estimación de la estabilidad relativa de las enzimas mutantes.

Es importante señalar que de todos los lotes de las enzimas mutantes purificados para la realización del presente trabajo, exclusivamente aquéllos que después de la cromatografía de intercambio iónico, pH 8.0, se dializaron inmediatamente contra el amortiguador de almacenamiento (pH 7.4) fueron capaces de replegarse.

4.6 Cinéticas de desplegamiento

Para realizar las cinéticas de desplegamiento se escogieron algunos valores de temperatura en la región de la transición térmica. El desplegamiento térmico en función del tiempo, a una temperatura dada, se estudió monitoreando los cambios en la elipticidad a 220 nm. En la figura 4.6 se muestran las cinéticas de desplegamiento para la C126S a diferentes temperaturas. Los datos experimentales se ajustaron bien a una cinética de primer orden (Ec. 3.8) obteniéndose de esta manera los valores de la constante de velocidad (k_d) de ambas mutantes para este proceso.

Con los valores de k_d determinados a diferentes temperaturas se construyó el gráfico de $\ln(k_d/T)$ contra $(1/T)$ (Fig. 4.7) que representa a la ecuación de Eyring:

$$\ln(k_d/T) = \ln E + \Delta S^{N \rightarrow ET}/R - (\Delta H^{N \rightarrow ET}/R) (1/T) \quad (4.1)$$

donde E representa un factor preexponencial ($E = k_B/h$, donde k_B es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck); $\Delta H^{N \rightarrow ET}$ y $\Delta S^{N \rightarrow ET}$ representan los cambios de entalpía y entropía, respectivamente, que ocurren durante la formación del estado de transición (ET). En la figura 4.7 se puede apreciar inmediatamente que la enzima C126S nativa presenta mayor inestabilidad cinética, especialmente a baja temperatura.

Los ajustes lineales de los datos de la figura 4.7 mostraron que la mutación de Cys por Ser provoca una gran disminución en $\Delta H^{N \rightarrow ET}$ (Tabla 4.3). El efecto de esta mutación también fue estudiado a pH 7.4 (Tabla 4.3). El valor de $\Delta H^{N \rightarrow ET}$ aumentó ligeramente (7 kcal mol^{-1}), mientras que el valor de k_d (extrapolado a $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$) se redujo solamente 1.6 veces, con respecto a sus valores a pH 8.5.

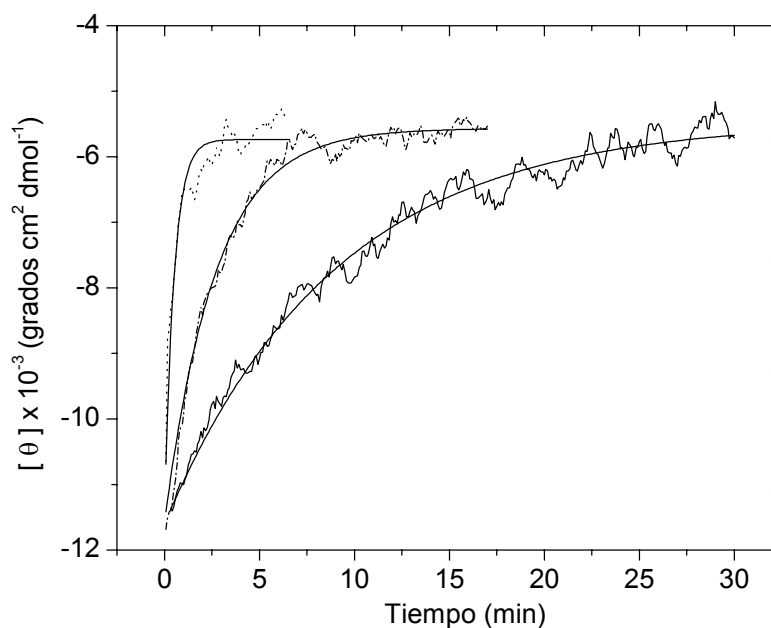


Figura 4.6. Cinéticas de desplegamiento de la C126S a diferentes temperaturas Las cinéticas mostradas corresponden a las siguientes temperaturas: $43.8 \text{ }^\circ\text{C}$ (—), $47.3 \text{ }^\circ\text{C}$ (- - -) y $51.9 \text{ }^\circ\text{C}$ (.....). Los cambios en la elipticidad de las soluciones enzimáticas, 0.010 mg mL^{-1} de enzima a pH 8.5 en regulador de Tris 50 mM, fueron seguidos a 220 nm y ajustados mediante la ecuación 3.8 (curvas suaves).

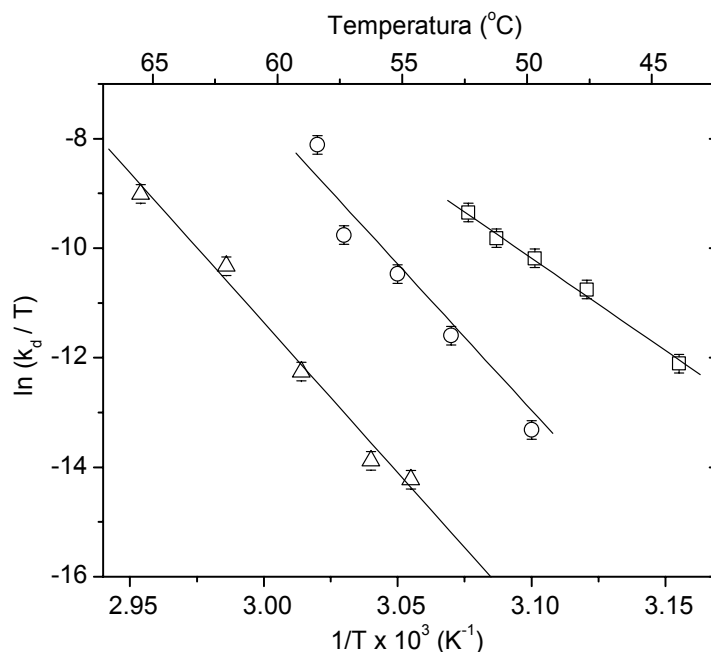


Figura 4.7: Gráfico de Eyring para la constante de desplegamiento (k_d) de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Las constantes cinéticas de desplegamiento fueron determinadas a pH 8.5 por DC en el UV lejano. Los datos mostrados corresponden a la ScTIM (8), C126S (□) y C126A (○). Para la primera los datos son los publicados por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001). Las líneas corresponden a las regresiones lineales obtenidas de acuerdo a la ecuación 4.1.

4.7 Cinéticas de replegamiento

Para lograr la recuperación de estructura secundaria durante el replegamiento, las soluciones de las enzimas mutantes fueron rápidamente desplegadas a altas temperaturas y del mismo modo fueron enfriadas (ver MATERIALES Y MÉTODOS, sección 3.11). La figura 4.8 muestra las cinéticas de replegamiento a 30 °C, para dos concentraciones de C126S. De las curvas cinéticas fue evidente la dependencia del tiempo de vida media con la concentración de proteína. La figura 4.9 muestra que la dependencia de la $t_{1/2}$ con la concentración es consistente con lo esperado para un reacción de segundo orden (esto es, $t_{1/2} = 1/(2 k_r C_o)$) con una constante de velocidad (k_r) de $3.3 \pm 0.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor concuerda adecuadamente con el obtenido para la k_r promedio ($3.7 \pm 0.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) determinado por el ajuste individual de las curvas a una cinética de segundo orden.

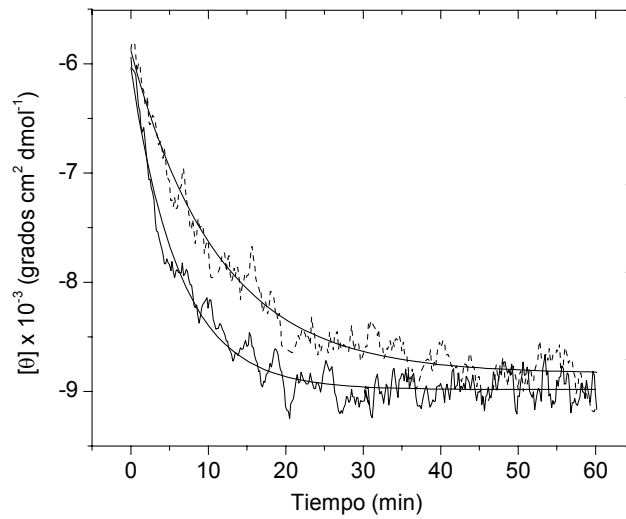


Figura 4.8. *Cinéticas de replegamiento de la C126S a 30 °C y dos diferentes concentraciones de enzima.* Los datos mostrados corresponden a 0.030 mg mL^{-1} (- - -) y 0.050 mg mL^{-1} (—), ambos en regulador de Tris 50 mM, pH 8.5. Las cinéticas fueron seguidas por los cambios en la elipticidad a 220 nm. Los datos fueron ajustados empleando la ecuación 3.9 (curvas suaves).

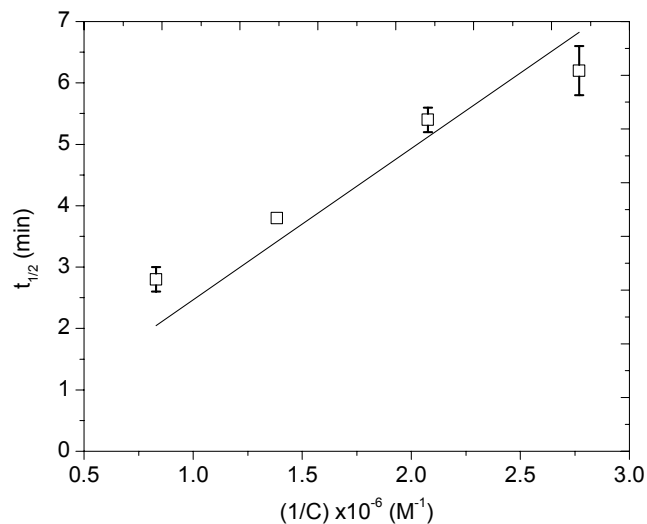


Figura 4.9. *Efecto de la concentración de proteína en el tiempo de vida media del replegamiento de la C126S.* Los datos experimentales fueron calculados a 30 °C, la concentración de las soluciones de la mutante de Ser estuvo en el intervalo de 0.56 y $1.9 \mu\text{M}$, expresada en términos de monómeros.

