

119
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

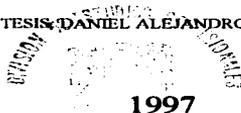
FACULTAD DE CIENCIAS

CINÉTICA DE RENATURALIZACIÓN DE LA
TRIOSAFOFATO ISOMERASA DE
Saccharomyces cerevisiae EN
PRESENCIA DE GLICEROL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
HUGO NÁJERA PEÑA



DIRECTOR DE TESIS: DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO



1997

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA ESCOLAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Cinética de renaturalización de la Triosafosfato Isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*
en presencia de glicerol.

realizado por Hugo Nájera Peña

con número de cuenta 8825496-6 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

Propietario Dra. Georgina Garza Ramos.

Propietario Dra. Luisa Alba Lois.

Suplente M. en IBB. Emma Saavedra Lira.

Suplente Biol. María Elena Chánéz Cárdenas

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, con el apoyo de CONACyT (0150P-N) y DGAPA-UNAM (IN103596FQ).

Yo no sé cómo me juzgue la posteridad, pero yo siempre me he visto como un niño jugando en la playa, divertido en encontrar de vez en cuando una piedra más lisa o una concha más bella que las demás, mientras el gran océano de la verdad yace completamente desconocido frente a mí.

NEWTON

Un experimentalista es alguien que trabaja con algo que no entiende mientras que un teórico es un entusiasta que no entiende nada de nada.

LUDWIG BOLTZMAN

A mis padres Salvador y Olga.

Un ejemplo de tesón y valentía.

Especialmente a mi madre, por la confianza y ayuda otorgada a lo largo de mi vida.

A mis hermanas Claudia y Anallely.

Mil gracias por su enseñanza y soporte, sobre todo por estar juntos.

In Memoriam

Rodrigo Peña Maceda y Blacky.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México; por dejarme ser parte de ella, desde la infancia hasta ahora...

A los integrantes del jurado: Dr. Alejandro Fernández Velasco, Dra. Georgina Garza Ramos, Dra. Luisa Alba Lois, M. en IBB. Emma Saavedra Lira y Biol. María Elena Chánez Cárdenas por la revisión del presente trabajo.

Especialmente a Alejandro, por que me ha dejado zarpar junto con el, en este gran crucero; por sus invaluable consejos y horas de paciencia y sobre todo por su amistad.

Agradezco especialmente a Emma y María Elena, por la revisión de la presente tesis, con su ayuda mejoro considerablemente. Mil gracias.

A Georgina Garza, siempre sus comentarios ayudaron a mejorar el contenido del trabajo experimental.

A todos mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes, particularmente a Edgar por su amistad (ni modo el destino nos volvió a reunir).

A los integrantes del seminario de los laboratorios 104 y 105 Ote. del IFC-UNAM, particularmente a los Doctores Marietta Tuena Sangri y Armando Gómez-Puyou

Son muchos los amigos que han compartido alguna parte de mi vida; vivire siempre agradecido por su amistad, especialmente a Rosa por estar en todo momento conmigo y soñar juntos.

Durante mis estudios de licenciatura goce de una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis.

Indice

Resumen	I
Abreviaturas	II
Capítulo I Introducción	
Plegamiento de proteínas	1
Jerarquía de la estructura de proteínas	3
Plegamiento <i>in vitro</i> vs <i>in vivo</i>	7
Plegamiento en presencia de cosolventes	9
Triosafofato Isomerasa	10
Estructura de la Triosafofato Isomerasa	12
Plegamiento y asociación de la TPI	14
Objetivos	16
Capítulo II Materiales y Métodos	
Reactivos	17
Preparación de amortiguadores	17
Purificación de la Triosafofato Isomerasa	17
Remoción del sulfato de amonio de la Triosafofato Isomerasa	20
Determinación de la concentración de proteína	20
Desnaturalización	21
Renaturalización	21
Ensayos de Actividad Catalítica con D-gliceraldehído-3-fosfato como sustrato	21
Ensayos de fluorescencia intrínseca	22
Tratamiento de los datos	23
Capítulo III Resultados	
Reactivación de la TPI	25
Efecto del glicerol en las preparaciones de la TPI	27
Renaturalización de la TPI al equilibrio en soluciones con glicerol	30
Efecto del glicerol en la cinética de renaturalización (actividad enzimática)	32
Efecto del glicerol en la cinética de renaturalización (fluorescencia intrínseca)	35
Capítulo IV Discusión y Conclusiones	37
Perspectivas	41
Referencias	42

Resumen

El plegamiento de proteínas es uno de los problemas más arraigados en la bioquímica. *In vitro*, la formación de la estructura biológicamente activa de las proteínas es un proceso espontáneo, guiado por la diferencia en energía entre los conformeros cinéticamente accesibles a la cadena polipeptídica.

El mecanismo del plegamiento presenta varias incógnitas; por ejemplo, ¿existen intermediarios en la ruta de plegamiento? si esto es cierto, ¿qué características presentan estas especies?. Una manera de explorar estas preguntas es mediante estudios cinéticos; en los que se determina mediante diversas técnicas las características de los conformeros visitados por la proteína en su camino hacia la conformación nativa.

El plegamiento de proteínas monoméricas involucra interacciones intramoleculares e interacciones proteína-solvente. El siguiente nivel de complejidad en el autoensamble de las macromoléculas biológicas, está dado por las proteínas oligoméricas; donde se observan además interacciones intercatenarias. El plegamiento de estas proteínas es especialmente interesante, ya que un gran número de enzimas son oligómeros y en la mayoría, la función biológica está regulada por las interacciones entre subunidades. La Triosafosfato Isomerasa (TPI ó TIM) es un homodímero, por lo tanto resulta uno de los modelos más sencillos para estudiar el plegamiento y asociación de proteínas. El trabajo de tesis realizado, utilizó como modelo a la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* (sTPI). Encontramos que el proceso de desnaturalización-renaturalización de sTPI es reversible. Después de la desnaturalización total en 6M de hidrocloreto de guanidina, la velocidad con la que se recupera la actividad catalítica depende de la concentración de TPI en la renaturalización; por lo tanto, la asociación de un intermediario y/o procesos unimoleculares, son limitantes dependiendo de la concentración de proteína.

La formación de la estructura cuaternaria requiere de la difusión de este intermediario en el solvente, debido a esto, al modificar la viscosidad del medio utilizando glicerol, disminuimos la frecuencia de choques entre las especies y por lo tanto, fue posible “estabilizar” intermediarios que de otra manera no se observarían.

Abreviaturas

αGDH	α-glicerolfosfato deshidrogenasa
αGP	α-glicerolfosfato
Act.	actividad catalítica
CD	dicroísmo circular
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Fluo.	fluorescencia intrínseca
G3P	D-gliceraldehído-3-fosfato
GdnHCl	hidrocloruro de guanidina
λ	longitud de onda en nanómetros
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
nm	nanómetros
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
sTPI	Triosafosfato Isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEA	trietanolamina
TED	amortiguador trietanolamina, ácido etilendiaminotetraacético, ditiotreitól.
TPI	Triosafosfato Isomerasa
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
xg	fuerza de centrifugación relativa en radio máximo

Plegamiento de proteínas

Las cadenas polipeptídicas adoptan durante y después de su biosíntesis en los ribosomas, una estructura tridimensional biológicamente activa, a este proceso se le conoce como plegamiento de proteínas; la fidelidad de este proceso determina la economía celular.

Existe información detallada del plegamiento de algunas proteínas monoméricas, sin embargo, la mayoría de las proteínas son de naturaleza oligomérica. La formación espontánea de la estructura de las proteínas a partir de una secuencia lineal de aminoácidos aún es poco conocida; en proteínas monoméricas se requiere solo del plegamiento intramolecular mientras que en el caso de las proteínas oligoméricas también se requiere del reconocimiento y la asociación intermolecular. Estas reacciones de asociación están relacionadas con la aparición de actividad catalítica, o la regulación de esta; por lo tanto, es importante generar información acerca del reconocimiento y ensamblaje de enzimas constituidas por varias cadenas polipeptídicas para conocer la ruta conformacional hacia la estructura biológicamente activa.

El plegamiento es un proceso rápido, por lo que las conformaciones parcialmente plegadas que la proteína adquiere antes de alcanzar la estructura nativa son de naturaleza efímera. En proteínas monoméricas, las características de estos intermediarios son detectables únicamente mediante técnicas rápidas (orden de milisegundos). En oligómeros el proceso está en el rango de minutos a horas por lo que se facilita la caracterización de los intermediarios (Jaenicke, 1991).

De esta manera, podemos referirnos al problema del plegamiento en términos de cómo y por qué una proteína adopta su conformación nativa. Una cadena polipeptídica es capaz de adoptar millones de conformaciones. Si la cadena polipeptídica visitara todas estas conformaciones, encontrar la estructura correcta le tomaría un tiempo mayor a la edad del universo. A pesar de esto, las proteínas se pliegan en segundos, a esto se le conoce como la paradoja de Levinthal. Para resolver la paradoja, es necesario sugerir la existencia de rutas preferenciales de plegamiento, esto es, solo unos cuantos conformémeros son visitados por la cadena.

Es entonces que surgen varias preguntas como: ¿Qué mecanismos sujetan la relación entre una secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional? ¿Qué es lo que determina la formación de la estructura nativa?

Para responder cómo una estructura de una dimensión, representada por la secuencia de aminoácidos, genera la estructura tridimensional correspondiente, es necesario determinar un "código de plegamiento", esto es, elucidar la relación estructura 1^a-estructura 3^a.

La desnaturalización es una de las metodologías que se ha utilizado con el fin de encontrar las vías o rutas de plegamiento. En proteínas globulares pequeñas desnaturalizadas por temperatura (Privalov, 1979), se ha encontrado que el plegamiento se lleva a cabo cooperativamente, es decir, existe una transición entre dos estados macroscópicos; el nativo y el desnaturalizado, sin la presencia de intermediarios estables (Creighton, 1990). De igual manera, mediante la adición de agentes desnaturalizantes como la urea y el hidrócloruro de guanidina, se ha encontrado que en muchas proteínas pequeñas, la estructura y la función cambian de manera simultánea. Por lo tanto, al aumentar la concentración del desnaturalizante,

lo que cambia es la proporción de proteínas que se encuentran en el estado nativo y en el estado desnaturalizado.

Existe controversia sobre las semejanzas de los conformeros desnaturalizados obtenidos por temperatura y agentes químicos, sin embargo, estos dos estados se consideran equivalentes ya que en ambos casos el estado desnaturalizado es el resultante del deterioro cooperativo y generalizado de la estructura nativa, sin cambios significativos en la estructura covalente (a excepción de los puentes disulfuro).

