

03072 24  
MAY 24 1995  
265

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del  
Colegio de Ciencias y Humanidades  
Sede Instituto de Biotecnología

FALLA DE ORIGEN

RELACION ESTRUCTURA-FUNCION DE LA  
TRIOSOFOSFATO ISOMERASA: ESTUDIOS POR  
FLUORESCENCIA

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Biotecnología

Presenta

Marisa Angela Septilveda Becerra

Cuernavaca, Mor. México, Marzo de 1995

1995



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A MIS PADRES, HERMANOS  
Y WILLIAM

Con todo mi amor

A MEXICO

País verde y herido  
Comarquita de veras  
Patria pobre

País ya te armarás  
Pedazo por pedazo  
Pueblo mi pueblo

Mario Benedetti.

Este trabajo se realizó con la asesoría del Dr. Alberto Darszon Israel en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, y con la colaboración de:

Dr. Armando Gómez Puyou

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Sergio T. Ferreira

Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro Brazil.

Dr. Retto Strasser

Laboratoire de Bioenergetique, Universite de Geneve, Switzerland.

## INDICE

Resumen.....	03
Introducción.....	05
Objetivo.....	07
Antecedentes.....	08
Características generales de la Triosofosfato Isomerasa.....	08
Reactivación de la Triosofosfato Isomerasa en micelas invertidas.....	11
Generalidades.....	12
El agua y la catálisis enzimática.....	13
Acción de los desnaturalizantes en la estructura-función de las proteínas.....	14
Enzimas atrapadas en micelas invertidas.....	16
Fluorescencia de proteínas.....	18
Transferencia de energía.....	19
Polarización y anisotropía.....	21
Marcaje de proteínas con monitores fluorescentes.....	23
Características de 1,5-IAEDANS y FITC.....	24
Materiales y Métodos.....	26
Resultados.....	35
Discusión.....	67
Conclusiones.....	78
Perspectivas.....	78
Bibliografía.....	80

## ABREVIATURAS

CEM - Centro espectral de masas

CTAB - Bromuro de hexadecil trimetilamonio

DHAP- Dihidroxiacetona fosfato

DTT - Dithiotreitol

GAP - Gliceraldehido-3-fosfato

$\alpha$ -GDH -  $\alpha$ -Glicerofosfato deshidrogenasa

GdnHCl - Cloruro de guanidina

EDTA - Etilendiamina tetraacetato

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

1,5-IAEDANS - 5-(((2-iodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-ácido sulfónico

MI - Micelas invertidas

$\beta$ -NADH - Dinucleótido de nicotinamida reducido

TEA - Trietanolamina

TED - Amortiguador TEA 40.0 mM/EDTA 10.0 mM/DTT, 1.0 mM; pH = 7.4

TPI - Triosofosfato Isomerasa

TPI-IAEDANS - TPI marcada con 1,5-IAEDANS

TPI-FITC - TPI marcada con FITC

## RESUMEN

Aún queda mucho por conocer acerca del mecanismo del plegamiento proteico a partir de la cadena polipeptídica totalmente desplegada. En el presente trabajo se estudió la renaturalización de la enzima homodimérica Triosafosfato Isomerasa (TPI) en micelas invertidas (MI) a partir de los monómeros desplegados, mediante la correlación estructura - función de los monómeros desplegado, plegado y del dímero.

La TPI interconvierte dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y D-gliceraldeido-3 - fosfato (GAP). Se conoce la estructura del cristal de la TPI de varias especies (Wierenga, R.K., et al., 1991; Zhidong, Z., et al., 1994). La TPI se disocia y se desnaturaliza en medio acuoso conteniendo 1 M de cloruro de guanidina (GdnHCl) (Waley, S.G., et al., 1973). La enzima desnaturalizada recupera su actividad cuando se diluye el desnaturalizante. La reactivación de la TPI a partir de los monómeros desplegados es dependiente de la concentración de proteína en medio acuoso (Waley, S.G., et al., 1973; Zabori, S., et al., 1980) y en las MI (Garza-Ramos, G., et al., 1992). Se ha propuesto que el monómero desplegado primero se pliega como un monómero capaz de formar el dímero catalíticamente activo. A bajas concentraciones de proteína la dimerización es la etapa limitante de la velocidad de la reacción. Este proceso ocurre en ordenes de magnitud más lento en MI formadas con 200 mM de bromuro de hexadecil trimetilamonio (CTAB) y n-octano / hexanol 8.7 % V/V (Garza-Ramos, et.al., 1992), permitiendo una mejor caracterización de la renaturalización, dimerización y reactivación de la TPI.

Haciendo uso de esta ventaja, mediante la fluorescencia intrínseca de la proteína se siguieron los cambios espectrales de los residuos aromáticos de la TPI que en estado desnaturalizado se transfirió a las MI con diferentes concentraciones de agua, simultáneamente se midió la recuperación de la actividad. Se encontró que

en 6.0 % de agua los cambios en la fluorescencia intrínseca ocurren en paralelo a la recuperación de la actividad catalítica. En las MI con bajo contenido de agua no ocurre la renaturalización y no se observan cambios en la estructura global de la proteína según se observó por su fluorescencia intrínseca.

Esto sugiere que la proteína altamente fluorescente que surge después de transferir a la TPI desnaturalizada a las MI en 6.0 % de agua es un intermediario en la vía de monómero desplegado a dímero activo. Además los datos muestran que la dimerización involucra un arreglo final de los aminoácidos aromáticos. En medio acuoso no se pudo detectar este intermediario (esto puede deberse a limitaciones técnicas), debido a que la reactivación de la TPI es un proceso rápido (Waley, S.G., 1973., Zabori S., et al, 1980).

La TPI se marcó con dos sondas fluorescentes: 5-(((2-iodoacetyl) amino) etil) amino) naftaleno -1- ácido sulfónico (1,5-IAEDANS) en una cisteína y con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una de las aminas libres. Mediante la transferencia de energía de los heterodímeros marcados con estos fluoróforos se estudió la reasociación y se correlacionó con la reactivación. Los monómeros marcados desplegados se reasociaron después de iniciar la reacción del replegamiento al bajar la concentración del GdnHCl. Se observó que en solución acuosa la renaturalización ocurre en tiempos muy cortos. La eficiencia de la transferencia de energía de los heterodímeros en solución acuosa se observó 2 ó 3 minutos después de la dilución del desnaturalizante y permaneció constante. En las condiciones experimentales 1:1 donador-aceptor la eficiencia de la transferencia de energía calculada fue 0.54. En Las MI fue posible seguir la cinética de la recuperación de la actividad de la mezcla de los monómeros marcados con el donador y los monómeros marcados con el aceptor, así como también se pudieron observar cambios en la eficiencia de la transferencia de energía



## INTRODUCCION

Las proteínas globulares poseen la propiedad de adquirir su estructura tridimensional autónomamente, en base únicamente a su secuencia de aminoácidos. Actualmente se acepta que el plegamiento y el ensamblaje de las subunidades proteicas en la célula están mediados por las chaperoninas [Ellis R.J., 1987]. El plegamiento *in vivo* de las proteínas esta acoplado a la traducción. Es evidente que la renaturalización *in vitro* debe ser diferente del plegamiento *in vivo*, debido a que el replegamiento ocurre a partir de la cadena polipeptídica completa, mientras que el plegamiento de la proteína naciente es un proceso que acompaña al crecimiento de la cadena polipeptídica desde su extremo amino terminal hasta su extremo carboxilo. Sin embargo hay muchas evidencias que demuestran que el producto final de la renaturalización *in vitro* es equivalente a la proteína nativa con respecto a todos los criterios físico-químicos bioquímicos y biológicos. El plegamiento proteico *in vitro* de proteínas monoméricas ocurre en ausencia de ribosomas, de enzimas y de otros factores. Es aquí donde surge la pregunta cómo la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional y la vía del plegamiento. El desarrollo de un código del plegamiento podría complementar el código genético, dogma central de la biología molecular: DNA → RNA → Cadena polipeptídica → Conformación funcional.

El conocimiento sobre las proteínas en los estados no-nativos o desnaturalizados es muy limitado, en comparación con el de las proteínas en su estado nativo. Esto se debe a que tales estados no se han cristalizado y además a que no hay métodos capaces de dar la suficiente información estructural para su caracterización. Aunque mediante resonancia magnética se podrían hacer estudios de estos estados, existen limitaciones, primero por que la resolución de la estructura por esta técnica es solo para proteínas de menos de 20 KDa, y segundo por que en

condiciones desnaturalizantes muchas proteínas tienden a agregarse. Los estados desnaturalizados son cruciales para entender la estabilidad de proteínas, sus propiedades de plegamiento, su transporte a través de las membranas y su recambio en los organismos vivos. En los estudios *in vitro* para tratar de elucidar el mecanismo del plegamiento proteico, generalmente se inicia con la proteína totalmente desnaturalizada. Posteriormente se procede a diluir el desnaturalizante, de tal manera que la proteína se renaturalice. Se ha propuesto un modelo para que el plegamiento de una cadena polipeptídica llegue a su estado final, el cual refleja un orden jerárquico [Figura 1].

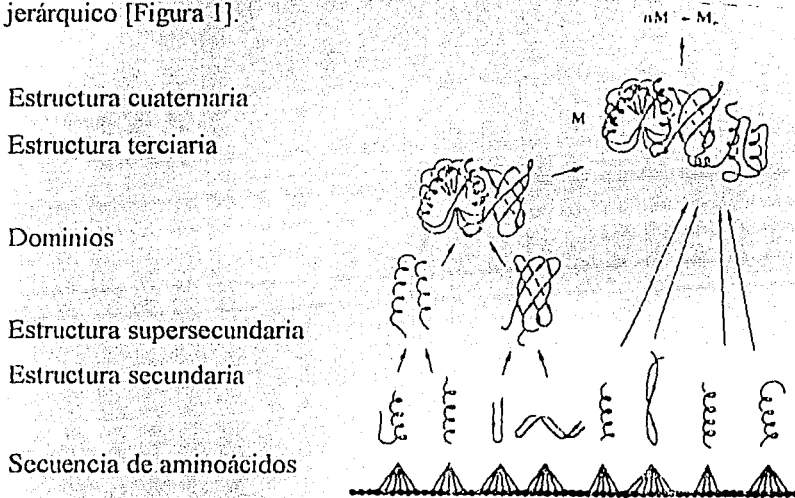


Figura 1. Jerarquía de la estructura y el plegamiento proteico. La estructura primaria unidimensional (••••) determina el plegamiento y la asociación de las proteínas globulares. Las interacciones de corto alcance en el nivel de la estructura secundaria se suplementan con las interacciones de largo alcance originando la formación de motivos estructurales y dominios (estructura supersecundaria y terciaria) [Jaenicke, R., 1987].

Dada una secuencia de aminoácidos, las interacciones de corto alcance conllevan a la formación de elementos regulares de estructura secundaria y supersecundaria, los cuales subsecuentemente constituyen dominios, es decir unidades estructurales que se pliegan autónomamente. En un nivel próximo los dominios coalescen para formar una estructura terciaria compacta -una subunidad. En el caso de la formación de la estructura cuaternaria, los monómeros estructurados o subunidades adquieren su estado final de mínima energía libre mediante reacciones de asociación secuencial (Jaenicke, R., 1984).

## OBJETIVO

Aún queda mucho por entender acerca del mecanismo del plegamiento proteico a partir de la cadena polipeptídica completamente desplegada. Debido a que el plegamiento proteico es un proceso dinámico que implica una gran movilidad conformacional de intermediarios que poseen una vida media corta, se ha buscado una estrategia que permita hacer más lento el proceso de la renaturalización proteica, con el fin de que sea posible atrapar a estos intermediarios lo suficientemente estables para su estudio estructural y cinético detallado. Tomando en cuenta el hecho de que en las micelas invertidas (MI) la renaturalización de la enzima dimérica Trisofosfato Isomerasa de músculo de conejo a partir de monómeros desplegados, ocurre en tiempos mucho más largos que en solución acuosa [Garza-Ramos, G., et al, 1992], el objetivo central de este trabajo fue caracterizar el proceso de la renaturalización de la Trisofosfato Isomerasa en micelas invertidas a partir de los monómeros desplegados mediante la correlación estructura-función de los monómeros desplegado y plegado y del dímero.

## ANTECEDENTES

### CARACTERISTICAS GENERALES DE LA TRIOSOFOSFATO ISOMERASA (TPI)

La TPI cataliza la conversión reversible de dihidroxiacetona:fosfato (DHAP) y gliceraldehido-3-fosfato (GAP), una reacción esencial en la vía glicolítica. La TPI es una de las enzimas mejor conocidas. Es un dímero formado por dos subunidades idénticas, con una alta constante de asociación [Krietsch, W.K.G., et al. 1970]. El mecanismo de la isomerización catalizada por la TPI se ha estudiado detalladamente. La reacción procede a través de la formación de un intermediario cis-enediol [Rose, I.A. y O'Connell, E.L., 1961., Fersht, A., 1985] (fig. 2).

Además la TPI cataliza la degradación de los sustratos DHAP y GAP para dar metilglicoxal y fosfato inorgánico [Webb, M.R., et. al, 1977; Richard, J.P., 1991]. Esta reacción es lenta comparada con la isomerización. Los valores de la eficiencia catalítica ( $K_{cat}/K_m$ ) para las reacciones de eliminación y de isomerización son  $10^8 M^{-1}s^{-1}$  y  $14 M^{-1}s^{-1}$  respectivamente [Richard, J.P., 1991; Komives, E.A., et. al, 1991]. Se han estudiado ampliamente sus parámetros termodinámicos y su desnaturalización por altas temperaturas y por GdnHCl [Zabori, S., et. al, 1980]. Mediante estudios de renaturalización [Zabori, S., et.al, 1980; Waley, S.G., 1973] y de mutagénesis [Casal, et. al, 1987] se ha postulado que el monómero es inactivo. Además no se ha encontrado un control alostérico o cooperatividad entre las dos subunidades [Fersht, A., 1985, Schnackers, K.D. and Gracy, R.W., 1991].

Se conoce la secuencia de la TPI de varias especies [Norton, I.L., et.al, 1970; Johnson, L.N. and Waley, S.G., 1967]. Para la enzima de músculo de conejo, el peso molecular del dímero es 53257 Da [Corran, P.H. and Waley, S.G., 1973], las cadenas polipeptídicas individuales poseen 248 aminoácidos. Se ha determinado la estructura

del cristal de la TPI de músculo de pollo [Banner, D.W., et.al, 1975], levadura [Alber, T., et.al, 1981] y tripanosomal [Wierenga, R.K., et. al, 1987]. En cada cristal las unidades asimétricas constan de un dímero completo. Cada subunidad tiene forma globular con dos asas sobresalientes. Por su estructura la TPI pertenece a las proteínas barril  $\alpha/\beta$ , familia de aproximadamente 20 proteínas [Figura 3] [Banner, D.W., et.al, 1975].

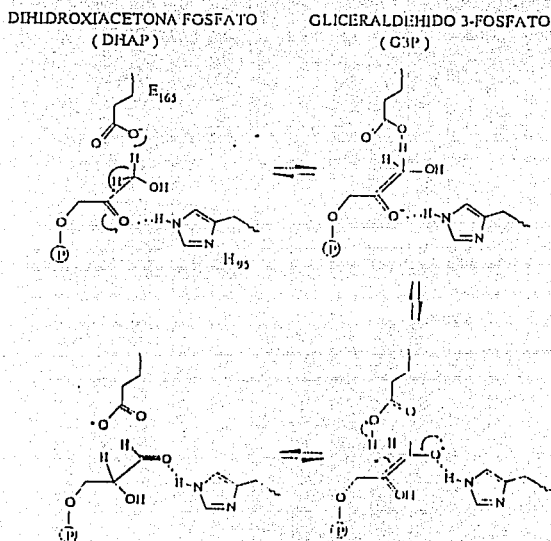


Fig. 2. Mecanismo de la reacción de isomerización catalizada por la Triosofosfato Isomerasa. Los grupos catalíticos son el glutámico 165 y la histidina 95. El Glu-165 actúa como una base general para quitar el protón del carbono 1 de DHAP, ayudado por la catálisis electrofílica de la His-95 y la Lys-12 que hacen al hidrógeno más ácido y estabilizan la carga negativa parcial que se forma en el oxígeno del carbonilo en el estado de transición.

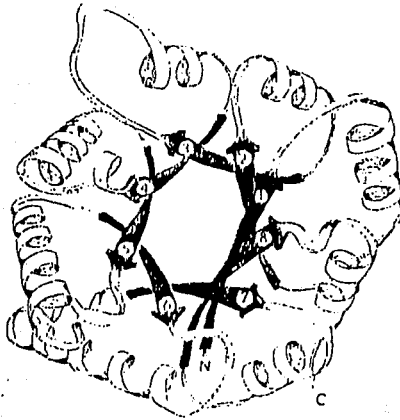


Fig. 3. Estructura de la Triosofosfato Isomerasa.

*Las partes globulares están formadas por 8 unidades  $\alpha\beta$  las cuales se doblan hacia arriba de una manera regular tal que las unidades  $\beta$  forman un barril de 8 hojas  $\beta$  paralelas. Las hélices  $\alpha$  se orientan hacia el exterior. Las conexiones entre las hojas  $\beta$  y las hélices  $\alpha$  forman 8 asas.*

La TPI tiene un asa flexible cerca del sitio activo. Esta asa esta formada por 10 aminoácidos y se localiza entre los residuos 166 a 176. En presencia de un ligando específico el asa flexible se mueve 7 Å desde una posición "abierto" a una "cerrado" [Banner, D.W., et. al, 1975, Wierenga, R.K., et. al, 1991]. Este movimiento aísla al sitio activo del solvente que rodea a la enzima, formando un puente de hidrógeno entre una glicina del asa y el grupo fosfato del sustrato, estabilizando así al intermediario enediol de la reacción. Existe otra asa en la interfase que permite los contactos entre las dos subunidades de la TPI, esta formado por los residuos 71 al 78. Estos se extienden desde una subunidad hacia una hendidura localizada cerca del sitio activo de la otra subunidad. [Lolis, E., et. al, 1990].

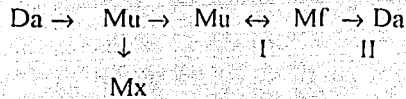
## REACTIVACION DE LA TPI EN MICELAS INVERTIDAS

Con el fin de caracterizar la reactivación de la Triosofosfato Isomerasa (TPI) a partir de la enzima desnaturalizada por GdnHCl, se realizó un estudio cinético en micelas invertidas. Se observó que la enzima nativa (dimerica) de músculo de conejo tiene una gran estabilidad en el sistema de MI formado por 200 mM de CTAB y octano/hexanol 8.7 % V/V. Aunque la actividad de la TPI atrapada en las micelas con 3.0 y 6.0 % de agua resultó ser 40 y 10 veces menor respectivamente que en solución totalmente acuosa, donde la actividad es de 4500  $\mu\text{moles} / \text{min} / \text{mg}$ , no presentó cambios significativos en 48 horas y disminuyó un 10 % después de 5 días de incubación en el solvente orgánico [Garza-Ramos, G., et al, 1992].

Anteriormente se sabía que la incubación de la TPI en sistemas acuosos convencionales conteniendo GdnHCL 1.0 M daba lugar a la monomerización de la enzima [Zabori, S., et al, 1980]. Además Waley (1973) había reportado que la proteína desnaturalizada puede rápidamente recuperar su actividad al diluir al desnaturalizante.

Tomando en consideración todo lo anterior, fue posible seguir el curso de la reactivación de la TPI al transferir a la enzima desnaturalizada con GdnHCl, al sistema de MI [Garza-Ramos, G., et al, 1992]. Se asumió que en la etapa de transferencia de la TPI a las micelas, el desnaturalizante se distribuye exclusivamente en la fase acuosa de las MI y la GdnHCl se diluye mas de 100 veces. Esto permite estudiar la renaturalización de la enzima con la subsecuente recuperación de la actividad. Al diluirse el desnaturalizante en las micelas el monómero tiende a retomar su conformación y como resultado de las colisiones entre micelas ocurre la reasociación de los monómeros para formar el dímero. En condiciones óptimas la reactivación puede ocurrir en un tiempo de aproximadamente 3 horas. El esquema derivado de la determinación de la velocidad de reactivación de TPI a partir de

monómeros desplegados por guanidina en solución acuosa y transferidos a MI es el siguiente:



en donde **Mu** y **Mf** son los monómeros desplegado y plegado respectivamente, y **Da** es el dímero catalíticamente activo, **Mx** corresponde a una forma inactiva de la proteína, formada en 3.0 % de agua en menos de 30 segundos.

Con estos experimentos se encontró que la velocidad de la reactivación de la TPI en MI se incrementó con la concentración de proteína, lo cual indicó que la catálisis requiere la formación del dímero y que, la etapa limitante de la velocidad de la secuencia total, es la dimerización de TPI a partir de los monómeros plegados (etapa II). A diferencia de que la renaturalización de la TPI en agua ocurre en segundos (Waley, S.G., 1973), en MI la etapa II ocurre en minutos. [Garza-Ramos, G., et. al, 1992].

## GENERALIDADES

### EL AGUA Y LA CATALISIS ENZIMATICA

El agua participa en todos los procesos bioquímicos *in vivo*, sin embargo aún no se conocen por completo los mecanismos a través de los cuales el agua participa en las reacciones bioquímicas y en el mantenimiento de la conformación nativa de los biopolímeros, entre ellos las enzimas. El agua es la fuerza motriz en la formación de las interacciones hidrofóbicas del interior de las proteínas globulares. Las moléculas



de agua disminuyen las interacciones electrostáticas, cubren la superficie de las proteínas y se expanden hacia el exterior cuando los monómeros tienden a formar multímeros. De tal manera que las moléculas de agua son participantes activos en los procesos involucrados en el plegamiento y asociación de proteínas, además de que confieren distintas características estructurales a las proteínas.

Las proteínas son moléculas altamente dinámicas. Los estudios cristalográficos y espectroscópicos muestran que los movimientos de las proteínas varían desde movimientos globales hasta vibraciones locales de átomos específicos. Las vibraciones locales de los átomos de la cadena principal y de las cadenas laterales ocurren en un rango de picosegundos, mientras que los movimientos de los dominios ocurren en el rango de microsegundos o más.

En los estudios de rehidratación gradual de la lisozima realizados por el grupo de Rupley y colaboradores [1983] reportan que existe un mínimo de agua que la enzima requiere para poder expresar su actividad catalítica. Esta es la llamada agua de hidratación, es decir una monocapa que cubre la superficie de la proteína. Las investigaciones sobre los eventos moleculares que ocurren en la rehidratación de enzimas han mostrado que existen tres categorías de agua: iniciando con la proteína deshidratada, las primeras moléculas de agua se unen a los grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos, esta agua tiene propiedades diferentes a las del agua líquida y su estructura es muy similar a la del agua sólida. La hidratación de los grupos ionizables es casi completa a 0.1 g de agua / g de proteína correspondiente aproximadamente a 2 moléculas de agua por carga. La segunda categoría forma puentes de hidrógeno con los carbonilos y posiblemente con los grupos amida del esqueleto proteico y con algunos grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos, esta agua tiene menor movilidad que el agua libre y sus movimientos están limitados a la formación y rompimiento de puentes de hidrógeno.

Finalmente la última categoría forma parte de la capa de hidratación y posee propiedades muy similares a las del agua líquida, es un poco más viscosa, sus propiedades termodinámicas y dinámicas difieren poco de las del agua líquida; el volumen es cerca de 10 % menor y la capacidad calorífica es mayor que la del agua pura. Cuando se empieza a formar la capa de hidratación la actividad catalítica aparece, esto ocurre cuando el contenido de agua es 0.2 - 0.3 g/g de proteína. La actividad se incrementa conforme aumenta la capa de hidratación. Rupley y colaboradores han reportado que la movilidad interna de las proteínas depende de la movilidad del agua que las rodea. Cuando se remueve esta agua o se disminuye la temperatura, la movilidad interna de las proteínas se reduce, lo que se refleja en una disminución de la capacidad para llevar a cabo la catálisis.

## ACCION DE LOS DESNATURALIZANTES EN LA ESTRUCTURA-FUNCION DE LAS PROTEINAS

Los estudios del plegamiento proteico *in vitro*, necesariamente empiezan con la proteína en condiciones diseñadas para destruir las interacciones no covalentes que estabilizan la conformación nativa. Los valores extremos de pH y temperatura, los solventes orgánicos, la presión alta y una variedad de agentes caotrópicos pueden causar cambios drásticos en la estructura de las proteínas globulares y por consiguiente la pérdida de la función [Tanford, 1968]. Esto no quiere decir que la proteína en tales condiciones extremas este completamente desplegada. Por ejemplo la estructura de una proteína desplegada térmicamente es similar a la desplegada por GdnHCl o urea. Los estudios de NMR de resonancias individuales de protones y de espectroscopia óptica de la  $\alpha$ -lactalbumina presentan evidencias de la existencia de estructura residual a altas temperaturas [Matthews, et. al, 1993]. En el espectro de dicroísmo circular del UV lejano de la  $\alpha$ -lactalbumina térmicamente desnaturalizada

se visualiza estructura secundaria residual. Aunque muchas proteínas presentan grandes cambios conformacionales en respuesta al incremento de cargas positivas de la proteína entre pH 5 y 2, la adición de sal a una proteína desnaturalizada por ácido puede causar una recuperación parcial de la elipticidad en el UV lejano [Goto Y. y Fink A.L., 1990]. Fink y colaboradores han atribuido este incremento en estructura secundaria a la interacción de las cargas positivas de los residuos de lisina con los aniones de la sal. La disminución de la repulsión electrostática provoca la contracción de la proteína y el incremento de la formación de estructura secundaria.

La urea y las sales de guanidina han sido muy utilizadas en el desdoblamiento de las enzimas, además hay muchos reportes que describen su efecto en la catálisis enzimática. Se sabe que las sales de guanidina y la urea perturban la estructura tridimensional de las proteínas [Pace, C.N., et. al, 1976]. Sin embargo hay reportes que indican disminución [Liang, S.J., et. al, 1990; Strambini, G.B. and Gonelli, M., 1986; Le Bras, G., et. al, 1989], o incremento [Iijima, S., et. al, 1990; Scheibe, R., et. al, 1990; Paudel, H.K. and Carlsson, G.M., 1990; Garza-Ramos, G., et. al, 1990] de la actividad enzimática por la acción de desnaturalizantes a concentraciones que no producen cambios drásticos en la estructura de la proteína.