Los estudios de replegamiento de las enzimas mutantes fueron realizadas en un intervalo de temperaturas entre 23.0 y 36.5 °C, usando soluciones de concentraciones entre 0.020 y 0.040 mg mL⁻¹. Independientemente de la concentración de la proteína y la temperatura del experimento, el porcentaje de replegamiento fue aproximadamente del 60–65%, de acuerdo con los valores finales de $[\theta]_{220}$, mientras que la actividad enzimática (medida a 25 °C) recuperada fue del 60 al 70%. El hecho de que el grado de reversibilidad sea constante en el intervalo de condiciones mencionadas, sugiere que las especies desnaturalizadas irreversiblemente formadas durante el replegamiento no son importantes, pero sí lo son a altas temperaturas que es donde se lleva a cabo el desplegamiento. Así, en los cálculos de las constantes de velocidad de replegamiento asumimos que solamente el 65% de la proteína desnaturalizada se replegó, lo cual introdujo una pequeña corrección en los valores de k_r . La dependencia de la temperatura de k_r se muestra en la figura 4.10. Los gráficos de Eyring para las dos mutantes muestran la curvatura típica del proceso de replegamiento y del fenómeno de replegamiento–asociación (Benítez-Cardoza y col., 2001 y referencias ahí citadas). El ajuste de los datos a la ecuación de Eyring con una capacidad calorífica de activación ($\Delta C_p^{2D \rightarrow ET}$) finita fue hecho de acuerdo a la expresión:

$$\ln(k_r/T) = A - B(1/T) - (\Delta C_p^{2D \rightarrow ET}/R) \ln(1/T) \quad (4.2)$$

donde el valor de B , $B = (\Delta H_{T_r} - \Delta C_p^{2D \rightarrow ET} T_r)/R$, permite calcular la entalpía de activación a cualquier temperatura dada, T_r (Benítez-Cardoza y col., 2001). Para C126A el valor obtenido de $\Delta C_p^{2D \rightarrow ET}$ fue -6.9 ± 1.2 kcal mol⁻¹ K⁻¹, bastante cercano al valor de la ScTIM (-7.4 ± 1.7 kcal mol⁻¹ K⁻¹), mientras que para la C126S la capacidad calorífica de activación fue un poco menor (-6.0 ± 1.2 kcal mol⁻¹ K⁻¹). En la tabla 4.3 se muestran los valores máximos de k_r , alcanzados aproximadamente a 27 °C; en esta tabla también se muestran los valores de k_r para la ScTIM y C126S determinados en condiciones cercanas a las fisiológicas (pH 7.4, 36.5 °C).

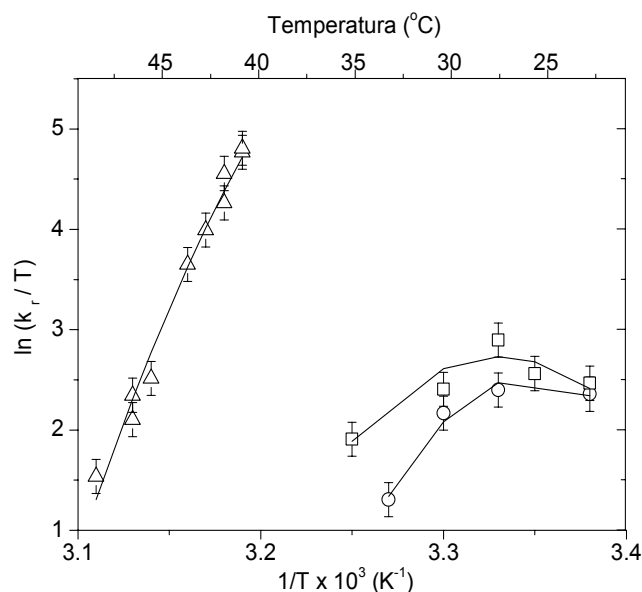


Figura 4.10. Grafico de Eyring para las constantes de velocidad de replegamiento (k_r) de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Las constantes cinéticas de replegamiento fueron determinadas de los experimentos de DC en la región del UV lejano a pH 8.5. Los datos mostrados corresponden a la C126S (\square), C126A (\circ) y ScTIM (\triangle). Estos últimos fueron tomados del trabajo de Benítez-Cardoza y colaboradores (2001). Las líneas corresponden a las curvas ajustadas con la ecuación 4.2.

pH 8.5	ScTIM ^a	C126S	C126A
$\Delta H^{N \rightarrow ET}$ (kcal mol ⁻¹)	114 (2)	68 (3)	101 (10)
k_d , 27 °C (s ⁻¹)	$2.1 (0.9) \times 10^{-11}$	$4.6 (1.3) \times 10^{-6}$	$5.0 (3.0) \times 10^{-9}$
$\Delta H^{2D \rightarrow ET}$, 27 °C (kcal mol ⁻¹)	43 (10)	≈ 0	≈ 0
k_r , 27 °C (s ⁻¹ M ⁻¹)	$5.0 (4.5) \times 10^4$	$5.3 (0.8) \times 10^3$	$3.3 (0.4) \times 10^3$
pH 7.4	ScTIM	C126S	
$\Delta H^{N \rightarrow ET}$ (kcal mol ⁻¹)	132 (5)	75 (2)	
k_d , 36.5 °C (s ⁻¹)	$7.2 (3.8) \times 10^{-9}$	$9.3 (2.0) \times 10^{-5}$	
k_r , 36.5 °C (s ⁻¹ M ⁻¹)	$8.0 (4.0) \times 10^4$	$2.3 (0.3) \times 10^3$	

Tabla 4.3. Parámetros cinéticos y termodinámicos de los procesos de desplegamiento-replegamiento de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Las constantes de velocidad fueron determinadas de las mediciones realizadas por medio de DC en la región del UV lejano a diferentes temperaturas. Los valores mostrados fueron obtenidos por determinación directa o por extrapolación a la temperatura indicada. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis. ^aLos valores para ScTIM, a pH 8.5, fueron tomados de los resultados reportados por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001).

4.8 Susceptibilidad a la proteólisis

La digestión proteolítica de ScTIM se realizó a 30 °C utilizando subtilisina en una relación molar 100:1, por 0, 8, 16, 32 y 48 h y fue detenida con PMSF previa a la adición de la solución digestora. A las 16 h se observaron indicios de proteólisis, los dos tiempos restantes mostraron el mismo patrón proteolítico. No se obtuvo una proteólisis total, lo que concuerda con lo reportado por Sun y colaboradores (1993) quienes trabajaron con TIM de levadura, del tipo comercial, y siempre observaron monómero residual en los geles.

Se hizo una digestión proteolítica en forma simultánea para la mutante de Ser y la ScTIM con subtilisina en una relación 100:1 a 30 °C por 0, 12, 24 y 48 h detenida con la adición de PMSF (Fig. 4.11). Observamos una sensibilidad a la proteasa similar entre ambas enzimas, lo que nos confirmó que la mutación no alteró sensiblemente la estructura de la TIM.

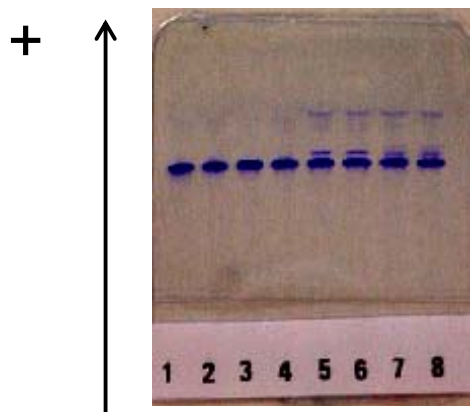


Figura 4.11. Patrón de proteólisis de las enzimas ScTIM y C126S incubadas con subtilisina. Ambas proteínas fueron incubadas en una relación molar TIM:subtilisina de 100:1 a 30 °C, en amortiguador de TEA100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4. La digestión proteolítica fue detenida con 3 mM de PMSF previo a la adición de la solución digestora. Los carriles con número impar corresponden a la ScTIM y los de número par a la C126S a los tiempos 0, 12, 24 y 48 h, respectivamente.

Por otro lado, es importante mencionar que cuando se detuvo la digestión proteolítica adicionando únicamente la solución digestora a diferentes relaciones molares de TIM con las proteasas subtilisina, papaína, quimotripsina o tripsina, la ScTIM y sus mutantes mostraron resistencia a las dos últimas proteasas, lo que concuerda con lo reportado por Sun y

colaboradores (1992). En la digestión de las TIMs con subtilisina o papaína se observó el mismo patrón de hidrólisis desde el tiempo muerto (tres segundos antes de adicionar la solución digestora) hasta las 24 h de incubación. Respecto a la subtilisina nos quedó claro que estos resultados fueron falsos positivos por lo observado en los experimentos anteriores. Para descartar que ocurriera lo mismo con la papaína, se hicieron experimentos parando la acción de la proteasa sobre TIM con metilmetano tiosulfonato (MMTS), previo a la adición de la solución digestora, encontrando que bajo estas condiciones la papaína no proteolizó a ninguna de las tres enzimas.

4.9 Efecto de la dilución en la estabilidad de la TIM y sus mutantes de Cys126

A todas las concentraciones ensayadas, las dos mutantes de Cys126 mostraron inestabilidad durante la incubación a 25 °C; se obtuvo en ambos casos una fase lag inicial, después de 20 días de incubación en ninguna de las concentraciones alcanzó el equilibrio, tendiendo a un mismo valor de actividad, 10% para la C126S y 50% para la C126A, aproximadamente (datos no mostrados). El aspecto relevante de este experimento fue el que a 25 °C la mutante de Ser fue la más inestable: a los once días la enzima perdió el 40% de actividad para el caso de la concentración de 10 ng mL⁻¹ mientras la ScTIM permaneció sin cambios apreciables aún a 1 ng mL⁻¹ (Fig. 4.12).