El plegamiento de la cadena polipeptídica naciente y la renaturalización de las proteínas desnaturalizadas inician de estados poco definidos, esto puede ser muy importante con respecto al plegamiento, debido a que la vía de formación de la estructura nativa puede depender del estado desnaturalizado.

A partir de estos estudios se ha estimado la estabilidad conformacional de la estructura de las proteínas. Para determinar las características de los conformeros visitados por la cadena, esto es, “la ruta de plegamiento”, es necesario utilizar un enfoque cinético; en el que se determinan mediante diversas técnicas, las propiedades estructurales y funcionales de los intermediarios visitados por la cadena polipeptídica, como función del tiempo.

Jerarquía de la estructura de proteínas.

Para abordar el problema del plegamiento de proteínas, es necesario conocer los principios que determinan la estructura de estas moléculas. Esto se debe principalmente a que la vía por la cual se pliega una cadena polipeptídica para adoptar su estado final, refleja la jerarquía estructural. En general, el plegamiento de estas moléculas se visualiza de la siguiente manera: dada una secuencia de aminoácidos, las interacciones entre vecinos locales dan lugar a

los elementos estructurales secundarios y super secundarios los que a su vez servirán para formar dominios estructurales que se pliegan independientemente; la unión de estos dominios da lugar a la estructura terciaria. Los oligómeros adquieren su estado final de menor energía por diversas reacciones de asociación (Jaenicke, 1987).

A continuación se describen aspectos generales de la estructura y el plegamiento de proteínas:

Estructura primaria.- se refiere a la secuencia de aminoácidos y sus características. El esqueleto polipeptídico consiste de una serie de enlaces covalentes, conocidos como enlaces peptídicos, enlazados mediante el C_{α} de los aminoácidos originales.

Estructura secundaria.- Arreglo conformacional local de los átomos del esqueleto polipeptídico. Debido al carácter de doble enlace del enlace peptídico, solo es posible la torsión de las uniones $N-C_{\alpha}$ y $C_{\alpha}-C$ descritas por los ángulos ψ y ϕ . Así, las estructuras regulares adoptadas por segmentos de la proteína están caracterizadas por ángulos de torsión particulares y pueden involucrar un número variable de residuos para la formación de las diferentes estructuras, como las α -hélices y las hojas β .

La interacción de la estructura del esqueleto y la secuencia de aminoácidos es vital en la determinación del plegamiento, por ejemplo, las prolinas pueden isomerizarse y las cisteínas forman enlaces disulfuro.

Tanto las hojas β como las α hélices, muestran ángulos ϕ y ψ en un mínimo energético para poder acomodar otras porciones de la estructura terciaria. La tendencia a formar una estructura compacta con un mínimo de espacio vacío, distorsiona a las hélices- α y las cadenas- β . Estas irregularidades complementan las características relevantes de estas estructuras, esto es, la naturaleza dipolo de las hélices (Hol, 1985; citado en Jaenicke, 1987), la

complementaridad anfipática y el empaque de arreglos regulares de la cadena polipeptídica (Chothia, 1984).

La formación de los motivos estructurales recae principalmente en la formación de los puentes de hidrógeno; en ausencia de ellos las interacciones electrostáticas pueden tener un efecto estabilizador significativo (Rossmann y Argos, 1981). Conforme la estructura tridimensional se adquiere, se asume que las porciones de la cadena polipeptídica naciente (estructura secundaria) sirven como sitios núcleo para el plegamiento.

Existen además estructuras “no repetitivas” que conectan hélices α y hebras β , bien definidas o desordenadas, debido a la flexibilidad local o las conformaciones alternativas tomadas por la proteína en solución o en cristal.

Estructura terciaria.- Está determinada básicamente por el arreglo de los segmentos estructurales α y β en el espacio; incluye la formación de la estructura super secundaria; y el ensamblaje de estos motivos, para generar dominios.

En el proceso para alcanzar la estructura tridimensional final, las extensiones de estructura secundaria se asumen como sitios de nucleación en el plegamiento de las proteínas. Así, el siguiente nivel de complejidad será la estructura supersecundaria, a la cual podemos definir como plegamientos recurrentes que consisten de una serie de elementos de estructura secundaria que aún no comprenden la estructura terciaria completa o dominio. Como las interacciones débiles son las responsables de la formación de estos elementos, las estructuras super secundarias son difíciles de predecir (Levitt y Chothia, 1976), sin embargo, están favorecidas por razones cinéticas durante el proceso de plegamiento y por razones energéticas (Jaenicke, 1987) debido especialmente a la distribución anfipática de las cadenas laterales hidrofóbicas y cargadas a lo largo de los elementos estructurales simples en la proteína plegada.

Los dominios resultantes son subestructuras compactas y representan unidades autónomas de plegamiento con una relación mínima de superficie/volumen, resultando en glóbulos. Los sitios activos de muchas enzimas residen en diferentes dominios o en las interfases de estos. Desde el punto de vista del plegamiento, los dominios son considerados como unidades cooperativas; basados en esta idea pueden ser considerados como los principales intermediarios en el proceso de plegamiento. La importancia funcional de los dominios radica en (Janin y Wodak, 1983; citado en Jaenicke, 1987):

-El sitio activo de una molécula puede ser la interfase entre dominios, lo cual permite la función simple de cada uno para asociarse y formar una molécula más compleja.

-Diferentes sustratos o efectores de una enzima dada, pueden unir a diferentes dominios y desarrollar varias funciones.

Estructura cuaternaria.- La estructura cuaternaria describe la estequiometría y geometría del ensamblaje macromolecular de monómeros o subunidades, este nivel se refiere a la asociación no covalente de 2 o más cadenas (Jaenicke, 1987).

Al formarse las interacciones entre dominios, la superficie que forma contactos entre subunidades parece apartarse del interior de la proteína, por lo que participa en la estabilización de la estructura terciaria.

La superficie enterrada parece estar relacionada con la estabilidad del ensamble. La razón es que la especificidad entre los contactos intersubunidades requiere una colocación precisa de cadenas laterales hidrofóbicas, apareamiento de cargas, y cadenas laterales que hacen puentes de hidrógeno con el esqueleto, muy similar al empaquetamiento de la cadena polipeptídica dentro de cada subunidad sencilla (Jaenicke, 1987).

Plegamiento *in vitro* vs *in vivo*.

El plegamiento *in vivo* es facilitado por varias proteínas, que ayudan a que el plegamiento se lleve a cabo en lugar y tiempo adecuados, o evitan la agregación irreversible de las cadenas recién sintetizadas. Sin embargo, *in vitro* existe un gran número de proteínas, que adoptan la conformación nativa sin ayuda de otras proteínas, información adicional o entrada de energía. (Creighton, 1993). La adquisición y estabilidad de estas estructuras está entonces determinada por la secuencia primaria de aminoácidos y las interacciones proteína-solvente (Anfinsen, 1973).

El plegamiento *in vivo* puede ser limitado por pasos co-traduccionales o post-traduccionales (vectoriales), mientras que para estudiar el plegamiento *in vitro*, se hace uso de experimentos de reversibilidad de la proteína desnaturalizada enfocándose en el replegamiento y reasociación. Los resultados pueden ser diferentes, pues la reconstitución *in vitro* parte de una cadena polipeptídica ya sintetizada (Jaenicke y Rudolph, 1986., Jaenicke, 1987 y Jaenicke 1991). Las propiedades y funciones de las proteínas, sobre todo de las enzimas, pueden verse afectadas por un sin fin de factores. En una célula, hay miles de sustancias que pueden relacionarse con otros constituyentes celulares, e intervenir en sus propiedades físicas y químicas, o participar en el buen funcionamiento de una proteína; sin embargo, no se conoce la contribución precisa de estos elementos, de ahí la necesidad de la purificación, esto es, aislar cierto elemento (en este caso una enzima) manteniendo sus características físicoquímicas.

Una proteína desnaturalizada representa un ensamble de confórmers rápidamente convertibles en otros de energía similar, casi todos los intermediarios son inestables en relación al estado nativo; como se vió anteriormente, uno de los modelos más comunes en el

plegamiento de proteínas es el que postula únicamente dos estados: el nativo y el desnaturalizado.

Para tratar de determinar los estados conformacionales de la proteína al renaturalizarla, se pueden emplear diversas técnicas; la desnaturalización por hidrocioruro de guanidina es una de ellas. Este compuesto es un agente caotrópico, cuyo mecanismo de acción todavía no es bien conocido (Tanford, 1968., Dill y Shortle, 1991 y Matthews, 1993). Aparentemente el hidrocioruro de guanidina aumenta la solubilización de los residuos de aminoácidos no polares en agua, es decir, debilita las interacciones hidrofóbicas; con base en estos resultados, los estados desnaturalizados por este agente se asumen como conformaciones de hebras al azar (random coil). Se considera que este estado es semejante al estado desnaturalizado *in vivo*, ya que los ángulos de rotación alrededor de cada enlace del esqueleto polipéptico y las cadenas laterales tienen completa e igual libertad de rotación.

La función biológica requiere de la estructura tridimensional del estado nativo, en el caso de las enzimas esta actividad se refiere a la capacidad catalítica. Esta característica ha sido ampliamente explotada para caracterizar los estados de plegamiento en dos direcciones: 1) La comparación de la estructura nativa y el producto de la reconstitución de los experimentos de desnaturalización-renaturalización, y 2) la determinación del tiempo requerido para la formación de la estructura terciaria y la actividad enzimática.

Las aproximaciones experimentales más utilizadas para caracterizar el plegamiento de las proteínas se refieren a las características estructurales, la función biológica y el estado de asociación.

Plegamiento en presencia de cosolventes

Algunos polioles como el glicerol, la sacarosa o el polietilen glicol se han utilizado como crioprotectores (Jarabak et al., 1966., Huang et al., 1995). Se ha establecido que en algunas proteínas globulares y péptidos, estos compuestos estabilizan la conformación nativa (Gekko y Timmasheff, 1981., Gekko e Ito, 1990., Oliveira et al., 1994) a través de una hidratación preferencial de la superficie de la proteína (Timasheff, et al., 1976). Se ha propuesto que la magnitud del efecto de estabilización es proporcional al cambio en la superficie entre los reactivos y los productos (Shortle et al., 1989).

El glicerol y el polietilen glicol también se han utilizado como asistentes en la renaturalización; varios autores han demostrado que estos agentes promueven la renaturalización, pues al agregar alguno de estos cosolventes en el amortiguador, se obtiene un porcentaje mayor de renaturalización en comparación al obtenido sin la adición del asistente (Shortle et al., 1989; Zhi et al., 1992; y Cleland et al., 1992).