El mecanismo de estos procesos aún no está bien estudiado, aunque hay suposiciones acerca de que estos cambios ocurren a través de modificaciones del sitio catalítico o mediante un incremento en la flexibilidad de la enzima. La acción de los desnaturalizantes involucra la solubilización de aminoácidos que son poco solubles en agua [Tanford, 1980]. También se sabe que los desnaturalizantes al unirse a ciertos aminoácidos debilitan las fuerzas que mantienen la estructura nativa de las proteínas [Lee, J.C. and Timasheff, S.N., 1974]. Finalmente, es probable que la urea y las sales de guanidina además modifiquen la estructura del agua [Creighton, T.E.,

1993]; ya que la acción general de estos agentes es promover o incrementar las interacciones entre los grupos proteicos y el solvente circundante.

## ENZIMAS ATRAPADAS EN MICELAS INVERTIDAS

Gracias a sus características únicas las micelas invertidas (MI) son sistemas que en el área de la enzimología permiten resolver algunas preguntas fundamentales que en sistemas acuosos convencionales son difíciles de analizar. Estas estructuras son agregados formados por detergentes en solventes orgánicos apolares, capaces de solubilizar microgotas de agua. En ellos los grupos polares del detergente forman el núcleo de la micela, mientras que los residuos hidrocarbónicos se orientan hacia el solvente apolar.

El papel del agua en la relación estructura-función de las enzimas se puede estudiar en estos sistemas ya que es posible controlar, dentro de cierto rango, tanto las dimensiones de la cavidad interna acuosa, como la cantidad de agua de las MI [Eicke, H., 1980; Robinson, B.H., et. al, 1984]. A una concentración constante de detergente, la dimensión y la forma de la cavidad interna de las MI se relaciona con el nivel de hidratación del sistema. El tamaño y forma de las micelas no se modifica arriba de cierta concentración de surfactante, por lo tanto su capacidad de solubilizar agua esta limitada [Hafeti, Y., 1985; Poon, P.H. and Wells, M.A., 1974]. Se ha demostrado que a un nivel de agua en el cual la actividad catalítica de una enzima es máxima, el radio promedio de la cavidad acuosa de las MI coincide con las dimensiones de la molécula de enzima [Eicke, H. y Renak, J., 1976; Martinek, K., et. al, 1977]. Un parámetro que indirectamente se relaciona con el tamaño de la cavidad acuosa es el  $W_0$ , que representa la relación de moléculas de agua y moléculas de detergente. Por ejemplo para uno de los sistemas de MI mas usados agua/bis(2 ethylhexil)sulfosuccinato de sodio (AOT)/isooctano, un  $W_0$  de 5 (1.83 % de agua)

equivale a un diámetro de la cavidad acuosa de  $20 \cdot A$ . Este valor se puede incrementar a  $80 \text{ \AA}$  a un  $W_0$  de 50. Al variar el  $W_0$  se modifican las propiedades del agua que forma la cavidad acuosa de la micela [Menger, F.M., et. al, 1973; Kumar, C. and Balasubramanian, D., 1980; Tsuji, K., et. al, 1983]. Utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) para analizar la movilidad de los protones del agua, por desplazamiento químico y tiempo de relajación del espín, se demostró que a un  $W_0 < 6$  el agua existe prácticamente como agua unida. Su movilidad se incrementa al incrementar el contenido de agua en el sistema micelar [Wong, M., et. al, 1977]. Cuando una proteína se transfiere a un sistema de MI se altera el equilibrio del sistema y consecuentemente ocurre una redistribución de las moléculas del detergente y de las moléculas de agua alrededor de la proteína. Se ha propuesto que las proteínas hidrofílicas se acomodan en el interior acuoso de la micela y quedan rodeadas de moléculas de agua [Martinek, K., et. al, 1986], mientras que las proteínas integrales de membrana del tipo de la citocromo oxidasa [Ramakrishnan, V.R., et. al, 1982; Escamilla, E. et, al, 1989], Ca-ATPasa de retículo sarcoplásmico [Ferreira, S.T. y Verjovsky-Almeida, S., 1989] se acomodan en la micela de tal forma que la porción hidrofílica interacciona con la interface cargada de la micela y la parte hidrofóbica de la proteína interacciona con la parte hidrocarbónica del detergente y con el solvente orgánico [Figura 4].

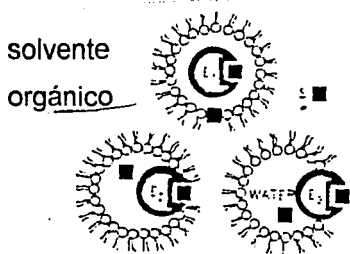


Figura 4. Representación esquemática del acomodo de la enzima en el sistema de micelas invertidas.

$E_1$  - enzima hidrofílica,

$E_2$  - enzima parcialmente hidrofóbica

$E_3$  - enzima hidrofóbica.

## FLUORESCENCIA DE PROTEINAS

La fluorescencia es una técnica espectroscópica muy útil en el estudio de las propiedades dinámicas de las macromoléculas biológicas. Las mediciones se llevan a cabo en soluciones ópticamente transparentes y se requieren pequeñas cantidades de material para el análisis, con la ventaja de la recuperación de las muestras después de los experimentos.

La mayoría de las proteínas absorben luz y emiten en el rango UV del espectro ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ). La absorbancia se debe a los aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano y fenilalanina, y en un pequeño porcentaje a los enlaces disulfuros. La emisión de tirosina en agua se observa a 303 nm y es relativamente insensible a la polaridad del solvente. El máximo de emisión del triptofano en agua es 348 nm y depende altamente de la polaridad [Teale, F.W. y Weber, G., 1957]. La tirosina transfiere energía al triptofano, debido a que el espectro de absorción de esta se superpone con el espectro de emisión del triptofano; es por eso que el 90 % de la fluorescencia de la mayoría de las proteínas se debe al triptofano cuyo espectro de emisión responde a la polaridad del medio circundante. El máximo de emisión refleja un promedio de la eficiencia cuántica de los triptofanos expuestos al solvente.

Se observan cambios espectrales como resultado de varios fenómenos tales como unión de ligandos, asociación proteína-proteína, desnaturalización y otros. La vida media de la fluorescencia de los residuos de triptofano es de 6 ns [Lakowicz, J.R., 1983]. Para el análisis estructural de la proteína a partir de los datos de fluorescencia, un parámetro apropiado para caracterizar globalmente el espectro de emisión es el centro espectral de masa ( $\lambda_{CEM}$ )

$$\lambda_{CEM} = \left( \int I(\lambda) \lambda d\lambda \right) / \left( \int I(\lambda) d\lambda \right)$$

donde  $\lambda$  y  $I(\lambda)$  son la longitud de onda de emisión y la intensidad de la emisión a una longitud de onda dada [Bismuto, E., et. al, 1987].

Una enzima como la TPI de músculo de conejo posee 5 triptofanos por subunidad, los cuales están distribuidos por toda la proteína y puede ser estudiada mediante la fluorescencia intrínseca y se puede obtener información sobre los cambios conformacionales de su estructura cuaternaria global, debidos a la perturbación del medio al que estén expuestos los residuos aromáticos fluorescentes.

## TRANSFERENCIA DE ENERGIA

Es posible marcar a una proteína con una sonda fluorescente covalentemente unida a ella, lo que permite monitorear la (o las) señal (es) del fluoróforo. La transferencia de energía del estado excitado de un donador (d) a un aceptor (a) es el resultado de las interacciones dipolo-dipolo entre "d" y "a". Bajo condiciones favorables la energía de excitación se puede transferir de un fluoróforo a otro, los requerimientos son:

- 1) la posibilidad de la interacción dipolo-dipolo entre los fluoróforos, para lo cual se requiere que la distancia entre ellos sea entre 10 y 80 Å.
- 2) una sobreposición apreciable del espectro de emisión del donador con el espectro de absorción del aceptor.

El hecho de que la transferencia de energía opere por un mecanismo de interacción dipolar explica la fuerte dependencia de tal transferencia con respecto a la distancia ( $r$ ) entre los grupos que participan. La interacción varía con el inverso de la sexta potencia de la separación ( $r$ ). La eficiencia de la transferencia de energía esta dada por:

$$E = 1/[1 + (R/R_0)^6]$$

donde  $R_0$  es una distancia característica del par donador-aceptor, llamada la distancia crítica de Förster, a la cual la eficiencia de la transferencia es del 50 %. Un parámetro que se mide frecuentemente es la eficiencia de la transferencia de energía  $E$ , la cual representa la proporción de los fotones absorbidos por el donador que son absorbidos por el aceptor. La eficiencia de la transferencia normalmente se calcula del rendimiento de la fluorescencia relativa en presencia ( $F_{da}$ ) y en ausencia ( $F_d$ ) del aceptor o de las vidas medias bajo estas mismas condiciones ( $\tau_{da}$  y  $\tau_d$ ):

$$E = 1 - (F_{da}/F_d); \quad E = 1 - (\tau_{da}/\tau_d)$$

El estudio de la dependencia del grado de la transferencia con respecto a la distancia en proteínas marcadas ha dado como resultado valiosa información estructural. El rango de distancias de éste fenómeno (10-80 Å) es comparable al diámetro de muchas proteínas y al grosor de las membranas biológicas. Cualquier fenómeno que afecte la distancia entre "d" y "a" va a afectar el grado de la transferencia de energía, permitiendo así que el fenómeno sea cuantificado (Lakowicz, J.R., 1983).

En muchas ocasiones se puede obtener información acerca de la asociación de las macromoléculas mediante mediciones de transferencia de energía, aún si estos datos no se utilizan para determinar las distancias entre las moléculas de donador y aceptor. Vanderkoi (1977) utilizó la transferencia de energía para determinar que en las membranas la  $Mg^{12}-Ca^{12}$ -ATPasa existe en un estado agregado. La ATPasa se marcó por separado con 1,5-IAEDANS (donador) y con iodo acetamidofluoresceína (IAF) (aceptor). Las moléculas de la ATPasa individualmente marcadas se reconstituyeron en las mismas vesículas de fosfolípido. Se observó que la fluorescencia del 1,5-IAEDANS se apagó parcialmente y la del IAF se incrementó. Lo anterior indicó que hubo transferencia de energía entre el donador y el aceptor.



El grupo de Hamaguchi (1991) utilizó la transferencia de energía para caracterizar la compactabilidad de un fragmento de la cadena ligera de una inmunoglobulina en la etapa temprana del plegamiento. El fragmento  $C_L$  de la cadena ligera de la inmunoglobulina tipo-k contiene una cisteína en el carboxilo terminal, la cual se modificó con 1,5-IAEDANS. Este fragmento contiene solo un triptofano en la posición 148. El fragmento contiene un puente bisulfuro el cual se redujo con el fin de eliminar el apagamiento que este provoca de la fluorescencia del triptofano. El fragmento reducido y marcado con 1,5-IAEDANS se estudió en las etapas primarias del replegamiento a partir del desplegamiento en presencia del GdnHCl, mediante la transferencia de energía del triptofano al 1,5-IAEDANS. Para el fragmento reducido  $C_L$ -IAEDANS la emisión del triptofano se sobrepone con la emisión del 1,5-IAEDANS y se observó la transferencia de energía entre el triptofano 148 y el grupo 1,5-IAEDANS en ausencia del GdnHCl. En 4M de GdnHCl la distancia entre el donador y el aceptor fue muy grande y la eficiencia de la transferencia de energía resultó muy baja. La distancia entre el triptofano 148 y el grupo 1,5-IAEDANS en la proteína intacta se calculó mediante los datos de la transferencia de energía, la cual concordó bien con la distancia obtenida mediante la cristalografía de rayos X. Mediante la transferencia de energía se estudió la cinética del desplegamiento y replegamiento del fragmento. Durante la cinética del replegamiento se calculó la eficiencia de la transferencia de energía la cual alcanzó el mismo nivel del de la proteína nativa en una muy temprana etapa del replegamiento.

## POLARIZACION Y ANISOTROPIA

Al excitar un fluoróforo con luz polarizada ocurre una fotoselección que consiste en la excitación exclusiva de los fluoróforos cuyos dipolos de transición de absorción se encuentran paralelos al vector eléctrico de excitación. Esta excitación

selectiva de una población de fluoróforos parcialmente orientados da como resultado una emisión parcialmente polarizada. Dentro de cada fluoróforo los momentos de transición para la absorción y la emisión tienen orientaciones fijas, el ángulo entre ellos determina la anisotropía máxima medida.

Para medir la polarización de la fluorescencia y la anisotropía, la muestra se excita con luz verticalmente polarizada (Fig. 5), el vector eléctrico de excitación paralelamente se orienta al eje z, entonces se mide la intensidad de emisión a través de un polarizador. Cuando el polarizador analizador se orienta paralelamente (II) a la dirección de la excitación polarizada, la intensidad observada es  $I_{||}$ , cuando el polarizador es perpendicular ( $\perp$ ) a la excitación, la intensidad es  $I_{\perp}$ . La polarización de la fluorescencia "p" y la anisotropía "r" están definidas por:

$$p = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp})$$

$$r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2I_{\perp})$$

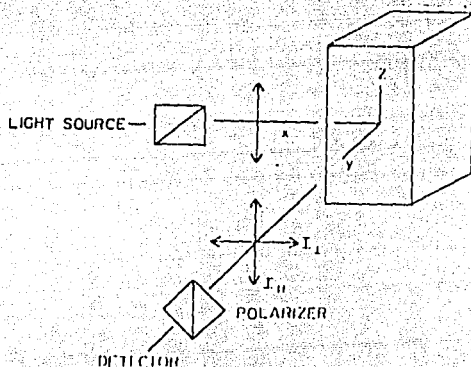


Figura 5. Polarización de la fluorescencia y Anisotropía

Los valores de polarización de la fluorescencia para un fluoróforo en solución acuosa son muy pequeños debido al movimiento Browniano, sin embargo el fluoróforo se puede colocar en un medio altamente viscoso en donde la polarización de su fluorescencia sea mayor debido a la restricción de su movimiento. En solución acuosa los fluoróforos covalentemente unidos a las proteínas muestran un valor de

polarización de la fluorescencia de 0.2 a 0.3, mientras que en un medio altamente viscoso es de 0.4 (Lakowicz, J.R., 1983).

#### MARCAJE DE PROTEINAS CON MONITORES FLUORESCENTES

Como generalmente la reacción de marcaje de una proteína con un fluoróforo se lleva a cabo a altas concentraciones del fluoróforo, consecuentemente es necesario eliminar el fluoróforo libre. Esto se puede hacer al filtrar la muestra con proteína marcada a través de una columna de sephadex que retenga al fluoróforo libre. Posteriormente midiendo la polarización de la fluorescencia es posible saber si ya se ha eliminado todo el fluoróforo libre; ya que si al filtrar una segunda vez y medir la polarización de la fluorescencia el valor de esta permanece constante, entonces se puede considerar que ya no hay fluoróforo libre. De lo contrario es necesario realizar las filtraciones necesarias hasta llegar a un valor constante de la polarización de la fluorescencia. El valor de la polarización de la fluorescencia o la anisotropía de un fluoróforo unido a una macromolécula va a depender del sitio de unión, de que tanta flexibilidad tenga este sitio, es decir va a depender de la movilidad local y global así como también del tamaño de la macromolécula.

Tomando todo lo anterior en consideración la ecuación de Perrin nos permite calcular el tamaño de la partícula a la cual se une el fluoróforo. Esta ecuación describe la depolarización causada por la difusión rotacional del fluoróforo. La ecuación de Perrin se presenta en dos formas alternativas:

$$\begin{aligned} 1/r &= 1/r_0 [1 + \tau RT/\eta V] \\ 1/p - 1/3 &= (1/p_0 - 1/3) [1 + \tau RT/\eta V] \end{aligned}$$

donde:

$p$  = polarización de la fluorescencia

$r$  = anisotropía

$p_0$  = polarización de la fluorescencia en ausencia de difusión rotacional

$r_0$  = anisotropía de la fluorescencia en ausencia de difusión rotacional

$\eta$  = viscosidad de la solución (poise)

$T$  = temperatura de la solución ( $^{\circ}\text{K}$ )

$R$  = constante de los gases ( $8.313 \cdot 10^7 \text{ erg. mol}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{K}^{-1}$ )

$V$  = volumen de la partícula ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ )

$\tau$  = vida media de la fluorescencia del fluoróforo ( ns ).

En esta ecuación se considera que la partícula tiene forma esférica.

Las medidas de polarización de la fluorescencia y anisotropía son también de gran utilidad en la investigación bioquímica. Esto se debe a que cualquier factor que afecte el tamaño, la forma o la movilidad local de una macromolécula va a afectar las anisotropías observadas. Esta propiedad de las macromoléculas se puede afectar por cambios en pH, temperatura, viscosidad, desnaturalizantes y por reacciones de asociación. Los fluoróforos generalmente absorben fotones cuyos vectores eléctricos se alinean paralelamente al momento de transición del fluoróforo, el cual tiene una orientación definida. En una solución isotrópica los fluoróforos están orientados al azar.

## CARACTERÍSTICAS DE 1,5-IAEDANS Y FITC

El 5-(((2-iodoacetil) amino) etil) amino) naftaleno-1-ácido sulfónico (1,5-IAEDANS) (fig.6) se une covalentemente a las cisteínas de las proteínas  $\{[\text{R}-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2]\} + \text{HS}-\text{R} \rightarrow \text{R}-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_2-\text{SR}$ , tiene un pico de absorción a 336 nm, además de que tiene también una absorción a 280 nm que equivale a un 20 % de la absorción a 336 nm. Su fluorescencia es dependiente de la polaridad del

medio, en agua el máximo de emisión se observa a 482 nm, en soluciones apolares el máximo se desplaza a longitudes de onda menores, es decir hacia el azul y la intensidad de la emisión aumenta. El tiempo de vida media de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS es de 20 ns, debido a lo cual los conjugados IAEDANS-proteína son muy utilizados en estudios de polarización de la fluorescencia y difusión rotacional. La emisión del 1,5-IAEDANS se sobrepone con la absorbancia del isotiocianato de fluoresceína (FITC), lo que lo hace ser un reactivo excelente como donador en la transferencia de energía al FITC [Lackowicz, J.R., 1983].

El FITC (fig.6) (R-N=C=S) se une covalentemente a las aminas libres de las proteínas, formando tioureas (R-NH-(C=S)-NH-R"). El tiempo de vida media de la fluorescencia del FITC es de 3.4 ns [Molecular Probes, 1994]. Tiene un pico de absorción en 496 nm y también absorbe a 280 nm, lo que equivale a un 40 % de la absorción a 496 nm. De tal manera que para calcular la estequiometría del marcaje de la proteína se mide su absorbancia a 280 nm y la del fluoróforo (496 nm para FITC, ó 336 nm para 1,5-IAEDANS). A la absorción a 280 nm de la proteína marcada se le debe restar la contribución a la absorbancia a 280 nm del fluoróforo.

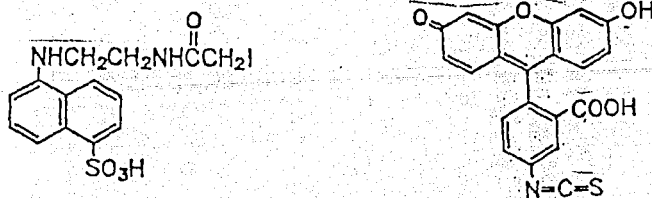


Fig. 6. Estructuras del 1,5-IAEDANS y FITC

## MATERIALES Y METODOS

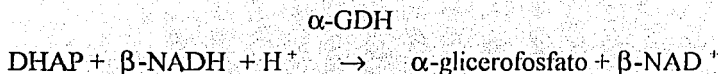
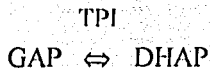
### MICELAS INVERTIDAS

El sistema de micelas invertidas descrito por Hillhorst y colaboradores [1984] y utilizado en el presente trabajo se compone de una mezcla (CHO) de 200 mM de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) en Octano y Hexanol en una relación volumétrica de 8.7 % (V/V). Las micelas invertidas se forman al añadir un amortiguador acuoso (TED). Se han descrito los diagramas de fase de este sistema [Hilrost, et. al, 1984]. Se mezclan 0.8 gr. de CTAB con 9.6 ml de n-octano y 1.1 ml de hexanol, en base al volumen total se calcula el porcentaje de agua a añadir y posteriormente se agita vigorosamente hasta obtener una solución ópticamente transparente. Este sistema permite solubilizar desde 1.5 hasta 10.0 % de agua, obteniéndose una solución ópticamente transparente. En algunos experimentos la concentración de agua del sistema se varió. El aumento de la cantidad de agua de las micelas se hizo añadiendo una determinada cantidad de amortiguador a las micelas invertidas y se agitó vigorosamente hasta obtener una solución transparente. La disminución de la cantidad de agua se hace diluyendo las micelas invertidas con una mezcla de CTAB 200 mM, n-octano y hexanol en una relación 8.7 v/v.

### ANALISIS DE ACTIVIDAD DE TPI EN MEDIO ACUOSO Y EN MI

La TPI (20-50 mg/ml) se disolvió en 40 mM TEA / 10 mM EDTA / 1 mM DTT, pH 7.4 (amortiguador TED). La TPI nativa o desnaturalizada con GdnHCl se transfirió a TED o a MI formadas con una determinada concentración de agua, alícuotas de esta mezcla (0.01 ng de TPI por ml de mezcla acuosa total, ó 0.1 ng de TPI por ml de MI del volumen total) se utilizaron para medir la actividad y se agregaron a 1 ml de TED o MI (formadas con la misma cantidad de agua que el sistema anterior), conteniendo 6.6 mM de GAP, 3.3 mM de  $\beta$ -NADH (200 nM por

mililitro de mezcla total) y entre 5 y 7 mg. de  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH).



Para el caso de las micelas se asume que estos componentes se distribuyen exclusivamente en la fase acuosa del sistema. La reacción se inició al añadir alícuotas de TED o MI conteniendo TPI y la reacción se midió espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de  $\beta$ -NADH a 340 nm. Se ha verificado que la actividad de la enzima atrapadora  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa no es limitante, y que el sustrato se encuentra a concentraciones saturantes. La actividad específica de TPI se expresa en  $\mu\text{M} / (\text{min mg})$ . Debido a que para medir los espectros de emisión de la TPI se requieren como mínimo 5 mg. de TPI por ml. de solución, fue necesario diluir las muestras para cuantificar la actividad de la enzima.

#### DESNATURALIZACION DE LA TPI EN SOLUCION ACUOSA

La TPI se desnaturalizó en medios acuosos al incubar por 1 hora en TED y la concentración indicada del GdnI Cl.

#### RENATURALIZACION DE LA TPI EN TED Y EN MI

Se transfirió 1  $\mu\text{l}$  de la mezcla anterior a 3.0 ml de TED o MI a un cierto contenido de agua (2.0 - 7.0 %).

## FLUORESCENCIA DE LA TPI EN TED Y EN MI

La TPI nativa o desnaturalizada (10-20 mg/ml) en solución acuosa se transfirió a TED o a MI, se siguió su emisión de 295 a 450 nm, después de excitar a 286 nm en un fluorómetro SLM-AMINCO equipado con un baño de circulación de agua ( $T = 25^{\circ} C$ ), slits de exc. 2 nm, slits de em. 2 nm. Para los experimentos de fluorescencia se utilizó a la TPI en un rango de concentraciones de 7 a 25  $\mu\text{g/ml}$ . Se escogió una longitud de onda de excitación de 286 nm debido a que en estas condiciones el pico raman característico para el n-octano no interfiere con el pico máximo de la emisión de la TPI.

## MARCAJE DE TPI CON 1,5-IAEDANS Y FITC

La TPI (20-50 mg/ml) se disolvió en TrisHCl 20 mM pH 8.5, se incubó por 15 horas a temperatura ambiente con un exceso 5 veces molar de 1,5-IAEDANS (disuelto en el mismo amortiguador) o de FITC (disuelto en DMSO). Se eliminó el fluoróforo libre por la técnica de centrifugación - filtración [Kasahara, M. y Penefsky, H.F, 1978]. Se pasó la muestra a través de una columna de 1 ml de sephadex G-10 equilibrada con TED y previamente centrifugada para eliminar el exceso de amortiguador. Se centrifugó por 2 min a 5000 r.p.m., de tal manera que en la columna quedó el fluoróforo libre (esto se puede ver con una lámpara UV) y la proteína unida al fluoróforo pasó a través de la columna. Se midió la polarización de la fluorescencia del eluido que contenía a la proteína marcada. Para el caso de la proteína marcada con 1,5-IAEDANS fue necesaria una sola filtración para eliminar el fluoróforo libre, ya que al hacer una segunda filtración el valor de polarización de la fluorescencia del recuperado ya no cambió. Para la proteína marcada con FITC fueron necesarias dos filtraciones a través de la columna de sephadex G-10 para poder eliminar el fluoróforo libre.



Para el cálculo de la estequiometría del marcaje para TPI-IAEDANS y TPI-FITC se midió la absorbancia de la proteína a 280 nm y del 1,5-IAEDANS a 336 nm o del FITC a 495 nm. Ambos fluoróforos absorben a 280 nm, por lo que fue necesario hacer una corrección al calcular la concentración de la proteína. Para el caso del IAEDANS esta absorbancia representa el 20 % de la absorción a 336 nm, por lo que a la absorbancia a 280 nm es necesario restarle el factor  $0.2A_{336}$ . Para el FITC la absorbancia a 280 nm corresponde al 40 % de la absorbancia a 494 nm, es decir a la absorbancia a 280 nm hay que substrarle el factor  $0.4A_{494}$ :

$$[\text{TPI}] = (A_{280} - 0.2 A_{336}) \times 0.79 ; \quad [1,5\text{-IAEDANS}] = A_{336}/5.6 \text{ mM}^{-1}$$

$$[\text{TPI}] = (A_{280} - 0.4 A_{494}) \times 0.79 ; \quad [\text{FITC}] = A_{494}/76 \text{ mM}^{-1}$$

## POLARIZACION DE LA FLUORESCENCIA Y ANISOTROPIA

Se colocaron los polarizadores en el canal de excitación, canal de emisión A , y en el canal de emisión B. El polarizador A se puso vertical ( $0^\circ$ ) y el polarizador B horizontal ( $90^\circ$ ) con respecto al polarizador de excitación ( $0^\circ$ ). La polarización se calculó con la ayuda del programa del fluorómetro usando la siguiente ecuación:

$$P = ((R_{\text{vert}} / R_{\text{horiz}}) - 1) / ((R_{\text{vert}} / R_{\text{horiz}}) + 1) = (R_{\text{corr}} - 1) / (R_{\text{corr}} + 1)$$

donde:

$R_{\text{vert}}$  es la relación A/B cuando el polarizador de excitación se pone en la posición vertical ( $0^\circ$ ),

$R_{\text{horiz}}$  es la relación A/B cuando el polarizador de excitación se pone en la posición horizontal ( $90^\circ$ ), y

$R_{\text{corr}}$  es la relación corregida de los componentes polarizados

La anisotropía se deriva de la polarización usando la siguiente ecuación:

$$r = 2P / (3-P)$$

El programa permite eliminar la señal del blanco, es decir del solvente o muestra sin el fluoróforo, la cual puede tener una señal de fondo o de dispersión de luz. Este blanco o señal de fondo se usa para corregir las señales totales de la muestra. Si los canales A y B se usan para registrar los componentes vertical y horizontal de la emisión respectivamente, entonces la rutina del registro del blanco almacena los valores de corrección para los canales A y B es decir -  $A_b$  y  $B_b$ . Los valores corregidos  $A_c$  y  $B_c$  de la muestra a registrar se determinan por:

$$A_c = A - A_b \quad \text{y} \quad B_c = A - B_b$$

entonces la polarización se calcula a partir de la relación corregida:

$$R_{\text{vert}} = A_c(\text{vert}) / B_c(\text{vert})$$

Después de medir el blanco se coloca la muestra que contiene el fluoróforo, y posteriormente el polarizador de excitación se pone en posición horizontal, con lo que el programa calcula  $R_{\text{horiz}}$ . Posteriormente el polarizador de excitación se coloca en la posición vertical para medir y calcular  $R_{\text{vert}}$ . Teniendo estos valores el programa calcula  $R_{\text{corr}}$ ,  $r$  y  $P$ , así como también las desviaciones estandar de cada parámetro.