Los datos obtenidos para cada concentración de la mutante C126S fueron ajustados utilizando la ecuación 4.3, en dicho ajuste no se consideró la fase lag.

$$AE_t = (AE_o - AE_f)e^{-k_d t} + AE_f \quad (4.3)$$

donde AE_t es el porcentaje de actividad enzimática al tiempo t , AE_o es el porcentaje de actividad inicial (100%), AE_f es el porcentaje de actividad final y k_d es una constante cinética de primer orden. Los valores de k_d para las diferentes concentraciones de enzima oscilaron entre 1.0×10^{-6} y 1.3×10^{-6} , siendo similares a la k_d obtenida por extrapolación a 25 °C en el gráfico de Eyring (1.0×10^{-6}), construido a partir de los datos de la cinética de desplegamiento seguida por DC en el UV lejano, en Tris 20 mM, pH 7.4 (datos no mostrados).

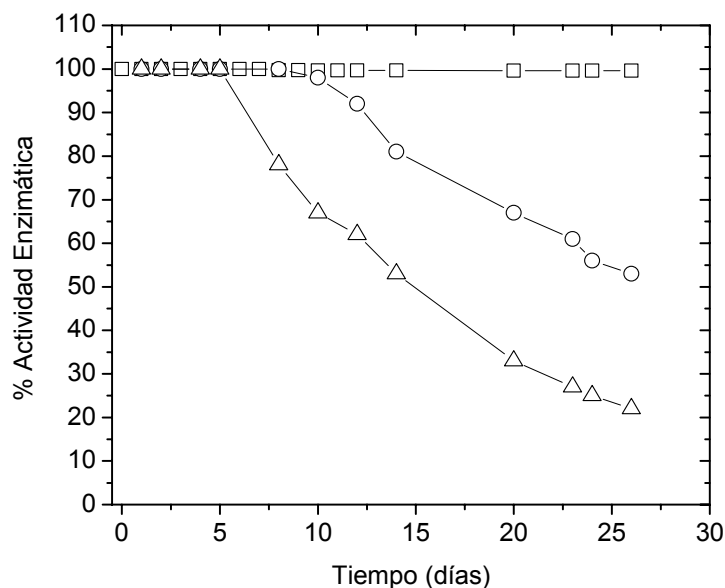


Figura 4.12. Efecto de la dilución en la estabilidad de las enzimas ScTIM, C126A y C126S. Las enzimas fueron incubadas a 25 °C, en regulador de TEA 100 mM, EDTA 10 mM y DTT 1 mM. Los datos mostrados corresponden a ScTIM a una concentración de 1 ng mL⁻¹ (□), C126A (O) y C126S (△) a una concentración de 10 ng mL⁻¹. En los tres casos a 1 mL de la muestra incubada le fueron adicionados los reactivos requeridos para medir la actividad enzimática en la dirección del DGAP a DHAP.

Por otro lado, cuando comparamos el porcentaje de actividad de la C126S incubada en los reguladores de TEA y Tris a una concentración de 0.010 mg mL⁻¹ y 25 °C, nuevamente apreciamos una fase lag inicial en ambos casos (Fig. 4.13), además del hecho de que la enzima en Tris es un poco más inestable: al sexto día la actividad de la C126S es del 85% contra el 100% de la actividad de la enzima en TEA (Fig. 4.13). Después de más de 40 días de incubación no se observó un valor constante en la actividad de la mutante de Ser.

Respecto a los espectros de DC en el UV lejano de la C126S en regulador de Tris (Fig. 4.13) también se observó una fase lag seguida por cambios pequeños de la señal de la elipticidad a 220 nm. Después de 20 días de incubación la señal de la elipticidad ya no cambió apreciablemente, reteniendo el 30% de la señal inicial, aproximadamente.

Finalmente, cuando los datos de la figura 4.13 fueron ajustados mediante la ecuación 4.3, se obtuvieron los siguientes valores de k_d : 1.2×10^{-6} (datos del porcentaje de actividad de la

enzima en TEA); 0.8×10^{-6} (porcentaje de actividad de la mutante en Tris); y 1.0×10^{-6} (porcentaje de la señal de elipticidad a 220 nm). El que estos valores sean parecidos al de la k_d determinada a partir de cinéticas de desplegamiento, a las mismas condiciones de concentración de enzima, pH y temperatura, apoya el hecho de que el cambio de Cys por Ser desestabiliza a la TIM además del hecho de que el modelo de dos estados si es aplicable para dichas enzimas.

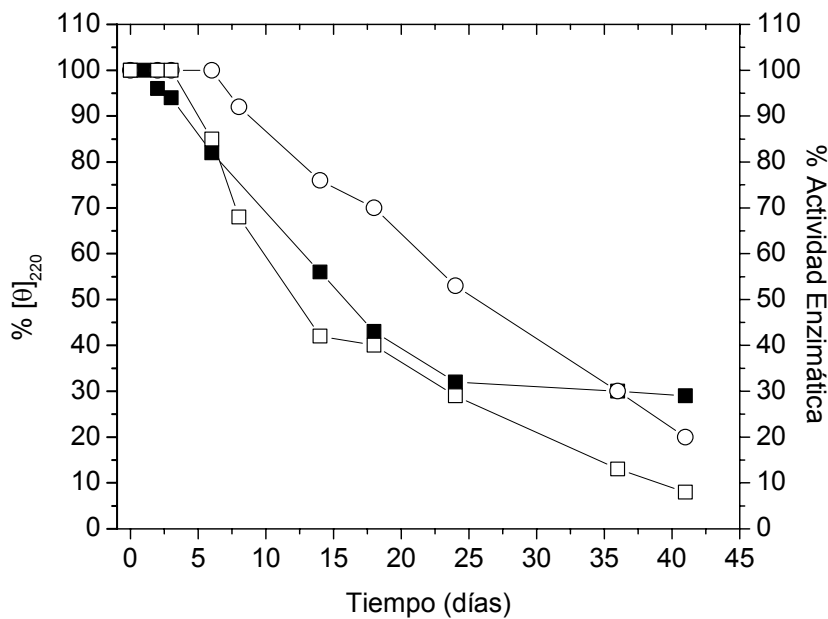


Figura 4.13. Efecto de la dilución en la estabilidad de la enzima C126S monitoreada por DC. Se muestran los datos del porcentaje residual de la señal de elipticidad a 220 nm (!) que se obtuvieron de los espectros de DC en la región del UV lejano a 25 °C, de la mutante C126S incubada a una concentración de 0.010 mg mL^{-1} en regulador de Tris 20 mM, pH 7.4 a 25 °C. Los datos del porcentaje de actividad corresponden a C126S incubada a 25 °C a una concentración de 0.010 mg mL^{-1} en los reguladores de Tris 20 mM, pH 7.4 (□) y TEA 100 mM, EDTA 10 mM, 1 mM, pH 7.4 (○). La actividad enzimática fue determinada en la dirección del DGAP a DHAP, en amortiguador de TEA 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4 a 25 °C, se inició la reacción con la adición de 15 ng de la enzima.

4.10 Simulación de la dinámica molecular en vacío de las enzimas ScTIM, C126A y C126S

A fin de determinar los cambios en el comportamiento dinámico de las moléculas de interés en este trabajo, se analizaron los resultados de la simulación molecular después de que se alcanzó la convergencia energética en cada caso (Fig. 4.14). Para analizar comparativamente los movimientos atómicos en las vecindades del sitio activo se emplearon las herramientas gráficas del programa Biograf así como algunas representaciones con todos los átomos y moléculas de agua estudiados.

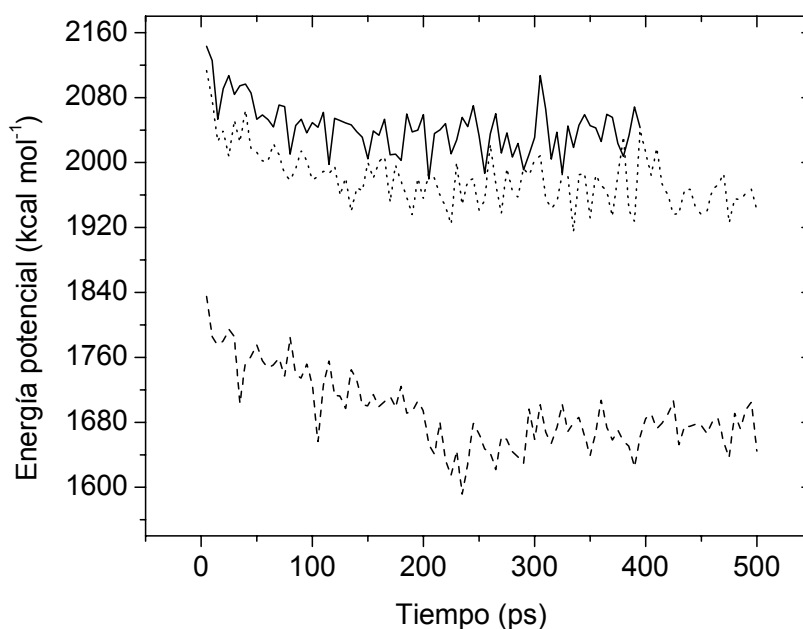


Figura 4.14. Convergencia energética de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. La dinámica molecular se concluyó cientos de ps posteriores a la convergencia de la energía potencial de la ScTIM (—), la C126S (···) y la C126A (---).

Para el análisis de las enzimas C126A y ScTIM se tomaron los conformeros de 500 ps y 395 ps, respectivamente, los cuales son los últimos de la dinámica molecular en convergencia. En el caso de la C126S se analizaron dos conformeros en la región de convergencia (440 y 520 ps) dado que, de acuerdo con la geometría del ángulo diedro de la cadena lateral del

residuo 126, esta mutante tuvo acceso a dos arreglos claramente distintos a lo largo de la simulación de la dinámica molecular lo cual no se observó para la ScTIM (Fig. 4.15).