Estos cosolventes también se han utilizado como agentes viscosogénicos, para determinar la naturaleza del paso limitante en algunos procesos como el plegamiento o la catálisis.

La determinación del paso limitante en el plegamiento de proteínas (excluyendo la isomerización de las prolinas o la formación de enlaces disulfuro), puede ser detallado por un análisis cinético (Matthews, 1993). Por ejemplo, en la subunidad α de la triptofano sintasa, al alterar la viscosidad del solvente mediante la adición de agentes viscosogénicos, se ha demostrado que el paso limitante es la asociación de dos unidades plegadas. Estos resultados muestran el papel de la difusión en la formación de la estructura nativa (Chrnyk y Matthews, 1990). Por otra parte, en un análisis por mutagénesis, la comparación de mutaciones sencillas o dobles en los aminoácidos de la interfase de la misma proteína, altera tanto la velocidad de

desnaturalización como la de renaturalización, demostrando que ambos segmentos de la proteína juegan un papel importante en este proceso. El plegamiento del monómero de la subunidad α envuelve un esquema de plegamiento de 6+2, esto es, primero se pliegan 6 unidades α/β y por último 2 unidades α/β (Matthews 1993). Esto también ha sido observado para otras proteínas (α/β), como la fosforibosil-antranilato isomerasa (Eder y Kirschner, 1992), por lo tanto, este podría ser un modelo general para la formación de estructuras simétricas, como los barriles α/β .

Triosafosfato Isomerasa

En el presente trabajo, utilizamos como modelo a la Triosafosfato Isomerasa, a continuación se mencionan algunos aspectos relevantes de esta enzima.

La Triosafosfato Isomerasa (TPI) es una proteína homodimérica de 27 KDa de naturaleza soluble, cataliza la interconversión entre la Dihidroxiacetona fosfato y el D-Gliceraldehído-3-Fosfato (Knowles, 1991). Ya que solo el G3P continúa en la vía glucolítica, esta enzima asegura la síntesis neta de ATP en la oxidación de la glucosa hasta piruvato. El mecanismo catalítico se conoce a detalle (Knowles y Alberly 1977, Knowles, 1991). La TPI se ha encontrado en todos los organismos en los que se ha buscado (Lolis et al., 1990); a la fecha, se ha reportado la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 40 especies y se tiene la estructura tridimensional a alta resolución de 6 de ellas: (pollo) *Gallus gallus* (Banner et al., 1975, Zhang et al., 1994), (levadura) *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis et al. 1990), *Trypanosoma brucei brucei* (Wierenga et al., 1991), *Escherichia coli* (Noble et al., 1993), (humano) *Homo sapiens sapiens* (Mande et al., 1994) y *Bacillus stearothermophilus* (Delboni, et al., 1995).

La mayoría de las enzimas analizadas, son dímeros formados por dos cadenas idénticas de 25-27 KDa a excepción de dos enzimas de bacterias hipertermófilas reportadas recientemente que son homotetrámeros de 100 KDa (Kohlhoff et al., 1996).

Los parámetros cinéticos de la TPI de diferentes especies son semejantes (Lambeir et al., 1987). Cada monómero tiene un sitio activo y funciona independientemente del otro, a la fecha no se han descrito cofactores o reguladores alostéricos, ni se ha detectado cooperatividad entre las subunidades (Schnackerz y Gracy, 1991).

La Triosafosfato Isomerasa es una enzima muy eficiente, la velocidad con que cataliza la isomerización del G3P es entre 10^8 y 10^9 veces mayor que en ausencia de ésta. La relación k_{cat}/K_m para el G3P como sustrato es de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; éste valor es comparable al calculado (10^8 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión (Knowles y Albery 1977). El perfil de energía libre de la reacción catalizada por la TPI, muestra que el estado de transición más alto, es la unión del G3P a la enzima (Knowles y Albery 1977). Gracias al estudio de los parámetros catalíticos de la TPI variando la viscosidad del solvente (Blacklow et al., 1988), se ha confirmado que la unión del G3P a la enzima, está limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos especies; por lo tanto, los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el solvente en la catálisis o los rearrreglos químicos entre sustrato y enzima son más rápidos. Debido a esto, la TPI es un catalizador "perfecto"; cualquier aumento en la velocidad de los pasos catalíticos no tendría efecto en la velocidad de la reacción (Knowles y Albery 1977).

Estructura de la Triosafosfato Isomerasa

La estructura secundaria de la TPI está formada por ocho hebras β que alternan con una (a veces dos) α hélice(s) (figura 1). La cadena polipeptídica se pliega de tal manera que las ocho hebras forman una hoja β paralela central semejando un barril.

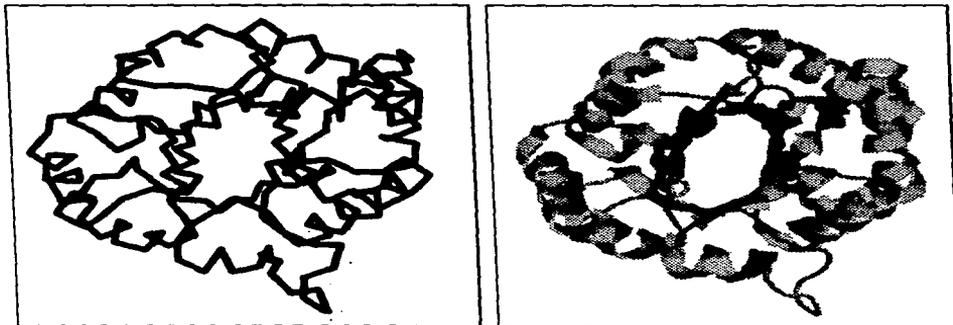


Figura 1 Estructura de la TPI (barril α/β); izquierda.- esqueleto polipeptídico; derecha.- estructura secundaria en caricatura.

El sitio activo se encuentra en uno de los extremos del barril en la cavidad formada por las asas contiguas a las hebras β (Banner et al., 1975) (figura 2). Este patrón topológico se ha encontrado en aproximadamente el 10% de las proteínas cristalizadas. No es claro si este patrón de plegamiento refleja las características de un ancestro común, o si el barril presenta una topología estable a la cual han convergido diferentes proteínas.

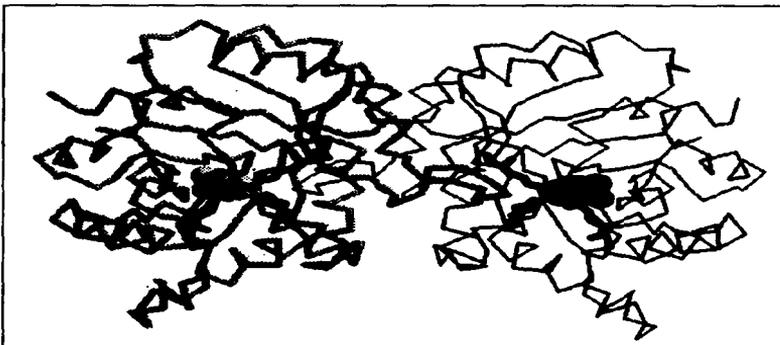


Figura 2 Esqueleto polipeptídico de la sTPI; se muestran los aminoácidos conservados del sitio catalítico con sus cadenas laterales (negro) y el análogo de sustrato fosfoglicohidroxamato (PGH) en espacio lleno.

En proteínas homólogas, los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo, están conservados, así como los residuos directamente relacionados con la catálisis (Creighton, 1993). Para el caso de la TPI sucede lo mismo (Lolis et al., 1990) (figura 2 y tabla 1); aunque existen diferencias en los aminoácidos de la interfase, tanto la estructura del barril así como la geometría de la asociación entre los monómeros (figura 3), son semejantes en diferentes especies (Wierenga y Noble, 1992).

1	12	60
MARTFFVGGNFKLN GSKQSIKEIVERLNTASIPENVEVVICPPATYLDYSVSLVKKPQVT		
	Lys	
61	95	120
VGAQ NAYLKASGAFTGENSV DQIKDVGAKWVILGHS ERRSYFHEDDKFIADKTKFALGQG		
	His	
121	165	180
VG VILCIGETLEEKKAGKTL DVVERQLNAVLEEVKDW TNVVVA YEPV WAIGTGLAATPED		
	Glu	
181	240	
AQDI HASIRKFLASKLGDKAA SEL RILYGG SANGSNA VT FKDKADVDGFLVGGASL KPEF		
241	248	
VDI INSRN		

Tabla 1 Secuencia primaria de aminoácidos de la sTPI donde se muestran (negritas) los residuos que intervienen en la catálisis.

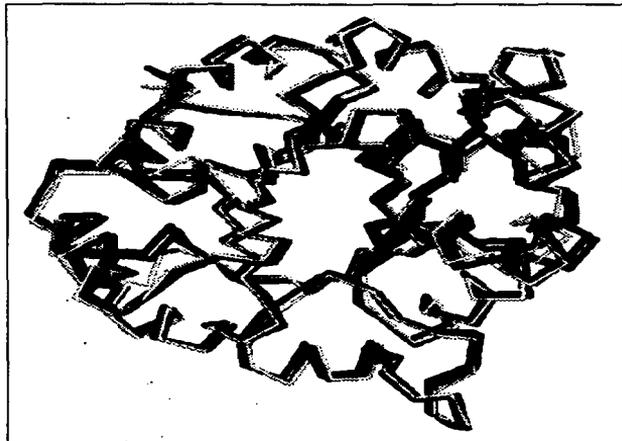


Figura 3 Sobreposición de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* (negro), *Trypanosoma brucei brucei* (gris oscuro) y pollo *Gallus gallus* (gris claro).

Se ha descrito que la enzima de conejo es estable como dímero aún a diluciones extremas 2 ng mL^{-1} (Zabori *et al*, 1980). No es claro por que la TPI solo es activa como dímero, pues los aminoácidos involucrados en la catálisis se encuentran contenidos en el monómero.

Plegamiento y asociación de la TPI

Ya que la TPI es un homodímero, esta enzima es uno de los modelos más sencillos para explorar el plegamiento y asociación de una proteína oligomérica.