## FLUORESCENCIA DE TPI MARCADA CON 1,5-IAEDANS

La TPI-IAEDANS (TPI marcada con 1,5-IAEDANS) nativa o desnaturalizada con GdnHCl en soluciones acuosas, se transfirió a TED o a MI formadas con una determinada concentración de agua, se siguió su emisión ( $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$ ) de 370 a 600 nm en un fluorómetro SLM-AMINCO equipado con un baño de circulación de agua ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), slits de exc. 2 nm, slits de em. 8 nm.

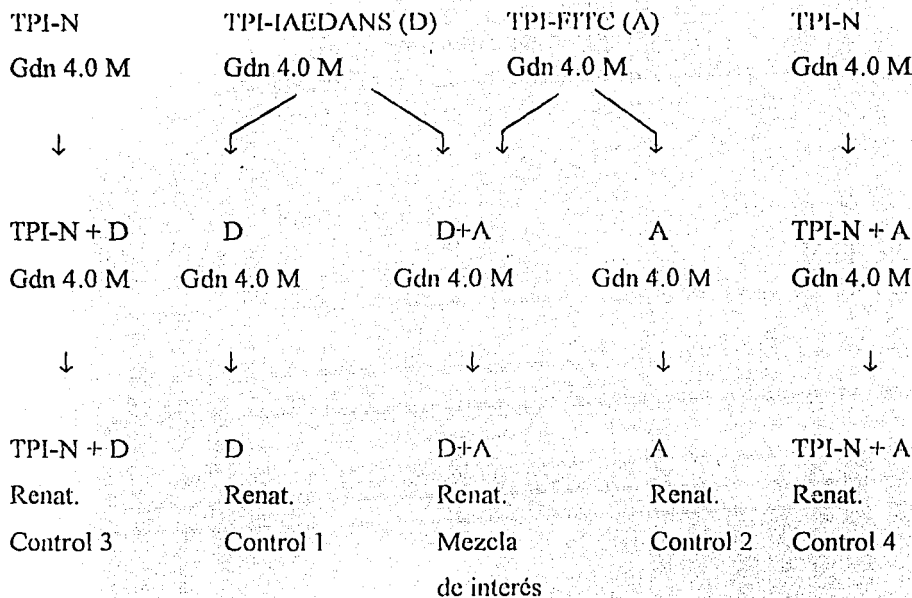
## TRANSFERENCIA DE ENERGÍA

La TPI-FITC (TPI marcada con FITC) y la TPI-IAEDANS (TPI marcada con 1,5-IAEDANS) se desnaturalizaron por separado con GdnHCl 4.0 M en solución acuosa (a la misma concentración de proteína). Después de una hora de incubación alícuotas iguales en concentración de ambas enzimas desnaturalizadas se mezclaron, y posteriormente la mezcla se transfirió a un determinado volumen de TED o de MI formadas con 6.0 % de  $\text{H}_2\text{O}$  en donde GdnHCl se diluye más de 100 veces. La concentración de proteína de la mezcla final generalmente fue de 10  $\mu\text{g/ml}$ . A diferentes tiempos se tomaron alícuotas para medir la recuperación de la actividad, así como también se midió la fluorescencia de 370 a 600 nm excitando a 360 nm (sl.exc. 2 nm, sl.em. 8 nm).

En esta mezcla se formaron heterodímeros de TPI-IAEDANS y TPI-FITC, entre los cuales se observó transferencia de energía. También se formaron homodímeros de TPI-IAEDANS y homodímeros de TPI-FITC.

Con el fin de poder cuantificar la magnitud de la eficiencia de la transferencia de energía fue necesario hacer controles muy estrictos (esquema 1). Inicialmente los controles fueron la TPI-IAEDANS renaturalizada en TED o en MI (control 1) y la TPI-FITC renaturalizada en TED o en MI (control 2). La concentración de proteína en los controles fue de 10  $\text{g/ml}$ . Sin embargo en estos controles la concentración del

fluoróforo era el doble que en la mezcla de transferencia, así que fue necesario hacer una manipulación de los espectros de emisión de los controles es decir dividir cada uno de ellos entre 2.



Esquema 1. Protocolo del experimento de la reasociación de la TPI medida por la transferencia de energía

En varios experimentos no solo se hicieron estos controles sino también se prepararon otros controles de la siguiente manera: TPI-IAEDANS o TPI-FITC y TPI sin marca (TPI-N) se desnaturalizaron por separado con GdnHCl 4.0 M (a la misma concentración de proteína). Después de una hora de incubación alícuotas iguales de ambas enzimas desnaturalizadas [TPI-IAEDANS (o TPI-FITC) y TPI sin marca] se mezclaron y posteriormente la mezcla se aplicó a un determinado volumen

de TED o de MI formadas con 6.0 % de H<sub>2</sub>O, donde la concentración total de proteína fue 10 μg/ml (mezcla de TPI-IAEDANS y TPI sin marca (control 3), mezcla de TPI-FITC y TPI sin marca (control 4) y la GdnHCL se diluyó mas de 100 veces. Se midió la fluorescencia de 370 a 600 nm, excitando a 360 nm

Se vio que en los controles 1 y 2 la doble concentración de proteína marcada con cada uno de los fluoróforos (en comparación con la mezcla de transferencia) originó dispersión de luz. Esta dispersión se vio reflejada en una emisión mayor del control 1 en comparación con el control 3, lo que no nos permitía ver el apagamiento de la fluorescencia del donador, y una emisión menor del control 2 en comparación con el control 4, que no permitía ver el aumento en la emisión del aceptor. Por ello se utilizaron los controles 3 y 4 los cuales contenían la misma concentración de proteína y de cada uno de los fluoróforos como en la mezcla de transferencia.

El control para cuantificar la recuperación de la actividad se hizo con la mezcla de alícuotas iguales en concentración de TPI-IAEDANS y TPI-FITC nativas que posteriormente se aplicó a un volumen determinado de TED o de MI conteniendo 6.0 % de agua, de tal manera que la muestra de transferencia y todos los controles se mantuvieron a la misma concentración de proteína.

La eficiencia  $E$  de la transferencia de energía entre los fluoróforos se determinó al medir la intensidad de la fluorescencia del donador en presencia ( $I'_{DA}$ ) y en ausencia ( $I'_{D}$ ) del aceptor:

$$E = 1 - (I'_{DA}/I'_{D}) \quad (1)$$

La eficiencia de la transferencia de energía esta relacionada con la distancia ( $R$ ) entre los fluoróforos y la distancia crítica de Förster ( $R_0$ ) a la cual la eficiencia de la transferencia es igual al 50 %:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (2)$$

$R_0$  se puede obtener por la ecuación :

$$R_0 = 9786 A (J k^2 n^4 Q_D) \quad (3)$$

donde:

$n$  = índice de refracción del medio, tomado = 1.4 para el agua,

$k^2$  = factor de orientación, considerado como 2/3 para proteínas globulares. Este factor esta relacionado con las orientaciones de los dipolos de los fluoróforos.

$Q_D$  = rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor

$J$  = integral de la sobreposición de los espectros de emisión del donador  $F_D(\lambda)$  y de absorción del aceptor  $\epsilon_A(\lambda)$ , y esta dada por la ecuación :

$$J = (\int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda) / (\int F_D(\lambda) d\lambda) \quad (4)$$

El rendimiento cuántico de TPI-IAEDANS se calculó al comparar su emisión máxima con la emisión del 1,5-iaedans en agua y en etanol. Para esto la concentración del fluoróforo unido a la proteína y del fluoróforo en agua y en etanol estuvo a la misma concentración molar. De tal manera que sabiendo el rendimiento cuántico del 1,5-IAEDANS en agua ( $Q_D = 0.29$ ) y en etanol ( $Q_D = 0.69$ ) [Molecular Probes, 1994] extrapolando obtuvimos el rendimiento cuántico para TPI-IAEDANS ( $Q_D = 0.68$ ).

La integral de la sobreposición "J", se calculó como lo describió Harvey Alan Berman y cols., 1980. Se corrieron los espectros de emisión de TPI-IAEDANS y de absorción de TPI-FITC. El rango del solapamiento de ambos espectros fue de 420 a 530 nm. En una hoja de cálculo se colocaron los valores de la longitud de onda, de la intensidad de emisión de TPI-IAEDANS a cada longitud de onda [ $F_D(\lambda)$ ], así como también los valores de la absorción de TPI-FITC. Sabiendo el coeficiente de extinción molar de FITC  $\epsilon_{494} = 76 \text{ mM}^{-1}$ , se calculó la concentración de FITC. Los

datos de absorción del FITC se dividieron por la concentración para determinar el coeficiente de extinción molar del FITC a cada longitud de onda [ $\epsilon_{\lambda}(\lambda)$ ], en unidades  $M^{-1}cm^{-1}$ . En otra columna se colocaron las longitudes de onda elevadas a la cuarta potencia [ $\lambda^4$ ]. Posteriormente se calculó la sumatoria:

$$\sum F_D(\lambda) \epsilon_{\lambda}(\lambda) \lambda^4 \quad (5)$$

que corresponde a el numerador de la ecuación 4. El área del espectro de emisión del donador es la integral:

$$\sum F_D(\lambda) d\lambda \quad (6)$$

que corresponde al denominador de la ecuación 4 y se calcula con ayuda del programa del fluorómetro. Finalmente al dividir la ecuación 5 entre la ecuación 6 se obtiene la integral del solapamiento de la emisión del donador con la absorción del aceptor (J) en unidades  $M^{-1}cm^{-1}$ . La distancia R entre el donador y el aceptor se calcula por la ecuación 7:

$$R = R_0 [(1-E)/E]^{1/6} \quad (7)$$

Todas las figuras muestran un experimento representativo de 3-6, en los que se observó un comportamiento similar.

## RESULTADOS

### DESNATURALIZACION DE LA TPI EN SOLUCION ACUOSA

Con el fin de saber las condiciones bajo las cuales la proteína se despliega totalmente, y que es lo que le pasa a su estructura global bajo la acción de las diferentes concentraciones del GdnHCl, y además para establecer el mecanismo de la

desnaturalización, se determinó la curva de la desnaturalización de TPI midiendo la fluorescencia intrínseca de la enzima ( $\lambda_{exc} = 286\text{nm}$ ) de 295 a 450 nm. (Fig. 7,A).

Tal y como se ha observado en otras proteínas [Pace, C.N., 1991], la gráfica del centro de masa del espectro de emisión de TPI incubada con diferentes concentraciones del GdnHCl, fue sigmoide. El equilibrio de la transición del estado nativo al estado completamente desnaturalizado, se observó después de 5 horas de incubación. En 0.7 M del GdnHCl se obtuvo el punto medio de la transición.

## CARACTERISTICAS DE LA TPI NATIVA Y DESNATURALIZADA EN MEDIO ACUOSO

Como se muestra en el experimento anterior el CEM de la proteína desnaturalizada se desplaza 23 nm hacia el rojo en comparación con la proteína nativa. En los experimentos subsiguientes se utilizó GdnHCl 4 M para desnaturalizar a la TPI. En la figura 7, B se muestra el espectro de emisión de TPI en solución acuosa, cuyo centro espectral de masa tiene un valor de 336 nm, y de la enzima incubada con 4.0 M GdnHCl por 1 hora, CEM = 359 nm. En esta última condición la intensidad de la fluorescencia de TPI decrece aproximadamente 15 %. Los cambios inducidos por 4M del GdnHCl alcanzan un máximo en 1 hora. Después de 3 minutos de la dilución de más de 100 veces del desnaturalizante se obtiene una enzima con un espectro similar al de la enzima nativa. De tal manera que el efecto del desnaturalizante es completamente reversible. Estos datos concuerdan con los resultados de Corran y Waley [1973] y de Zabori y Jaenicke [1980], quienes demostraron que la TPI desnaturalizada se puede reactivar al diluir el desnaturalizante.



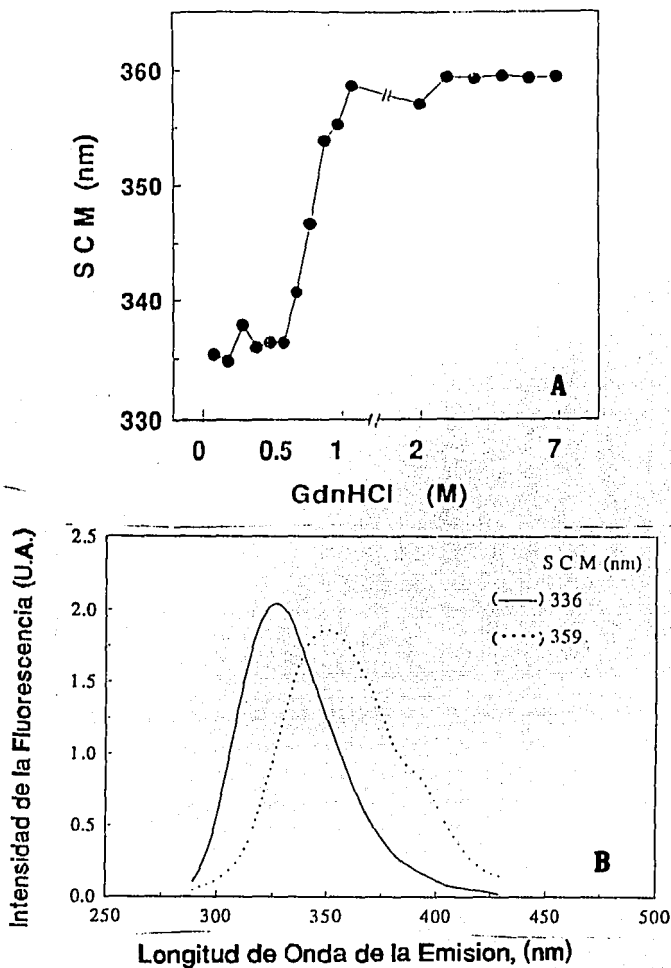


Figura 7. Efecto de la concentración del GdnHCl sobre el Centro Espectral de (A) y Espectros de emisión de TPI en solución acuosa y en GdnHCl 4.0 M (B). La *T* Isomerasa a una concentración de 22.0  $\mu\text{g/ml}$  se incubó por una hora en el amortiguador trietanolamina 40.0 mM / EDTA 10.0 mM / DTT 1.0 mM y la indicada concentración del GdnHCl, pH 7.4. Se corrieron los espectros de emisión ( $\lambda_{\text{cem}} = 286 \text{ nm}$ ). La gráfica A muestra el Centro Espectral de Masa (CEM, nm) contra la concentración del GdnHCl. En B se muestran los espectros de emisión de TPI incubada sin (-----) y con (.....) 4.0 M del GdnHCl.

## FLUORESCENCIA INTRINSECA DE LA TPI A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA.

Fue de gran importancia analizar los cambios estructurales globales que la enzima experimenta al encontrarse en medios con diferente concentración de agua, al ser atrapada en MI. Esto fue posible midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína:

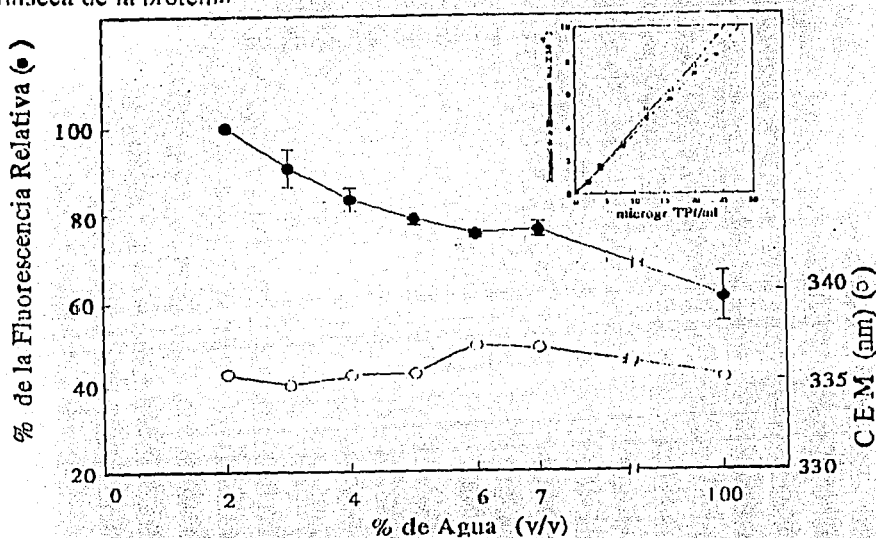


Figura 8. Fluorescencia relativa de la TPI nativa en Micelas Invertidas con varias co de agua. En el eje Y se graficó la intensidad de la fluorescencia relativa en el centro espectral de masas (●) (el promedio de 4 experimentos) de la TPI atrapada en micelas invertidas con las concentraciones de agua indicadas y en 100.0 % de agua. El 100.0 % representa la intensidad de la fluorescencia en micelas invertidas con 2.0 % de agua. El símbolo (○) representa el CEM del espectro de emisión de la TPI atrapada en las micelas con las concentraciones de agua indicadas. En el cuadro superior derecho se muestra la intensidad de la fluorescencia de diferentes concentraciones de TPI en micelas invertidas con 6.0 % de agua (○) y en solución totalmente acuosa (●).

Se ha reportado [Garza-Ramos, G., et. al, 1992] que el contenido de agua tiene un efecto en la actividad de la TPI. Como ya se mencionó en los antecedentes, la TPI es estable en el sistema de MI. Sin embargo la actividad es 10 o más veces menor que en soluciones totalmente acuosas.

Con el propósito de tratar de elucidar los cambios conformacionales que la enzima sufre al ser atrapada en las micelas se determinó la fluorescencia intrínseca de la enzima a diferentes concentraciones de agua (fig. 8). A la mas baja concentración de agua analizada (2.0 %), el CEM fue 335 nm, es decir 1-2 nm menor que el de la enzima en 100.0 % de agua. Se observó que la intensidad de la fluorescencia en el centro espectral de masa en MI, decrece al ir aumentando el contenido de agua, cabe mencionar que se observa el mismo patrón de fluorescencia cuando la enzima se transfiere a un sistema que contiene la concentración indicada de agua que cuando la enzima primero se transfiere a un sistema con 2.0 % de agua y subsecuentemente se incrementa el agua a los diferentes niveles. Este incremento en la fluorescencia intrínseca que la enzima presenta al ser atrapada en las micelas con un bajo contenido de agua, puede reflejar una propiedad de los triptofanos que consiste en que cuanto más hidrofóbico sea el medio que los rodee mayor será su emisión (Lackowick, 1983). Las alteraciones de la fluorescencia intrínseca de la TPI inducidas por el atrapamiento en MI fueron reversibles y dependientes de la concentración de agua.

#### FLUORESCENCIA INTRINSECA DE LA TPI NATIVA, DESNATURALIZADA Y RENATURALIZADA EN MICELAS INVERTIDAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE DTT

La recuperación de la actividad de la TPI en MI solo ocurre a porcentajes de agua mayores de 3.5 [Garza-Ramos, G., et. al, 1992]. Debido a esto quisimos investigar que tan diferente es la estructura global de la proteína después de haber

estado en GdnHCl 4 M y ser posteriormente transferida a MI con diferentes contenidos de agua. También quisimos saber si en las condiciones de renaturalización de la enzima podríamos ver una cinética de cambios estructurales de tal manera que pudiéramos hacer una correlación estructura-función. La TPI se desnaturizó por 1 hora en mezclas totalmente acuosas estándares con 4.0 M del GdnHCl. Posteriormente una alícuota de 2  $\mu$ l se transfirió a 3.0 ml de MI que contenían diferentes concentraciones de agua y en donde la GdnHCl residual fue 66.0 mM. Los espectros de emisión de las muestras se corrieron después de 5 minutos (Figura 9, espectros "g", "i" y "k") y de 24 horas (espectros "h", "j" y "l") de la transferencia.

En las tres concentraciones de agua, el espectro de emisión en los primeros minutos de incubación, muestra que la fluorescencia intrínseca de la proteína fue mucho mas alta que la de la TPI nativa o la desnaturizada atrapada en MI. Sin embargo la magnitud de la emisión fue mas alta en 2.0 y mas baja en 6.0 % de agua. Después de 24 horas de incubación la fluorescencia intrínseca de las tres muestras disminuyó. El decremento en la fluorescencia fue del 10.0, 24.0 y 80.0 % con 2.0, 3.0 y 6.0 % de agua respectivamente. Se determinó la actividad de las tres muestras después de 24 horas de incubación.

De acuerdo con datos previos [Garza-Ramos, G., et, al, 1992], la reactivación fue menos del 10.0 y 15.0 % para las muestras con 2.0 y 3.0 % de agua respectivamente, mientras que en 6.0 % de agua la reactivación fue del 80 % (considerando como 100 % la actividad de la enzima nativa transferida a MI con las diferentes concentraciones de agua). Estos datos muestran que la aparición de la actividad se acompaña de cambios en la estructura proteica. Además en la figura 9 se muestran los espectros de la fluorescencia intrínseca de la TPI nativa atrapada en MI con diferentes contenidos de agua (espectros "a", "b" y "c"). La eficiencia cuántica para la enzima atrapada en las micelas es mayor que en medio acuoso (ver fig. 8).

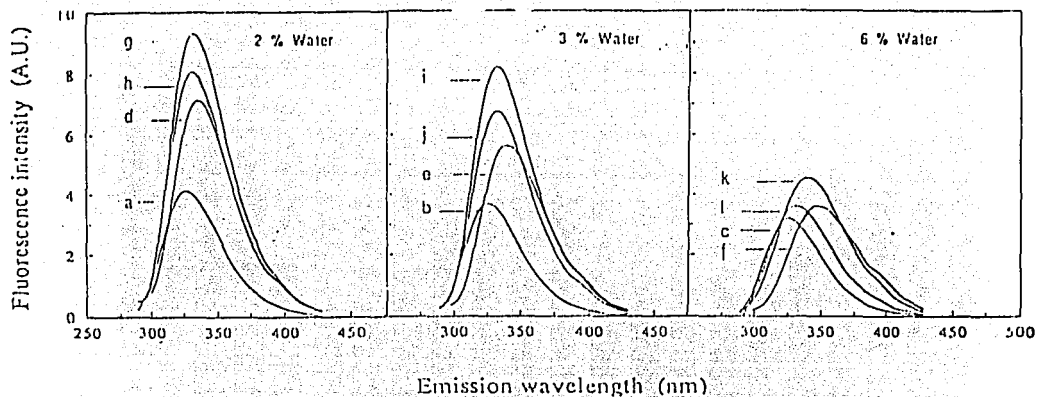


Figura 9. Espectros de la fluorescencia intrínseca de la TPI nativa, desnaturada y en micelas invertidas con diferentes concentraciones de agua. La TPI se desnaturó a una concentración de 25 mg/ml en el amortiguador trietanolamina 40.0 mM / EDTA 10.0 mM / DTT 1.0 mM conteniendo 4.5 M del GdnHCl, pH 7.4. Después de una hora una alícuota de 1  $\mu$ l se transfirió a 3.0 ml de micelas invertidas que contenían la concentración de agua indicada. En las tres muestras se ajustó la concentración de GdnHCl residual a 66.0 mM (asumiendo que el GdnHCl se distribuye únicamente en la fase acuosa). Los espectros "g", "i" y "k" se corrieron 5 minutos después de la transferencia. Los espectros "j", "l" y "m" se corrieron 24 horas después de la transferencia. Los espectros "a", "b" y "c" corresponden a la fluorescencia intrínseca de la TPI nativa, "d", "e" y "f" muestran la fluorescencia intrínseca de la TPI desnaturada con 4.0 M del GdnHCl y después transferida a micelas invertidas conteniendo una solución 4.0 M del GdnHCl.

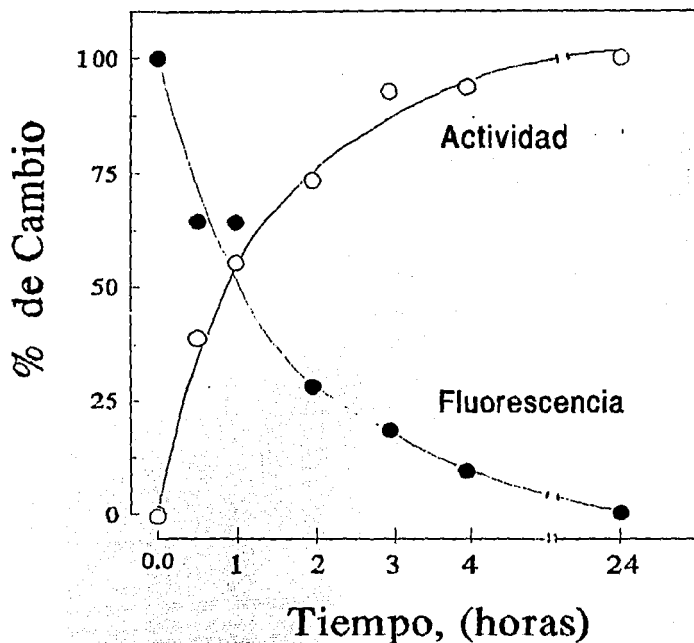


Figura 10. Fluorescencia y actividad de la TPI durante la renaturalización en las MI. La TPI se desnaturizó en solución acuosa conteniendo 1.0 mM de DTT y GdnHCl 4.0 M. Después de una hora la muestra se transfirió a micelas invertidas conteniendo 6.0 % de agua. En los tiempos indicados se corrieron los espectros de emisión y se midió la actividad. Los resultados se graficaron como el porcentaje de los máximos cambios que la enzima experimentó durante 24 horas.