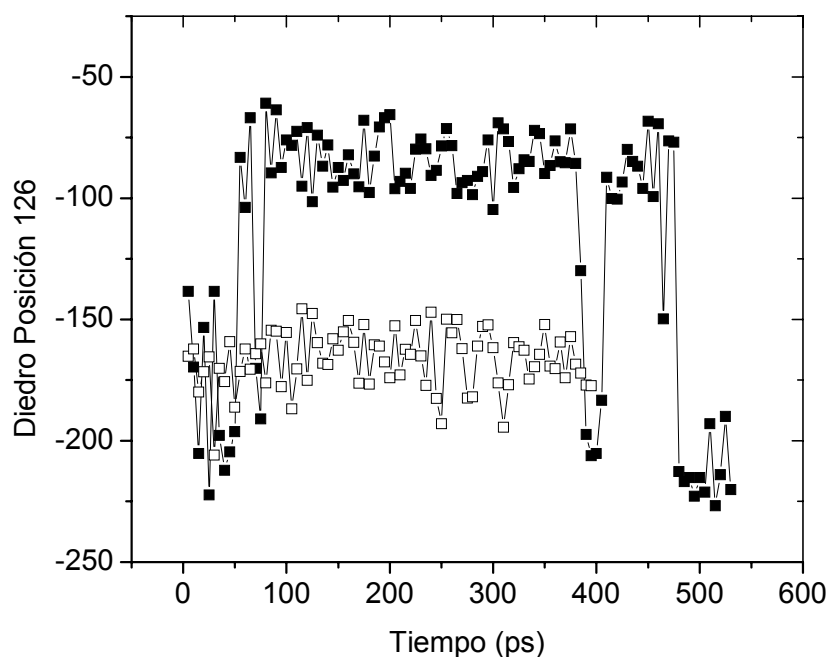


Figura 4.15. Comparación de los diedros del residuo en la posición 126 en ScTIM y la C126S. Variación del diedro en la posición 126 de la ScTIM (\square) y la C126S(\blacksquare).

A partir de los conformeros mencionados se hizo el análisis de todos los puentes de hidrógeno posibles entre átomos de los residuos del sitio activo y de aminoácidos cercanos, así como moléculas de agua a una distancia máxima de 5 Å y con una desviación de la linealidad de 50° como límite. En la tabla 4.4 se muestran las distancias de tales interacciones de los residuos con los átomos vecinos.

Tabla 4.4. Comparación de las distancias de puente de hidrógeno para las enzimas ScTIM, C126A y C126S. El primer átomo corresponde al residuo indicado entre paréntesis y el segundo al átomo del residuo con el que se establece la interacción, también señalado entre paréntesis.

INTERACCIÓN	DISTANCIA (Å)			
	ScTIM	C126A	C126S (440 ps)	C126S (520 ps)
N ζ (Lys12)–O ϵ 2(Glu97)	3.94	2.92	2.81	2.82
N ζ (Lys12)–N ϵ 2(His95)			2.88	3.01
N ζ (Lys12)–W ^a 601	4.50	2.95		
N ζ (Lys12)–W602	2.95	4.75		
O ^b (Lys12) ^c –N ^c (Asn14)	3.10	3.10	3.10	3.10
O(Lys12)–N ϵ 2(Gln64)	2.83	2.80	2.82	2.77
N(Lys12)–O(Cys41)	4.32	4.32	4.32	4.32
N ζ (Lys12)–O δ 1(Asn10)				4.41
N(Lys12)–O δ 1(Asn10)		3.05		2.94
O γ 1(Thr75)–O δ 1(Asn10, cB ^d)	3.77	3.96	3.00	3.72
O γ 1(Thr75)–N δ 2(Asn10, cB)	2.88	3.12	3.83	3.10
O γ 1(Thr75)–NZ(Lys12, cB)	2.91	2.87	2.91	2.91
O γ 1(Thr75)–N(Lys12, cB)			5.00	4.77
O γ 1(Thr75)–N ϵ 2(Gln, cB)	4.95	4.75	4.72	4.77
N(Thr75)–O(Ala73, cA ^e)	4.23	4.18	4.28	4.28
N(Thr75)–O(Phe74, cA)	2.29	2.29	2.30	2.25
O γ 1(Thr75)–N(Phe74, cA)			4.93	4.84
O γ 1(Thr75)–O(Phe74, cA)			4.92	4.91
O(Thr75)–N(Gly76, cA)	2.31	2.26	2.20	2.24
O γ 1(Thr75)–N(Gly76, cA)	4.71	4.73	4.56	4.68
O(Thr75)–N(Glu77, cA)	3.87	3.80	3.95	3.93
O γ 1(Thr75)–N δ 1(His95, cB)	4.48	4.31	4.40	4.58
O γ 1(Thr75)–N ϵ 2(His95, cB)	4.61	4.13	4.23	4.59
N(Thr75)–O ϵ 1(Glu97, cB)	3.04	3.16	3.19	3.45
O γ 1(Thr75)–O ϵ 1(Glu97, cB)	2.83	2.82	2.78	2.79

O γ 1(Thr75)–O ϵ 2(Glu97, cB)	4.52	4.47	4.53	4.69
O(Thr75)–N ϵ (Arg98, cB)	3.67	4.00	3.88	3.88
O(Thr75)–NH1(Arg98, cB)	4.82			
O(Thr75)–NH2(Arg98, cB)	2.78	2.89	2.85	2.94
O(Ile92)–W759			2.96	
N(Ile92)–O(Ala63)			2.76	2.77
N(Leu93)–O(Ile124)			2.84	2.86
O(Gly94)–W603	3.28	2.10		
O(Gly94)–N ϵ (Arg99)	3.02			2.88
N(Gly94)–W775	2.87	2.91	2.81	
N(Gly94)–W759				2.96
N(Gly94)–O ϵ 1(Glu104)	4.99	4.81		
O(His95)–N(Glu97)				2.95
O(His95)–N(Arg98)		2.79	2.92	
O(His95)–N(Arg99)	2.85	2.94	2.97	2.84
O(His95)–N(Ser100)		5.00		4.71
N(His95)–W759	3.32	3.66	2.92	4.02
N(His95)–W775	4.63	4.84		
N ϵ 2(His95)–N δ 2(Asn10)			4.20	
N ϵ 2(His95)–W601			4.26	
N ϵ 2(His95)–N(Ser96)				4.94
N δ 1(His95)–N(Ser96)				4.06
N(Cys, Ala, Ser126)–O(Leu93)	3.00	3.84	2.94	3.02
O(Cys, Ala, Ser126)–N ϵ (Arg99)	2.89	2.88	3.09	2.99
O γ (Ser126)–O(Ile124)			4.90	
O γ (Ser126)–O(Gly94)				2.87
O(Cys126)–W603	3.88			
N(Ile127)–O(Ala163)		2.93		
O(Glu165)–N(Val167)	3.06	3.00	3.01	3.07
O(Glu165)–N(Glu129)	3.56		3.46	3.55
N(Glu165)–O(Ile127)	2.87	2.88	2.92	2.91

O ϵ 1(Glu165)–W603	3.00	3.13		
O ϵ 1(Glu165)–N(Ser96)	2.89	2.76	3.01	2.88
O ϵ 1(Glu165)–W601	2.88	2.86		

^aW: molécula de agua. ^bO: Oxígeno del carbonilo de la cadena principal. ^cN: Nitrógeno de la cadena principal.
^dcB: cadena B. ^ecA: cadena A.

Los datos mostrados en la tabla 4.4 dejaron ver que en general la C126A conserva la mayoría de las interacciones presentes en la ScTIM, lo que no sucedió con la C126S. El análisis de las interacciones y distancias, comparando a la ScTIM con cada una de las mutantes, generó los siguientes resultados:

1) Lys12

- A) C126A-ScTIM. Mantiene todas las interacciones y presenta adicionalmente una interacción con Asn10. Las distancias con Glu97 y W601 disminuyen 1.02 y 1.55 Å, respectivamente, sucediendo lo contrario con W602 (aumenta 1.80 Å).
- B) C126S-ScTIM. Las interacciones con las moléculas de agua ya no están presentes; sin embargo, en C126S tiene interacciones adicionales con His95 y Asn10.

2) Thr75

- A) C126A-ScTIM. En general, mantiene las mismas interacciones y distancias a excepción de aquella del O del carbonilo de la cadena principal con el NH1 de la Arg98 (residuo altamente conservado) de la otra subunidad, la cual ya no aparece en ninguna de las dos mutantes.
- B) C126S-ScTIM. En esta mutante se observan tres nuevas interacciones del O γ 1 con el N de la Lys12 (residuo estrictamente conservado) de la otra cadena así como con el N y el O de la Phe74 (de la misma cadena).

2) Gly94

- A) C126A-ScTIM. Mantiene la mayoría de las interacciones, con distancias similares, con excepción de aquella con Arg99. La distancia respecto a W603 es más corta para C126A (1.8 Å).

B) C126S-ScTIM. En el confórmero de 440ps, únicamente mantiene la interacción con W775, cuya distancia no varía apreciablemente. Respecto al confórmero de 520 ps, la interacción con Arg99 disminuye 0.12 Å y aparece en esta mutante la interacción con W759.

3) His95

A) C126A-ScTIM. Este residuo sólo tiene tres interacciones en ScTIM, las tres aparecen en la mutante y las distancias no varían apreciablemente.

B) C126S-ScTIM. Únicamente se mantienen dos de las tres interacciones presentes en ScTIM, perdiéndose la interacción con W775. Lo relevante aquí es que la mutante presenta cinco interacciones adicionales todas ellas con residuos altamente conservados y con la molécula W601.

4) Residuo en la posición 126

A) C126A-ScTIM. Se mantienen las interacciones con Leu93 y Arg99, para el primer residuo la distancia aumenta 0.84 Å en la mutante. Se pierde la interacción con W603.

B) C126S-ScTIM. Mantiene las interacciones con Leu93 y Arg99, sin variación apreciable en las distancias. Al igual que para la mutante de Ala, se pierde la interacción con W603. Sin embargo, presenta interacciones con Gly94 e Ile124.

5) Glu165

A) C126A-ScTIM. La interacción con el Glu129 fue la única que no se mantuvo en la mutante de Ala.

B) C126S-ScTIM. Se perdieron las interacciones W602 y W603.

Finalmente, cabe mencionar que las mutaciones promovieron que aparecieran otros aminoácidos dentro de los 5 Å de distancia analizados, en el caso de la C126S fueron Ile92 y Leu93, y para el caso de la C126A la Ile127.

5. DISCUSIÓN

5.1 Catálisis

Cuando se mutan los residuos Glu165, His95 y Lys12 la eficiencia catalítica de la TIM se ve disminuida en un intervalo de 140 a 4000 veces (Raines y col., 1986; Komives y col., 1991; Lodi y col., 1994), por lo que no sorprende que sean residuos estrictamente conservados. En el caso de las mutantes de Cys126, al sustituir dicho residuo por Ser, una cadena menos hidrofóbica, se observó una disminución de K_M y k_{cat} de 4 veces respecto a la ScTIM (Tabla 4.1). Por otro lado cuando se cambió la Cys por Ala, un residuo de similar hidrofobicidad pero de menor tamaño, se observó una caída menor en ambos parámetros cinéticos.