La renaturalización de la TPI de conejo (Waley, 1973; Zabori *et al*, 1980) y de pollo (Mevittie *et al*, 1977) (a partir de la enzima desnaturalizada por hidrocloreuro de guanidina), es completamente reversible. La cinética de renaturalización determinada por la recuperación de la actividad enzimática, depende de la concentración de proteína a concentraciones bajas. A

concentraciones elevadas, la cinética se vuelve de primer orden, esto es, independiente de la concentración de enzima. Debido a esto, cuando la concentración de proteína es baja, el paso limitante es la asociación de los monómeros; al aumentar la concentración de proteína, la asociación deja de ser limitante y el paso más lento es unimolecular, ya sea anterior o posterior a la formación del dímero. Como primera aproximación los datos se ajustan a un modelo consecutivo uni-bimolecular ($k_{uni}=1.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $k_{bi}=3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) en el que se asume que los monómeros formados durante la renaturalización son inactivos (Zabori *et al.*, 1980). La velocidad de asociación ($3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es cercana a la esperada (10^5 a $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para la asociación de dos moléculas de tamaño semejante limitada por difusión. Esto implica que durante la renaturalización, todos los choques entre los monómeros son productivos.

Debido a esto, Jaenicke y col. (Zabori *et al.*, 1980) sugieren que la asociación de los monómeros está limitada por difusión, sin embargo, para determinar experimentalmente el papel de la difusión, es necesario determinar las constantes cinéticas al variar la viscosidad del solvente (Chrnyk y Matthews, 1990).

Existen dos explicaciones tentativas para explicar el valor elevado de k_{bi} en la renaturalización de la TPI: 1) las subunidades aisladas tienen una conformación que es complementaria con la interfase del otro monómero antes del choque y 2) las interacciones que tienen lugar durante la dimerización son débiles, ya que estos conformeros contienen restricciones geométricas no específicas; sin embargo, esta estructura laxa se rearreglaría posteriormente (reshuffling) para dar lugar al dímero activo.

Aunque se ha propuesto un intermediario monomérico en el plegamiento de esta enzima, sus características estructurales, estabilidad y el papel de la difusión en su formación no se conocen.

Objetivos

El presente trabajo plantea los siguientes objetivos particulares:

- 1. Determinar por recuperación de la actividad catalítica y fluorescencia intrínseca la cinética de renaturalización de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae*.**
- 2. Proponer un modelo cinético que incorpore los resultados experimentales obtenidos y describa el proceso de renaturalización.**
- 3. Determinar por recuperación de la actividad catalítica y fluorescencia intrínseca la cinética de renaturalización de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de glicerol.**
- 4. Determinar el papel de la difusión en el plegamiento y asociación de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* mediante un modelo que incorpore los resultados obtenidos en presencia de glicerol.**

Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de las fuentes indicadas:

α -GDH, Gdn-HCl (Boheringer Mannheim)

Glicerol 87%, NaOH (Merck)

Q-Sepharosa, Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech)

α -GDH, azida de Na, Dowex-50W, DTT, EDTA, G3P, NaCl, NADH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, PMSF,

TEA, Tris HCl (SIGMA Chemical Company)

Preparación de Amortiguadores

Se prepararon soluciones madre TED¹ 1/0.1/0.01 M pH 7.5; TED 200/20/2 mM pH 7.4 y TED 100/10/1 mM pH 7.4; en todos los casos, se ajustó el pH con NaOH 10N gota a gota, mediante un potenciómetro (Beckman mod. Φ 72 pH Meter). Posteriormente se realizaron las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones especificadas de glicerol % (v/v) y de TPI; de manera que todas las soluciones tienen una concentración final de TED 100/10/1 mM pH 7.4.

Purificación de la Triosafosfato Isomerasa

La Triosafosfato Isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (sTPI) se purificó a partir de células de *Escherichia coli* cepa JM103, que contienen el plásmido (pKK223-3yitim), para la sobreexpresión de la TPI silvestre recombinante. El crecimiento de las células se llevó a cabo a

¹ Amortiguador que contiene trietanolamina, ácido etilendiaminotetraacético y ditiotreitol en las concentraciones mencionadas en cada caso.

37°C en medio Luria-Bertani (Maniatis et al. 1982), suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Cuando la A_{600} es cercana a 1.0, el cultivo se induce mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), con una concentración final de 100µg/mL, posteriormente el crecimiento continuó por 12 h. Los cultivos celulares empleados fueron donados amablemente por la M. en IBB. Emma Saavedra en el laboratorio del Dr. Ruy Perez-Monfort del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Los pasos de purificación se mencionan a continuación: (ver figura 4)

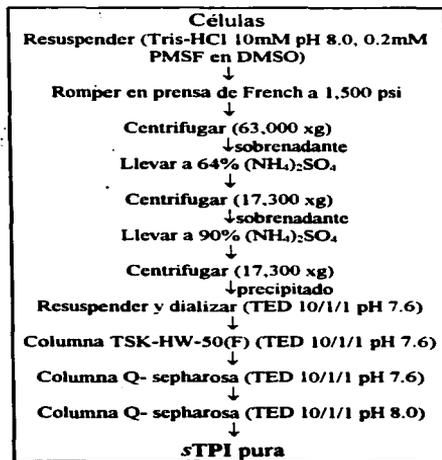
A partir de 3 litros de cultivo de *E. coli* se obtuvo aproximadamente 18-20 g de bacterias, se resuspendió el precipitado en 45 mL en amortiguador Tris HCl 10 mM pH 8.0 y PMSF 0.2 mM (este último a partir de una solución 20 mM en DMSO); las células se rompieron por cambios de presión en prensa de French a 1500 psi (3x), se centrifugó a 63,000 xg por 1 hora a 4 °C, se tomó el sobrenadante y llevó a 64% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ después de 12 h, se centrifugó a 17, 300 xg por 15 minutos, el sobrenadante se llevó a 90% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12h después, esta solución se centrifugó a 17, 300 xg por 15 minutos, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 3 mL de TED 10/1/1 pH 7.6, para después dializarlo contra amortiguador TED 10/1/1 mM. pH 7.6 250 mL por 6 horas y posteriormente contra 1 L del mismo amortiguador.

Esta solución se filtra antes de pasar por las siguientes columnas:

Cromatografía de filtración en gel; columna TSK-HW-50(F) (16 mm diámetro, 70 cm largo, 102-135 mL) equilibrada con amortiguador TED 10/1/1 mM azida de Na 1 mM pH 7.6 250 mL, flujo 1 mL/min controlado por FPLC (Pharmacia Biotech). De las fracciones obtenidas se midió proteína a 280 nm y actividad enzimática, las fracciones con mayor actividad específica se seleccionan para la siguiente columna.

Cromatografía de intercambio iónico; columna Q-sepharosa (16 mm diámetro, 40 cm largo, 42-74 mL), equilibrada con TED 10/1/1 mM pH 7.6 la TPI se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0-100 mM; las fracciones con mayor actividad específica se reúnen, para ajustar el pH a 8.0, e introducir las a la columna de Q-sepharosa; esta vez equilibrada con TED 10/1/1 mM pH 8.0. La TPI se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0-150 mM. Las fracciones con mayor actividad específica muestran una pureza mayor al 95%, se observa una sola banda en geles de poliacrilamida en presencia de SDS teñidos con azul de Coomassie (no presentado). Se obtuvieron como promedio 40 miligramos de enzima pura por lote, con una actividad específica de $7,981 \pm 770 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Se almacenó en sulfato de amonio.

Figura 4 Diagrama de flujo para la purificación de sTPI. Se menciona la fracción (sobrenadante o precipitado) utilizada para el siguiente paso.



Remoción del sulfato de amonio de la Triosafosfato Isomerasa

El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se separó de la TPI por dos métodos diferentes:

Filtración-centrifugación.- (Penefsky, 1977) Se equilibraron las columnas (jeringas de insulina con 1 mL de Sephadex G-50) con 5 mL de amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4; se centrifugó por 1 min a 5,000 r.p.m. en centrifuga clínica para quitar el exceso de amortiguador. Preparación de la enzima: 2 mL de TPI en sulfato de amonio se centrifugaron por 10 min a 12,000 r.p.m. en una microfuga (Eppendorf mod. 5415C), y posteriormente se resuspendieron en 200-300 μL de amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4. Esta enzima se inyectó (100-150 μL por columna) a las columnas pre-equilibradas y se centrifugó por 1 min a 5,000 r.p.m. en centrifuga clínica; posteriormente se determinó la concentración de proteína. Con este método se recupera del 85-90% de la proteína inicial.

Diálisis.- Se centrifugaron 5 mL de la solución de sTPI por 10 min a 17,750 xg, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0.5 mL de amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4. El resuspendido se dializó primero contra 250 mL de amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 y por último contra 0.8 del mismo amortiguador. La muestra se concentró (cuando era necesario) en cámara de acrílico para ultrafiltración utilizando membrana de nitrocelulosa (Aminco, Co) con corte en peso molecular de 10,000.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante un espectrofotómetro Beckman mod. DU 7500 utilizando $A_{280}^{1\%_{1\text{cm}}}=10$ (Nickbarg y Knowles, 1988), utilizando como blanco el último amortiguador en el que estuvo la enzima (McVittie et al. 1977).

Desnaturalización

Para desnaturalizar a la TPI se incubó a la enzima en una solución con 6M GdnHCl en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 por periodos variables entre 30 min y 1h a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$). En estas condiciones los espectros de dicroísmo circular (CD) y fluorescencia intrínseca indican que la proteína está totalmente desnaturalizada.

Renaturalización

Renaturalización de la TPI: una pequeña alícuota de TPI desnaturalizada se llevó a un volumen grande de amortiguador, para obtener una concentración residual de hidrocloreto de guanidina de 60 mM e iniciar la renaturalización de la proteína. En aquellos casos en los que la renaturalización se realizó a concentraciones elevadas de proteína (100 y $50\mu\text{g mL}^{-1}$) la concentración GdnHCl residual fue de 160 y 80 mM respectivamente. En el tiempo cero de la renaturalización, se diluyó a la enzima en el amortiguador de renaturalización y se agitó en vortex por lo menos durante 15 segundos. En los ensayos de fluorescencia intrínseca se utilizaron soluciones con alto contenido de glicerol por lo que la agitación en vortex fue de al menos 40 segundos.

Ensayos de Actividad Catalítica con D-gliceraldehído-3-fosfato como sustrato

La actividad enzimática fue seguida espectrofotométricamente (Beckman mod. DU7500 equipado con accesorio cinético) mediante la disminución en la absorbencia a 340 nm debido a la oxidación del NADH, determinada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 por un ensayo acoplado (ver figura 5) utilizando D-gliceraldehído-3-fosfato como sustrato. El D,L-gliceraldehído-3-fosfato se preparó a partir del dietilacetal por 3 min de hidrólisis con

Dowex- 50W a 90 ° C. La cantidad del isómero D fue determinado enzimáticamente, en un ensayo que contiene 2 μ l de G3P, 0.2 mM NADH 10 μ g de α -GDH y 2.44 μ g de TPI en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 a un volumen de 1 mL. Por otra parte los ensayos de actividad catalítica se realizaron con 2 ng de TPI, 1.5-3mM D-gliceraldehído-3-fosfato, 0.2 mM NADH y 5-10 μ g de α -glicerolfosfato deshidrogenasa² en un volumen final de 1 mL.