La enzima desnaturizada con 4.0 M del GdnHCl y transferida a MI formadas con diferentes porcentajes de una solución de 4.0 M del GdnHCl (Figura 9, espectros "d", "e" y "f") presenta un espectro de emisión con una fluorescencia mas alta y un CEM mayor que la enzima nativa atrapada en MI con las diferentes concentraciones de agua.. Así mismo el patrón de la fluorescencia de la enzima desnaturizada y

transferida a micelas que contienen guanidina 4 M difiere del de la enzima desnaturalizada en medio acuoso (ver fig. 7, B), es decir la enzima atrapada tiene una emisión mas alta y un CEM un poco menor.

De acuerdo al experimento anterior se investigó si los cambios en la fluorescencia intrínseca ocurren en paralelo a la aparición de la actividad. Se encontró que en MI con 6.0 % de agua ocurre una disminución temporal de la intensidad de la fluorescencia en el CEM (•) que correlaciona con la aparición de la actividad (o) (fig. 10). El tiempo medio de los cambios máximos de la fluorescencia intrínseca y la actividad fue de 60 minutos.

Se realizaron experimentos [Fernández-Velasco, A., et al., 1994] para investigar porque la TPI se reactiva en MI con altas concentraciones de agua (6.0 %) y no se reactivó en 2.0 y 3.0 % de agua. La TPI desnaturalizada se transfirió a MI con 5.0 % de agua. En esta condición la proteína posee las propiedades fluorescentes de una estructura nativa y es capaz de regenerar casi la totalidad del dímero activo durante una incubación de 24 horas. Sin embargo si después de 5 minutos en 5.0 % de agua el contenido de agua del sistema se reduce a 2.0 %, la proteína no se reactiva en 24 horas de incubación. Por otro lado si después del salto de agua de 5.0 a 2.0 % se le incrementa la concentración de agua a 5.0 % la proteína es capaz de renaturalizarse tal y como si hubiese estado en 5.0 % de agua desde el principio de la transferencia. Es decir después del salto de agua de 5.0 a 2.0 % se atrapan monómeros competentes. En base a estas observaciones se investigaron los cambios estructurales que la enzima experimenta durante este salto de agua. Se observó que cuando se transfiere TPI desnaturalizada a MI con 5.0 % de agua y después de 5 minutos se disminuye el contenido de agua a 2.0 %, no solo se detiene la reactivación sino que también se detienen los cambios en la fluorescencia (Tabla 1). Subsecuentemente al añadir agua para obtener un 5.0 % se observan los cambios graduales en la fluorescencia intrínseca que correlacionan con la recuperación de la

actividad. Cuando la TPI desnaturalizada se transfirió a MI con 2.0 % de agua, no ocurrió la renaturalización (ver fig. 9). Al añadir agua a 5.0 % no se recuperó la actividad, pero la fluorescencia intrínseca disminuyó, sin embargo no llegó a tener una intensidad de fluorescencia como cuando la TPI desnaturalizada se transfirió directamente a 5.0 % de agua (Tabla 1).

**TABLA 1**

**Fluorescencia intrínseca de los monómeros competentes y no competentes en micelas invertidas con 2.0 y 5.0 % de agua.**

Condición	CEM	Intensidad de la fluorescencia (U.A)
2.0 % de agua	343	6653
2.0 % → 5.0 % de agua	344	4674
5.0 % de agua	343	3577
5.0 % → 2.0 % de agua	344	6241
5.0 % → 2.0 % → 5.0 % de agua	344	3686

La TPI se desnaturalizó con 4.0 M del GdnHCl por una hora, y posteriormente se transfirió a micelas invertidas formadas con las concentraciones de agua indicadas. El símbolo → indica que la concentración de agua en las micelas invertidas se cambió al nivel indicado. Los espectros de la fluorescencia intrínseca se corrieron 5 minutos después de transferir a la TPI a las micelas invertidas formadas con 2.0 ó 5.0 % de agua. Después de estas mediciones se cambió el contenido de agua a la concentración indicada e inmediatamente se volvieron a tomar los espectros de emisión.



## EFFECTO DEL DTT

La TPI posee 5 cisteínas por monómero, estos no forman puentes disulfuros y sin embargo en medio acuoso y en MI su reactivación máxima requiere DTT. En MI la ausencia de DTT previene la renaturalización de la enzima probablemente debido a la formación de puentes disulfuros. Con estas observaciones se trató de correlacionar actividad y estructura utilizando la fluorescencia intrínseca. Al añadir DTT a diferentes tiempos después de diluir el desnaturizante, se reinicia la reactivación. El espectro de la fluorescencia intrínseca y la actividad de TPI nativa en MI con o sin DTT son muy similares (fig. 11, espectros e y f). Como ya se mencionó anteriormente, en presencia de DTT la enzima se reactiva y simultáneamente se observan cambios en su fluorescencia intrínseca. En ausencia de DTT la enzima no recupera la actividad en MI y casi no se observan cambios en su fluorescencia intrínseca después de 24 horas (espectro c). Si se añade DTT después de transferir a la TPI desnaturizada a MI, se reinicia la reactivación temporal así como también la capacidad de experimentar cambios en su fluorescencia intrínseca (espectros b y d).

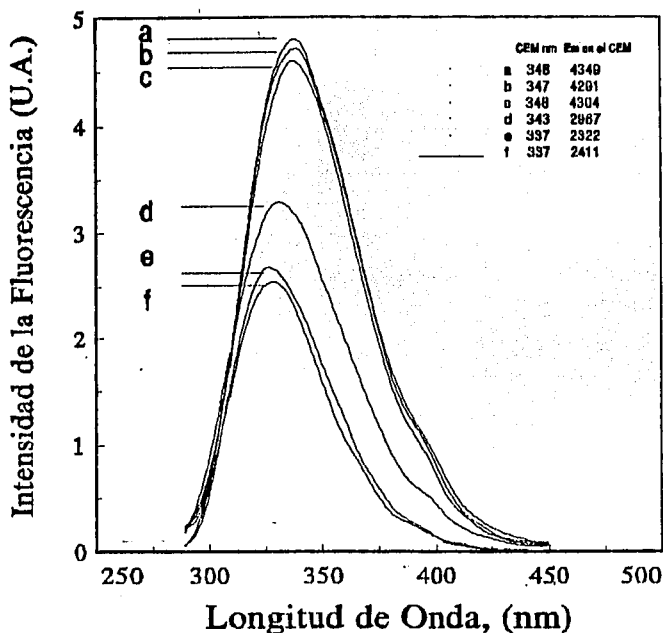


Figura 11. Espectros de emisión de la TPI transferida a micelas invertidas con y sin dithiothreitol. La TPI (22 mg/ml) se desnaturalizó en el amortiguador trietanolamina 40.0 mM / EDTA 10.0 mM / DTT 1.0 mM conteniendo 4.5 M del GdnHCl, pH 7.4. Después de una hora una alícuota de 1ml se transfirió a micelas invertidas formadas con 6.0 % de amortiguador con y sin 1.0 mM de DTT.

a y c son los espectros de emisión de la TPI desnaturalizada y transferida a micelas invertidas sin DTT, 5 minutos y 24 horas después de la transferencia respectivamente.

b y d son los espectros de emisión de la TPI desnaturalizada y transferida a micelas invertidas sin DTT. Después de 2 horas se añadió DTT y los espectros se corrieron 5 minutos (b) y 24 horas (d) después de la adición del DTT.

e y f son los espectros de la TPI nativa en micelas invertidas con (f) y sin (e) DTT.

## MARCAJE DE LA TPI DE DIFERENTES ESPECIES CON 1,5-IAEDANS Y CON FITC

Mediante la fluorescencia intrínseca de la triosofosfato isomerasa fue posible observar los cambios estructurales globales que la enzima experimenta durante su desnaturalización y renaturalización. La proteína cuenta con cinco triptofanos por subunidad, sin embargo el marcaje individual de cada uno de los monómeros con sondas fluorescentes distintas que puedan presentar transferencia de energía brinda alternativas para caracterizar estos cambios estructurales. Por esta razón y con la idea de ver como ocurren el plegamiento y la asociación de la enzima, se utilizaron dos sondas fluorescentes. De tal manera que al tener una subunidad marcada con un fluoróforo donador (1,5-IAEDANS) y la otra subunidad con un fluoróforo aceptor (FITC) podría ser posible seguir la reasociación del dímero.

Lo anterior se hizo utilizando la estrategia mas usual para estudiar la reasociación que consiste en: desnaturalizar a la proteína con un agente caotrópico y después diluir el desnaturalizante. Esto es factible hacerlo no solo en solución acuosa sino también en las micelas invertidas donde, como ya se mencionó, tenemos la ventaja de que la renaturalización de la triosofosfato isomerasa ocurre en tiempos más largos que en solución acuosa. Como sabemos la TPI posee 5 residuos cisteína por subunidad, a donde se puede unir covalentemente el 1,5-IAEDANS. Por otra parte cada monómero contiene aproximadamente 29 aminas libres que es el sitio de reacción del FITC con las proteínas, entre ellas 21 son lisinas, las cuales son las más reactivas con el FITC.

En las condiciones de la reacción de marcaje utilizadas y después de eliminar el fluoróforo que no reaccionó con la TPI se obtuvo una relación estequiométrica de marcaje de la enzima de 1:1. Es decir, que cada monómero de la TPI resultó estar marcado con una molécula de fluoróforo, tanto para el 1,5-IAEDANS como para el

FITC. La polarización de la fluorescencia de TPI-IAEDANS fue  $0,225 \pm 0,002$  y para TPI-el FITC  $0,220 \pm 0,005$ , valores típicos obtenidos en todos los experimentos. La estequiometría del marcaje se determinó al medir el espectro de absorción de la enzima marcada (ver métodos). Además en el laboratorio se realizaron experimentos para determinar si solo un sitio en la TPI se marca con estas dos sondas fluorescentes. La proteína se marcó con diferentes relaciones proteína-fluoróforo manteniendo constante el tiempo de incubación. Cuando se puso a reaccionar a la TPI con un exceso de 3, 5 y 7 molar del el 1,5-IAEDANS, durante 15 horas, después de eliminar el fluoróforo no reaccionado, se encontró que la proteína se marcó 1:1 monómero: IAEDANS. Lo mismo se obtuvo en el caso de el FITC.

En otra serie de experimentos se incubó por diferentes tiempos a la proteína con un exceso determinado de fluoróforo. En el caso de 1,5 -IAEDANS se observó que la proteína se marca 1:1 a partir de las 4 hs de incubación. Después de 20 hs de incubación progresivamente aumenta la relación del marcaje y a las 100 hs se observa una relación de marcaje de 1:2 monómero:fluoróforo. Esto indicó que de 4 a 20 horas de incubación solo una de las cinco cisteínas reacciona. Posteriormente se observa la saturación cuando la relación del marcaje es de 1:2 (esto es de 70 a 100 horas).

Para la reacción con el el FITC se observó que a partir de las 16 horas se llega a la saturación y la relación del marcaje fue 1:1. Estos experimentos indicaron que el marcaje de la TPI con cada uno de estos fluoróforos es específico. En las condiciones utilizadas se marca un solo sitio por monómero [Garzón-Rodríguez W., Beltrán C., 1994, resultados no publicados]. El Dr. Sergio Ferreira de la Universidad Federal de Rio de Janeiro midió la vida media de la fluorescencia de la enzima marcada con el 1,5-IAEDANS, mediante el método de modulación y fase, y encontró solamente un

componente de vida media de 17.8 ns. Esto sugiere que el el 1,5-IAEDANS solamente se une a una cisteína, ya que si el marcaje no fuera en un sitio se observarían 2 o más componentes de la vida media de la fluorescencia.

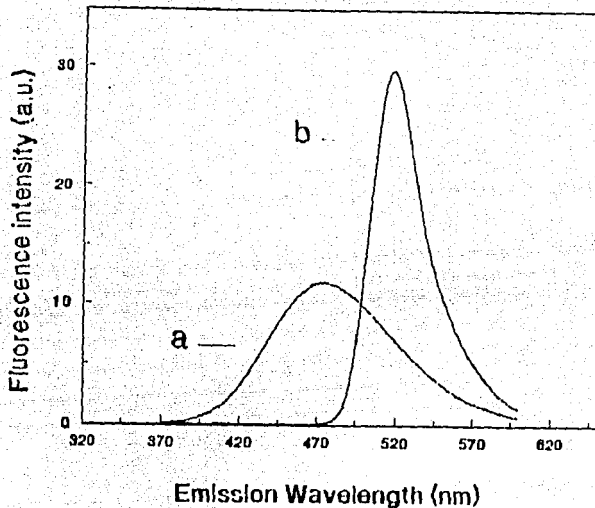


Fig. 12. Espectros de emisión de la TPI marcada con el 1,5-IAEDANS y con el FITC. Se muestran los espectros de emisión de TPI-IAEDANS (---) y TPI-FITC (—). La concentración de proteína en ambas muestras es de 8.2 g por ml de solución acuosa conteniendo 40 mM de trietanolamina / 10 mM de ditioneitol / 1 mM de EDTA, pH = 7.4. La longitud de onda de excitación fue de 360 nm.

En la figura 12 se muestran los espectros de emisión de TPI-IAEDANS y TPI-el FITC. Mediante proteólisis y secuenciación en el laboratorio se ha determinado que el sitio de unión del el 1,5-IAEDANS a la TPI es la cys-217

[Garzón-Rodríguez W., Beltrán C., 1994, resultados no publicados]. Como la TPI tripanosomal no tiene la cisteína 217, se intentó marcarla con el 1,5-IAEDANS, pero no se logró. Esto sugiere que el el 1,5-IAEDANS se une solo a la cisteína más reactiva. Así mismo se está tratando de determinar el sitio de unión del FITC a la TPI de músculo de conejo. Además se logró marcar a la TPI de tripanosoma con el FITC en una relación estequiométrica 1:1.

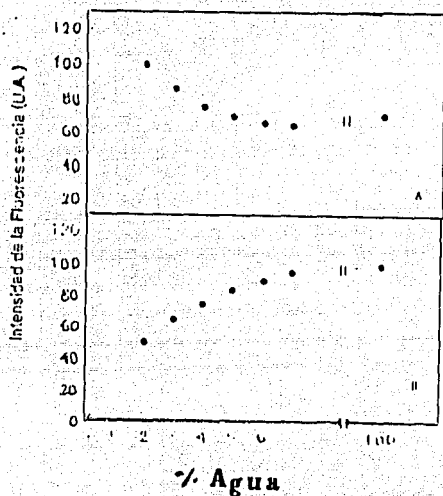


Figura 13. Fluorescencia relativa de la TPI-IAEDANS (A) y la TPI- FITC (B) en micelas invertidas con diferentes concentraciones de agua. La gráfica muestra (promedio de dos experimentos) la intensidad de la fluorescencia relativa en el centro espectral de masas de la TPI-IAEDANS (A) o la TPI- FITC (B) atrapada en micelas invertidas con la concentración de agua indicada. El 100.0 % en A representa la intensidad de la fluorescencia en micelas con 2.0% de agua, en B la intensidad de la fluorescencia en 100.0 % de agua.

## FLUORESCENCIA DE TPI-IAEDANS y TPI-FITC A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA

La fluorescencia de TPI-IAEDANS o de TPI-FITC se determinó a diferentes concentraciones de agua en el sistema de MI y en 100.0 % de agua (fig. 13 A y B). Para la enzima marcada con el 1,5-IAEDANS se observó que la intensidad de la fluorescencia en el CEM en MI decrece conforme aumenta el contenido de agua. En un medio totalmente acuoso la intensidad de la emisión es 30.0 % menor con respecto a la muestra transferida a 2.0 % de agua. además se observa un desplazamiento del CEM hacia el rojo conforme aumenta el contenido de agua de las MI. En 2.0 % de agua el CEM tiene un valor de 485 nm, mientras que en 7.0 % de agua es de 497 nm y en 100.0 % de agua es 492 nm. El 1,5-IAEDANS es sensible a la polaridad del medio.

La cisteína 217, a la que está unido el 1,5-IAEDANS es un sitio bastante expuesto al solvente, en la parte externa de la  $\alpha$ -hélice 7, lo cual explica los cambios que observamos. Es decir, al encontrarse la TPI-IAEDANS en medios cada vez más apolares su espectro de emisión se desplaza más hacia el azul y la intensidad de la fluorescencia incrementa. Cuando la TPI-IAEDANS se encuentra atrapada en las micelas, su espectro de emisión del 1,5-IAEDANS no solo va a depender del contenido de agua de las micelas sino también de la posibilidad de interacción del fluoróforo con la superficie de la micela.

Para la enzima marcada con el FITC se observó que la fluorescencia en el CEM aumenta conforme incrementa el contenido de agua del sistema. El FITC al contrario del 1,5-IAEDANS no es sensible a la polaridad del medio (Molecular Probes, 1994), sin embargo presenta enormes cambios en la eficiencia cuántica en los diferentes contenidos de agua, lo cual se debe posiblemente a las interacciones con la superficie cargada de las MI. El CEM se desplaza hacia el azul conforme aumenta el

contenido de agua del sistema y tiene un valor de 537, 535 y 531 en 2.0, 7.0 y 100.0 % de agua respectivamente.

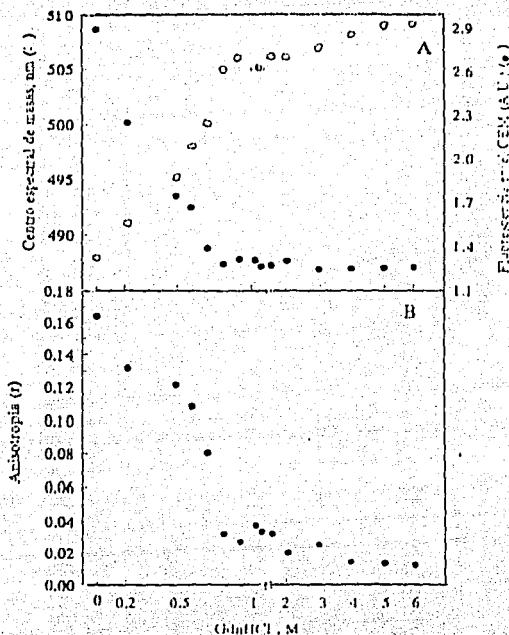


Figura 14. Efecto de la concentración del GdnHCl en (A) la fluorescencia y (B) en la anisotropía de TPI-IAEDANS. La TPI-IAEDANS a una concentración de 20.0 mg/ml se incubó por una hora en el amortiguador estandar + dithiothreitol y la concentración indicada del GdnHCl, a pH 7.4. Posteriormente se corrieron los espectros de emisión ( $\lambda_{exc}$  360 nm). En A se graficó el centro espectral de masas (○) vs la concentración del GdnHCl. (●) representa la fluorescencia en el centro espectral de masas. En B se graficó la anisotropía vs  $[GdnHCl]$ . El punto medio de la transición del estado nativo al estado desnaturalizado se observa en 0.7 M del GdnHCl.



## DESNATURALIZACION DE LA TPI-IAEDANS EN SOLUCION ACUOSA

A través de la fluorescencia intrínseca de la TPI, mediante la incubación con diferentes concentraciones del GdnHCl, pudimos observar una transición del estado nativo de la proteína al estado completamente desnaturalizado. Con la proteína marcada con el 1,5-IAEDANS se intentó ver si el mecanismo de esta transición es o no de dos estados, como es el caso de algunas otras proteínas. Pace (1991) y Privalov (1990) han propuesto un mecanismo de 2 estados para aquellas proteínas en las que al estudiar su desnaturalización midiendo 2 parámetros distintos se obtienen curvas sigmoides similares.

La TPI-IAEDANS se incubó 1 hora en diferentes concentraciones de GdnHCl, y se determinó la curva de desnaturalización de la enzima (fig. 14 A y B), midiendo la fluorescencia (A) y la anisotropía (B) del 1,5-IAEDANS unido a cada monómero de TPI ( $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$ ). Como se puede observar en la gráfica A la fluorescencia en el CEM (•) disminuye conforme aumenta la concentración del GdnHCl, y el CEM (o) se desplaza hacia el rojo. Para la enzima nativa el CEM tiene un valor de 488 nm y para la enzima desnaturalizada con GdnHCl 6.0 M el CEM es 509 nm, es decir para la enzima completamente desplegada el CEM se desplaza 21 nm hacia el rojo.

El punto medio de la transición del estado nativo al estado completamente desnaturalizado se observa en 0.6 M del GdnHCl, según se monitoreó por la fluorescencia de TPI-IAEDANS. En la gráfica de la anisotropía de TPI-IAEDANS contra la concentración del GdnHCl (B) se observa la disminución de la anisotropía conforme aumenta la concentración del GdnHCl. Esto indica que entre más desplegada está la enzima el fluoróforo experimenta mayor movilidad, por lo que su anisotropía es cada vez menor. La anisotropía para TPI-IAEDANS nativa es de 0.165 y para la enzima desnaturalizada es 0.015. El punto medio de la transición del estado nativo al estado completamente desnaturalizado se observa en 0.7 M del GdnHCl, según se monitoreó por la anisotropía de TPI-IAEDANS. Aunque el punto medio de

las curvas de desnaturalización es de 0.6 a 0.7 M del GdnHCl, no podemos decir que la transición es de dos estados ya que las curvas del CEM y la anisotropía no tienen la misma forma. Esto sugiere la existencia de estados intermedios durante la desnaturalización de la TPI. Por lo tanto, el mecanismo de la desnaturalización se puede explicar mediante el siguiente esquema:



### VOLUMEN DE TPI-IAEDANS

Se calculó el volumen de la TPI-IAEDANS en solución acuosa y en MI utilizando la ecuación de Perrin (ver punto 7 en Generalidades), con la idea de saber si se modificaba o no la enzima al ser atrapada en las micelas. Mediante esta expresión [Lakowicks, 1991], se calculó el volumen molecular de la enzima marcada con el 1,5-IAEDANS (fig. 15), midiendo la anisotropía ( $r$ ) de TPI-IAEDANS en medios de diferente viscosidad ( $\eta$ ), utilizando sacarosa al 15, 24 y 38 % (p/V). Graficando  $1/r$  versus  $T/\eta$  se obtiene una línea recta con una pendiente igual a  $\tau R/r_0 V$  y la ordenada al origen es igual a  $1/r_0$ , de tal manera que con los valores obtenidos de la gráfica de Perrin se calcula el volumen.

El dímero de la TPI no tiene una forma precisamente esférica, tiene una longitud de aproximadamente 77 Å y un diámetro de 38 Å, de tal manera que calculando el volumen como si fuera un cilindro obtenemos un valor de  $5.26 \times 10^4$  cm<sup>3</sup>/mol. En solución acuosa el volumen obtenido por la ecuación de Perrin es de  $7.6 \times 10^4$  cm<sup>3</sup>/Mol. Como ya se mencionó anteriormente Rupley y colabs. al realizar estudios de la hidratación gradual de la lisozima concluyeron que la capa de hidratación necesaria para observar actividad catalítica es de 0.2 - 0.3 g de agua / g de proteína. El hecho de haber obtenido experimentalmente un valor del volumen del.

dímero de la TPI mayor que el valor calculado sabiendo las dimensiones del dímero se puede explicar de la siguiente manera:

- 1) La ecuación de Perrin esta diseñada para partículas esferoidales.
- 2) La capa de hidratación de la proteína es del 20 al 30 % del volumen total calculado experimentalmente.
- 3) En la gráfica de Perrin el valor del inverso del intercepto en el eje Y ( $r_0$ ) corresponde a la anisotropía intrínseca del fluoróforo que podría observarse si no ocurriera rotación molecular. El valor que se obtuvo experimentalmente fue de 0.25, mientras que el valor teórico que corresponde a un fluoróforo inmóvil es de 0.3, esto indicaría que el fluoróforo tiene una movilidad local significativa. Además es necesario considerar que por la forma de la molécula de TPI, ésta rotaría como un elipsoide, no como una esfera.
- 4) La viscosidad de las diferentes soluciones de sacarosa no se midieron, sino se tomaron de una tabla que contenía las viscosidades de diferentes porcentajes de sacarosa, podría haber diferencias. [Handbook of Chemistry and Physics, 1981-1982]

En MI al 2.0 y 6.0 % de agua conteniendo sacarosa de diferente viscosidad el volumen calculado por la ecuación de Perrin fue  $6.07 \times 10^4$  y  $3.99 \times 10^4$   $\text{cm}^3/\text{Mol}$  respectivamente, tomando los mismos valores de viscosidad que para el cálculo del volumen en solución totalmente acuosa.

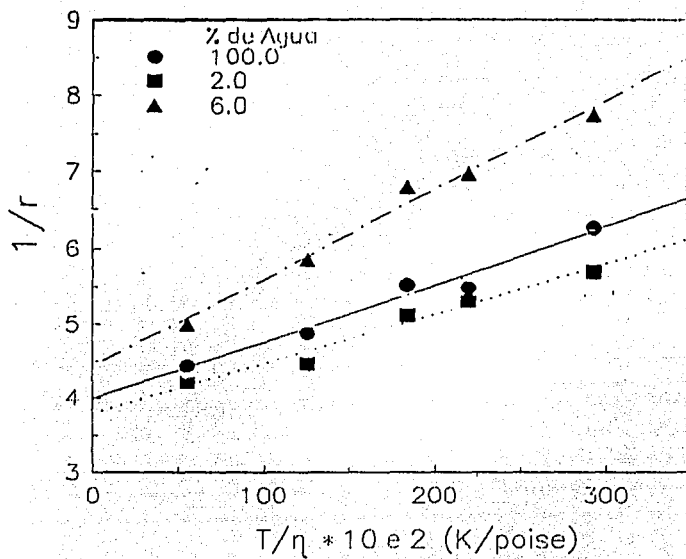


Figura 15. Gráfica de Perrin para el cálculo del volumen de la TPI.

$$1/r = 1/r_0 [1 + \tau R/V(T/\eta)]$$

$$T = 25^\circ \text{C} = 298^\circ \text{K cm}^3$$

$\tau = 17.8 \times 10^{-9}$  s, y  $12.6 \times 10^{-9}$  s en 100.0 % de agua y en las MI 6.0 % agua respectivamente.

$$R = 8.34 \times 10^7 \text{ erg mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

	$1/r_0$	k (pendiente)	V, $\text{Cm}^3 / \text{mol}$
100.0 % de agua (●)	3.945	$-7.590 \times 10^{-4}$	75950
MI 6.0 % agua (▲)	4.43	$-1.165 \times 10^{-4}$	39856
MI 2.0 % agua (■)	3.80	$-6.590 \times 10^{-4}$	60679

## CAMBIOS DE LA FLUORESCENCIA Y LA POLARIZACION DE LA FLUORESCENCIA DURANTE LA RENATURALIZACION DE LA TPI-IAEDANS EN MEDIO ACUOSO Y EN MICELAS INVERTIDAS

Mediante la fluorescencia intrínseca fue posible monitorear los cambios globales de la estructura de la TPI durante su renaturalización a partir de los monómeros totalmente desplegados. Esto también fue posible mediante la fluorescencia del grupo 1,5-IAEDANS unido a la cys-217 de cada monómero de la TPI (Tabla 2). La TPI-IAEDANS nativa o desnaturalizada se transfirió a TED o a MI al 6.0 % de agua.