La disminución del valor de K_M sugiere que la mutación de la Cys126 por Ser aumenta en mayor grado la afinidad por el sustrato que la mutación de Ala. Sin embargo, la disminución en k_{cat} indica que las enzimas mutantes son menos afines por el estado de transición de la reacción, provocando una menor estabilización de dicho estado activado. No obstante, al comparar los valores de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) se nota poca diferencia entre las tres enzimas (Tabla 4.1), habiendo un efecto compensatorio entre el aumento de la afinidad por el sustrato y la disminución de la velocidad máxima para el caso de la mutante C126S. Estas diferencias son comparables con las observadas entre TIMs de diferentes especies (ver Apéndice III). Debido a que las concentraciones intracelulares de DHAP y DGAP están generalmente por debajo del valor de K_M (por ejemplo, en *S. cerevisiae* las concentraciones reportadas son de 0.3 mM y de 0.4 a 1.2 mM, respectivamente (Albe y col., 1990)), la enzima probablemente funciona *in vivo* lejos de las condiciones de saturación y de esta manera la eficiencia catalítica pudiera ser el parámetro determinante para su actividad. En este contexto, la Cys126 difícilmente pudiera ser considerada como esencial para la actividad de isomerasa.

Por otro lado, la mayor afinidad de las mutantes C126A y C126S por el inhibidor competitivo PGA se debe principalmente a un cambio de entropía menos desfavorable en la asociación. Debido a que la interacción TIM-PGA involucra varias interacciones carga-carga entre los residuos del sitio activo y el inhibidor, es atractivo interpretar el ΔS_u menos desfavorable como resultado de un mayor grado de desolvatación durante la formación del complejo enzima-inhibidor.

Respecto a las diferencias observadas entre los valores de K_u , para la ScTIM y sus mutantes de Cys126, obtenidos por CTI y titulación fluorométrica (Tabla 4.2) quedó claro que tal discrepancia no se debe a la diferencia de concentraciones de TIM utilizadas en cada técnica, dado que en las determinaciones de este parámetro por el método cinético la concentración de TIM utilizada es del orden de los nanogramos por mL y los valores fueron comparativos con aquellos obtenidos por CTI, donde se utilizaron concentraciones del orden de los miligramos por mL. Por lo anterior, esta desigualdad posiblemente se debió a la técnica en sí, ya que en la CTI la interacción enzima-ligando se cuantifica en forma directa (en el orden de las microcalorías) y en el caso de la titulación fluorométrica, Sampson y Knowles (1992) demostraron que lo que se cuantifica es el apagamiento de la fluorescencia que sufren los Trp168 (65%) y Trp90 (35%) con la unión del ligando. Estos autores determinaron la K_I mediante titulación fluorométrica, utilizando el inhibidor competitivo fosfoglicolohidroxamato; cuando compararon el valor para la TIM silvestre con el obtenido de la enzima doble mutante W90Y/W157F observaron una disminución en la K_I de 16 μM a 9 μM , y por consiguiente un aumento en la K_u , pudiéndose explicar de este modo los valores menores obtenidos por titulación fluorométrica en comparación con los observados con CTI.

La mayor afinidad de las mutantes por el sustrato pudiera explicarse haciendo un análisis de los valores de ΔG_u obtenidos por CTI de la mutante de Ser y la ScTIM con el PGA, que son las que muestran mayor diferencia (Fig. 5.1A). Tenemos un ΔG_u más negativo para la C126S, siendo la diferencia entre ambos valores igual a $0.6 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo que implica que el complejo C126S-PGA es más estable.

Para la reacción catalizada (Fig. 5.1B) se realizó un estudio comparativo de los valores de k_{cat} , obtenidos con el sustrato DGAP, haciendo las siguientes suposiciones: 1) ambas enzimas inician en un mismo nivel energético antes de reaccionar con el sustrato, dicha suposición parece válida dado que no existen cambios conformacionales significativos con la mutación; y 2) la mutación estabiliza más el complejo enzima-sustrato, lo que sucede para el complejo C126S-PGA.

Escribiendo las ecuaciones de Arrhenius para cada enzima y haciendo un análisis matemático como se describe a continuación, se obtiene una diferencia de ΔG^\ddagger de $0.86 \pm 0.02 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Ec. 5.1), cuyo valor es aproximado al de la diferencia entre los ΔG_u , lo cual

explicaría la mayor afinidad de esta enzima por el sustrato y el efecto de la disminución en la k_{cat} .

$$k_{cat} = 4.7 \times 10^3 \text{ (ScTIM)}$$

$$k'_{cat} = 1.1 \times 10^3 \text{ (C126S)}$$

$$\frac{k_{cat}}{k'_{cat}} = \frac{Ae^{-\Delta G^\ddagger/RT}}{Ae^{-\Delta G'^\ddagger/RT}}$$

$$\ln \frac{k_{cat}}{k'_{cat}} = \frac{\Delta G'^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{RT}$$

$$\Delta G'^\ddagger - \Delta G^\ddagger = RT \ln \frac{k_{cat}}{k'_{cat}} = 0.86 \text{ kcal mol}^{-1} \quad (5.1)$$

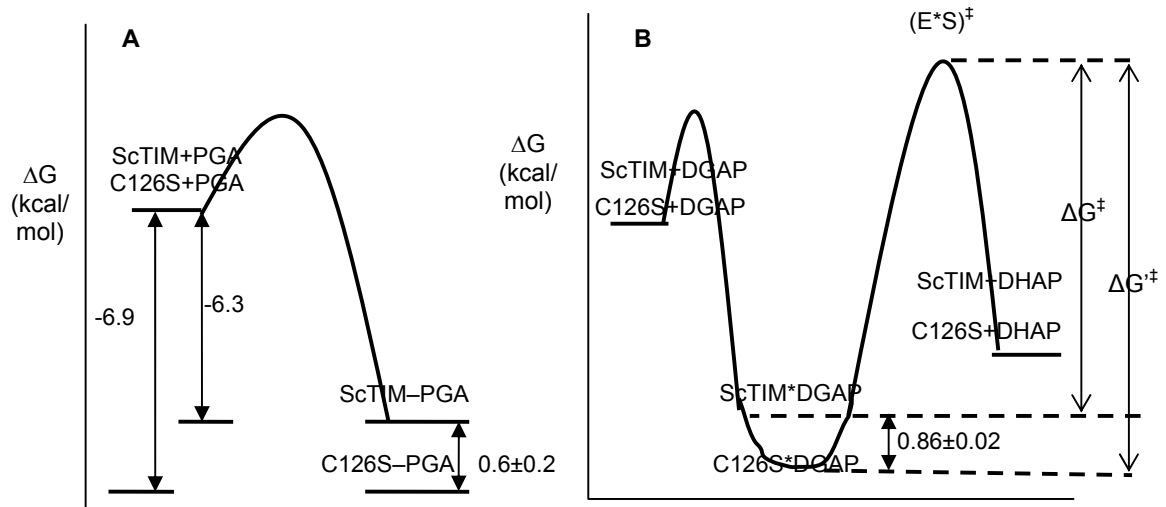


Figura 5.1. Análisis comparativo del cambio de ΔG_u para la ScTIM y la mutante C126S. La diferencia entre los valores de ΔG_u obtenidos por CTI para la ScTIM y la C126S (A) se comparó contra el valor de $\Delta \Delta G^\ddagger$ catalítico de estas enzimas (B).

5.2 Estabilidad

La presencia de histéresis en las transiciones de desplegamiento–replegamiento de proteínas se ha documentado en un número creciente de reportes. Probablemente, este fenómeno tiene su origen en las cinéticas lentas de desplegamiento o replegamiento bajo ciertas condiciones que obstaculizan lograr el equilibrio entre los estados moleculares participantes (Benítez-Cardoza y col., 2001; Nájera y col., 2003); algunas complicaciones adicionales surgen por la tendencia de los estados desplegados a agregarse. De este modo, la disminución en la T_m aparente observada para las mutantes de TIM (Fig. 4.5) debe tomarse como un indicio de disminución en la estabilidad cinética, más que termodinámica, del dímero nativo. Sin embargo, los estudios cinéticos y calorimétricos del desplegamiento y replegamiento inducidos térmicamente en la ScTIM (Benítez-Cardoza y col., 2001), sugieren que se puede aplicar un modelo simple de dos estados para explicar el equilibrio operante: $N \rightleftharpoons 2D$. Un apoyo adicional para este modelo proviene de la concordancia razonable de los valores calorimétricos para los cambios de entalpía y capacidad calorífica con aquellos derivados de los parámetros cinéticos (Benítez-Cardoza y col., 2001). En el modelo mencionado, la reacción de replegamiento conduce a la formación de la estructura secundaria nativa. Aunque pueden ser necesarios rearrreglos subsecuentes de la estructura terciaria para la recuperación de la actividad enzimática, el modelo de dos estados aparentemente explica la estabilidad global de la TIM dimérica. Nuestros resultados muestran que dicho modelo puede ser aplicado para la C126S y la C126A. Las energías libres estándar para el replegamiento fueron calculadas de:

$$\Delta G^{2D \rightarrow N} = -RT \ln K_r \quad (5.2)$$

donde la constante de equilibrio de replegamiento, K_r , está dada por el cociente de las constantes cinéticas (k_r/k_u). Los valores de $\Delta G^{2D \rightarrow N}$ para las tres variantes de TIM (27 °C, pH 8.5) se muestran en la tabla 5.1; también, se enlistan los valores correspondientes a las entalpías y entropías de replegamiento.