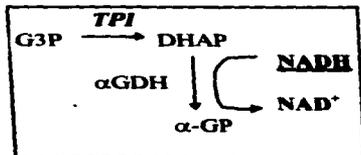


Figura 5 Esquema del ensayo acoplado para medir actividad catalítica de TPI.

Ensayos de fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca de los residuos del triptofano de sTPI fue usada para analizar la renaturalización. Cada subunidad contiene 3 residuos de triptofano, el primero se localiza en la hoja β 4 (W90), el segundo en el asa 6 (W157) y el tercero en el asa flexible del sitio activo (W168), los dos últimos en la unidad α/β 6 (figura 6).

² El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fue removido de esta enzima por filtración-centrifugación como se mencionó previamente, o mediante centrifugación por 10 min a 12,000 r.p.m. en microfuga (Eppendorf mod 5415C) resuspendida en un volumen 10 veces menor al inicial.

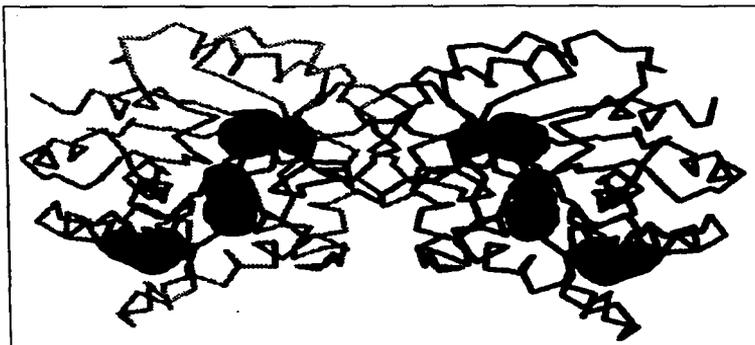


Figura 6 Esqueleto polipeptídico de la sTPI mostrando los triptofanos de cada subunidad en espacio lleno.

En los espectros de fluorescencia intrínseca (Espectrofluorómetro ISS-PC1), la muestra se excitó a 280 nm y se colectó la emisión entre 300 y 400 nm cada nanómetro. La celda de cuarzo utilizada fue de 1 cm de paso de luz. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (25°C), en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4, variando tanto la concentración de glicerol como la de TPI. Para los experimentos de cinética se utilizó la misma λ de excitación y se siguió la intensidad en la emisión de la fluorescencia a 320 nm, (λ de máxima emisión en la TPI nativa), como función del tiempo mediante el programa de cinética lenta del fluorómetro.

Tratamiento de los datos

Los datos de actividad catalítica fueron normalizados de la siguiente manera: para los experimentos al equilibrio, se tomó como referencia la actividad catalítica de la proteína nativa en cada condición. Para los datos de reactivación, se tomó como 100% la actividad máxima obtenida después de la renaturalización (24-96 h), la actividad de la enzima renaturalizada es generalmente cercana a la de la enzima nativa y es en todos los casos mayor al 50%.

Los datos de fluorescencia intrínseca también fueron normalizados. Tanto en los experimentos al equilibrio (24-96 h), como en los de reactivación, el 100% es la señal de fluorescencia a 320 nm de la proteína nativa.

Los datos de actividad catalítica y fluorescencia intrínseca, fueron analizados mediante el programa "Graft" versión 3.09b.

Reactivación de la TPI

Para determinar el curso temporal de la formación de la estructura nativa se desnaturalizó previamente a la enzima en 6 M de GdnHCl, y después de diluir el desnaturalizante (t=0) se tomaron alícuotas para determinar la recuperación de la actividad catalítica.

En 4 experimentos independientes, al diluir el desnaturalizante la enzima se renaturaliza y recupera gradualmente la actividad previa a la desnaturalización, esto es, la reactivación de la TPI es reversible. La cinética es reproducible, pues en todos los casos el mismo patrón describe al proceso. La figura 7 muestra estos resultados.

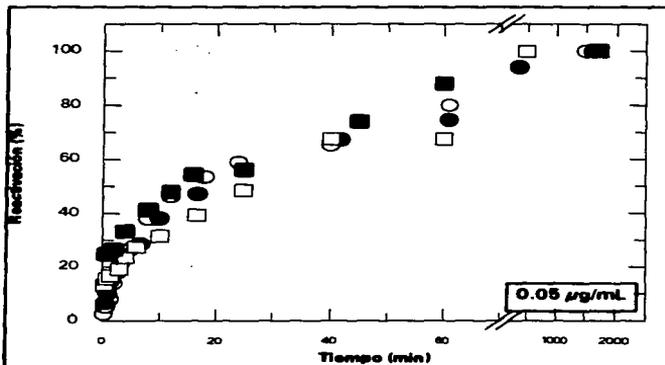


Figura 7 Curso temporal de la reactivación de la TPI

La formación del dímero es una reacción bimolecular, por lo tanto depende de la concentración de monómeros. A continuación (figura 8) se muestra la cinética de renaturalización de la TPI a diferentes concentraciones de proteína.

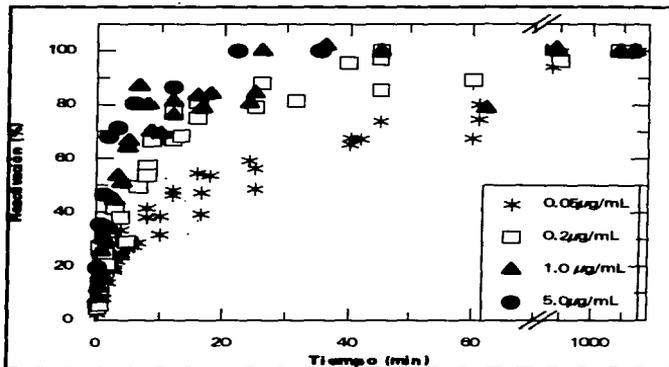


Figura 8 Reactivación de la TPI al variar la concentración de enzima en la renaturalización.

Esta figura muestra como con 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TPI en la renaturalización, la velocidad con la que se recupera la actividad es semejante, esto es, la velocidad es independiente de la concentración de proteína (●, ▲). En contraste, a concentraciones menores de TPI (0.05-0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *, □), la velocidad de reactivación depende de la concentración de enzima. Por lo tanto, cuando la concentración de proteína es baja la renaturalización está limitada por un paso bimolecular (reacción de segundo orden). Por otra parte, cuando la concentración de TPI en la renaturalización es elevada (1-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), el paso limitante es unimolecular (reacción de primer orden). Por esta razón podemos descartar el modelo más sencillo de plegamiento $2M \rightarrow D$ donde M es el monómero desnaturalizado y D es el dímero nativo, pues si este describiera el

proceso, al aumentar la concentración de enzima, continuaría incrementándose la velocidad de renaturalización. Por lo tanto, es necesario postular la aparición de un intermediario (I) en la ruta de plegamiento, $2M \rightarrow I \rightarrow D$, los modelos más sencillos para un solo intermediario son el uni-bimolecular (Waley, 1973 y Zabori et al., 1980), en el que el intermediario M^* representa un monómero competente para la dimerización $2M \rightarrow 2M^* \rightarrow D$ y el modelo bi-unimolecular (Plomer y Gafni, 1993), en el que el intermediario D^* representa un dímero no nativo $2M \rightarrow D^* \rightarrow D$.

Efecto del glicerol en las preparaciones de la TPI

Para estudiar el efecto del glicerol en la cinética de renaturalización, se tiene que demostrar primero que este cosolvente no afecta significativamente las propiedades de la enzima nativa. Para comprobar esto, se incubó la TPI en soluciones con porcentajes de glicerol variables.

El espectro de fluorescencia intrínseca de la TPI, casi no varía cuando la enzima se incubaba por 1 hora en concentraciones crecientes de glicerol (figura 9), sin embargo después de 24 horas de incubación, se observa que la intensidad de fluorescencia disminuye a bajas concentraciones de glicerol, por el contrario a concentraciones elevadas de glicerol se conserva (figura 10). Este fenómeno es más claro si graficamos la intensidad de fluorescencia a 320 nm vs % de glicerol (figura 11) (el 100% es la enzima incubada en 75% de glicerol).

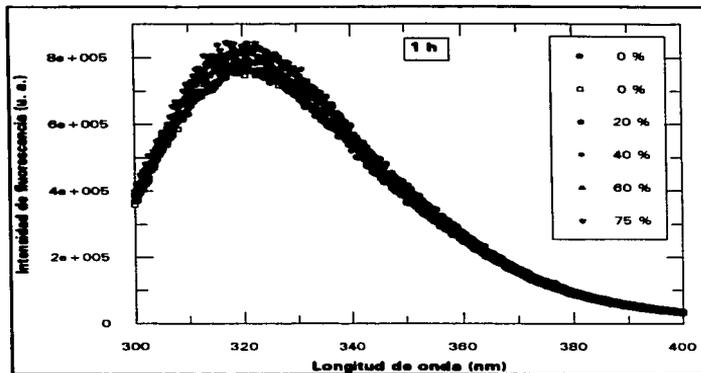


Figura 9 Incubación de la TPI ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 1 h variando la concentración de glicerol. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron tomados a la hora, después de la incubación.

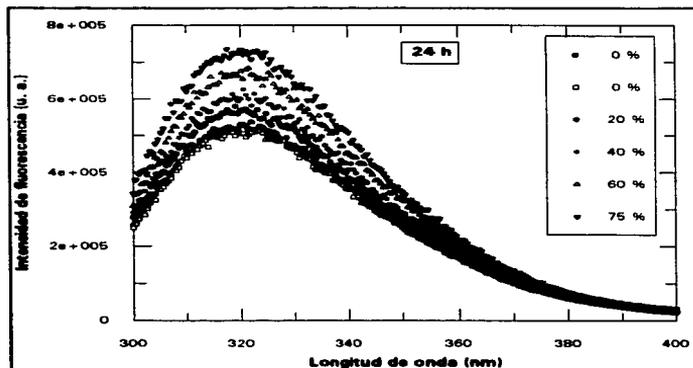


Figura 10 Incubación de la TPI ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h variando la concentración de glicerol. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron tomados a las 24 h después de la incubación.