Tabla 2. Características de fluorescencia de la TPI-IAEDANS.

TPI-IAEDANS	CEM, nm	Fluorescencia Rel. en el CEM	Polarización de la Fluorescencia	micromol/min /mg
en TED	488	100	0.220 +/- 0.005	4800
en las MI con 6.0 % H <sub>2</sub> O	495	87	0.170 +/- 0.005	450
en GdnHCl 4.0M	508	46	0.031 +/- 0.005	
en las MI 6.0% con GdnHCl 4.0 M	500	71	0.110 +/- 0.004	
renat. en TED	488	90	0.210 +/- 0.005	4464
renat. en las MI 6.0 % H <sub>2</sub> O	495	100	0.115 +/- 0.003	360

La fluorescencia de TPI-IAEDANS en agua presenta un CEM = 488 nm. En MI con 6.0 % de agua el CEM = 495 nm y la intensidad de fluorescencia es aproximadamente 10 % menor que en medio totalmente acuoso. La enzima desnaturalizada en 4.0 M del GdnHCl tiene un desplazamiento del CEM de 20 nm hacia al rojo y su fluorescencia esta apagada aproximadamente 50.0 %. Para la

enzima desnaturalizada atrapada en MI al 6.0 % conteniendo 4.0 M del GdnHCl el CEM se desplaza 5 nm hacia el rojo y la fluorescencia esta apagada aproximadamente 25 % con respecto a la enzima nativa en 6.0 % de agua. La enzima renaturalizada en solución acuosa recupera en un 90.0 % su fluorescencia y actividad y el CEM regresa al valor normal.

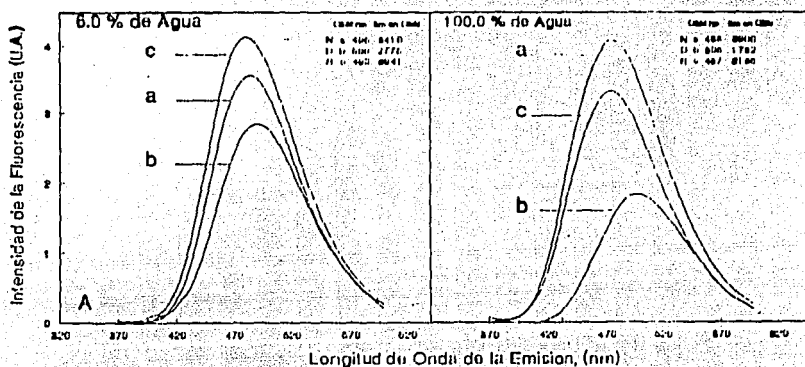


Figura 16. Espectros de emisión de la TPI-IAEDANS nativa (a), desnaturalizada (b) y renaturalizada (c) en las MI 6.0 % de agua (A) y 100.0 % de agua (B). La TPI-IAEDANS se incubó por una hora en el amortiguador estándar y 4.0 M GdnHCl. Después de esto una alícuota de 2µl se transfirió a (B) solución totalmente acuosa o a (A) MI conteniendo 6.0 % de agua (espectro c). El espectro "a" corresponde a la enzima nativa en solución acuosa (B) o en las MI con 6.0 % de agua (A). El espectro "b" representa a la enzima desnaturalizada con 4.0 M GdnHCl (B) o la enzima desnaturalizada con 4.0 M del GdnHCl y atrapada en las MI al 6.0 % conteniendo 4.0 M GdnHCl (A).

Lo anterior sugiere que la renaturalización es casi total, la proteína vuelve a retomar su conformación, pues el CEM regresa de 508 a 488 nm. En MI con 6.0 % de agua la enzima renaturalizada presenta una fluorescencia aproximadamente 10.0

% mayor que la TPI nativa en 6.0 % de agua y su CIEM regresa al valor normal (fig. 16, A y B), además de que se recupera el 80.0 % de la actividad.

En TED la polarización de la fluorescencia ( $p$ ) de TPI-IAEDANS es de  $0.220 \pm 0.005$ , en MI 6.0 %  $H_2O$  es  $0.170 \pm 0.005$ , lo que indica que la cys-217 a donde se une el el 1,5-IAEDANS presenta más movilidad en las micelas con 6.0 % de agua que en medio totalmente acuoso (Tabla 2). La enzima desnaturalizada en GdnHCl 4.0 M muestra una polarización de la fluorescencia de  $0.031 \pm 0.005$ , valor muy bajo debido al desplegamiento del monómero por lo que el sitio de unión del fluoróforo a la proteína tiene una movilidad local y global mayor que cuando la proteína se encuentra en el estado de dímero. Para el monómero desplegado y transferido a MI al 6.0 % conteniendo una solución del GdnHCl 4 M la polarización de la fluorescencia es de  $0.110 \pm 0.004$ , lo que representa aproximadamente la mitad del valor de "p" para el dímero en solución acuosa. El monómero desplegado al estar en la cavidad de la micela tiene una movilidad restringida y es por eso que su polarización de la fluorescencia es mayor que la del monómero desplegado en GdnHCl 4.0 M. Al transferir a la enzima desnaturalizada a TED observamos un valor de polarización de la fluorescencia de  $0.176 \pm 0.004$  y después de 24 horas de incubación alcanza un valor de  $0.210 \pm 0.005$  y una recuperación de la actividad del 93.0 % (fig. 17, A).

Esto sugiere que la renaturalización de la TPI en medio totalmente acuoso ocurre totalmente, ya que se recupera casi toda la actividad y el valor de polarización de la fluorescencia regresa al normal.

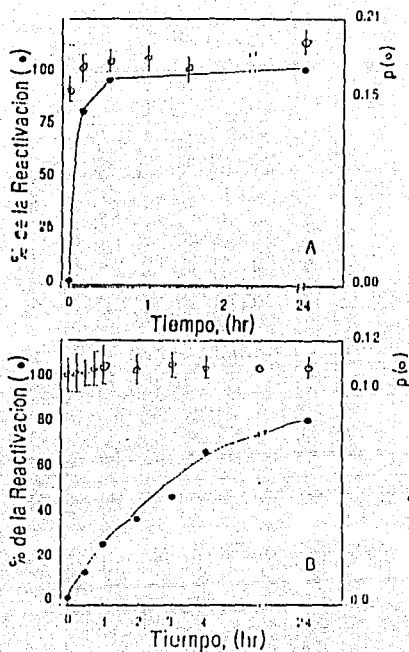


Figura 17. Polarización de la fluorescencia y actividad de la TPI-IAEDANS durante la renaturalización en solución totalmente acuosa (A) y en micelas invertidas con 6.0 % de agua. La TPI-IAEDANS se incubó por una hora en el amortiguador estándar conteniendo 4.0 M GdnHCl, pH 7.4. Después de esto se tomó una alícuota de esta muestra y se transfirió a solución totalmente acuosa (A) o a micelas invertidas conteniendo 6.0 % de agua (B). La concentración de proteína fue 8 g/ml. En los tiempos indicados se midió la actividad  $\phi$  y la polarización de la fluorescencia ( $\rho$ ) de las muestras.

Cuando TPI-IAEDANS desnaturalizada con GdnHCl 4.0 M se transfiere a MI conteniendo 6.0 % de agua la polarización de la fluorescencia de esta muestra es de



$0.115 \pm 0.003$ , valor muy similar al del monómero atrapado en las MI. Al incubar por varias horas y medir la polarización de la fluorescencia en diferentes tiempos, prácticamente no ocurren cambios. Sin embargo, la actividad se recupera un 80.0 % (fig. 17, B).

Como se puede ver la enzima renaturalizada en las MI (a diferencia de la proteína renaturalizada en solución totalmente acuosa) no recupera el valor de la polarización de la fluorescencia del dímero y tampoco totalmente la actividad. Esto podría indicar que en las micelas hay varias poblaciones de estructuras, y los monómeros representan una fracción significativa, de otra manera no sería tan baja la polarización. Es decir que existen dímeros activos y/o dímeros incorrectos y/o monómeros incorrectos incapaces de dimerizar debido a lo cual la polarización de la fluorescencia no es igual que la del dímero nativo. De tal manera que el valor de polarización de la fluorescencia representa un promedio de las polarizaciones de todas las estructuras.

## REASOCIACION DE LA TPI EN TED Y EN MI A PARTIR DE LOS MONÓMEROS DESPLEGADOS DE TPI-IAEDANS Y TPI-FITC

Ya que el espectro de emisión del el 1,5-IAEDANS se sobrepone con el espectro de absorción del FITC, se sabe que puede haber transferencia de energía del el 1,5-IAEDANS al el FITC [J.A. Barden, 1987., J.R. Lackowicz, 1988]. Mediante la transferencia de energía de un fluoróforo donador (el 1,5-IAEDANS) unido a un monómero de TPI a un fluoróforo aceptor (el FITC) unido a otro monómero de TPI, es posible seguir la reasociación de los monómeros para formar el dímero.

La TPI-IAEDANS y TPI-FITC se desnaturalizaron con GdnHCl 4.0 M por una hora (a la misma concentración de proteína). Se combinaron alícuotas de estas

muestras en una relación 1:1 y la mezcla se transfirió a un volumen determinado de TED o de MI formadas con 6.0 % de agua, condiciones bajo las cuales el desnaturalizante se diluye 100 o más veces. Posteriormente se corrió el espectro de emisión excitando a 360 nm [fig. 18 A (en H<sub>2</sub>O), B (en MI), espectro 3]. De la misma manera se midieron los espectros de emisión de los controles es decir TPI-IAEDANS (o TPI-FITC) y TPI (sin marca), que se desnaturalizaron con GdnHCl 4.0 M por separado por una hora (a la misma concentración de proteína). Alicuotas de estas muestras se combinaron y la mezcla se transfirió a un volumen determinado de TED o de MI con 6.0 % de agua, espectros 1 y 2 en la fig. 18 A (en H<sub>2</sub>O) B (en MI). Además en la figura 18 se muestra la suma de los espectros de emisión del donador (1) y el aceptor (2), espectro 4.

Al comparar el espectro 4 con el 3 vemos que hay transferencia de energía, en agua es evidente pues se aprecia la disminución de la emisión del donador (480 nm) y el aumento en la emisión del aceptor (520 nm). Sin embargo en MI se aprecia bien la disminución del donador, pero muy poco el aumento en la emisión del aceptor. Es por esto que fue necesario obtener matemáticamente los espectros de emisión del donador y del aceptor en la mezcla para hacer más evidente la transferencia de energía.

En la figura 18 el espectro 5 corresponde a la emisión del donador en la mezcla y se obtiene matemáticamente al multiplicar el espectro 1 por el factor  $F_{da}/F_d$ . Así mismo el espectro 6 corresponde a la emisión del aceptor en la mezcla y se obtiene al restar el espectro 5 del 3. Al comparar los espectros 1 y 2 con los espectros 5 y 6 se puede apreciar que en la mezcla hay una disminución en la emisión del 1,5-iaedans y un aumento en la emisión de el FITC lo que significa que hay transferencia de energía del 1,5-iaedans a el FITC.

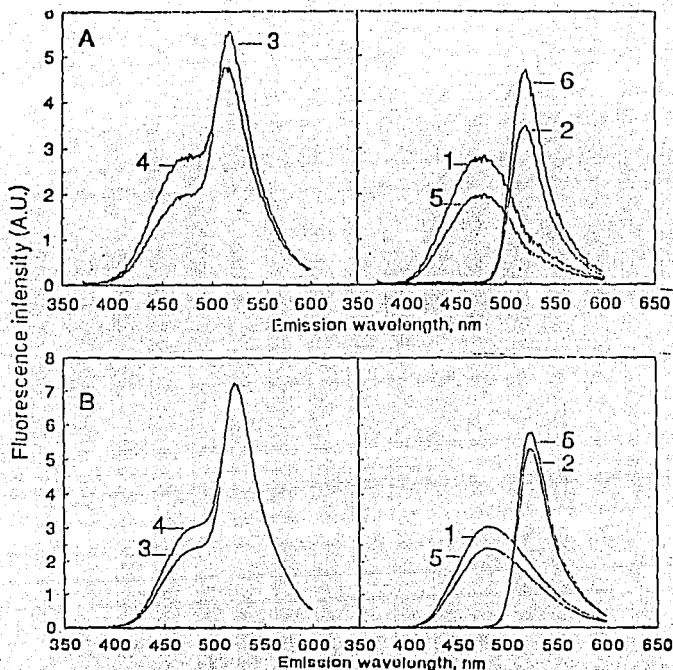


Figura 18. Reasociación de los monómeros de la TPI-IAEDANS y la TPI-FITC en TED (A) y en las MI conteniendo 6.0 % de agua(B). Se muestra el espectro de emisión de la mezcla de renaturalización TPI-IAEDANS y TPI-FITC (3), y de los controles: mezcla de renaturalización de TPI-IAEDANS y TPI (1), mezcla de renaturalización TPI-FITC y TPI (2). Se muestra la suma matemática de los espectros 1 y 2, espectro 4. El espectro 5 corresponde a la emisión del donador en la mezcla y se obtiene al multiplicar el espectro 1 por un factor que es igual a  $F_d/F_a$ . El espectro 6 corresponde a la emisión del aceptor en la mezcla y se obtiene al restar el espectro 3 del 5 (ver detalles en el texto), A en solución acuosa y B en micelas invertidas 6.0 % de agua.

Al mezclar dos poblaciones distintas, es decir los monómeros de TPI-IAEDANS y los monómeros de TPI-FITC, tendríamos tres clases de dímeros: homodímeros de TPI-IAEDANS, homodímeros de TPI-FITC y heterodímeros de TPI-IAEDANS y TPI-FITC. Estadísticamente la probabilidad de que se forme un heterodímero es del 50 %. La eficiencia de la transferencia de energía se puede calcular sabiendo la fluorescencia del donador en presencia ( $F_{da}$ ) y en ausencia ( $F_d$ ) del aceptor. La renaturalización de los heterodímeros formados en solución acuosa según lo indica la transferencia de energía ocurre rápidamente, es decir que a las 24 horas la eficiencia de la transferencia de energía es la misma que en el tiempo inicial y tiene un valor de 0.54 (Fig. 18 A).

En MI la cinética de la renaturalización de la mezcla de TPI-IAEDANS y TPI-FITC es mas lenta que en solución acuosa, según se vio por la recuperación de la actividad y por los cambios en la eficiencia de la transferencia de energía (fig. 19). Al aplicar la mezcla de TPI-IAEDANS y TPI-FITC desnaturalizadas con GdnHCl 4.0 M a MI formadas con 6.0 % de agua fue posible medir el espectro de emisión aproximadamente 2-3 minutos después de la aplicación de la muestra. La eficiencia de la transferencia de energía en el tiempo inicial fue de 0.36, sin embargo la actividad es nula. Posteriormente se observa una cinética de recuperación temporal de la actividad así como también un aumento en la eficiencia de la transferencia de energía. La dimerización es la etapa limitante en la renaturalización de TPI en MI [Garza-Ramos y cols, 1992]. Después de 24 horas la recuperación de la actividad es del 80.0 % y la eficiencia de la transferencia de energía es de 0.50, casi el mismo valor obtenido en solución totalmente acuosa.

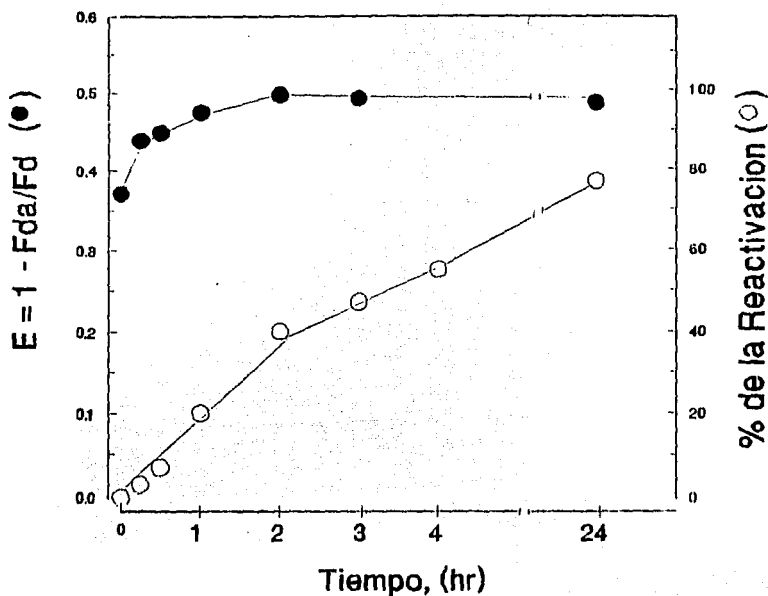


Figura 19. Cambios en la transferencia de energía durante la renaturalización de TPI-IAEDANS y TPI-FITC en las MI conteniendo 6.0 % de agua.

La TPI-IAEDANS y la TPI-FITC se desnaturalizaron por separado con 4.0 M del GdnHCl por una hora. Después se combinaron alícuotas iguales de ambas muestras y la mezcla se transfirió a un determinado volumen de MI conteniendo 6.0 % de agua. De tal manera que la concentración residual del GdnHCl fué 66.0 mM (considerando que GdnHCl se distribuye únicamente en la fase acuosa de las micelas). La concentración de proteína fue 14.5 g/ml. En los tiempos indicados se corrieron los espectros de emisión ( $\lambda_{exc} = 360$  nm) y se tomaron alícuotas para medir la actividad. Se muestra la gráfica de la recuperación temporal de la actividad de la mezcla TPI-IAEDANS y TPI-FITC (○). Los círculos cerrados

muestran el valor de la eficiencia de la transferencia de energía calculada a los tiempos indicados,  $E = 1 - F_{da} / F_d$ .

Las cinéticas de recuperación de la actividad y de transferencia de energía en micelas invertidas son diferentes. Para que se forme el dímero en MI es necesario que ocurra el choque entre dos micelas conteniendo un monómero cada una de ellas. Se han propuesto dos modelos para explicar el proceso de intercambio entre micelas. El modelo 1 involucra la fusión transiente de dos micelas para formar una doble micela con un tiempo de vida media corto. Durante este tiempo el contenido de las micelas se redistribuye por difusión translacional.

Mediante la técnica de dispersión neutrónica quasi-elástica se han medido los coeficientes de difusión ( $D$ ) del surfactante y el agua en los sistemas de micelas invertidas (correspondientes a la difusión intra-micela) [Fletcher P.D.I., 1986]. Para el sistema de AOT a un  $W_0 = 20$  se obtuvieron valores de  $D(\text{AOT}) = 6 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  y  $D(\text{H}_2\text{O}) = 1.3 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Es difícil obtener un valor exacto para la vida media de la doble micela transiente, pero los datos experimentales para el AOT fueron consistentes con una vida media en el rango de microsegundos. Por esto la vida media de la doble micela es suficiente como para que ocurriera el intercambio micelar por difusión. Posteriormente la doble micela se descompone en dos micelas estructuralmente parecidas a las micelas iniciales.

El modelo 2 involucra la difusión de las especies intercambiadoras a través de la bicapa del surfactante que se forma en el punto de contacto de dos micelas que no se funden. Esta bicapa también tiene una vida media corta. Posteriormente se separan las micelas para ser tan independientes como las iniciales. Esto sugiere que independientemente de como ocurra la interacción entre las micelas, esta dura al menos microsegundos. Por lo tanto, un monómero marcado con el donador y un

monómero marcado con el aceptor podrían tener contacto durante microsegundos aunque no formaran el dímero correcto y podría ocurrir transferencia de energía. Cuanta transferencia habría dependería de factores geométricos en cada choque y de la afinidad de un monómero por el otro. Cuando la renaturalización se efectúa en las MI, inicialmente no se observa actividad. La formación del dímero activo ocurre en un tiempo medio  $\tau_{1/2} = 2$  h. Cuando se mezclaron micelas formadas con 6.0 % de agua conteniendo TPI-IAEDANS nativa con micelas conteniendo TPI-FITC nativa no se observó transferencia de energía del el 1,5-IAEDANS a el FITC, lo que sugiere que la TPI en las micelas no se disocia y reasocia.

Para obtener la distancia entre el donador unido a uno de los monómeros de TPI y el aceptor unido a el otro monómero, fue necesario medir y calcular ciertos parámetros (ver Materiales y Metodos). Para el rendimiento cuántico del donador (TPI-IAEDANS), se obtuvo un valor de  $Q_p = 0.68$ . La integral del solapamiento de los espectros de emisión del donador y de absorción del aceptor fue  $J = 8.48 \times 10^{-14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^2$ . La distancia crítica de Förster calculada según la ecuación 3 (ver métodos) fue  $R_0 = 45.43 \text{ \AA}$ . De tal manera que con estos valores y con la eficiencia de la transferencia de energía obtenida experimentalmente en solución acuosa  $\beta = 0.54$ , fue posible calcular la distancia  $R = 44.2 \text{ \AA}$  según la ecuación 7:

## DISCUSION

### CARACTERIZACION DE LA TPI NATIVA EN SOLUCION TOTALMENTE ACUOSA Y EN LAS MI

La TPI nativa atrapada en las MI presenta una actividad menor que en solución acuosa. La actividad aumenta conforme se incrementa el contenido de agua en las micelas y tiene un valor de 100 y 450  $\mu\text{Mol}/\text{min mg.}$  en 3.0 y 7.0 % de agua

respectivamente versus 4500  $\mu\text{Mol}/\text{min mg}$  en 100 % de agua [Garza-Ramos y cols., 1992]. Aún en MI formadas con el más alto contenido de agua que acepta este sistema, la actividad es 10 veces menor que en solución totalmente acuosa. Aunque no se conocen las dimensiones de la cavidad acuosa de las micelas invertidas que se utilizaron en este trabajo, se puede decir que en las MI con 2.0 % de agua es posible albergar un dímero de la TPI, basados en la evidencia de que la tripsina y su inhibidor (que pesan casi lo mismo que el dímero de la TPI) interaccionan en este sistema [Fernández-Velasco A., et. al, 1994]. En 6.0 % de agua el dímero de la TPI tendría menor restricción, ya que la cavidad acuosa es mayor que en 2.0 % de agua. Sin embargo mediante la fluorescencia hemos podido ver que hay diferencias estructurales entre la enzima atrapada en las micelas y la enzima en solución acuosa, que podrían explicar la baja actividad de la TPI al ser atrapada:

a) La intensidad de la fluorescencia intrínseca en el CEM de la TPI atrapada en MI incrementa conforme se disminuye el contenido de agua del sistema. Sin embargo el CEM es muy similar en los diferentes contenidos de agua (fig. 8). Este cambio en la intensidad puede deberse a la sensibilidad de los residuos de triptofano al ser expuestos a un medio cada vez más hidrofóbico (Lakowicz, J.R., 1983). Pero no es posible descartar que este cambio refleje la interacción de la proteína con la interfase cargada de la micela, ya que hay evidencias que indican que la fluorescencia (Desfoses, et. al, 1991) y la fosforescencia (Strambini y Gonelli, 1988) de los triptofanos de las proteínas se modifican por su interacción con las superficies micelares. Aún en 6.0 % de agua la eficiencia cuántica de los triptofanos de la TPI es aproximadamente 15.0 % mayor que en 100.0 % de agua. Esto podría indicar que los triptofanos están expuestos a un medio más hidrofóbico, aunque según la RMN en MI al 6.0 % de agua, ésta tiene propiedades muy similares a las del agua libre [Capitanini D., et. al, 1988., Kernén P., et. al, 1993]. Esto podría indicar que los



triptofanos parecen estar interaccionando también con las moléculas del solvente orgánico apolar.

b) El espectro de emisión de TPI-IAEDANS en 100.0 % de agua tiene un CEM = 488 nm. Para la enzima desnaturalizada en 4.0 M del GdnHCl el CEM = 508 nm, es decir esta desplazado 20 nm hacia el rojo y la fluorescencia esta apagada aproximadamente un 50.0 %. La fluorescencia de la TPI-IAEDANS nativa atrapada en MI formadas con 6.0 % de agua es aproximadamente 10.0 % menor que en agua. Presenta un CEM = 495 nm, valor intermedio entre los CEM de la enzima nativa en solución totalmente acuosa y la enzima desnaturalizada (Fig. 16), es decir que tomando en cuenta estos datos parecería que la enzima atrapada esta parcialmente desnaturalizada.

c) Además la polarización de la fluorescencia de la TPI-IAEDANS es  $0.220 \pm 0.005$  y  $0.170 \pm 0.005$  en 100.0 y 6.0 % de agua respectivamente (Tabla 2). La menor polarización de la fluorescencia de la enzima atrapada con respecto a 100 % de agua, podría explicarse de dos maneras: o el sitio de unión del fluoróforo es mucho mas móvil en la micelas, o bien en las micelas alguna fracción de la proteína se encuentre en otras conformaciones diferentes de la conformación del dímero activo, es decir como dímeros incorrectos, y por lo tanto incapaces de formar el dímero activo.

d) Al calcular el volumen de la TPI por la gráfica de Perrin, los valores obtenidos en las diferentes condiciones resultaron ser distintos, es decir tanto en las micelas como en solución acuosa (Fig. 15). Esto posiblemente se debe a que:

1) Al medir la polarización de la fluorescencia de la TPI-IAEDANS en las micelas, no solo se esta viendo la rotación de la proteína sino también la de las micelas. Para el caso de las micelas formadas con 6.0 % de agua en las que una gran proporción del agua es muy similar a el agua libre, no se esperaría tanta diferencia al calcular el volumen por la ecuación de Perrin. Sin embargo, al medir la polarización de la

fluorescencia de la proteína marcada en MI con 2.0 % de agua la rotación de la micela podría tener una mayor contribución, ya que en estas condiciones la proteína tiene mayores posibilidades de interactuar con la interface cargada de la micela. Posiblemente a esto se deba que mediante la ecuación de Perrin obtuvimos un volumen mayor en las micelas con 2.0 % de agua que con 6.0 % de agua.

2) En la gráfica de Perrin el valor de  $r_{00}$ , es decir la anisotropía intrínseca del fluoróforo que podría observarse si no ocurriera rotación molecular es de 0.3, mientras que el valor que se obtuvo experimentalmente fue de 0.25. El fluoróforo se comporta diferente de acuerdo al sitio al que se une en la proteína así como también de acuerdo al medio que lo rodee (Lakowicz, 1983). Este comportamiento estará gobernado tanto por la movilidad local del sitio de unión como por la movilidad global de la proteína y también por la rotación de las micelas.