Los valores de desestabilización relativa, expresados como $\Delta \Delta G = \Delta G_{\text{mutante}} - \Delta G_{\text{ScTIM}}$, son 4.9 y 8.6 kcal mol⁻¹ para las mutantes de Ala y Ser, respectivamente. El primer valor es bastante aproximado al $\Delta \Delta G$ de 5.4 kcal mol⁻¹ reportado por Silverman y Harbury (2002) para

la misma mutación. Las magnitudes de $\Delta\Delta G$ son demasiado grandes para ser solamente justificadas por las diferentes hidrofobicidades de las cadenas laterales involucradas en la mutación: sobre la base de las energías libres de transferencia (Creighton, 1993), la sustitución de un residuo de Cys oculto, por Ala o Ser se esperaría que desestabilizara al estado nativo cuando mucho por 1.2 y 1.6 kcal mol⁻¹, respectivamente. Varios autores han mencionado que cuando la sustitución de un residuo hidrofóbico oculto por otro de menor tamaño deja una cavidad en la estructura nativa, el efecto desestabilizante es mayor (alrededor de 1.8 hasta 2.5 kcal mol⁻¹ por grupo metileno eliminado) (Ferst, 1999; Jackson y Sternberg, 1994; Connelly y col., 1991). Por lo tanto, si la Cys es considerada como una típica cadena hidrofóbica, y considerando su tamaño, la máxima desestabilización esperada para la mutación de Cys por Ala pudiera estar entre 3.0 y 4.0 kcal mol⁻¹, en buena concordancia con el valor de $\Delta\Delta G$ experimental. Por otro lado, el $\Delta\Delta G$ mucho mayor para la mutante de Ser sugiere la presencia de alteraciones más drásticas en las fuerzas que determinan la estabilidad de la TIM; por ejemplo, un aumento en la accesibilidad del solvente en la molécula nativa pudiera promoverse debido a la mutación (Jackson y Sternberg, 1994).

pH 8.5	ScTIM ^a	C126S	C126A
$\Delta G^{2D \rightarrow N}$, 27 °C (kcal mol ⁻¹)	-21.1 (0.6)	-12.5 (0.2)	-16.2 (0.4)
$\Delta H^{2D \rightarrow N}$, 27 °C (kcal mol ⁻¹)	-71 (10)	-68 (3)	-101 (10)
$T\Delta S^{2D \rightarrow N}$, 27 °C (kcal mol ⁻¹)	-50	-56	-85
pH 7.4	ScTIM	C126S	
$\Delta G^{2D \rightarrow N}$, 36.5 °C (kcal mol ⁻¹)	-18.5 (0.5)	-10.5 (0.2)	

Tabla 5.1. Parámetros termodinámicos del procesos de replegamiento de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Las constantes de velocidad fueron determinadas de las mediciones realizadas por medio de DC en la región del UV lejano a diferentes temperaturas. Los valores mostrados fueron obtenidos por determinación directa o por extrapolación a la temperatura indicada. Las funciones termodinámicas para el replegamiento fueron calculadas suponiendo un modelo de dos estados. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis. ^aLos valores para ScTIM, a pH 8.5, fueron tomados de los resultados reportados por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001).

Las causas de la desestabilización pudieran investigarse comparando las otras propiedades termodinámicas; sin embargo, en la tabla 5.1 se puede observar que no hay correlación entre los valores de ΔG y ΔH (o con los correspondientes términos entrópicos) para el replegamiento de las variantes de TIM; esta falta de correlación también ha sido observada con otras proteínas (Murphy y Freire, 1992).

El punto importante aquí es determinar si los cambios relativos en las funciones termodinámicas pueden o no relacionarse con las alteraciones en las propiedades moleculares que se cree son determinantes en la estabilidad de la proteína. Con este fin, hemos aplicado un modelo simple en el cual las funciones termodinámicas son parametrizadas en términos de las áreas de superficie apolar y polar que se ocultan durante el replegamiento (Murphy y Freire, 1992). De acuerdo a esta aproximación $\Delta H^{2D \rightarrow N}$ y $\Delta C_p^{2D \rightarrow N}$ pueden ser expresados como:

$$\Delta H^{2D \rightarrow N} = \Delta H^* \Delta ASA_{pol} + \Delta C_p^{2D \rightarrow N} (T - T_H^*) \quad (5.3)$$

$$\Delta C_p^{2D \rightarrow N} = \Delta C_{p,pol} \Delta ASA_{pol} + \Delta C_{p,ap} \Delta ASA_{ap} \quad (5.4)$$

donde ΔASA_{pol} y ΔASA_{ap} representan los cambios en el área superficial polar y no polar accesible al solvente, debido al replegamiento; los parámetros que aparecen en estas ecuaciones ($\Delta H^* = 35 \text{ cal (mol } \text{Å}^2)^{-1}$; $\Delta C_{p,pol} = -0.26 \text{ cal K}^{-1} (\text{mol } \text{Å}^2)^{-1}$; $\Delta C_{p,ap} = 0.45 \text{ cal K}^{-1} (\text{mol } \text{Å}^2)^{-1}$; $T_H^* = 373 \text{ K (100 } ^\circ\text{C)}$) han sido obtenidos a partir del estudio de varias proteínas y compuestos modelo (Murphy y Freire, 1992). La descripción termodinámica del replegamiento se completa escribiendo el término entrópico:

$$T\Delta S^{2D \rightarrow N} = T\Delta S^{conf} + T\Delta C_p^{2D \rightarrow N} \ln (T/T_s^*) \quad (5.5)$$

donde T_s^* es 385 K (112 °C); ΔS^{conf} representa la contribución entrópica proveniente de los cambios conformacionales durante el proceso, y se asume que es proporcional al número de residuos en la molécula. Resolviendo las ecuaciones 5.3 y 5.4 con los datos de la ScTIM, se encontró que 17,500 Å² de área polar y 26,600 Å² de área apolar se ocultan en el replegamiento. El promedio del área oculta por residuo de aminoácido está cercano a 90 Å²,

un poco menos de 95–100 Å² por residuo que ha sido determinado para proteínas de aproximadamente 200 residuos (Murphy y Freire, 1992). De la ecuación 5.5, ΔS^{conf} , cuando normalizamos por el número total de residuos, es igual a -4.1 cal K⁻¹ (mol de residuos)⁻¹, comparado con -4.3 cal K⁻¹ (mol de residuos)⁻¹ determinado para otras proteínas (Murphy y Freire, 1992). Estos resultados pueden ser un indicio de que algo de estructura residual permanece en la TIM térmicamente desnaturalizada, como fue sugerido por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001). En cualquier caso, la parametrización empírica parece que describe bien el proceso de desplegamiento–replegamiento de la ScTIM, por lo menos para permitirnos comparaciones con sus mutantes de Cys126. Los valores de ΔASA_{pol} y ΔS^{conf} de la C126A fueron similares a los de la ScTIM, mientras que ΔASA_{ap} fue aproximadamente 1000 Å² menor para la mutante. Aunque estos resultados parecen ser consistentes con una disminución en la estabilidad debida principalmente a la formación de una cavidad hidrofóbica en la mutante plegada, el valor de ΔASA_{ap} es dudoso debido a la incertidumbre en las áreas ocultas calculadas (aproximadamente $\pm 2,500$ Å²). Para la mutante C126S, en contraste, se obtuvo una gran disminución tanto en el ΔASA_{pol} (aproximadamente 3,000 Å²) como en el ΔASA_{ap} (aproximadamente 5,000 Å²), comparada con la ScTIM; el ΔS^{conf} para esta mutante fue de -3.4 cal K⁻¹ (mol de residuos)⁻¹, indicando una pérdida considerablemente menor de entropía en el replegamiento comparada con aquella de las otras variantes de TIM. La reducción en las áreas ocultas y en el ΔS^{conf} parece demasiado grande para ser causada únicamente por la sustitución de un residuo hidrofóbico interno por otro más polar. Más bien, pudiera reflejar perturbaciones que alcanzan a extenderse más allá de la vecindad del residuo 126, como revelan los resultados de la dinámica molecular para la C126S, en comparación con la ScTIM, donde los residuos Lys12, Ile92, Leu93 e His95 exhiben interacciones adicionales, además de la pérdida de interacciones con moléculas de agua; esto último pudiera explicarse por el aumento en la movilidad de tales moléculas lo que conllevaría a una enzima más hidratada apoyando el hecho de un mayor grado de desolvatación con la unión del ligando.

Una posible explicación de cómo el área oculta puede reducirse por la mutación C126S puede encontrarse examinando las estructuras de TIM de alta resolución (0.83 y 1.5 Å), recientemente determinadas (Kursula y Wierenga, 2003; Rodríguez-Romero y col., 2002). Este análisis reveló que, independientemente de la presencia o ausencia de ligando en el sitio activo, el átomo S γ de Cys126 ocupa una posición clave donde puede jugar un doble papel: 1)

Aparentemente actúa como un sello para el núcleo del barril- β , haciendo enlaces de hidrógeno con los oxígenos de la cadena principal de Ile124 y Leu93, cuyas cadenas laterales son componentes del interior del núcleo del barril. 2) El átomo S_{γ} está localizado a una distancia de van der Waals (aproximadamente 4.1 Å) del $O_{\epsilon 2}$ del Glu165, formando parte precisamente de la pared del “fondo” del sitio activo. Si bien, las moléculas de solvente abundan en la región del sitio activo, ninguna de éstas interactúa en forma directa con el S_{γ} ; sus tres moléculas de agua vecinas más cercanas están localizadas de 5.0 a 6.0 Å de distancia. Una de estas moléculas forma un enlace de hidrógeno con el $O_{\epsilon 2}$ del Glu165, mientras que las otras dos hacen lo mismo con los residuos localizados en las asas 3, 4 y 7, o en las hojas β 4, 7 y 8. Es razonable entonces, que en la C126S el carácter hidrofílico de la cadena lateral pueda afectar la distribución de las moléculas del solvente en una región relativamente grande de la proteína; en consecuencia, esto conduciría a una mutante nativa más hidratada en comparación con la ScTIM, como se sugiere para los resultados de la dinámica molecular. Es más, esta propuesta es consistente con una mayor desolvatación ocurrida cuando los ligandos se unen a la C126S, como mencionamos antes para la entropía de unión.