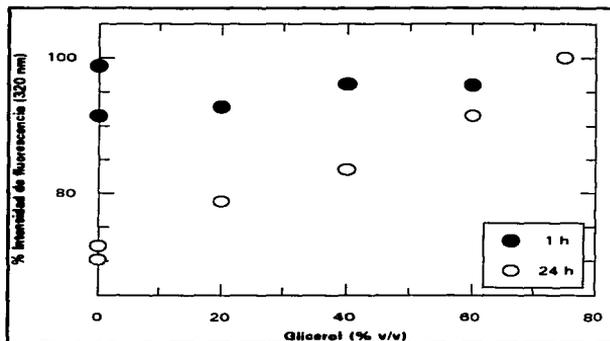


Figura 11 Intensidad de fluorescencia (%) después de 1 y 24 horas de incubación en diferentes porcentajes de glicerol.

A pesar de este efecto protector del glicerol en la fluorescencia intrínseca, la actividad catalítica es independiente de la concentración de glicerol en la preincubación (figura 12), por lo tanto los cambios producidos por el glicerol son reversibles. No hemos profundizado más en el fenómeno de protección de la fluorescencia intrínseca.

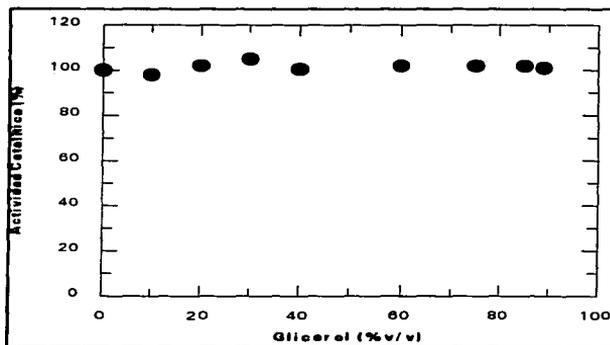


Figura 12 Incubación de la TPI (0.2 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h variando la concentración de glicerol. La actividad se midió como se mencionó previamente en materiales y métodos. (capítulo II)

Renaturalización de la TPI al equilibrio en soluciones con glicerol

Posteriormente se determinó la reversibilidad en la aparición de la función catalítica y de la estructura terciaria al variar la concentración de proteína y de glicerol en la renaturalización. Después de 72 o 96 horas de renaturalización, en todas las condiciones empleadas, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de renaturalización, es decir, no se muestra un patrón reproducible; aunque se muestra una leve disminución en la recuperación de la actividad catalítica al aumentar el contenido de glicerol en la renaturalización (tabla 2).

Tabla 2 Renaturalización (%) de la TPI al variar la concentración de enzima y glicerol, determinado por actividad catalítica y fluorescencia.

	Act		Fluo		Act		Fluo		Act		Fluo		
	100	100	50	50	20	20	10	10	5	5	1	0.2	0.05
●	89	91	108	90	65	80	72	79	76	81	92	90	99
●	106	91	89	86	65	84	67	71	77	78	99	83	80
●	92	93	79	89	73	86	74	83	73	62	107	77	81
●	79	95	75	94	56	83	64	92	56	89	117	75	75
●	64	92	68	96	50	82	50	81	47	106	108	55	50

Act = Determinación de actividad catalítica 72 horas después del inicio de la renaturalización. (%)

Fluo = Determinación de fluorescencia 96 horas después del inicio de la renaturalización. (%)

a Glicerol (% v/v)

b Concentración de TPI $\mu\text{g mL}^{-1}$

La actividad enzimática de las proteínas es uno de los parámetros más sensibles a cambios estructurales. Por lo tanto, se determinaron los parámetros cinéticos K_m^3 y V_{max}^4 , utilizando la ecuación de Michaelis-Menten para la proteína nativa y renaturalizada en soluciones con glicerol; los datos obtenidos se muestran en la tabla 3.

³ K_m = constante de Michaelis; relaciona la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente con la concentración de sustrato.

⁴ V_{max} = velocidad máxima.

Tabla 3 Parámetros cinéticos de la sTPI nativa y renaturalizada

Glicerol (% v/v)	Nativa Km (mM)	G3P Vmax (µmol/min*mg)	Renaturalizada Km (mM)	G3P Vmax (µmol/min*mg)
0	0.77±0.08	11.536±979	0.72±0.09	8148±637
40	0.66±0.08	9.973±454	0.59±0.06	9002±338
75	0.73±0.10	9.878±505	0.76±0.11	7241±397

También se presentan los datos obtenidos por otros autores con la TPI de *Saccharomyces cerevisiae*, y de otras fuentes (tabla 4) sin la presencia de glicerol; en nuestras condiciones los parámetros cinéticos de la sTPI, nativa y renaturalizada son muy semejantes.

Tabla 4 Comparación de Km, de TPIs de diferentes fuentes.

TPI fuente	Nativa G3P Km (mM)	Renaturalizada G3P Km (mM)	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	1.27 ±0.06	1.86±0.12	Krietsch et al., 1970
	1.45±0.05		Hartman y Ratrie, 1974
	1.22±0.05		Lambeir et al., 1987
	1.50±0.01 E		Nickbarg y Knowles, 1988
	1.27±0.06		Sun et al., 1992
0.62±0.05			
Cerveza	0.32±0.02	1.5	Krietsch et al., 1970
	0.32-0.46		Hartman y Norton, 1974*
	0.39		Sawyer y Gracy, 1975
	1.8		Zabori et al., 1980
	0.39±0.05		Lambeir et al., 1987
0.43±0.06	1.40±0.28	Sun et al., 1992	
Bisnoso	0.43	No reportado	Sawyer y Gracy, 1975
	0.49		Mainfroid et al., 1996
Palo	0.39	No reportado	Plaut y Knowles, 1972 *
	0.47		Putman et al., 1972 *
<i>T. brassicae</i>	0.25±0.05	No reportado	Lambeir et al., 1987

E. expresada en *E. coli*

*Tomado de Lambeir et al., 1987

Efecto del glicerol en la cinética de renaturalización (actividad enzimática)

Debido a que la formación de la estructura cuaternaria requiere de la difusión de los monómeros en el solvente, modificamos la viscosidad del amortiguador de renaturalización utilizando glicerol, pues de esta manera disminuimos la frecuencia de choques entre los monómeros.

Con 20% (v/v) de glicerol en la renaturalización, no se observa retraso en la aparición de la función biológica, en tres de las cuatro concentraciones se nota prácticamente la misma velocidad de reactivación, excepto a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 13) en este caso la reactivación es semejante a la observada sin glicerol (figura 8). La reactivación es cercana al 100% antes de los 5 minutos.

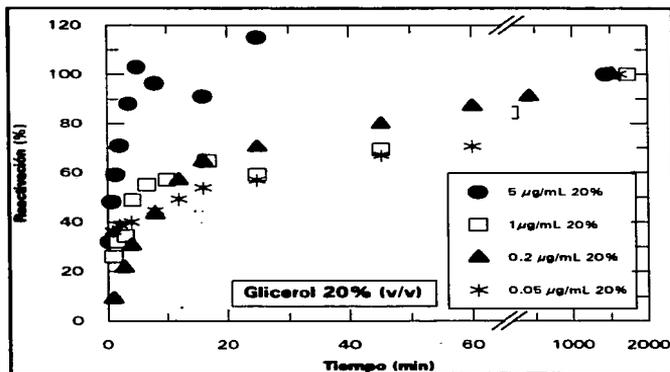


Figura 13 Cinética de reactivación de la TPI a diferentes concentraciones de TPI en presencia de 20% (v/v) de glicerol en la renaturalización

Al aumentar la viscosidad del solvente agregando 40% (v/v) de glicerol en la renaturalización (figura 14), la velocidad de reactivación disminuye, esto es, el paso bimolecular (2° orden) es limitante en todas las concentraciones de enzima empleadas, ya que en todos los

casos, se observa un incremento en la velocidad de renaturalización al aumentar la concentración de proteína. A diferencia de la renaturalización sin glicerol donde la cinética de reactivación es muy semejante con 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

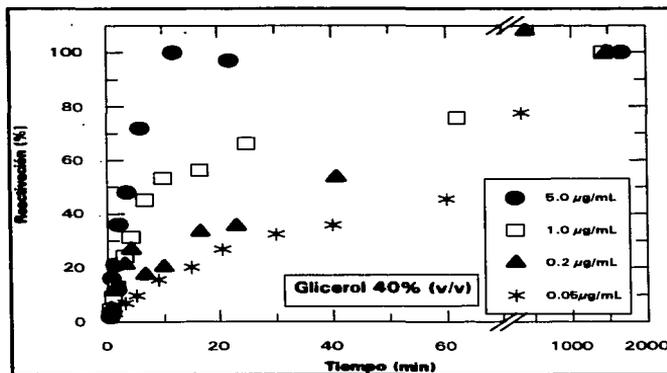


Figura 14 Curso temporal de la reactivación de la TPI a diferentes concentraciones de proteína en presencia de 40% de glicerol en la renaturalización.

Al aumentar el porcentaje de glicerol en la renaturalización, a 60 (figura 15) se observa además, un retraso en la aparición de la actividad catalítica de 3 horas (60 % v/v) mientras que en 75 (% v/v) se requiere hasta de 5-6 horas (figura 16) para que se observe actividad, en este tiempo, solo se obtiene el 20 % de la actividad que la enzima recupera a las 72 horas; por lo tanto a concentraciones elevadas de glicerol se observa un retraso en la aparición del intermediario (M* o D*) que da lugar a la enzima nativa.

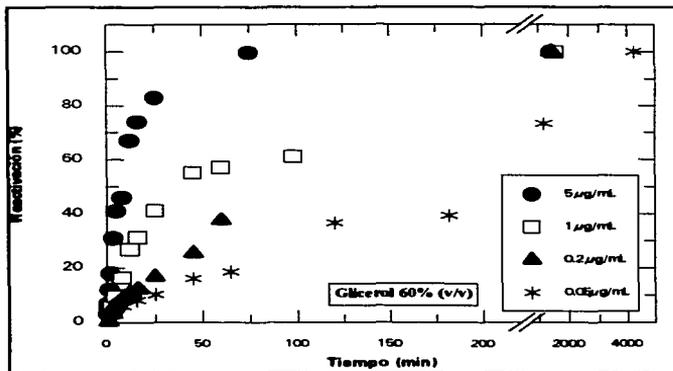


Figura 15 Curso temporal de la reactivación de la TPI a diferentes concentraciones de proteína, en presencia de 60 % de glicerol.