Con este grado de incertidumbre es difícil decir con certeza que es lo que le pasa a la enzima al estar atrapada en las micelas, iniciando por el hecho de que aún en las micelas que contienen 6.0 % de agua la actividad de la enzima es del 10 % comparada con su actividad en medio totalmente acuoso. Una posibilidad sería que solo existieran un 10 % de los dímeros activos y el 90 % restante se encontrara en estado monomérico, lo que explicaría que al calcular el tamaño de la partícula mediante la ecuación de Perrin se obtiene un valor aproximadamente de la mitad del valor obtenido en solución acuosa (ver figura 15). Esta posibilidad puede descartarse ya que las características de la fluorescencia intrínseca de la TPI nativa en solución totalmente acuosa y la enzima atrapada son muy similares, lo cual sugiere que la estructura cuaternaria global no se ve drásticamente afectada. Lo más probable es que todos los dímeros sean activos pero por el hecho de encontrarse restringidos en su movilidad en las micelas presenten solo el 10 % de la actividad.

Por otra parte utilizando un sistema modelo [Fernández-Velasco, A., et. al, 1994] para tratar de ver si la interacción física entre los monómeros puede ocurrir en las micelas con 2.0 % de agua. Para esto se escogieron a la tripsina y el inhibidor de tripsina de soya que tienen un peso molecular muy similar al monómero de la TPI. En MI con 2.0 % de agua se observó inhibición en aproximadamente dos minutos. A concentraciones equivalentes de monómeros de TPI el tiempo de dimerización fue mucho mayor. La interacción de la tripsina con su inhibidor en las MI con 2.0 % de agua indica que el tamaño de estas micelas es suficiente para albergar al dímero de la TPI. Sin embargo como cada proteína se comporta diferente dependiendo del medio que la rodee y de las interacciones con el solvente circundante, no es posible concluir que en las MI no pudieran existir dímeros incorrectos.

Los datos anteriores (a-d) sugieren que la TPI atrapada presenta alguna modificación estructural que la hace diferente de la enzima en medio totalmente acuoso.

#### DESNATURALIZACION DE LA TPI

Las curvas de la desnaturalización de la TPI con diferentes concentraciones del GdnHCl (fig. 1, fig. 14 A y B) muestran el carácter cooperativo del desplegamiento de la enzima, tal y como sucede en otras proteínas [Creighton, T.E., 1993]. A pesar de que las tres curvas obtenidas a partir de tres parámetros diferentes presentan un punto medio en 0.6 - 0.7 M del GdnHCl de la transición del estado nativo al estado desnaturalizado; estas no son similares, lo que sugiere que el mecanismo de desnaturalización no se ajusta al modelo de dos estados, sino que en el proceso de la desnaturalización hay estados intermedios (Privalov, 1989).

#### CARACTERIZACION DE LA TPI RENATURALIZADA EN LAS MI

Cuando se transfiere TPI desnaturalizada en 4.0 M de GdnHCl a MI formadas con un alto contenido de agua (6.0 %), la proteína presenta características fluorescentes diferentes de las enzimas nativa y desplegada en MI (ver fig. 9). Su fluorescencia intrínseca es mayor y su CEM tiene un valor intermedio entre el de las enzimas nativa y desnaturalizada. Si la mezcla se deja incubando, progresivamente se recupera la actividad catalítica así como también se presentan cambios en el espectro de la fluorescencia intrínseca. Finalmente después de 24 horas se recupera casi la totalidad de la actividad y el espectro de la fluorescencia intrínseca es muy parecido al de la enzima nativa.

La enzima renaturalizada en MI conteniendo 6.0 % de agua, en condiciones óptimas, recupera casi el 100 % de su actividad, sin embargo no llega a ser igual que la enzima nativa atrapada en MI:

a) Su fluorescencia intrínseca es mayor que para la enzima nativa (aproximadamente un 10 %) y su CEM es también mayor (2-3 nm) (Fig. 9).

b) La fluorescencia de la TPI-IAEDANS renaturalizada es aproximadamente un 10.0 % mayor que para la TPI-IAEDANS nativa. (Fig. 16, B)

c) La polarización de la fluorescencia de la enzima nativa marcada con IAEDANS es de  $0.170 \pm 0.005$  mientras que para la enzima renaturalizada es  $0.115 \pm 0.003$ , valor muy similar al del monómero atrapado en las MI. Al incubar por varias horas y medir la polarización de la fluorescencia en diferentes tiempos, prácticamente no se observan cambios en la polarización de la fluorescencia. Sin embargo la actividad se recupera en 80.0 % (fig. 17, B). La enzima renaturalizada en las MI no recupera el valor total de la polarización de la fluorescencia del dímero y tampoco total. Esto sugiere que existe heterogeneidad en las estructuras, es decir hay dímeros activos y/o dímeros incorrectos y/o monómeros incorrectos incapaces de dimerizar debido a lo cual la polarización de la fluorescencia no llega a ser igual a la del dímero nativo. De tal manera que el valor de polarización de la fluorescencia

representa un promedio de las polarizaciones de las estructuras que se formen en las MI.

## INTERMEDIARIOS DEL PLEGAMIENTO DE LA TPI EN MI

Hughson (1990) ha atrapado intermediarios de la vía del plegamiento de proteínas monoméricas bajo condiciones desnaturalizantes suaves, sin embargo tanto los estados plegado como desplegado son inestables. Baker y cols. (1992) también han atrapado un intermediario del plegamiento de la proteasa alfa-lílica, usando una proteína que pierde su región pro. En lo que se refiere a las proteínas oligoméricas se ha estudiado la modificación de la estabilidad del contacto entre las subunidades por altas presiones hidrostáticas (Silva y Weber, 1993), por sulfato de amonio (Girg, et al, 1983), y por mutagenesis sitio dirigida (Ahern et al, 1987; Casal et al, 1987; Borchert y cols, 1993).

Se ha reportado [Fernández-Velasco, A., et al, 1994] que cuando la TPI desnaturalizada primero se transfiere a las MI con un alto contenido de agua, y posteriormente se disminuye la cantidad de agua en contacto con la proteína antes de que se forme el dímero, se atrapan monómeros competentes debido a la limitación de agua, por lo que se detiene la reactivación. Es decir que los monómeros al haber estado en las MI con un alto contenido de agua, alcanzan una conformación parcial o totalmente plegada como para tener la capacidad de dimerizarse; pero al disminuirse el agua se "congelan" en un estado de monómero competente.

En el presente trabajo se observó que no solo se detiene la reactivación, sino también los cambios en la fluorescencia intrínseca. Subsecuentemente al aumentar el contenido de agua del sistema se reinicia la reactivación y los cambios en la fluorescencia intrínseca. Esto sugiere que la proteína altamente fluorescente que surge después de transferir a la TPI desnaturalizada a las MI (Fig. 9, espectro k) es

un intermediario en la vía de monómero desplegado a dímero activo. Además los datos muestran que la dimerización involucra un arreglo final de los aminoácidos aromáticos. En medio acuoso no se pudo detectar este intermediario (esto puede deberse a limitaciones técnicas), ya que el espectro de emisión de TPI obtenido 2 ó 3 minutos después de la dilución del GdnHCl es similar al de la proteína nativa. Esto no es sorprendente, ya que la reactivación de la TPI en medio acuoso es un proceso rápido (Waley, S.G., 1973., Zabori S., et al, 1980). El incremento en la fluorescencia intrínseca del monómero en las MI puede deberse al plegamiento del monómero, también puede corresponder a un monómero cuya fluorescencia se ve afectada por la interacción con la interface cargada de la micela. Hay evidencias que suponen que la fluorescencia de los triptofanos se altera por las superficies micelares (Strambini, G.B. y Gonelli, M., 1988)

Aunque la existencia de un monómero altamente fluorescente no se ha podido visualizar en medio acuoso, en las MI este intermediario existe y se puede atrapar por un tiempo significativamente grande (fig. 9). En Las MI se pueden atrapar otras dos estructuras que se obtienen a partir de los monómeros desplegados de la TPI y se pueden caracterizar estructuralmente en base a su fluorescencia intrínseca:

1) Cuando la TPI desnaturalizada se transfiere a las MI con 3.0 % de agua o menos (en ausencia o en presencia de DTT), esta proteína adquiere una estructura incapaz de formar el dímero activo (ver fig. 9 y tabla I).

2) Cuando la TPI desnaturalizada se transfiere a altas concentraciones de agua (> 4.5 %), en ausencia de DTT, la enzima adquiere una conformación incapaz de formar un dímero activo e incapaz de experimentar cambios en su fluorescencia intrínseca, mientras no se le agregue poder reductor (ver fig. 11).

Es factible que estas tres estructuras sean diferentes debido a que las condiciones experimentales bajo las cuales se obtienen lo son, y a que tienen

capacidad de experimentar o no la reactivación. Sin embargo las tres poseen características de fluorescencia intrínseca muy similares. Se podría suponer que después de que los residuos aromáticos de la proteína se transfieren a un medio de baja polaridad como las MI, la proteína puede seguir diferentes vías que pueden ser controladas por la cantidad de agua y el estado redox del sistema.

Para el caso de los monómeros competentes es relevante el hecho de que la formación de dímeros activos paralelamente ocurre con cambios en la fluorescencia intrínseca (ver fig. 10). Esto sugiere que la dimerización involucra un arreglo final de los residuos aromáticos.

#### REASOCIACION DE LA TPI EN LAS MI MEDIDA POR LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA

Mediante la transferencia de energía de un fluoróforo donador unido a uno de los monómeros de TPI a un fluoróforo aceptor unido a otro, en confirmación a reportes previos (Waley, 1973), se observó que en solución acuosa la renaturalización ocurre en tiempos muy cortos (ver fig. 18 A). La eficiencia de la transferencia de energía de los heterodímeros en solución acuosa se observó 2 ó 3 minutos después de la dilución del desnaturizante y permaneció constante por 24 h. En las condiciones experimentales 1:1 donador-aceptor la eficiencia de la transferencia de energía calculada fue 0.54. En Las MI fue posible seguir la cinética de la recuperación de la actividad de la mezcla de los monómeros marcados con el donador y los monómeros marcados con el aceptor (ver fig. 19), así como también se pudieron observar cambios en la eficiencia de la transferencia de energía (ver fig. 18 B). La variación temporal de la transferencia de energía, la cinética de la recuperación de la actividad en las MI conteniendo 6.0 % de agua, y la evidencia

[Garza-Ramos G., et. al, 1994] de que la dimerización es la etapa limitante en la renaturalización de la TPI sugieren que:

Como consecuencia del intercambio micelar, que ocurre cuando dos micelas interaccionan (en microsegundos); un monómero marcado con donador y un monómero marcado con aceptor se encuentren en una micela, puedan adquirir un plegamiento parcial y sean capaces de dimerizarse. En estas condiciones habría una distancia lo suficientemente pequeña entre el donador y el aceptor como para que ocurra la transferencia de energía. Posteriormente puede ocurrir la dimerización y eventualmente llegarse a la estructura correcta con la subsecuente adquisición de la actividad catalítica.

La distancia entre el donador y el aceptor unidos cada uno de ellos a un monómero de la TPI, se calculó mediante la eficiencia de la transferencia de energía y a través de las ecuaciones 1-7 (ver métodos, pag. 34-36 y resultados pag. 68). El valor de R obtenido fue 44.2 Å. Se tiene el sitio de unión del 1,5- IAEDANS; a través de proteólisis y secuenciación en el laboratorio se está tratando de determinar el sitio de unión del FITC a la TPI. Se tienen resultados previos mediante los cuales se han descartado 16 lisinas. Se ha obtenido un fragmento fluorescente alrededor de 7000 Da, que empieza en el residuo 175, han leído 10 aminoácidos que no contienen lisinas y a partir del residuo 185 solo quedan 5 lisinas, entre las cuales está el sitio de unión del FITC. Gabriel Moreno del laboratorio del Dr Xavier Soberón obtuvo una minimización de la estructura de la TPI de conejo a partir de la estructura de la enzima de pollo. A través de esta minimización se midió la distancia de la cys-217, sitio del 1,5-IAEDANS, a las 5 lisinas a donde podría estar unido el aceptor. Estas distancias fluctúan entre 57.72 y 69.85 Å. Al comparar estos valores con la distancia obtenida experimentalmente se puede ver que la diferencia es muy pequeña.



En solución totalmente acuosa la formación de los dímeros activos de la TPI a partir de los monómeros desplegados ocurre en segundos, mientras que en micelas invertidas el tiempo medio para esta reacción es de más de una hora. Es por esto que utilizando las MI en el presente trabajo fue posible atrapar intermediarios de la vía del plegamiento de esta proteína y hacer un estudio estructura-función. En este sentido este sistema de micelas invertidas presenta ventajas en comparación con la solución totalmente acuosa, -Rahaman y Halton (1991) estudian los efectos de la proteína en la estructura y forma micelar y en el sistema como un todo. Aunque aún no claro, es posible que la superficie micelar cargada restrinja la movilidad libre de la proteína y que provoque distorsiones de los intermediarios en la vía del plegamiento. Para el caso de la TPI estas posibles distorsiones impiden parcialmente la formación de los monómeros competentes y de los dímeros catalíticamente activos. Por otro lado, es difícil determinar la cantidad exacta de agua que rodea a la proteína atrapada en el interior de la micela, sin embargo por NMR se ha hecho un análisis de los protones del agua en el sistema de micelas invertidas utilizado en este trabajo (Kernen y cols., 1993). Se ha encontrado que a concentraciones de agua menores de 4.0 % los protones existen en estado de unión, mientras que arriba de esta concentración los protones del agua poseen propiedades del agua libre; por lo que a 6.0 % de agua el factor de interacción con la superficie micelar podría ser importante.

## CONCLUSIONES

En confirmación a los reportes previos (Hagen, 1990 a, b., Garza-Ramos y cols. 1992) se mostró que la renaturalización de proteínas puede ocurrir en las MI, permitiendo así una mejor caracterización de los procesos de plegamiento y reasociación de subunidades proteicas.

Las MI presentan una alternativa adicional para determinar la secuencia de eventos que ocurren durante el plegamiento proteico y la formación de enzimas multiméricas.

Mediante la fluorescencia intrínseca de la TPI y la fluorescencia de TPI-IAEDANS fue posible monitorear los cambios estructurales globales y específicos que la enzima dimerica sufre al ser atrapada en las micelas, así como también caracterizar a la enzima renaturalizada en las MI.

A través de la fluorescencia intrínseca y mediante la transferencia de energía de un fluoróforo donador unido a un monómero de la proteína a un fluoróforo aceptor unido a otro de los monómeros de la TPI, fue posible monitorear la reasociación del dímero a partir de los monómeros desplegados, y confirmar el modelo propuesto para la renaturalización de la TPI en las MI [Garza-Ramos y cols., 1992]. En las MI la formación de dímeros activos y los cambios en la fluorescencia intrínseca ocurren en paralelo. Esto sugiere que el plegamiento y la dimerización involucran un arreglo final de los residuos aromáticos fluorescentes.

## PERSPECTIVAS

Utilizando los monómeros marcados con el 1,5-IAEDANS sería posible caracterizar estructuralmente los tres conformeros que se atrapan en las MI a partir de los monómeros desplegados de la TPI:

-el monómero altamente fluorescente que se obtiene al transferir a la TPI desnaturalizada a las MI con 6.0 % de agua.

-la estructura incapaz de formar el dímero activo que se obtiene cuando la TPI desnaturalizada se transfiere a las MI con 3.0 % de agua o menos (en ausencia o en presencia de DTT).

-la enzima que adquiere una conformación incapaz de formar un dímero activo e incapaz de experimentar cambios en su fluorescencia intrínseca, mientras no se le agregue poder reductor, que se obtiene cuando la TPI desnaturalizada se transfiere a altas concentraciones de agua (> 4.5 %), en ausencia de DTT.

Las condiciones experimentales en que estas estructuras se obtienen son diferentes, sin embargo las tres poseen características de fluorescencia intrínseca muy similares. Mediante una sonda específica -el 1,5-IAEDANS, podría ser posible diferenciar estas estructuras.

Sería interesante estudiar la reasociación de la TPI mediante las estrategias que utilizamos en este trabajo (tanto en solución acuosa como en micelas invertidas) utilizando una cinética rápida, ya que con la resolución de esta técnica tal vez fuera posible monitorear las etapas primarias del plegamiento de esta proteína.

Midiendo los tiempos de vida media sería posible también calcular la eficiencia de la transferencia de energía durante la formación de heterodímeros formados por monómeros de TPI-FITC y TPI-IAEDANS.

Por otro lado sería interesante poder hacer quimeras con monómeros de TPI de conejo marcados con el 1,5-IAEDANS con monómeros de TPI de tripanosoma marcados con el FITC. La transferencia de energía nos indicaría si ocurre o no esta asociación.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahern, T.J., Casal, J.I., Petsko, G.A. and Klivanov, A.M. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 675-679.
- Alber, T., Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., (1981) Phil. Trans., R.Soc. London, B 239, 159-171.
- Baker, D. Sohl, J. and Agard, D.A., (1992) Nature 356, 263-265.
- Banner, D.W., et al., (1975) Nature, 255, 609-614.
- Bismuto, E., Jameson, D.M. and Gratton, E., (1987) J. Am. Chem. Soc., 109, 2354-2357.
- Borchert, T.V., Pratt, K., Zeelen, J.Ph., Callens, M., Noble, M.E.M., Opperdoes, F.R., Michels, P.A.M. and Wierenga, R.K. (1993) Eur. J. Biochem., 211, 703-710.
- Capitani, D., Haering G, Luisi P.L., (1988) J.Phys. Chem. 92; 3500
- Casal, J.I., Ahern, T.J., Davenport, R.C., Petsko, G.A. and Klivanov, A.M. (1987) Biochemistry 26, 1258-1264.
- Corran, P.H., Waley, S.G., (1973) FEBS Lett. 30, 97-99.
- Creighton, T.E., (1993) Proteins, Structure and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co. New York.
- Eicke, H., Renak, J., (1976) Helv. Chim. Acta, 59, 2883-2891.
- Eicke, H., (1980) Top. Curr. Chem., 87, 85-145.
- Elis, R.J., (1987), Nature, Vol.370.
- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou A., Millán, L. and Darszon, A., (1989) Arch. Biochem. Biophys. 272, 332-343.
- D. Alejandro Fernández-Velasco, Marisa A. Sepúlveda-Becerra, Antonio Galina, Alberto Darszon, Marietta Tuena de Gómez-Puyou and Armando Gómez-Puyou, (1994) Biochemistry, 34, 361-369

- Ferreira, S.T. and Verjovski-Almeida, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 15392-15397.
- Fersht, A., (1985) *Enzyme structure and mechanism*. W. H. Freeman and Co.
- Fletcher, P.D.I., (1987), *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 83, 985.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A. I., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 172, 830.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou A., Gracy, W., (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 389-395.
- Girg, R., Jaenicke, R. and Rudolph, R. (1993) *Biochem. Int.* 7, 433-441.
- Goto and Fink, (1990) *Biochemistry* 29, 4313-4320.
- Hafeti, Y., (1985) *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 1015-1069.
- Harvey Alan Berman, Juan Yguerabide and Palmer Taylor, 1980, 19, 2226-2235
- Hamaguchi, (1991), *Biochemistry* 30, 1012-1019.
- Handbook of Chemistry and Physics, 1981-1982, Editor Robert Weast, CRC Press.
- Hughson, F.M., Wright, P.E. and Baldwin, R.L. (1990), *Science* 249, 1544-1548.
- Kasahara, M., Penetsky, H.S., (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4180-4187
- Jaenicke, R., (1984) *Angew. Chem.*, 96, 402-835.
- Jaenicke, R., (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 49, 117-237
- Johnson, L.N., Waley, S.G., (1967) *JMB*, 29, 321.
- Kernen, P., Degli Agosti, R., Greppin, H., Darszon, A. and Strasser, R.J. (1993) *Experientia* 49, A51.
- Komives, E.A., Chang, L.C., Lolis, E., Petsko, G.A. and Knowles, J.R. (1991), *Biochemistry* 30, 3011-3019.
- Krietsch, W.K.G., Pentchev, P.G., Klingenburg, H., (1970), *European J. Biochem.* 14, 289.
- Kumar, C. and Balasubramanian, D., (1980) *J. Colloid Interface Sci*, 74, 64-70.
- Lakowicz, J.R., (1983) Plenum Press, New York and London

- Le Bras, G., Teschner, W., Deville-Bone, D. and Garel, J.R., (1989) *Biochemistry*, 28, 6836-6841.
- Lee, J.C. and Timasheff, S.N., (1974) *Biochemistry*, 13, 257.
- Liang, S.J., Lin, Y.Z., Zhou, J.M., Tsou, C.L., Wu, P., and Zhou, Z., (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1038, 240-246.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. and Petsko, G.A., (1990) *Biochemistry* 29, 6609-6618.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Berezin, I.V., (1977) *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, 236, 920-923.
- Martinek, K., Levashov, V.A., Klyachko, L.N., Khmelnskiy, Y.L. and Berezin, I.V., (1986) *Eur. J. Biochem.* 155, 453-468.
- Menger, F.M., Donohue, J.A. and Williams, R.P., (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 286-289
- Molecular Probes, (1994) *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, Richard P. Haugland.
- Norton, I.L., et al., (1970) *Biochemistry*, 9, 4952.
- Pace, C.N., (1975) *Crit. Rev. Biochem.*, 3, 1-43.
- Pace, C. N. (1991), *Biochemistry* 31, 317-425.
- Paudel, H.K. and Carlsson, G.M., (1990) *Biochem. J.*, 268, 393-399.
- Poon, P. H., Wells, M. A., (1974) *Biochemistry*, 13, 4928-4936.
- Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S.Yu., Grico, Yu.V., Makhatazde, G.I., Khechinashvili, N.N., (1989) *J. Mol. Biol.* 205, 337.
- Rahaman, R.S. and Hattton, T.A. (1991), *J. Phys. Chem.* 95, 1799-1811.
- Ramakrishnan, V.R., Darszon, I., Montal, M., (1982), *The Journal of Biol. Chem.*, Vol. 258, No. 8, 4857-4860.
- Richard, J.P. (1991) *Biochemistry* 30, 4581-4585

- Robinson, B.H., et al., (1984) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1, 80, 13-27.
- Rupley, J.A., Gratton, E. and Careri, G., (1983) *Trends Biochem. Sci.*, 8, 18-22.
- Silva, J.L. and Weber, G. (1993) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44, 89-113.
- Schnackers, (1991), *Eur. J. Biochem*, 199, 231-238
- Scheibe, R., Rudolph, P., Reng, W. and Jaenicke, R., (1990) *Eur. J. Biochem.*, 189, 581-587
- Strombini, G.B. and Conelli, M., (1986) *Biochemistry*, 25, 2471-2476.
- Tanford, (1980) "The hydrophobic Effect, 2nd. ed., John Willey and Sons, New York, 1980
- Teale, F.W. and Weber, G., (1957) *Biochem. J.*, 65, 476-482.
- Tijima, S., Saiki, T. and Bappu, T., (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 613, 1-9.
- Tsuji, K., Sunamoto, J. and Fendler, J. H., (1983) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2889-2893.
- Vanderkoi, (1977) *Biochemistry*, Vol. 16, N 7, 1262-1267.
- Webb, M.R., Standing, D.N. and Knowles, J.R. (1977) *Biochemistry* 16, 2738-2741.
- Wierenga, R.K., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., (1987) *J. Mol. Biol.*, 198, 109-121.
- Wong, M., Thomas, J.K. and Nowak, T., (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 4730-4736.
- Zabori, S., Rainer, R., Jaenicke, R., (1980) *Naturforsch* 35, 999-1004

# Water Requirements in Monomer Folding and Dimerization of Triosephosphate Isomerase in Reverse Micelles. Intrinsic Fluorescence of Conformers Related to Reactivation<sup>†</sup>

D. Alejandro Fernández-Velasco,<sup>†</sup> Marisa Sepúlveda-Becerra,<sup>‡</sup> Antonio Galina,<sup>§</sup> Alberto Darszon,<sup>§</sup> Marietta Tuena de Gómez-Puyou,<sup>†</sup> and Armando Gómez-Puyou<sup>\*,†</sup>

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, and Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor, México*

Received May 12, 1994; Revised Manuscript Received October 11, 1994<sup>¶</sup>

**ABSTRACT:** The possibility of using reverse micelles to stabilize monomers prior to formation of dimeric triosephosphate isomerase (TPI) from rabbit muscle was studied. TPI denatured with guanidine hydrochloride undergoes reactivation in reverse micelles formed with *n*-octane, hexanol, cetyltrimethylammonium bromide, and water. Reactivation of around 80% is observed at TPI concentrations of about 2  $\mu\text{g/mL}$  of reverse micelles and water concentrations above 4.0%. With 3.0% water, reactivation is about 10%. If denatured TPI is incubated for a few seconds in reverse micelles with 5.0% water (or higher) followed by incubation in 3.0% water, reactivation is between 35% and 50%. That is, a brief exposure of denatured TPI to reverse micelles with a relatively high water concentration yielded a significant amount of structures competent for formation of catalytically active dimers. As evidenced by kinetic data, these structures correspond to monomers of TPI [Garza-Ramos, G. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., & Gracy, R. W. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 389–395]. After a 5–2.0% water transition, competent monomers were stabilized for at least 30 min; a subsequent rise in water concentration led to dimerization and appearance of activity. By changes in the amount of water, it was possible to determine in reverse micelles the amount of water required for monomer folding and dimerization; i.e., less water was required in the dimerization step. Experiments with a model system, trypsin and the soybean inhibitor, showed that, in reverse micelles with 2.0% water, protein–protein interactions readily take place. Hence, the lack of dimerization of TPI monomers in micelles with this water content suggests that, after collision, interacting monomers must undergo conformational changes that result in a stable catalytically active dimer. The intrinsic fluorescence spectra of native and denatured TPI entrapped in reverse micelles with 6.0% water were clearly different. Both differed from that of monomers competent for reactivation. With time, the intrinsic fluorescence of the latter changed in parallel to the appearance of catalytic activity. The intrinsic fluorescence of competent and incompetent conformers was sensitive to water concentration. At equal water concentrations no obvious difference was observed between the two. TPI at various states of denaturation produced by various concentrations of guanidine hydrochloride in standard aqueous media could also be stabilized in reverse micelles with 2.0% water, an increase in water concentration induced reactivation. The lack of interconversion between folded monomers and active dimers in reverse micelles with low water content suggests that in these conditions there is a kinetic barrier that prevents formation of active dimers from folded monomers.

Kauzmann (1959) proposed that water is a predominant component in protein folding, mainly as consequence of the unfavorable entropy of water molecules near nonpolar residues. More recent studies on the role of water on protein

folding explored the role of hydration of polar and nonpolar amino acids on protein stability (Privalov & Gill, 1988; Makhatadze & Privalov, 1993; Privalov & Makhatadze, 1993). These and other studies (Rupley & Carri, 1991; Jenicke, 1987) have led to the concept that water is fundamental in the function and stability of proteins. However, the precise contribution of water, and particularly how much water is needed for protein folding and/or formation of oligomeric proteins, is not known. As continuation of studies concerning the contribution of water in specific events of enzyme mobility (Barrabin et al., 1993), this work explores the water requirements in monomer folding and dimerization of homodimeric triosephosphate isomerase (TPI).<sup>1</sup>

TPI is formed by two identical eight strand  $\beta$ -sheet subunits of around 26 000 Da. It catalyzes the interconversion of glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate

<sup>†</sup> This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico from the Universidad Nacional Autónoma de México and from CONACYT. A.D. is an International Fellow of the Howard Hughes Medical Institute.