Cualquiera que sea la causa de la menor estabilidad observada para la C126S, es evidente que esta mutación podría disminuir el nivel de TIM nativa *in vivo*. Por ejemplo, tomando la concentración de TIM de 1.24 mg mL⁻¹ encontrada en *S. cerevisiae* (Albe y col., 1990), como un valor representativo, y usando datos reportados en la tabla 4.3, se calculó que en condiciones cercanas a las fisiológicas cerca del 2% de la C126S pudiera estar desplegada. En contraste, bajo condiciones similares, la fracción de la ScTIM desplegada será mil veces menor. La presencia de cantidades significativas de monómeros desplegados o semiplegados puede entonces conducir a una disminución de la cantidad de enzima nativa, debido a la tendencia de aquellos de formar agregados u otras especies desnaturalizadas irreversiblemente; lo anterior estaría de acuerdo con los resultados obtenidos de la incubación a 25 °C de la ScTIM y sus mutantes de Cys126. Además, la agregación inespecífica puede representar una seria desventaja puesto que el plegamiento de un polipéptido naciente ocurre en el citoplasma cuya concentración de proteína alcanza valores de 100 mg mL⁻¹ o más. Por lo tanto, las mutaciones que reducen la velocidad de plegamiento, como las estudiadas en este trabajo, se esperaría que también aminoraran la expresión global y disminuyeran la producción de la enzima funcional. Ambas mutantes, C126S y C126A, no solamente muestran disminución en

las velocidades de plegamiento, sino también tienen mayor propensión a sufrir desnaturalización irreversible que la ScTIM. Si la Cys126 juega o no algún papel para evitar reacciones laterales indeseables en la TIM desplegada o parcialmente desplegada constituye todavía una cuestión abierta.

Nuestros resultados indican que la razón de la estricta conservación de la Cys126 está relacionada con su requerimiento para el plegamiento eficiente y estabilidad de la TIM nativa más que para mantener su eficiencia catalítica. Lo anterior está apoyado por estudios de bioinformática realizados sobre proteínas de la familia de la TIM, en los que se identificó a la Cys126 de TIM de *Bacillus stearothermophilus* como un residuo estabilizante de la enzima (Gromiha y col., 2004).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

- 1) El cambio del residuo de Cys por Ser o Ala no afectó sensiblemente las estructuras secundaria (espectros de DC en el UV lejano) ni la terciaria de la enzima (fluorescencias intrínseca y espectros de DC en el UV cercano); asimismo, no se crean nuevos sitios de proteólisis (susceptibilidad proteolítica).
- 2) Las mutaciones provocan una disminución tanto en K_M como en k_{cat} lo que nos dice que las enzimas mutantes son más afines por el sustrato pero que su velocidad catalítica es menor en condiciones de saturación, esto es, la barrera energética para alcanzar el estado activado se incrementa. Por otro lado, la eficiencia catalítica de las enzimas mutantes es prácticamente igual a la de la ScTIM y debido a que la enzima por lo general trabaja *in vivo* en condiciones lejanas a la saturación, k_{cat}/K_M sería el parámetro determinante para su actividad por lo que la Cys126 pudiera considerarse como no esencial para su catálisis.
- 3) Los valores de K_u muestran que la mutación les confirió mayor afinidad por el análogo del sustrato, en concordancia con la disminución de K_M . La mayor afinidad de las mutantes por el PGA se debe fundamentalmente a una contribución entrópica menos desfavorable.
- 4) La Cys126 esta involucrada en el mantenimiento de interacciones favorables que estabilizan la conformación nativa de la ScTIM, ya que las mutaciones promovieron un corrimiento en la T_m de 9 °C (C126A) y 13 °C (C126S). Además, el valor de la energía libre estándar para el replegamiento ($\Delta G^{2D \rightarrow N}$) es más pequeño para las mutantes que para la TIM silvestre, lo que podría disminuir el nivel de TIM nativa *in vivo*. Por lo anterior, el papel de la Cys126 pareciera ser más importante para el plegamiento y estabilidad de la TIM.

Perspectivas

1) Estructura cristalográfica de la C126S

El obtener la estructura cristalográfica de la mutante de Ser con y sin ligando, sería una herramienta muy útil para poder explicar el ΔS_u menos desfavorable que se observó para esta enzima.

2) Otras mutantes de Cys126

Alineamos las secuencias de TIM de 108 especies e hicimos un análisis estadístico del porcentaje de cambio de Cys ocultas por los 19 residuos restantes (**Tabla 7.1**). Observamos que Val e Ile son los aminoácidos que presenta mayor porcentaje de cambio por lo que sería interesante estudiar el efecto de estas mutaciones en la catálisis y estabilidad de la TIM de *S. cerevisiae* así como de otras especies.

Residuo	% de cambio de Cys por el residuo
Val	25
Ile	23
Ala	15
Leu	11
Trp, Phe	4
Pro, Gly, His	3
Thr, Ser	2
Met, Tyr	1
Arg, Glu, Lys, Asn, Gln, Asp	Menos del 1%

Tabla 7.1. Cambio de las Cys ocultas por otro residuo de aminoácido. Se alineó la estructura primaria de TIM de 108 especies y se localizaron las posiciones ocultas con Cys, entonces se realizó un análisis estadístico para determinar el porcentaje de cambio de la Cys por los demás residuos.

- Albe, K.R., Butler, M.H., y Wright, B.E. (1990) *J. Theor. Biol.* **143**:163–95
- Albery, J.W. y Knowles, J.R. (1976) *Biochemistry* **15**:5631–40
- Albery, W.J. y Knowles, J.R. (1976) *Biochemistry* **15**:5627–30
- Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K. y Maes, D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:2199–2206
- Arnon, R. (1970) *Methods Enzymol.* **19**:226–52
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., y Wilson, I.A. (1975) *Nature* **255**:609–14
- Banett A.J., Rawlings N.D., y Woessner, J.F. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press.
- Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (2001) *Biochemistry* **40**:9049–58
- Blacklow, S.C., Liu, K.D., y Knowles, J.R. (1991) *Biochemistry* **30**:8470–76
- Bordo, D. y Argos, P. (1990) *J. Mol. Biol.* **211**:975–88
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**:248
- Campbell, D. I., Jones, B. R., Kiener, A. P., Richards, E., Waley, G. S. y Wolfenden, R. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **83**:347–52
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., y Klibanov, A. M. (1987) *Biochemistry* **26**:1258–64
- Connelly, P., Ghosaini, L., Hu, C.-Q., Kitamura, S., Tanaka, A., y Sturtevant, J.M. (1991) *Biochemistry* **30**:1887–91
- Cook, L.L., y Gafni, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:13991–3
- Creighton, T. E. (1993) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, N.Y.
- Cudd, A. y Fridovich, I. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**:11443–7
- Cui, Q., y Karplus, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**:2284–90
- Delboni, L.F., Mande, S.C., Retier-Delrue, F., Mainfroid, V., turley, X., Vellieux, M.D., Martial, J.A., y Hol, W.G.J. (1995) *Protein Sci.* **4**:2594–2604

- Estell, D.A., Graycar, T.P., y Wells, J.A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**:6518–21
- Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science. A guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company. New York
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Gracy, R.W. (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**:389–95
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., y Gómez-Puyou, A. (1998) *Eur. J. Biochem.* **253**:684–91
- George, D.G., Barker, W.C., y Hunt, L.T. (1990) *Methods in Enzymology* **183**, 333–51
- Giles, N.M., Giles, G.I., y Jacob, C. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**:1–4
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., y Pérez-Montfort, R. (1995) *Chem. Biol.* **2**:847–855
- Gracy, R. W. (1992) *Stability of protein pharmaceuticals, Part B: In vivo pathways of degradation and atrategies for protein stabilization*. Tim J. Ahern y Mark C. Manning (ed) Plenum Press, New York, pp 119–45
- Gregoret, L.M., Rader, S.D., Fletterick, R.J., y Cohen, F.E. (1991) *Proteins* **9**:99–107
- Gromiha, M.M., Pujadas, G., Magyar, C., Selvaraj, A., y Simon, Istvan (2004) *Proteins: Structur, Function and Bioinformatics* **55**:316–29
- Harris, T.K., Cole, R.N., Comer. F.I., y Mildvan, A.S. (1998) *Biochemistry* **37**:16828–38
- Hartman, C.F., LaMuraglia, M.G., Tomozawa, Y. y Wolfenden, R., (1975) *Biochemistry* **14**:3274–9.
- Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Mendoza-Hernández, G., Gómez-Puyou, A., y Pérez-Montfort, R. (2002) *Biochemistry* **41**:4230–4238
- Jackson, R.M., y Sternberg, M.J.E. (1994) *Protein Eng.* **7**:371–83
- Jogl, G., Rozovsky, S., McDermott, A.E., y Tong, L. (2003) *PNAS* **100**:50–55
- Knowles, J.R. (1991) *Nature* **350**:121–4.
- Komives, E.A., Chang, L.C., Lolis, E., Tilton, R.F., Petsko, G.A., y Knowles, J.R. (1991) *Biochemistry* **30**:3011–19
- Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A.-M., Antonov, A.M., Augustyns, K., y Wierenga, R.K. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**:5189–96

- Kursula, I., Partanen, S., Lambeir, A.-M., y Wierenga, R.K. (2002) *FEBS letter* **518**:39–42
- Kursula, I., y Wierenga, R.K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:9544–51
- László, P. (1999) *Protein Evolution*, pp 33–50, 1st Ed, Blackwell Science.
- Lipton, S.T., Choi, Y.-B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godsik, a., y Bankston, L.A. (2002) *Trends Neurosci.* **25**:474–80
- Lodi, P.J., Chang L.C., Knowles, J.R. y Komives, E.A., (1994) *Biochemistry* **33**:2809–14
- Lolis, E., Alber. T. Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. y Petsko, A.G. (1990) *Biochemistry* **29**:6609–18
- Lolis, E. y Petsko, A.G., (1990) *Biochemistry* **29**:6619–25
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J.-M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A. y Goraj, K., (1996) *Protein Sci.* **5**:229–39.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G. Tuena, de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Pérez-Monfort, R., (1998) *J. Mol. Biol.* **283**:193–203.
- Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. y Hol, W.G.J., (1994) *Protein Sci.* **3**:810–21
- Mayo, S.L., Olafson, B.D., y Goddard, W.A. III (1990) *J. Phys. Chem.* **94**:8897–8909
- Mirny, L. A., y Shakhnovich, E. I. (1999) *J. Mol. Biol.* **291**: 177–96
- Murphy, K.P., y Freire, E. (1992) *Adv. Protein Chem.* **43**:103–12
- Nagano, N., Christine, A., y Thornton, J.M. (2002) *J. Mol. Biol.* **321**:741–65
- Nájera, H., Costas, M., y Fernández-Velazco, D.A. (2003) *Biochem. J.* **370**:785–92
- Nath, M.D., y Peterson, D.L. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **392**:287–94
- Noble, M.E.M., Wierenga, R.K., Lambeir, A.-M., Opperdoes, F.R., Thunnissen, A.-M. W.H., Kalk, K.H., Groendijk, H., y Hol, W. G. J. (1991) *Proteins Struct. Funct. Genet.* **10**:50–69.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gahimont, A.-C. y Martial, J. A. (1993) *Acta Crystallogr. Sec. D.* **49**:403–17.
- Norton, I. L. y Hartman, F. C. (1972) *Biochemistry* **11**:4435–41
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**:700–5