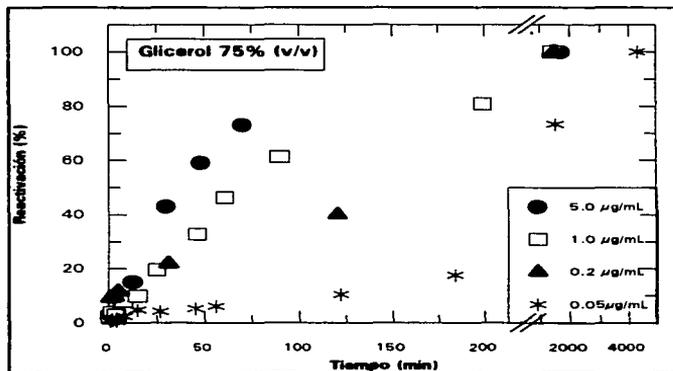


Figura 16 Curso temporal de la reactivación de la TPI a diferentes concentraciones de proteína, en presencia de 75 % de glicerol.

Efecto del glicerol en la cinética de renaturalización (Fluorescencia intrínseca)

Con el objeto de determinar las características estructurales de los conformeros presentes durante la reactivación, se utilizó la espectroscopia de fluorescencia del triptofano. Esta técnica nos permite obtener información acerca de la estructura terciaria, es decir nos permite conocer el ambiente que rodea a los aminoácidos aromáticos en la proteína. El siguiente ensayo muestra la cinética de renaturalización de la TPI ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en amortiguador TED 100/10/1 mM pH 7.4 y en presencia de 75 (% v/v) por duplicado (figura 17).

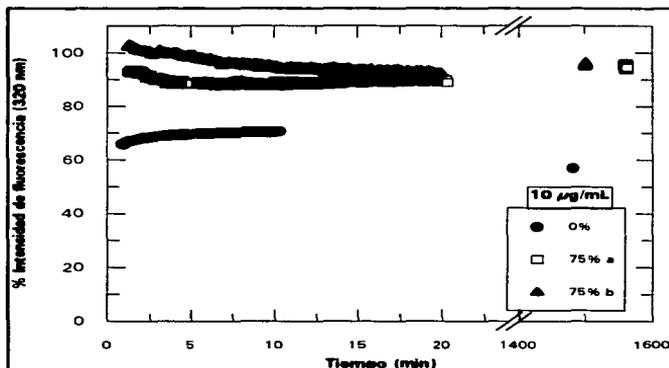


Figura 17 Curso temporal de la reactivación de la TPI ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) renaturalizada en amortiguador y en presencia de 75% v/v de glicerol, determinada por fluorescencia intrínseca (λ 320 nm)

Al reactivar a la TPI ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) tanto en amortiguador, como en soluciones con 75% v/v de glicerol (figura 17), se obtiene aproximadamente la misma señal de fluorescencia en los primeros minutos que a las 24 horas; por lo tanto disminuimos la concentración de proteína

para lograr observar algún cambio en la señal de fluorescencia de la TPI al renaturalizarse. Esto es difícil ya que la relación blanco-muestra es muy grande a concentraciones elevadas de glicerol, las concentraciones más bajas de proteína para la que es posible tener una señal de fluorescencia confiable son $1 \mu\text{g TPI mL}^{-1}$ sin glicerol, $2.5 \mu\text{g TPI mL}^{-1}$ en presencia de 40% (v/v) de glicerol (figura 18) y $10 \mu\text{g TPI mL}^{-1}$ con 75% (v/v) de glicerol.

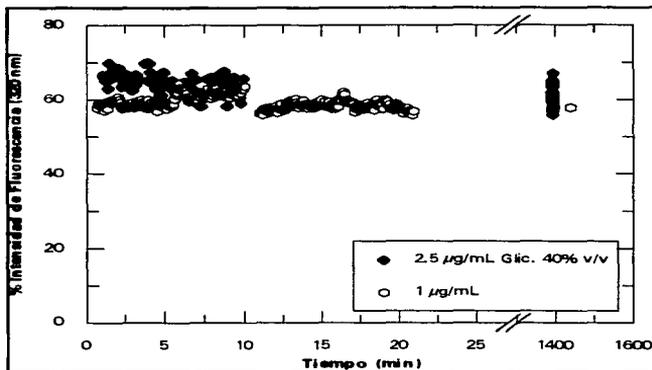


Figura 18 Cinética de renaturalización, determinada por fluorescencia intrínseca (320 nm) TPI (1 y $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en 40 % v/v glicerol)

El ensayo anterior de fluorescencia intrínseca nos indica que el ambiente que rodea a los aminoácidos aromáticos es semejante en el intermediario y en la proteína nativa, ya que en el primer minuto, obtenemos la misma fluorescencia que la mostrada a las 24 horas. A pesar de que la estructura terciaria muestra un ambiente semejante en los triptofanos, los aminoácidos del sitio activo no se encuentran aún con la conformación adecuada, ya que la recuperación de la actividad es un proceso más lento (figura 8), esto puede deberse a que el sitio activo no este del todo arreglado en el intermediario.

Discusión y Conclusiones

Conocer más acerca del plegamiento no solo de proteínas monoméricas, sino también de la asociación de proteínas oligoméricas, nos permitirá conocer si efectivamente, existe un código de plegamiento que pueda llegar a predecir para una cadena lineal de aminoácidos el tipo de plegamiento que tendrá en su forma biológicamente activa.

En el presente trabajo describimos la formación de una estructura oligomérica a partir de las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas o abiertas, utilizando uno de los modelos más sencillos, la enzima homodimérica, Triosafosfato Isomerasa.

Los resultados obtenidos se discuten a continuación:

Efecto del glicerol en la TPI nativa y renaturalizada.

Como se mostró en los resultados, la presencia del glicerol en la TPI no tiene efectos irreversibles. En la TPI nativa, el glicerol protege la señal de fluorescencia intrínseca (figura 11) y la actividad catalítica, la cual permanece constante aun después de preincubar a la TPI en glicerol por 24 horas (figura 12). La TPI renaturalizada no muestra diferencias significativas en cuanto al porcentaje de renaturalización (tabla 2) determinado por actividad catalítica y/o fluorescencia intrínseca. Los parámetros cinéticos son semejantes para la TPI nativa y la renaturalizada (tabla 3) tanto en ausencia como en presencia de glicerol; estos valores son similares a los reportados por otros autores (tabla 4). Estos datos nos indican que en nuestras condiciones, la enzima nativa y la renaturalizada en ausencia y presencia de glicerol son semejantes. Por lo tanto los procesos estudiados son completamente reversibles.

Renaturalización de la TPI.

Para describir el mecanismo de plegamiento de la sTPI es necesario postular la presencia de un intermediario ($2M \rightarrow I \rightarrow D$) durante la renaturalización de la enzima (figura 8), ya que el paso limitante en la reacción es unimolecular o bimolecular dependiendo de la concentración de proteína en el experimento. En el caso del modelo uni-bimolecular ($2M \rightarrow 2M^* \rightarrow N$) el paso que limita la reacción a bajas concentraciones de proteína es $2M^* \rightarrow D$, esto es, el paso de monómero competente a dímero activo, mientras que a concentraciones de proteína mayores, el paso limitante es unimolecular $2M \rightarrow 2M^*$ (reacción de primer orden), es decir, el paso del monómero desnaturalizado a monómero competente.

En el modelo bi-unimolecular ($2M \rightarrow D^* \rightarrow D$) a concentraciones bajas de enzima, el paso limitante es $2M \rightarrow D^*$, el paso de monómero desnaturalizado a dímero no nativo, por otra parte, a concentraciones de proteína altas, el paso que limita la reacción es unimolecular $D^* \rightarrow D$; el paso de dímero no nativo a dímero activo.

Renaturalización de la TPI en presencia de glicerol.

La renaturalización de la TPI se modifica por la adición de glicerol en el amortiguador de renaturalización como se resume a continuación:

En presencia de 40% (v/v) de glicerol (figura 14) la velocidad del paso bimolecular disminuye. $2M^* \rightarrow D$ (para el primer modelo) y $2M \rightarrow D^*$ (para el segundo), en cualquiera de los dos casos, la asociación de los monómeros es mas lenta en este intervalo de concentraciones ($0.5-5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$), pues estamos disminuyendo la frecuencia de choques entre las especies; en el primer modelo se asocian dos monómeros competentes y en el segundo dos monómeros "parcialmente plegados" pero no activos.

Este efecto es más evidente al aumentar el porcentaje de glicerol a 60 (figura 15) y 75% (v/v) (figura 16). En estos casos se observa, además de la disminución del paso bimolecular, un retraso considerable en la aparición de la actividad catalítica. Esto sugiere, que el paso unimolecular también se afecta por el glicerol. Si nos referimos al primer modelo, las concentraciones elevadas de glicerol afectan la velocidad de plegamiento de los monómeros ($2M \rightarrow 2M^*$), en este caso, el paso limitante es el del plegamiento intramolecular del monómero. Ya que $k_1 \gg k_2$ el paso que limita la renaturalización de la TPI es el unimolecular de primer orden, por lo tanto, el proceso se vuelve independiente de la concentración.

En el segundo modelo, el paso que limita al proceso es $D^* \rightarrow D$, aunque la enzima ya está asociada, el paso mas lento es el reordenamiento para dar lugar al sitio activo con función catalítica. Esto es, si $k_1 \ll k_2$ el paso que limita la renaturalización de la TPI en presencia de alto contenido de glicerol (60 y 75 % v/v) es el unimolecular (de primer orden) posterior a la asociación de los monómeros.

La renaturalización de la TPI determinada por fluorescencia intrínseca (figuras 17 y 18), muestra en todas las concentraciones de enzima y de glicerol, que el ambiente que rodea a los aminoácidos aromáticos en la proteína nativa es semejante en el intermediario; desconocemos sin embargo, si el intermediario es un monómero competente (M^*) o un dímero no nativo (D^*).

La sTPI tiene 3 triptofanos por cada subunidad y ninguno de ellos se encuentra en la interfase monómero-monómero, esto nos permite decir que el interior del barril en el intermediario y en el dímero es semejante al menos por fluorescencia.

Los experimentos presentados, indican que en la Triosafosfato Isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* al igual que en la enzima de conejo (Waley 1973; Zabori et al, 1980) el paso limitante depende de la concentración de proteína en la renaturalización. Es importante

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

señalar, que en todas las condiciones mostradas, el porcentaje de recuperación de la actividad biológica y de la estructura terciaria es cercano al 100% e independiente de la concentración de glicerol (tabla 2). Por otra parte, la enzima nativa y renaturalizada son semejantes en cuanto a los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , por lo tanto, el glicerol modifica principalmente la velocidad de interconversión de los confómeros presentes durante la renaturalización.