\* Corresponding author, at the Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, México, D.F. 04510 México. Phone (525) 622-5629, FAX (525) 622-5611.

<sup>†</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

<sup>‡</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca.

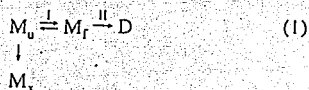
<sup>§</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>¶</sup> Abstract published in *Abstracts ACS Abstracts*, December 1, 1994.



through well established mechanisms (Albery & Knowles, 1976, 1977; Knowles, 1991). As a side reaction, TPI catalyzes the formation of methylglyoxal phosphate (Richard, 1991), and in repeated catalytic cycles, it undergoes specific covalent modifications (Lang et al., 1990). The crystal structure of TPI from several sources (Banner et al., 1975; Alber et al., 1981; Lolis et al., 1990; Wierenga et al., 1991, 1992; Noble et al., 1993; Mañde et al., 1994) has been determined at high resolution.

From studies of TPI reactivation from unfolded monomers at various protein concentrations in standard aqueous media (Waley, 1973; Zabori et al., 1980), and in reverse micelles (Garza-Ramos et al., 1992b), the following simplified reaction sequence was derived:



$M_u$  is an unfolded monomer that is first transformed into  $M_f$ .  $M_f$  stands for a monomer competent for dimerization with a structure different from that in the catalytically active dimer (D).  $M_x$  is a broad term that indicates structures that do not form the active dimer. In both standard aqueous media, and reverse micelles, at relatively low protein concentrations, the rate limiting step is dimerization (step II). However, the process is orders of magnitude slower in reverse micelles (Garza-Ramos et al., 1992b).

The later observation, and previously reported data (Rupley & Careri, 1991; Zaks & Klibanov, 1985; Ramirez-Silva et al., 1993), suggested that systems with a low water content may be used to ascertain important features of enzyme action. In fact, in such systems it was possible to trap different enzyme conformers (Russell & Klibanov, 1988) and intermediates of catalytic cycles (Escamilla et al., 1989). Thus, it was thought that reverse micelles, in addition to current approaches (Hughson et al., 1990; Baker et al., 1992), could be applied to trap intermediates of the formation of dimeric TPI. If so, the system could be used to explore if the different reactions that lead to TPI dimerization have distinct water requirements, to determine the structural characteristics of conformers related to the formation of the TPI dimer, and to determine the modifications that they undergo in the transition from a catalytically inactive monomer to a quaternary structure that is catalytically active.

The results on the reactivation of TPI in reverse micelles here described show that by changes of their water content, it was possible to arrest, or initiate, the formation of active dimers. This allowed the determination of the amount of water required for monomer folding and dimerization. Moreover, since the monomers could be trapped for a substantial time, it was possible to determine their intrinsic fluorescence and the changes that accompany formation of the catalytically active dimer.

## MATERIAL AND METHODS

Triosephosphate isomerase from rabbit muscle, trypsin, cetyltrimethylammonium bromide, *n*-octane, hexanol,  $\alpha$ -

glycerophosphate dehydrogenase, NADH, and glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal were obtained from Sigma. Glyceraldehyde 3-phosphate was prepared from glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal as described by the supplier. Soybean trypsin inhibitor was from Worthington. The activity of TPI in all aqueous mixtures, measured as described elsewhere (Rozacky et al., 1971), was around 4 000  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  with glyceraldehyde 3-phosphate as substrate. TPI concentration was determined by its absorbance at 280 nm,  $\epsilon_{280}^{\text{TPI}} = 12.9$  (Rozacky et al., 1971).

**Reverse Micelles.** The basic system for reverse micelles contained 200 mM cetyltrimethylammonium bromide suspended in *n*-octane and hexanol in a ratio of 8.7:1 (v/v). Reverse micelles were formed by adding a water solution of 40 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4, to the desired water concentration (1.5–6.0% v/v;  $W_0 = 4.1$ –16.6, respectively). This was followed by vigorous stirring. The reverse micelle system with and without TPI was stable for at least a week. The water solubility diagrams of this type of reverse micelles have been described (Hilhorst et al., 1984; Fernández-Velasco et al., 1992). Under these conditions, the concentration of reverse micelles is between 1 and 4 mM (Laine et al., 1987).

**Assay of TPI Activity in Reverse Micelles.** In all cases activity was measured at 24 °C in reverse micelles that contained 6.0% water (v/v); this water phase contained 40 mM triethanolamine, pH 7.4, 1 mM dithiothreitol, 10 mM EDTA, 3.3 mM glyceraldehyde 3-phosphate, 0.2 mM NADH (overall concentration), and 5–7  $\mu\text{g}$  of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase. The latter enzyme was introduced after the micelles had been formed with the aforementioned components; previously, ammonium sulfate in the enzyme was removed (Garza-Ramos et al., 1992b) by filtration–centrifugation in Sephadex G-50 columns equilibrated with 40 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4. For the assay of TPI activity, an aliquot (generally less than 20  $\mu\text{L}$ ) of reverse micelles that contained native or TPI at various levels of reactivation was added. The decrease in optical density at 340 nm was used as measure of activity. Activity was linear with time until NADH concentration became limiting. The activity of TPI in reverse micelles with 6.0% water was around 420  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ .

**Denaturation of TPI in All Aqueous Media and Its Reactivation in Reverse Micelles.** TPI was denatured in 4–6 M GdnHCl of a standard aqueous media containing 40 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4, for 1 h at 24 °C. In the experiments in which only reactivation was determined, the concentration of protein was 3–6 mg/mL. In the fluorescence experiments the protein concentration was 25–30 mg/mL. Reactivation was started by injection of 1  $\mu\text{L}$  of the denatured enzyme into 3.0 mL of reverse micelles formed at the desired water concentration with a solution of 40 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4. The transfer of denatured TPI to reverse micelles resulted in at least a 75-fold dilution of GdnHCl (maximal concentration of GdnHCl in the water phase was 80 mM). The concentration of protein ranged between 1 and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of reverse micelles system (10–320 nM monomer, overall concentration). As the concentration of micelles is 1–4 mM (Laine et al., 1987), on ..

<sup>1</sup> Abbreviations: BAEE, *N*-(benzoyl-L-arginine ethyl ester); EDTA, ethylenediaminetetraacetate; GdnHCl, guanidine hydrochloride; SCM, spectral center of mass; TPI, triosephosphate isomerase;  $W_0$ , ratio of water to surfactant molecules.

statistical basis, not more than one monomer will be localized in a single micelle. After transfer, the system was incubated at 24 °C. To follow reactivation of TPI, aliquots were withdrawn at various times and their activity assayed. As noted, activity was always measured in reverse micelles that contained 6.0% water (v/v);  $W_0 = 16.6$ . No reactivation took place during the activity measurements, i.e., activity was linear with time.

In several experiments, the concentration of water in the system was varied during the course of TPI reactivation. When a decrease in the amount of water was desired, the reverse micelle system was diluted with a mixture of dry cetyltrimethylammonium bromide, *n*-octane, and hexanol, or reverse micelles that had the desired water concentration. When a rise in water concentration was needed, an aliquot of an aqueous solution of 40 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4, was injected. Controls were made in all conditions; these comprised native TPI transferred to reverse micelles that had water at the concentration in which reactivation of TPI was studied. When changes in water concentration were made during reactivation, the same changes were made in control TPI. Reactivation is expressed as percent of the activity of a control that had not been exposed to GdnHCl but that had undergone identical changes in water concentrations. It is noted that the stability of the native enzyme was not affected by such changes; i.e., enzyme activity of these samples remained constant for at least 48 h irrespective of the water content of the micelles.

**Intrinsic Fluorescence.** The intrinsic fluorescence emission spectra of TPI in reverse micelles were determined in an SLM AMINCO 8000 spectrofluorometer with 2 nm slits in both excitation and emission. At an excitation wavelength of 286 nm, emission spectra were recorded between 290 and 430 nm. The fluorometer cell was thermostated at 24 °C. The spectral center of mass (SCM) was calculated according to the following equation (Bismuto et al., 1987):

$$\lambda_{\text{cm}} = \frac{\int \lambda I(\lambda) d\lambda}{\int I(\lambda) d\lambda}$$

where  $\lambda$  and  $I(\lambda)$  are wavelength (in nanometers) and fluorescence intensity at a given wavelength, respectively. In all cases, emission fluorescence spectra of identical samples (without protein) were recorded. These were subtracted from the experimental samples.

**Assay of Trypsin Activity in Reverse Micelles.** Trypsin activity in reverse micelles was assayed as described by Iltis and Garafa-Carmona (1991) with *N*- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester as substrate.

## RESULTS

Denatured TPI transferred to a reverse micelle system that contains water concentrations above 5.0% reactivates; by at least 80%. When the system contains 3.0% water ( $W_0 = 8.3$ ) or less, reactivation is around 10%; if the water concentration of the latter sample is raised to 5.0%, reactivation remains at about 10% (Garza-Ramos et al., 1992b). This indicated that the transfer of the denatured enzyme to reverse micelles with a relatively low water content produces structures that fail to form a catalytically active dimer. Here we explored if the transfer of denatured TPI monomers to

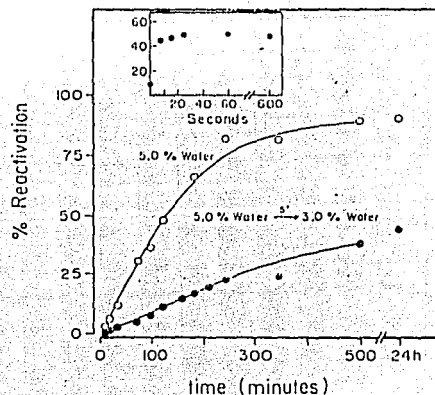


FIGURE 1: Kinetics of TPI reactivation in reverse micelles after a 5% to 3% water transition. TPI denatured in 6.0 M GdnHCl was transferred to reverse micelles that contained 5.0% water, yielding a concentration of 3.7  $\mu\text{g}$  of protein/mL of reverse micelles. After 5 min, the water content was decreased to 3.0% by mixing with the dry basic mixture for formation of reverse micelles ( $\Phi$ ), or with an equivalent volume of reverse micelles with 5.0% water ( $\circ$ ). At the indicated times, activity was measured. The inset shows the time at which reverse micelles with 5.0% water were mixed with dry basic mixture; activity was measured after 24 h of the water jump.

reverse micelles with high water concentrations ( $> 5.0\%$ ;  $W_0 > 13.9$ ) could yield structures capable of following the pathway to an active dimer at lower water concentrations.

Figure 1 shows the results of such an experiment. Denatured TPI was transferred to reverse micelles with 5.0% water; after 5 min of incubation, the water content of the mixture was diminished to 3.0%. At this time, TPI activity was hardly detectable; however, it progressively appeared with the time of incubation (Figure 1). After 24 h, activity was around 40% of that of the native enzyme. The time course of reactivation of denatured TPI in reverse micelles in which water was always at a concentration of 5.0% is also shown; in this case, reactivation was close to 100%. As noted above, denatured TPI transferred directly to micelles with 3.0% water underwent reactivation of about 10%.

The findings of Figure 1 illustrate that a brief incubation of denatured TPI monomers in reverse micelles with a water content of 5.0% produced a substantial amount of conformers competent for formation of active dimers in 3.0% water. An attempt was made to determine the minimal time that the denatured monomer had to be exposed to 5.0% water for acquisition of such a conformation (inset, Figure 1). The shortest time that could be assayed was 8 s. This sufficed to produce a population of conformers competent for undergoing dimerization; longer times of incubation in 5.0% water (up to 10 min) did not result in higher reactivation (inset of Figure 1). The kinetics of reactivation at various protein concentrations (Garza-Ramos et al., 1992b) show that the rate limiting step for formation of the active dimer from unfolded monomers is the bimolecular step. Hence, in comparison to reactivation in micelles with 5.0% water, the lower reactivation that is observed after a 5.0–3.0% water transition may indicate that, at the low water concentration, there is an equilibrium between  $M_1$  and competent monomers

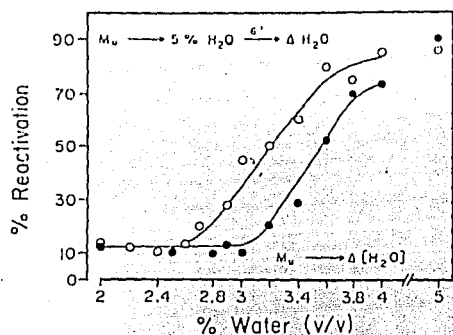


FIGURE 2: Amount of water required for monomer folding and dimerization in reverse micelles. The protocol was as in Figure 1. In the traces depicted with (●), TPI denatured with 6.0 M GdnHCl was transferred to reverse micelles that had the indicated water concentrations and incubated for 24 h. In the trace depicted with (○), denatured TPI was transferred to reverse micelles with 5.0% water; after 6 min, the water concentration of various aliquots was adjusted to the concentrations shown by mixing with different volumes of dry basic mixture, or by adding aqueous buffer so as to yield the water concentrations shown. The samples were incubated for 24 h and activity was measured.

(M<sub>2</sub>) that are able to undergo dimerization and/or a reduction in the number of productive collisions due to a lower concentration of competent monomers.

The data in Figure 1 also show that, at equal protein concentrations, the reactivation rate was higher in micelles with 5.0% than with 3.0% water; i.e., the half-lives for maximal reactivation were 110 and 260 min, respectively. This suggests that, in addition to protein concentration, the rate of active dimer formation is controlled by the water content of the micelles.

**Water Requirements for Monomer Folding and Dimerization of Denatured TPI in Reverse Micelles.** To estimate the amount of water required in the two general steps of the pathway (monomer folding and dimerization; see reaction sequence 1 in the introduction), reactivation was measured under two conditions. In one, the enzyme was transferred directly to reverse micelles with different water contents (trace depicted by closed circles in Figure 2). In a second condition, the denatured enzyme was first transferred to 5.0% water; after 6 min, the water content of the system was adjusted to various levels (open circles in Figure 2). In both cases, activity was measured after 24 h. In the two conditions, the curves of the extent of reactivation versus the amount of water appeared sigmoidal.

In the experiment of Figure 2, reactivation of denatured TPI transferred directly to different water concentrations reflected water requirements in the overall process of active dimer formation. In the samples in which the denatured protein was first incubated in 5.0% water to allow monomer folding and subsequently exposed to different water concentrations, the level of reactivation indicated the amount of water required for dimerization. From the curves, it is evident that more water is needed for monomer folding than for dimerization, i.e., 3.6% and 3.2% for half-maximal reactivation.

**Stabilization of Competent Monomers in the Formation of TPI Dimers.** When denatured TPI was transferred to

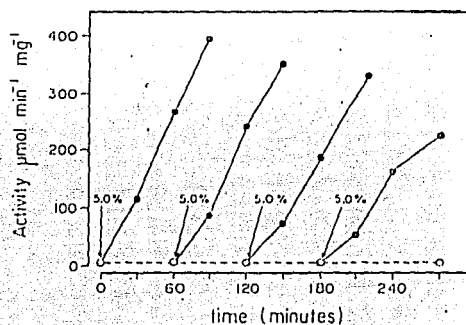


FIGURE 3: Reactivation of denatured TPI after 5.0% to 2.0% to 5.0% water transitions. The protocol was as in Figure 1, except that 5 min after transfer of TPI denatured in 6.0 M GdnHCl to reverse micelles with 5.0% water, the water content of the system was decreased to 2.0%; this is time zero in the figure. At the times shown by the arrows, the water content of the samples was brought back again to 5.0% by addition of aqueous buffer; activity was measured at the times shown (●). The trace with the arrow at time zero indicates denatured TPI transferred to reverse micelles with 5.0% water that was diluted after 5 min with reverse micelles with 5.0% water.

reverse micelles with 5.0% water, the enzyme reactivated to values of 80% or more. In contrast, when denatured TPI was transferred to micelles with 5.0% water, followed by a reduction in water concentration to 3.0%, reactivation ranged between 35% and 50%. The lower reactivation after the 5.0–3.0% water transition indicated that, at the latter water concentration, the population of M<sub>2</sub> and M<sub>1</sub> formed in 5.0% water had sufficient mobility to follow the pathway toward the active dimer or to an incorrect structure (M<sub>3</sub> in reaction sequence 1). As protein mobility depends on the amount of water in contact with the protein (Rupley & Careri, 1991; Zaks & Klibanov, 1984; Afleck et al., 1992; Garza-Ramos et al., 1992a), it was asked if, at water concentrations lower than 3.0%, the conformation of the competent monomeric structure could be stabilized.

Denatured TPI was transferred to reverse micelles with 5.0% water to induce formation of the folded monomer; after 5 min, the amount of water was reduced to 2.0%. Hardly any reactivation took place (open circles in Figure 3). However, if the concentration of water was brought back to 5.0%, reactivation was restored (closed circles, Figure 3). It is noted that, after 30 min in 2.0% water, a rise in water concentration produced a rate of reactivation that was close to that of the enzyme that throughout the experiment remained in 5.0% water. At longer times of incubation in 2.0% water, reactivation was slower. These results indicated that by decreasing the amount of water in the micelles to values of 2.0%, it was possible to stabilize competent monomers for a substantial length of time.

Stabilization of monomers by a 5.0–2.0% water transition was also observed at different extents of reactivation in micelles with 5.0% water. In the experiment of Figure 4, reactivation of TPI in 5.0% water was allowed to proceed for various times. At this state, a reduction of the water content to 2.0% arrested reactivation. Note that, after the decrease in water concentration, the activity of the previously formed dimers was maintained. When water concentration was brought back again to 5.0%, reactivation reappeared.

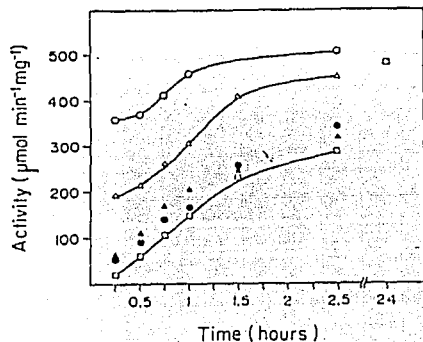


FIGURE 4: Arrest and reinitiation of TPI reactivation. Denatured TPI was allowed to reactivate in reverse micelles with 5.0% water. The time course is illustrated by  $\square$ . At different times of reactivation, the following protocol was followed, where  $H$  indicates a water transition: ( $\bullet$ ) 5.0%  $H$  2.0% (24 h)  $\rightarrow$  activity; ( $\blacktriangle$ ) 5.0%  $H$  2.0% (18 h)  $\rightarrow$  activity; ( $\circ$ ) 5.0%  $H$  2.0% (1 h)  $H$  5.0% (24 h)  $\rightarrow$  activity; ( $\triangle$ ) 5.0%  $H$  2.0% (24 h)  $H$  5.0% (24 h)  $\rightarrow$  activity.

hence, in 2.0% water, both the active and the inactive structures were stabilized. It is pointed out that as the time of incubation in 2.0% water was prolonged, the extent of reactivation was lower, but even after standing for a day at 2.0% water, at least 40% of the monomers were able to dimerize after a rise in water concentration (Figure 4).

**Intrinsic Fluorescence of TPI during Reactivation in Reverse Micelles.** In reverse micelles, reactivation of TPI occurs in times much larger than in conventional water systems. Thus, in this system, it is relatively easy to study the structural changes that accompany reactivation. Accordingly, the changes in intrinsic fluorescence that TPI undergoes during reactivation were determined (Figure 5). Prior to these studies, the spectra of native TPI in reverse micelles that contained 2.0%, 3.0%, and 6.0% water, and that of denatured TPI transferred to reverse micelles formed with equivalent concentrations of 4.0 M GdnHCl, were determined (Figure 5). In reference to native TPI, the denatured enzyme exhibited a spectra with a higher fluorescence emission and a higher spectral center of mass (SCM).

To follow the possible changes in intrinsic fluorescence that TPI could undergo during reactivation, the enzyme was denatured for 1 h in standard aqueous mixtures with 4.0 M GdnHCl. At this time a 1  $\mu$ L aliquot was transferred to 3.0 mL of reverse micelles that contained 2.0%, 3.0%, and 6.0% water. The fluorescence spectra of the samples were recorded within 5 min after transfer (at this time, hardly any catalytic activity was detected). In the samples with 2.0%, 3.0%, and 6.0% water, the intrinsic fluorescence of the protein was higher than that of native or denatured TPI entrapped in reverse micelles. It was also observed that the magnitude of fluorescence emission was highest with 2.0% and lowest with 6.0% water. After 24 h of incubation, the intrinsic fluorescence of the three samples diminished, but the decrease was larger in the sample with 6.0% water. This was accompanied by a shift in the SCM of about 7 nm (from 349 to 342 nm), thus approaching the spectra of the native enzyme. The reactivation of the sample in 6.0% water was 83%, whereas in reverse micelles with 2% and 3% water, reactivation was 5% and 12%, respectively. It is noted that

for fluorescence measurements protein concentration in the range of 8–10  $\mu$ g/mL of reverse micelles had to be employed. In this concentration range, the rate of reactivation was still dependent on protein concentration (not shown).

The changes in fluorescence and activity that denatured TPI underwent in reverse micelles formed with 6.0% water were also determined as a function of time. There was a strong parallelism in the two processes (Figure 6). The time for half-maximal changes in intrinsic fluorescence and activity were almost equal.

**Fluorescence Properties of Competent and Incompetent TPI Monomers in Reverse Micelles.** Depending on the water concentration of the micelles, it is possible to trap monomers that are either competent or incompetent for dimerization. For example, competent monomers may be stabilized by transfer of denatured TPI to micelles with 5.0% water, followed by a diminution of water to 2.0% (Figure 3). Incompetent monomers may be trapped by transferring denatured TPI directly to micelles with 2.0% water. Thus, the system allows a comparison of the intrinsic fluorescence of both types of monomers, and how the amount of water affects their intrinsic fluorescence. The SCM and the relative fluorescence intensity of both types of monomers at various water concentrations are shown in Table 1. The intrinsic fluorescence of the competent monomers in 5.0% water decreased when water concentration was diminished to 2.0%; the SCM was affected, but slightly. At the latter water concentration, the spectrum of the competent monomer was strikingly similar to that of denatured TPI transferred directly to reverse micelles with 2.0% water (incompetent monomer). It was also observed that the fluorescence spectra of the incompetent monomers decreased when water concentration was raised to 5.0%, yielding a spectrum similar to that of the competent monomer (Table 1). These findings showed that the amount of water is central to the fluorescence properties of correct and incorrect monomers and that there are no obvious differences in their intrinsic fluorescence.

**Trapping in Reverse Micelles of Conformers Produced by GdnHCl in Conventional Aqueous Media.** Concerning the stabilization of monomers in reverse micelles, another question addressed was if the conformers that exist at various concentrations of denaturant in conventional aqueous systems may also be trapped by transferring them to reverse micelles. TPI was incubated with various concentrations of GdnHCl in standard water mixtures for 2 h; at this time, aliquots of the various mixtures were transferred to reverse micelles with 2.0% water. Immediately after transfer, the activity of the various mixtures was measured (open circles, Figure 7). The observed values are considered to reflect the amount of active dimers existing at the time of transfer. After 24 h of incubation, activity was again measured. In all samples a relatively low level of reactivation was observed; i.e., 10% or less (not shown).

In another part of the experiment of Figure 7, after a 15 min incubation in 2.0% water, the water content of the various reverse micelles mixtures was raised to 5.0%. Their activity was measured after 24 h (closed circles, Figure 7). Significant activation was observed in the samples that had been exposed to GdnHCl concentrations between 0.7 and 1.0 M. In this concentration range, GdnHCl produces TPI monomerization (Sawyer & Gracy, 1975). Hence, it would appear that monomers of TPI formed in conventional water systems can be successfully trapped in reverse micelles with

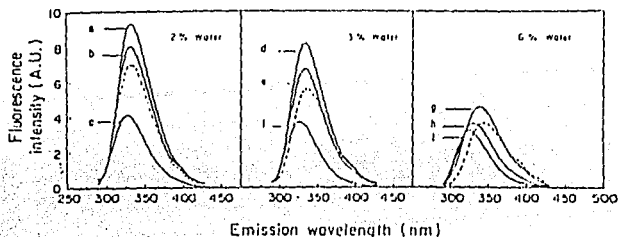


FIGURE 5: Intrinsic fluorescence emission spectra of native, denatured, and reactivated TPI in reverse micelles. Native TPI and TPI denatured in 4.0 M GdnHCl were transferred to reverse micelles formed with aqueous buffer or a solution of 4.0 M GdnHCl, respectively; the concentration of these solutions in the reverse micelles was 2.0%, 3.0%, or 6.0% (as shown). Traces c, f, and i show the spectra of native TPI in micelles formed with 2.0%, 3.0%, and 6.0% buffer; the dashed lines depict the spectra of the denatured enzyme in reverse micelles formed with 4.0 M GdnHCl. Denatured TPI was also transferred to reverse micelles formed with aqueous buffer at a concentration of 2.0%, 3.0% and 6.0% water. Traces a, d, and g show spectra taken 5 min after transfer. Traces b, e, and h show the spectra of the latter samples after 24 h. The concentration of GdnHCl in the aqueous phase of all samples (except those shown by the dashed lines) was adjusted to 60 mM.

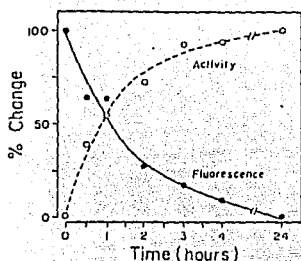


FIGURE 6: Fluorescence and activity of TPI during reactivation. TPI was denatured in 4.0 M GdnHCl and transferred to reverse micelles with 6.0% water. At the indicated times, emission fluorescence spectrum and activity were determined. The results are plotted as percent of the maximal changes in activity and fluorescence (intensity at the spectral center of mass) that the enzyme underwent in 24 h.

Table 1: Intrinsic Fluorescence of Competent and Noncompetent Monomers in Reverse Micelles with 2.0% and 5.0% Water<sup>a</sup>

condition	SCM	rel fluorescence intensity
5.0% water	343	3577
5.0% H 2.0% water	344	6241
5.0% H 2.0% H 5.0% water	344	3686
2.0% water	343	6653
2.0% H 5.0% water	344	4674

<sup>a</sup> TPI was denatured in 4.0 M GdnHCl for 1 h and thereafter transferred to reverse micelles that had the indicated water concentrations. H denotes that water concentration in reverse micelles was changed to the level indicated. Five minutes after transfer of TPI to reverse micelles with 2.0% or 5.0% water, fluorescence emission spectra were recorded. After these traces were obtained, water was changed to the concentration shown, and the spectra were again recorded.