- Ottesen, Martín y Svendsen, I. (1970) *Methods Enzymol.* **19**:199–215.
- Palzkill, T. y Botstein, D. (1992) *Proteins* **14**:29–44
- Parthasarathy, S., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P., y Murthy, M.R.N. (2002) *Biochemistry* **41**:13178–88.
- Pettersson, G. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**: 28–95
- Plaut, B., y Knowles, J.R. (1972) *Biochem. J.* **129**:311–320
- Poteete, R.A., Rennell, D. y Bouvier, E.S., (1992) *Proteins* **13**:38–40
- Raines, R.T., Sutton, E.L., Straus, D.R., Gilbert, W., y Knowles, J.R. (1986) *Biochemistry* **25**:714–54
- Ray, S. S., Balaram, H. y Balaram, P., (1999) *Chem. Biol.* **6**:625–637
- Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Mendoza-Hernández, G., López-Velázquez, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., y Gómez-Puyou, A. (2002) *Proteins* **48**:580–590
- Reyes-Vivas, H., Hernández-Alcántara, G., López-Velázquez, G., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., y Gómez-Puyou, A. (2001) *Biochemistry* **40**:3134–40
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo, Y. L., Kornhauser, A., y Fernández-Velasco, D. A. (2002) *J. Mol. Biol.* **322**:669–675
- Rozacky, E.E., Sawyer, T.H., Barton, R.A., y Gracy, R.W. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **146**:312–20
- Russel, R.J. y Tylor, G. L., (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**:370–4
- Sampson, N.S. y Knowles, J.R. (1992) *Biochemistry* **31**:8482–7.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schnackerz, K.D., y Gracy, R.W. (1991) *Eur. J. Biochem.* **199**:231–8
- Silverman, J.A., Balakrishnan, R., y Harbury, P.B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:3092–97
- Silverman, J.A., y Harbury, P.B. (2002) *J. Mol. Biol.* **324**:1031–40
- Stryer, L. (1995) *Biquímica*, Tomo I, 4a. Ed., Reverté, S.A., Barcelona, España

- Sun, A.-Q., Yüksel, K.Ü., y Gracy, R.W., (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **293**:382–90.
- Sun, A.-Q., Yüksel, K.Ü., y Gracy, R. W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:26872–8
- Symersky, J., li, S., Carson, M., Lou, M. (2003) *Proteins* **15**:484–86
- Tang, Chuan-ye, Yüksel, K.Ü., Jacobson, T.M. y Gracy, R.W. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **283**:12–9
- Téllez-Valencia, A., Ávila-Ríos, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., López-Calahorra, F. y Gómez-Puyou., A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**:958–63
- Urade, Y., Tanakas, T., Eguchi, N., Kikuchi, M., Kimura, H., Toh, H., y Hayaishi, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:1422–28
- Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R.A., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., y Fernández-Velasco, D.A. (2000) *Protein Peptide Letters* **7**: 57–64
- Velanker, S.S., Ray, S.S., Gokhale, R.S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy, M.R.N. (1997) *Structure* **5**:751–61.
- Waley, S.G. (1973) *Biochem. J.* **135**:165–72
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S. y Hol, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* **220**:995–1015
- Williams, J. C., Zeelen, J. Ph., Neubauer, G. M., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambeir, A.-M. y Wierenga, R. K. (1999) *Protein Engng.* **12**:243–50
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., y Lin, L.-N. (1989) *Anal. Biochem.* **179**:131–7
- Zhang, Z., Sugio, S., Komives, A. E., Liu, D. K., Knowles, R. J., Petsko, A. G. y Ringe, D., (1994) *Biochemistry* **33**:2830–7
- Zhang, Z., Komives, A.E., Sugio, S., Blacklow, C.S., Narayana, N., Xuong, H.N., Stock, M.A., Petsko, A.G., y Ringe, D. (1999) *Biochemistry* **38**:4389–4397
- Zubillaga, R.A., Pérez-Montfort, R., y Gómez-Puyou, A. (1994) *Arch. Biochem. Bophys.* **313**:328–336

APÉNDICE I. Alineamiento de la secuencia de TIM de 108 especies

APÉNDICE II. Determinación fluorométrica de la constante de unión Proteína-Ligando

La unión de una enzima con un inhibidor ($E + I \leftrightarrow EI$) puede describirse mediante la siguiente ecuación:

$$K_u = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (7.1)$$

donde K_u es la constante de unión; $[EI]$ es la concentración del complejo enzima-inhibidor, $[E]$ es la concentración de proteína y $[I]$ es la concentración del inhibidor.

El siguiente desarrollo es válido para sistemas de interacción enzima-inhibidor donde la fluorescencia del ligando es insignificante o nula a la longitud de onda de emisión analizada. Considerando que las intensidades de fluorescencia (F) son aditivas:

$$F = F_E[E] + F_{EI}[EI] \quad (7.2)$$

donde F_E es la fluorescencia intrínseca de la proteína y F_{EI} es la fluorescencia del complejo enzima-inhibidor.

Si E_T es la concentración total de la enzima:

$$E_T = [E] + [EI] \quad (7.3)$$

Despejando $[E]$ de (7.2) y sustituyendo en (7.3), tenemos:

$$\begin{aligned} F &= F_E(E_T - [EI]) + F_{EI}[EI] \\ F &= F_E E_T - F_E[EI] + F_{EI}[EI] \end{aligned} \quad (7.4)$$

Sea F_T la fluorescencia de la enzima a la concentración E_T en ausencia de inhibidor:

$$F_T = F_E E_T \quad (7.5)$$

Sustituyendo (7.5) en (7.4): $F = F_T + F_{EI}[EI] - F_E[EI]$

Dividiendo cada término entre F_T y despejando $[EI]$:

$$\begin{aligned} \frac{F}{F_T} &= 1 + \frac{F_{EI}}{F_T} [EI] - \frac{F_E}{F_T} [EI] \\ \frac{F}{F_T} - 1 &= \left(\frac{F_{EI}}{F_T} - \frac{F_E}{F_T} \right) [EI] \\ [EI] &= \frac{\frac{F}{F_T} - 1}{\frac{F_{EI}}{F_T} - \frac{F_E}{F_T}} = \frac{\frac{F}{F_T} - 1}{\frac{F_{EI} E_T}{F_E E_T} - \frac{F_E}{F_E E_T}} \end{aligned} \quad (7.6)$$

Multiplicando (7.6) por E_T en el numerador y denominador del segundo miembro de la ecuación:

$$[EI] = \frac{E_T \left(1 - \frac{F}{F_T} \right)}{1 - \frac{F_{EI}}{F_E}} \quad (7.7)$$

En el caso de que la proteína fluoresca menos al unir el inhibidor: $\frac{F_{EI}}{F_E} < 1$ y $\frac{F}{F_T} < 1$

Denominamos al cociente $\frac{F_{EI}}{F_E} = CA$; donde CA es la constante de apagamiento

Entonces si sustituimos CA en (7.7), tenemos:

$$[EI] = E_T \frac{1 - F/F_T}{1 - CA} \quad (7.8)$$

Si K_I es la constante de disociación y $K_I = I/K_u$, entonces:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (7.9)$$

$$[I] = \frac{K_I}{\frac{E_T}{[EI]} - 1}$$

De (7.8) tenemos:

$$\frac{E_T}{[EI]} = \frac{1 - CA}{1 - F/F_T}$$

Si definimos: $y = 1 - F/F_T$; llegamos a la siguiente ecuación: $[I] = \frac{K_I y}{1 - CA - y}$ (7.10)

Si redefinimos: $1 - CA = a$

$$K_I = b$$

$$E_T = c$$

Entonces $[EI] = \frac{cy}{a}$ y $[I] = \frac{by}{a - y}$

Si x es la concentración total de inhibidor, entonces:

$$x = \frac{cy}{a} + \frac{by}{a - y} \quad (7.11)$$

Rearreglando la ecuación (7.11) como un polinomio de segundo grado:

$$cy^2 - ay(c + x + b) + a^2x = 0$$

Resolviendo para y :

$$y = \frac{a}{2c} \left[c + x + b - \sqrt{(c + x + b)^2 - 4cx} \right] \quad (7.12)$$

Cabe señalar que únicamente el signo negativo de la ecuación cuadrática (7.12) es el que ajusta los datos de la titulación fluorométrica (curva hiperbólica).

APÉNDICE III. Parámetros cinéticos de TIM de diferentes especies

Especie TIM	K_M^- (mM)	k_{cat}^- (s ⁻¹)	k_{cat}^- / K_M^- (M ⁻¹ s ⁻¹)	Condiciones	Referencia
Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1.5	8700	5.8x10 ⁶	Temperatura: 30 °C Amortiguador: TEA/EDTA 200/20, pH 7.4	Lodi y col., 1994
Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1.3	8000	6.15x10 ⁶	Temperatura: 30 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.6	Sampson y Knowles 1992
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	0.42	8300	1.98x10 ⁷	Temperatura: 25 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.4	Stephen C. y col., 1990
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	0.39	4333	1.1x10 ⁷	Temperatura: 30 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.6	Plaut y Knowles, 1972
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0.48	4333	9x10 ⁶	Temperatura: 25 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.4	Reyes-Vivas y col., 2001
<i>Trypanosoma cruzi</i>	0.66	4320	6.5x10 ⁶	Temperatura: 30 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.4	Garza-Ramos y col., 1998
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	0.47	3500	7.5x10 ⁶	Temperatura: 30 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.6	Stephen C. y col., 1991
<i>Trypanosoma brucei</i>	0.66	2966	4.5x10 ⁶	Temperatura: 25 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.4	Garza-Ramos y col., 1998
<i>Leshmania mexicana</i>	0.9	5255	5.84x10 ⁶	Temperatura: 25 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.4	Ostoa-Saloma y col., 1997
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	0.49	4500	9.18x ⁶	Temperatura: 25 °C Amortiguador: TEA/EDTA 100/10, pH 7.4	Mainfroid y col., 1996