Ya que la fluorescencia observada después del primer minuto, es semejante a la obtenida a las 24 horas, los monómeros competentes o el dímero no nativo tienen una estructura terciaria semejante a la encontrada en el dímero activo. En presencia de 60 y 75% de glicerol se observa, además del retraso en la asociación de los monómeros, un retraso considerable en la aparición de la actividad catalítica (figura 15 y 16). Esto sugiere fuertemente que la reacción intramolecular que da lugar a monómeros competentes o al dímero activo, se retrasa en presencia de glicerol por un arreglo intramolecular de los confómeros en el primer modelo cinético o por un rearrreglo intermolecular (reshuffling) de las cadenas en el segundo.

Perspectivas

Algunas interrogantes interesantes que surgen de este trabajo son:

- **Estudiar las características estructurales y estado de asociación del intermediario.**
- **Encontrar el modelo matemático que se ajuste y describa al proceso de plegamiento, para determinar las constantes cinéticas del proceso y dilucidar cual de los dos modelos aquí planteados es el correcto.**
- **Estudiar las características estructurales de los conformeros en los primeros eventos en la ruta de plegamiento (orden de milisegundos)**
- **Determinar si existen diferencias al utilizarse otros agentes desnaturalizantes, para encontrar si el estado nativo y el estado desnaturalizado son los mismos para los diferentes agentes.**
- **Estudiar la contribución del glicerol en la estabilidad de la sTPI**

Referencias

- Anfinsen, C. B.** 1973. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*. **181**: 223-230.
- Banner, D. W., A. C. Bloomer., G. A. Petsko., D. C. Phillips., C. I. Pogson., I. A. Wilson. P. H. Corran., A. J. Furth., J. D. Milman., R. E. Offord., J. D. Priddle y S. G. Waley.** Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*. **255**: 609-614.
- Blacklow, S. C., R. T. Raines., W. A. Lim., P. D. Zamore y J. R. Knowles.** 1988. Triosephosphate Isomerase Catalysis Is Diffusion Controlled. *Biochemistry*. **27**:1158-1167.
- Cleland, J. L., C. Hedgepeth y D. I. C. Wang.** 1992. Polyethylene Glycol Enhanced Refolding of Bovine Carbonic Anhydrase B. *Journal of Biological Chemistry*. **267**: 13327-13334.
- Chothia, C.** 1984. Principles that determine the structure of proteins. *Annual Reviews in Biochemistry*. **53**: 537-572.
- Chrnyk, B., y R. C. Matthews.** 1990. Role of Diffusion in the folding of the α Subunit of Tryptophan Synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **29**: 2149-2154.
- Creighton, T. E.** 1990. Protein Folding. *Biochemical Journal* **270**: 1-16.
- Creighton, T. E.** 1993. "Proteins: Structures and Molecular Properties." (2ª Ed) W. H. Freeman and Co. N. Y.
- Delboni, L. F., S. C. Mande., F. Rentier-Delrue., V. Mainfroid., S. Turley., F. M. D. Vellieux., J. A. Martial y W. G. J. Hol.** 1995. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential

thermostability factors in six isomerases with known three dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science*. **4**: 2594-2604

Dill, K. A. y D. Shortle. 1991. Denatured States of Proteins. *Annual Reviews in Biochemistry*. **60**: 795-825.

Eder, J. y K. Kirschner. 1992. Stable Substructures of Eightfold $\beta\alpha$ -Barrel Proteins: Fragment Complementation of Phosphoribosylanthranilate Isomerase. *Biochemistry*. **31**: 3617-3625.

Gekko, K. y H. Ito. 1990. Competing Solvents Effects of Polyols and Guanidine Hydrochloride on Protein Stability. *Journal of Biochemistry*. **107**: 572-577.

Gekko, K. y S. N. Timasheff. 1981. Thermodynamic and Kinetic Examination of Protein Stabilization by Glycerol. *Biochemistry*. **20**: 4677-4686.

Hartman, F. C. y H. Ratrie. 1977. Apparent equivalence of the active-site glutamyl residue and the essential group with pK_a 6.0 in Triosephosphate Isomerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **77**: 746-752.

Huang, P., A. Dong y W. S. Caughey. 1995. Effects of Dimethyl Sulfoxide, Glycerol and Ethylene Glycol on Secondary Structures of Cytochrome *c* and Lysozyme As Observed by Infrared Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **84**: 387-392.

Jaenicke, R. 1987. Folding and Association of Proteins. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **49**: 117-237.

Jaenicke, R. 1991. Protein Folding: Local Structures, Domains, Subunits, and Assemblies. *Biochemistry*. **30**: 3147-3161.

Jaenicke, R. 1996. Protein Folding and Association: In Vitro Studies for Self-Organization and Targeting in the cell. *Current Topics in Cellular Regulation*. Academic Press, Inc. **34**: 209-314

- Jaenicke, R. y R. Rudolph** 1986. Refolding and Association of Proteins. *Methods in Enzymology*. **131**: 218-250.
- Jarabak, J., E. Seeds y P. Talalay.** 1966. Reversible Cold Inactivation of a 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase of Human Placenta: Protective Effect of Glycerol. *Biochemistry*. **5**: 1269-1279.
- Knowles, J. R.** 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* (London). **350**:121-124.
- Knowles, J. R. y J. W. Albery.** 1977. Perfection in Enzyme Catalysis: The Energetics of Triosephosphate Isomerase. *Accounts of Chemical Research*. **10**:105-111.
- Kohlhoff, M., A. Dahm y R. Hensel.** 1996 Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters*. **383**: 245-250.
- Krietsch, W. K. G., P. G. Pentchev., H. Klingenburg., T. Hofstätter y T. Bücher.** 1970. The Isolation and Crystallization of Yeast and Rabbit Liver Triose Phosphate Isomerase and a Comparative Characterization with the Rabbit Muscle Enzyme. *European Journal of Biochemistry*. **14**: 289-300
- Lambeir, A., F. R. Opperdoes y R. K. Wierenga.** 1987. Kinetic properties of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *European Journal of Biochemistry*. **168**: 69-74
- Levitt, M. y C. Chothia.** 1976. Structural patterns in globular proteins. *Nature*. **261**: 552-557.
- Lolis, E., T. Alber., R. C. Davenport., D. Rose., F. C. Hartman y G. A. Petsko.** 1990. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*. **29**: 6609-6618.
- Maniatis, T., Fritch, E.F. and Sambrooks, J.** 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Mainfroid, V., P. Terpstra., M. Beauregard, J. Frère., S. C. Mande., W. G. J. Hol., J. A. Martial y K. Goraj.** 1996. Three hTIM Mutants that Provide New Insights on why TIM is a Dimer. *Journal of Molecular Biology.* **257:** 441-456.
- Mande. S. C., V. P. Mainfroid., K. H. Kalk., K. Goraj., J. A. Martial y W. G. J. Hol.** 1994. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. *Protein Science.* **3:** 810-821.
- Matthews, R. C.** 1993. Pathways of Protein Folding. *Annual Reviews in Biochemistry.* **62:** 653-683.
- McVittie, J. D., P. M. Esnouf y A. R. Peacocke.** 1977. The denaturation-renaturation of Chicken-Muscle Triosephosphate Isomerase in guanidinium chloride. *European Journal of Biochemistry.* **81:**307-315.
- Nickbarg, E. B. y J. R. Knowles.** 1988. Triosephosphate Isomerase: Energetics of the Reaction Catalyzed by the Yeast Enzyme Expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **27:** 5939-5947.
- Noble, M. E. M., J. P. Zeellen, J. P., R. K. Wierenga., V. Mainfroid., K. Goraj., A. C. Gohimont y J. A. Martial.** 1993. Structure of triosephosphate isomerase from *E. Coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog.* sect. D. **49:** 403-417.
- Oliveira, A. C., L. P. Gaspar., A. T. Da Poian y J. L. Silva.** 1994. Arc Repressor will not denature Under Pressure in the Absence of Water. *Journal of Molecular Biology.* **240:** 184-187.
- Penefsky, H. S.** 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry.* **252:**2891-2899.

- Plomer J. J. y A. Gafni.** 1993. Renaturation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* after denaturation in 4 M guanidine hydrochloride: kinetics of aggregation and reactivation. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1162**:89-96
- Privalov, P. L.** 1979. Stability of Proteins. *Advances in Protein Chemistry.* **33**: 167-241.
- Rossmann, M. G. y P. Argos.** 1981. Protein Folding. *Annual Reviews in Biochemistry.* **50**: 497-532.
- Sawyer, T. H. y R. W. Gracy.** 1975. Ligand Binding and Denaturation Titration of Free and Matrix-Bound Triosephosphate Isomerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **169**: 51-57.
- Schnackerz, K. D. y R. W. Gracy.** 1991. Probing the catalytic sites of triosephosphate isomerase by ³¹P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *European Journal of Biochemistry.* **199**: 231-238
- Shortle, S., A. K. Meeker y S. L. Gerring.** 1989. Effects of Denaturants at Low Concentrations on the Reversible Denaturation of Staphylococcal Nuclease. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **272**: 103-113.
- Sun, A. Q., K. Ü. Yüksel y R. W. Gracy.** 1992. Interactions between the Catalytic Centers and Subunit Interface of Triosephosphate Isomerase Probed by Refolding, Active Site modification, and Subunit Exchange. *Journal of Biological Chemistry.* **267**: 20168-20174.
- Tanford, C.** 1970. Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry.* **24**: 1-95
- Timasheff, S. N., J. C. Lee., E. P. Pittz y N. Tweedy.** 1976. *Journal of Colloid and Interface Science.* **55**: 658-663.
- Waley, S. G.** 1973. Refolding of Triose Phosphate Isomerase. *Biochemical Journal.* **135**: 165-172

- Wierenga, R. K., M. E. M. Noble., G.Vriend., S. Nauche y W. G. J. Hol.** 1991. Refined 1.83 Å structures of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *Journal of Molecular Biology*. **220**: 995-1015.
- Wierenga, R. K., M. E. M. Noble y R. C. Davenport.** 1992. Comparison of the Refined Crystal Structures of Liganded and Unliganded Chicken, Yeast and Trypanosomal Triosephosphate Isomerase. *Journal of Molecular Biology*. **224**:1115-1126.
- Zabori, S., R. Rudolph y R. Jaenicke.** 1980. Folding and Association of Triose Phosphate Isomerase from Rabbit Muscle. *Z. Naturforsch.* **35c**: 999-1004.
- Zhang, Z., S. Sugio., E. A. Komives., K. D. Liu., J. R. Knowles., G. A. Petsko y D. Ringe.** 1994. Crystal Structures of Recombinant Chicken Triosephosphate Isomerase-Phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8 Å Resolution. *Biochemistry*. **33**: 2830-2837.
- Zhi, W., S. J. Landry., L. M. Gierasch y P. A. Srere.** 1992. Renaturation of citrate synthase: Influence of denaturant and folding assistants. *Protein Science*. **1**: 522-529.