2.0% water in a state competent for subsequent formation of the active dimer.

**Causes for Lack of Dimerization in Reverse Micelles with 2.0% Water.** In reverse micelles with 2.0% water, competent monomers do not form an active dimer. This finding was central for the trapping of monomers that upon a rise in water concentration follow the pathway toward active dimers. Thus, the question arises as to the causes that prevent dimerization in reverse micelles with 2.0% water. Among several possibilities, this could be due to hindrances in the transfer of two monomers to a single micelle. This alternative was

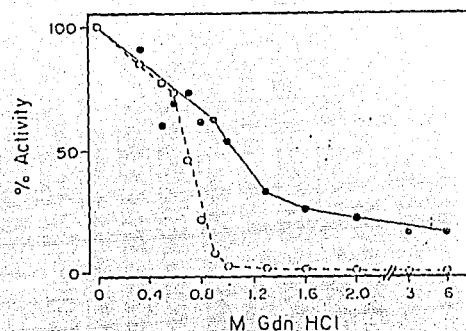


FIGURE 7: Reactivation in reverse micelles of TPI that had been exposed to various GdnHCl concentrations. TPI was incubated for 2 h in the indicated concentrations of GdnHCl. At that time it was transferred to reverse micelles with 2.0% water, and its activity was measured (O). After 15 min, the water concentration was raised to 5.0% and after 24 h activity was measured (●).

examined with a model system. Trypsin and the trypsin inhibitor from soybean have a  $M_w$  of around 23 800 and 21 500, respectively; these are relatively close to that of the TPI monomer ( $M_w = 26 000$ ). Trypsin entrapped in reverse micelles with 2.0% water was catalytically active. Thus the time course for the inhibition of trypsin activity by the inhibitor was determined in reverse micelles with 2.0% water (Figure 8). At concentrations of trypsin and trypsin inhibitor similar to those at which reactivation of TPI was measured, half-maximal inhibition of trypsin activity took place in a time range of 5 min; albeit inhibition was about 80% whereas in all aqueous media, it was 100% (the cause of the lower inhibition in reverse micelles has not been studied). Nevertheless, the observation that trypsin and its inhibitor readily interact in reverse micelles with 2.0% water suggests that the lack of formation of active TPI dimers was not due to impairments in the transfer of two monomers to a single micelle. Instead, it would appear that, in order to attain catalytically active TPI dimers, the monomers must undergo internal structural arrangements that stabilize the dimeric structure and that relatively high water concentrations are needed to support such arrangements.

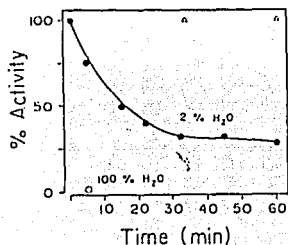


FIGURE 8: Inhibition of trypsin activity by the soybean trypsin inhibitor in reverse micelles with 2.0% water. Reverse micelles were formed at a concentration of 2.0% water that contained 100 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , and either 0.06  $\mu\text{M}$  trypsin or 0.06  $\mu\text{M}$  soybean trypsin inhibitor at pH 8.0. At time zero, equal volumes of the two types of micelles were mixed. At the indicated times aliquots were withdrawn and their activity was assayed in reverse micelles that contained 0.25 mM BAEI (overall concentration). (●) shows activity at the indicated preincubation times. ( $\Delta$ ) indicates activity of trypsin preincubated without inhibitor. (○) shows the activity of trypsin preincubated in aqueous media with inhibitor for 5 min.

## DISCUSSION

Intermediates of the folding pathway of monomeric proteins have been trapped under mild denaturing conditions, where neither the folded nor the unfolded states are stable (Hughson et al., 1990). Baker et al. (1992) have also trapped an intermediate in the folding of  $\alpha$ -lytic protease using a protein that lacks its pro region. In oligomeric proteins, the stability of intersubunit contact has been altered by high hydrostatic pressure (Silva & Weber, 1993), ammonium sulfate (Girg et al., 1983), and site-directed mutagenesis (Ahern et al., 1987; Casal et al., 1987; Borchert et al., 1993). Hagen et al. (1990a,b) studied the renaturation of monomeric proteins in reverse micelles. Where it is described that by decreasing the water content of reverse micelles, it is possible to stabilize monomers competent for formation of dimeric TPI, as well as monomers formed in aqueous media. In both conditions, the trapped monomers remain in such state for substantial lengths of time; a rise in water concentration destabilizes the monomer and dimerization ensues. Thus, it was possible to determine that less water is required for dimerization than for monomer folding.

*Intrinsic Fluorescence of Conformers Involved in the Formation of Active Dimers.* The slow time course of TPI reactivation in reverse micelles allowed studies of the structural changes that accompany reactivation. Upon transfer of denatured TPI to reverse micelles with a relatively high water content, the protein acquires fluorescence characteristics that differ from those of the native and unfolded enzyme. Its intrinsic fluorescence is higher, and its spectral center of mass is intermediate between that of denatured and native enzymes. With time, catalytic activity progressively appears, concomitant to changes in emission fluorescence. When activity and fluorescence no longer change, the enzyme exhibits a fluorescence pattern that approaches that of the native enzyme. It was also observed that lowering the amount of water in contact with competent monomers stopped reactivation and changes in fluorescence; a subsequent rise in the water concentration restored reactivation and related fluorescence changes. Hence, the highly fluorescent conformers that appear after transfer of denatured

TPI to reverse micelles represent an intermediate step in the pathway of an unfolded monomer to an active dimer. The data also show that dimerization involves a final arrangement of aromatic residues.

So far, we have failed to detect this fluorescent intermediate during TPI reactivation in all aqueous mixtures; i.e., spectra of TPI obtained 2–3 min after GdnHCl dilution were similar to those of the native protein (not shown). Since dimerization and reactivation of TPI in all aqueous media are rapid processes (Waley, 1973; Zabori et al., 1980), the failure to detect a high fluorescent intermediate in standard aqueous media may be due to technical limitations. However, it may be that the fluorescent intermediate with high fluorescence exists only in reverse micelles. That is, the fluorescence enhancement of the monomer in reverse micelles may result from folding to a monomer with high fluorescence, but alternatively, it may correspond to a monomer whose fluorescence is perturbed by the medium in the micellar core, and/or its interaction with the charged micellar wall. Indeed, there is evidence indicating that the fluorescence (Desfosses et al., 1991) and phosphorescence (Strambini & Gonelli, 1988) of protein tryptophans are modified by micellar surfaces.

Although the existence of the highly fluorescent monomer was not visualized in all aqueous media, in reverse micelles the intermediate species could be trapped for a substantial length of time. Moreover, in reverse micelles incompetent TPI monomers could also be locked in a state amenable to studies of their intrinsic fluorescence. It is noteworthy that the intrinsic fluorescence spectra of competent and incompetent monomers were markedly similar. This suggests that structural differences between the two types of monomers may be rather subtle, and that other approaches must be used to ascertain differences between the two.

*Monomer-Dimer Interconversion in Reverse Micelles.* It has been reported that dissociation of multimeric proteins in reverse micelles is favored by decreasing the size of the micellar water pool (Kabanov et al., 1991). Thus, dimerization in reverse micelles involves the association constant between monomers and the restrictions of the water space imposed by the physical limits of the micelle. The experiments with a model system (trypsin and the soy bean trypsin inhibitor) indicated that, at low water concentrations, proteins can interact. In consequence, it would appear that 2.0% water in reverse micelles does not suffice to support the final conformational arrangements that lead to the formation of the active dimer. In this context, it has been described that, after collision, complexes of multisubunit proteins undergo further transformations (Rudolph et al., 1986; Le Bras et al., 1989; Jaenicke & Buchner, 1993).

Regarding the barriers that hinder dimerization in reverse micelles, it is relevant that, with 2.0% water, the activity measurements indicated that after prolonged incubation times (48 h) formation of active dimers from competent monomers was less than 10%. On the other hand, when native TPI was transferred to reverse micelles with 2.0% water, the population of active dimers remained constant (100%). Hence, in 2.0% water there is no interconversion between competent monomers and active dimers. Near-equilibrium levels between the two conformers could only be reached at high water concentrations. Therefore, at low, but not at high water concentration, there is a kinetic barrier that hinders monomer-dimer interconversion.

*Advantages and Disadvantages in the Use of Reverse Micelles for Studying Protein Folding and Dimerization.* Enzymes entrapped in reverse micelles exhibit characteristics that may be used to study events related to protein mobility. Events such as catalysis (Garza-Ramos et al., 1994) and dimerization occur in "slow motion". For instance, in conventional aqueous media, formation of active TPI dimers from denatured monomers occurs in seconds, whereas in reverse micelles, the time for half-maximal reactivation is more than 1 h when 1–4 µg of protein/mL of reverse micelles is used. Moreover, in reverse micelles, it is possible to arrest or reinstate the process by changes in water concentration. In this regard, reverse micelles have clear advantages over conventional aqueous media.

However, reverse micelles systems have disadvantages. These are principally due to their physicochemical properties, and in particular to the ill-defined characteristics of protein-filled micelles. Rahaman and Hatton (1991) recently reviewed the effects that a protein exerts on the host micelle, and on the system as a whole. From the available data, it is not yet clear to what extent micellar structure and size are affected by the protein. Likewise, it is possible that the charged micellar surface might prevent free mobility of the protein and induce distortions of the intermediates that occur in the "normal" pathway of folding. If these distortions take place, it is clear that, at least for TPI, the perturbations do not affect formation of the competent monomers and catalytically active dimers. However, one of the main problems in the use of reverse micelles concerns the amount of water that is needed for a given process. For instance, with denatured TPI transferred to reverse micelles with 3.0% water ( $W_0 = 8.3$ ), there is a reactivation of around 10%. At this water concentration, there are about 1700 water molecules per micelle. Following Rupley and Careri (1991), about 1100 water molecules are required to surround TPI with a monolayer. Thus, on these grounds, it would appear that more than a monolayer of water molecules is needed to support formation of the active dimer. However, it is stressed that these figures do not necessarily indicate that this is the amount of water that is in contact with the protein in a protein-filled micelle. The latter is of importance, since very likely these water molecules are the ones that support or arrest structural arrangements during protein folding and dimerization (Zaks, 1992). In this respect, it is of interest that NMR analysis of water protons in reverse micelles of the type used here revealed that, up to 4.0% water exists as "bound" water; above this concentration, water protons exhibit the properties of "bulk" water (Kernen et al., 1993). Hence, in the evaluation of the amount of water that is needed to support folding and dimerization of TPI, both the amount and the state of the solvent should be taken into consideration. Nevertheless, the present results illustrate that, in addition to other approaches (Udgaonkar & Baldwin, 1988; Roder et al., 1988; Serrano et al., 1992; Radford et al., 1992), water may be used to probe events involved in protein folding and dimerization. This is because water is an essential component of such processes.

## REFERENCES

Affleck, R., Xu, Z. F., Suzawa, V., Focht, K., Clarck, D. S., & Dordick, J. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1160–1164.

- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A., & Klibanov, A. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 675–679.
- Alber, T., Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Rivers, P. S., & Wilson, I. A. (1981) *Philos. Trans. R. Soc. (London) B* 293, 159–171.
- Albery, W. J., & Knowles, J. R. (1976) *Biochemistry* 15, 5631–5640.
- Albery, W. J., & Knowles, J. R. (1977) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 16, 285–293.
- Baker, D., Sohl, J., & Agard, D. A. (1992) *Nature* 356, 263–265.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogsom, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Ford, A. J., Millan, J. D., Olford, R. E., Pridde, J. D., & Waley, S. G. (1975) *Nature* 255, 609–614.
- Barrabin, H., Scofano, H. M., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 757–763.
- Bismuto, E., Jameson, D. M., & Gratton, E. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2354–2357.
- Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. Ph., Callens, M., Noble, M. E. M., Oppderloe, F. R., Michels, P. A. M., & Wierenga, R. K. (1993) *Eur. J. Biochem.* 211, 703–710.
- Bru, R., & García-Carmona, F. (1991) *FEBS Lett.* 282, 170–174.
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., & Klibanov, A. M. (1987) *Biochemistry* 26, 1258–1264.
- Desfosses, B., Citanova, N., Urbach, W., & Waks, M. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 79–87.
- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Millan, I., & Darszon, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 332–343.
- Fernández-Velasco, D. A., Garza-Ramos, G., Ramírez, S., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205, 501–508.
- Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992a) in *Biomolecules in Organic Solvents* (Gómez-Puyou, A., Ed.) pp 113–131. CRC Press, Boca Raton.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., & Gracy, R. W. (1992b) *Eur. J. Biochem.* 208, 389–395.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Yüksel, Ü., & Gracy, R. W. (1994) *Biochemistry*, 33, 6960–6965.
- Gigg, R., Jaenicke, R., & Rudolph, R. (1983) *Biochem. Int.* 7, 433–441.
- Hagen, A. J., Hatton, T. A., & Wang, D. I. C. (1990a) *Biotech. Bioeng.* 35, 955–965.
- Hagen, A. J., Hatton, T. A., & Wang, D. I. C. (1990b) *Biotech. Bioeng.* 35, 966–975.
- Hilhorst, R., Spruijt, T., Laane, C., & Veejer, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 459–466.
- Hughson, F. M., Wright, P. E., & Baldwin, R. L. (1990) *Science* 249, 1544–1548.
- Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117–237.
- Jaenicke, R., & Buchner, J. (1993) *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.* 4, 1–30.
- Kabanov, A. V., Klyachko, N. L., Nemetkin, S. N., Merker, S., Zaroza, A. V., Bunik, V. I., Ivanov, M. V., & Levashov, A. V. (1991) *Protein Eng.* 4, 1009–1017.
- Kautzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14, 1–63.
- Kernen, P., Degli Agostini, R., Greppin, H., Darszon, A., & Strasser, R. J. (1993) *Experientia* 49, A51.
- Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350, 121–124.
- Laane, C., Hilhorst, R., & Veejer, C. (1987) *Methods Enzymol.* 130, 216–229.

- Le Bras, G., Teschner, W., Deville-Bonne, D., & Garel, J.-R. (1989) *Biochemistry* 28, 6836-6841.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., & Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609-6618.
- Makhatadze, G. I., & Privalov, P. L. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 639-659.
- Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., & Hol, W. G. J. (1994) *Protein Sci.* 3, 810-821.
- Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohinont, A. C., & Martial, J. A. (1993) *Acta Crystallogr. D* 49, 403-417.
- Privalov, P. L., & Gill, S. J. (1988) *Adv. Protein Chem.* 39, 191-234.
- Privalov, P. L., & Makhatadze, G. I. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 660-679.
- Radford, S. E., Dobson, C. M., & Evans, P. A. (1992) *Nature* 358, 302-307.
- Rahaman, R. S., & Hatton, T. A. (1991) *J. Phys. Chem.* 95, 1799-1811.
- Ramirez-Silva, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1993) *Biochemistry* 32, 5332-5338.
- Richard, J. P. (1991) *Biochemistry* 30, 4581-4585.
- Roder, H., Elove, G. A., & Englander, S. W. (1988) *Nature* 335, 700-704.
- Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A., & Gracy, R. W. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 312-320.
- Rudolph, R., Fuchs, I., & Jaenicke, R. (1986) *Biochemistry* 25, 1662-1669.
- Rupley, J. A., & Careri, G. (1991) *Adv. Protein Chem.* 41, 37-172.
- Russell, A. J., & Klibanov, A. M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11624-11626.
- Sawyer, T. H., & Gracy, R. W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 51-57.
- Serrano, L., Matoushek, A., & Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 847-859.
- Silva, J. L., & Weber, G. (1993) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44, 89-113.
- Strambini, G. B., & Gonelli, M. (1988) *J. Phys. Chem.* 92, 2850-2853.
- Tang, C. Y., Yuksel, K. U., Jacobson, T. M., & Gracy, R. W. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 382-390.
- Udgaonkar, J. B., & Baldwin, R. L. (1988) *Nature* 335, 694-699.
- Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* 135, 165-172.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., & Hol, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 995-1015.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., & Davenport, R. C. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126.
- Zabari, S., Rudolph, R., & Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* 35, 999-1004.
- Zaks, A. (1992) In *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A* (Ahern, T. J., & Manning, M. C., Eds.) pp 249-271, Plenum Press, New York.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1984) *Science* 224, 1249-1251.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3194-3196.

B1941054M



Miami *Bio/Technology*  
Short Reports  
Volume 6



Advances in Gene Technology:  
**PROTEIN ENGINEERING**  
and  
**STRUCTURAL BIOLOGY**

Proceedings of the 1995  
Miami *Bio/Technology* Winter Symposium  
held on February 4-9, 1995

*Editors*

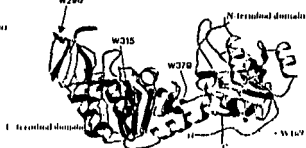
William J. Whelan, Gregory A. Petsko, Fazal Ahmad, Harvey Bialy,  
Sandra Black, Keith Brew, Roger Fenna, Susan Hassler  
and John Hodgson

## Characterisation of the structural and energetic properties of the intermediates on the folding pathway of pGK from *Bacillus stearothermophilus*

M. Parker, S. Hanson, G. Jackson, J. Spencer, R. Staniforth & A. Clarke.  
Molecular Recognition Centre, Biochem. Dept., University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK.

Our object for folding/stability studies is the glycolytic enzyme phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. This protein has two distinct domains, each essentially adopting a structure composed of a central  $\beta$ -sheet packed on either side by  $\alpha$ -helices, and no disulphide bonds, thus eliminating the added complexity of their formation in the folding reaction (Davies et al. 1993).

Figure 1: Structure of *B. stearothermophilus* pGK showing positions of native tryptophans (W315 and W320) and engineered tryptophans.



Steady state and time resolved fluorescence studies on single tryptophans, genetically inserted in and around the protein (figure 1), have been used to probe the local environment changes incurred as the protein unfolds by chemical denaturation. By use of these, and other spectroscopic and physical properties, we are beginning to dissect the structural and energetic properties of the equilibrium and kinetic intermediates present on the folding pathway.

Figure 2 shows equilibrium unfolding profiles for the single tryptophan mutants outlined in figure 1. These clearly demonstrate the existence of distinct equilibrium intermediates on the folding pathway: each tryptophan reporting specific local events.



Figure 2: Equilibrium unfolding profiles for single tryptophan mutants of pGK.

Current fitted to the data as a calculated fit to the experimental data.

The free energy changes for these equilibrium folding transitions are calculated by considering the changes in free energy of solvation of internal residues with respect to the denaturant

(Staniforth et al. 1993). This method of analysis enables more accurate estimates for these changes, compared to conventional methods, and also serves to illustrate the cooperativity of these folding events in terms of the number of residues that become buried upon folding of the protein. The data in figure 2 have been fitted in this manner.

Stopped-flow fluorescence studies have also been employed to dissect the events on the kinetic folding pathway. An example of the late rate-determined folding events is illustrated in figure 3. Linear free energy profiles, constructed by analysing the kinetics across the 'late' equilibrium transitions, reveals the existence of a kinetic intermediate, i.e. one that is not significantly populated at equilibrium. We are currently employing computer simulations to elucidate the properties of these metastable intermediates.

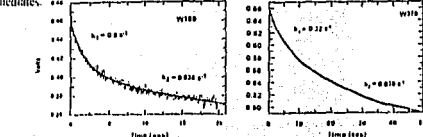


Figure 3: Stopped-flow fluorescence traces of the late rate of denaturing folding kinetics of W319 and W321 tryptophan mutants.

As experimental evidence suggests that most of the decisions that determine the final conformation are made in the early events, it is imperative that we define them, mechanistically and energetically. Steady state and time resolved fluorescence energy transfer and circular dichroism studies are now being employed to study the formation of the 'early' folding intermediates. Recent studies suggest that the first detectable equilibrium and kinetic intermediates are compact with significant native-like secondary structure and that their formation from the unfolded state is a highly cooperative process.

In addition, we are investigating the formation of hydrophobic interactions in these initial stages of folding. This involves creating small, non-disruptive deletion mutants of paired hydrophobic residues that are either near or distant in sequence but which form closely in the folded state. The extent to which these interactions are formed in these intermediates and the contributions they make to their stability are analysed by constructing double mutant cycles (Fersht et al. 1992).

Staniforth R.A., Hanson S.G., Smith C.J., Jackson G.S., Badcoe I.G., Aikinson T., Holbrook J.J. and Clarke A.R. (1993) *Biochemistry* 32, 3812-3851.

Davies G.J., Gombosi S.J., Lintchick J.A. and Watson H.C. (1993) *Proteins: Struct. Funct. and Genet.* 15,283-293.

Fersht A.R., Matousek A. and Serrano L. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 771-782.

## REASSOCIATION OF TROPOPHOSPHATE ISOMERASE IN REVERSE MICELLES MEASURED BY ENERGY TRANSFER

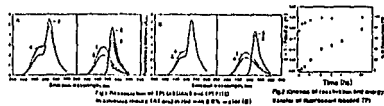
Sepúlveda-Balboa, M.A., Terceira, S.T., Stavari, R., Gámez-Rodríguez, W., Gótzian, C., Gómez-Puyou, A. and Pizarro, A.  
Instituto de Biociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México  
Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil  
Laboratoire de Biophysique, Université de Genève, Suisse (land)  
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México

**Introduction.** A lot remains to be known about the mechanism of folding from the fully unfolded polypeptide chain. In the present study we investigated the reassociation of rabbit Trophosphatase isomerase (TPI) in aqueous media and in reverse micelles (RM) from unfolded monomers using fluorescence energy transfer (FET). TPI is formed by two identical cysteic strands of ~26000 Da and it interconverts dihydroxyacetone biphosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde-3-phosphate (GAP). The crystal structure of TPI from several species is known [1,2]. TPI dissociates and denatures in aqueous media containing 1 M guanidinium hydrochloride (GdnHCl) [3]. The denatured enzyme recovers its activity when the denaturant is diluted. TPI reactivation from unfolded monomers is protein concentration dependent in aqueous media [4,5] and in RM [6]. It has been proposed that the unfolded monomer is first folded into a monomer able to form the catalytically active dimer. At relative low protein concentrations, the rate limiting step is dimerization. This process is much slower in RM formed from 200 mM hexadecyltrimethylammonium bromide and n-octanetriol:hexanol 8:2 v/v, allowing a better characterization of TPI reactivation, dimerization and reactivation. TPI was labelled with 5-((2-iodoethyl)amino)fluorantini) naphthalen-1-sulfonic acid (5-IAE-DANS) in one cysteine, and with fluorescein isothiocyanate (FITC) in one of its free amino groups. FET from TPI heterodimers labelled with these fluorophores was used to assay reassociation and to correlate it with reactivation. The labelled unfolded monomers reassociate as the native ones after starting the recharging reaction by lowering the GdnHCl concentration.

**Methods.** TPI was labelled by dissolving it in buffer 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 containing 1,5-IAE-DANS or FITC at 4 or 3.5 molar excess, respectively and incubated for 15 hours in the dark. Free dye was eliminated in Sephadex G-100 columns equilibrated with 40 mM triethanolamine/10 mM ethylenediamine tetraacetate/1 mM diethylenetriol, pH 7.4 (buffer A). The stoichiometry of labelling with either fluorophore was 1:1 (monomer:fluorophore). Activity was measured as described [6,7]. The efficiency (E) of FET between probes was determined by measuring the fluorescence intensity of the donor both in the presence (F<sub>1</sub>) and absence (F<sub>2</sub>) of the acceptor as given by:  $E = 1 - F_2/F_1$ .

**Results and Discussion.** FET from 1,5-IAE-DANS to FITC has been used to estimate association and distances in labelled proteins [8]. Here we employed TPI labelled with these two fluorophores to study recharging and reassociation in aqueous media and in RM. TPI-

IAE-DANS (TPI labelled with 1,5-IAE-DANS) and TPI-FITC (TPI labelled with FITC) were separately denatured with 4.0M GdnHCl for 1 hr. Thereafter, aliquots of both samples were combined 1:1 and the mixture was transferred to buffer A or RM containing 6.0% water, diluting the denaturant more than 100 times (6.0 mM final in RM). Recovery of activity and fluorescence spectra (excitation at 30 nm, were measured simultaneously as a function of time [Fig. 1, spectrum 3, panel A (in water) and panel B (in RM)]). Controls were made as follows: TPI-IAE-DANS (or TPI-FITC) and TPI without label were separately denatured with 4.0M GdnHCl as indicated above and combined and then transferred to buffer A or RM formed with 6.0% water [Fig. 1, spectra 1 and 2, panel A (in water), panel B (in RM)]. Spectrum 4 is the sum of spectra 1 and 2. Spectrum 5 corresponds to the emission of the donor in the mixture of interest and is mathematically obtained by multiplying the spectrum 1 by the factor  $F_2/F_1$ . Similarly, spectrum 6 corresponds to the emission of the acceptor in the mixture obtained by subtracting spectrum 5 from 3. Comparison of spectra 1 and 2 with spectra 5 and 6, indicates that in the mixtures of interest there was FET from TPI-IAE-DANS (decrease in the emission of the donor to TPI-FITC (increase in the emission of the acceptor). In aqueous media TPI reactivation occurs very fast, i.e., the energy transfer efficiency observed 2 or 3 minutes after denaturant dilution was 0.3 and remained constant after 24 hours. In RM, the kinetics of activity recovery and energy transfer of the mixture of monomers labelled with donor and acceptor are very different. Fig. 2 shows that in the first time point (2-3 min), the efficiency of the energy transfer was already 0.18. However, at this time there was no activity. After 24 hours 80.0% of the activity recovered, and the efficiency of FET was 0.25. These results suggest that since in RM collisions between micelles occur in the millisecond range there is enough time for energy transfer between donor and acceptor labelled TPI monomers before the functional dimer is formed. In time ( $t_{1/2} \approx 2$  hr), these collisional yield dimers which become active and increase the efficiency of energy transfer almost to the value obtained in aqueous media.



References.

- Wetters, R.K. et al. (1991) *Proteins* 10, 33-49
- Zhang, Z., et al. (1994) *Biochemistry* 33, 2830-2837
- Sawyer, T.H. and Glynn, R.W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 51-57
- Waley, S.G. (1973) *Biochem. J.* 135, 165-172
- Zabala, S. et al. (1980) *Naturforsch.* 35, 999-1004
- Clara-Roman, G. et al. (1992) *E. J. Biochem.* 206, 309-315
- Fernández-Alfonso, A. et al. (1994) (submitted to *Biochemistry*)
- Mosco, M. (1990) *Int. J. Biochem.* 187, 139-152