

11281

*UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO*

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE PLEGAMIENTO Y
ASOCIACIÓN DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
*Saccharomyces cerevisiae***

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS PRESENTA

EDGAR VÁZQUEZ-CONTRERAS

MAYO DE 2000

278984



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México .

A María Elena

**A Elizabeth
Alejandro
Jesús
y
Josefina Galicia**

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Una cosa que hace que el paso por esta vida me sea mas
agradable, es que
cuando yo me muera,
se muere todo.**

RESUMEN

En este trabajo se reporta un intermediario al equilibrio así como una evaluación directa de los cambios en energía libre en la desnaturalización de la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa (TPI o TIM). La TPI de *Saccharomyces cerevisiae* fue equilibrada en soluciones de cloruro de guanidinio (Gdn-HCl) o urea. En ambas transiciones se determinaron las alteraciones en la fluorescencia intrínseca y el dicroísmo circular, así como las propiedades hidrodinámicas y catalíticas. En urea el dímero nativo se disocia y desnaturaliza en un proceso de dos estados ($N \rightleftharpoons 2U$) sin intermediarios detectables al equilibrio y con un ΔG^{H_2O} de 17.0 ± 0.4 kcal mol⁻¹. Por el contrario en la desnaturalización por Gdn-HCl, se observó un intermediario capaz de unir 1-anilinoftaleno-8-sulfonato (ANS). Experimentos de filtración en gel, centrifugación al equilibrio y dispersión dinámica de luz indican que este intermediario es un monómero. Los datos espectroscópicos obtenidos a partir de la desnaturalización por Gdn-HCl se analizaron en términos de un modelo de tres estados con un intermediario monomérico ($N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$); no fue posible obtener los cambios en energía libre asociados al proceso, después del tratamiento los valores de m y ΔG^{H_2O} poseen errores inaceptables. Es posible incrementar la fracción de intermediario en experimentos a concentraciones altas y constantes de Gdn-HCl + NaCl. Todos los cambios en energía libre involucrados en las transiciones en urea y en Gdn-HCl se obtuvieron utilizando el método tradicional de la extrapolación lineal. De acuerdo con los valores de ΔG^{H_2O} obtenidos para el proceso de dos estados en urea o para el de tres estados en Gdn-HCl + NaCl, en ausencia de desnaturalizantes, la actividad catalítica de la TPI permanece constante en el intervalo de 7.4 pM - 0.2 μ M. Los valores de ΔG^{H_2O} obtenidos son comparables con los reportados para la TPI de humano utilizando mutantes monoméricas y para la enzima de conejo usando métodos cinéticos y datos al equilibrio. En las tres TPIs eucariontes, la asociación de los monómeros provee más del 75 % de la energía total del proceso de plegamiento/asociación y los monómeros son marginalmente estables (1.2 a 2.5 kcal mol⁻¹). Estas observaciones se han interpretado como una indicación de que la TPI es un dímero principalmente por razones de estabilidad. Alternativamente, proponemos que para un dímero como la TPI ($k_d = 0.02$ pM), no existe presión evolutiva para mantener un monómero muy estable, de hecho existen barriles β/α monoméricos marginalmente estables. Estas consideraciones sugieren que la baja estabilidad de los monómeros es una consecuencia y no la razón para la naturaleza oligomérica de la TPI y apoya la idea de que el acomodo de los sitios catalíticos al realizarse la dimerización, es un prerequisite para su función biológica.

ABSTRACT

In this work is reported an equilibrium intermediate in the unfolding of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase (TIM or TPI), and of a direct evaluation of the free energy changes involved. TIM from *Saccharomyces cerevisiae* was equilibrated in guanidinium hydrochloride (Gdn-HCl) or urea solutions. Alterations in intrinsic fluorescence and far UV circular dichroism, as well as hydrodynamic and catalytic properties of TIM were determined in both transitions. In urea, the native dimer dissociates and unfolds in a two-state process ($N \rightleftharpoons 2U$) without detectable equilibrium intermediates and an associated ΔG^{H_2O} of 17.0 ± 0.4 kcal mol⁻¹. In contrast, an intermediate state able to bind 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) was observed in Gdn-HCl denaturation. Gel filtration, equilibrium centrifugation and dynamic light scattering experiments indicated that this intermediate is a monomer. Spectroscopic data for Gdn-HCl induced denaturation were analyzed in terms of a three-state model involving a monomeric intermediate ($N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$). In this denaturant, it was impossible obtain the changes in free energy, after this treatment the m and ΔG^{H_2O} values have unacceptable errors. The fraction of intermediate increased in experiments at high and constant (Gdn-HCl + NaCl) concentrations. All the free energy changes involved in the transitions in urea and in Gdn-HCl were obtained using the traditional lineal extrapolation method. In agreement with the ΔG^{H_2O} values obtained from the two-state process observed in urea, or the three-state process observed in Gdn-HCl + NaCl, in the absence of denaturants the catalytic activity of TIM remained constant in the 7.4 pM - 0.2 μ M range. The ΔG^{H_2O} values obtained are comparable with those reported for human TIM using monomeric mutants and for rabbit TIM using kinetic and equilibrium data. In the three eukariotic TIMs, monomer association provides more than 75% of the overall free energy of the folding/association process, and monomers are marginally stable (1.2 to 2.5 kcal mol⁻¹). These observations have been interpreted as an indication that TIM is a dimer mainly because of stability reasons. Alternatively, we propose that for a tight dimer like TIM ($K_d = 0.02$ pM), there is no functional pressure to maintain a very stable monomer; indeed, functional and marginally stable monomeric β/α barrels have been observed. These considerations suggest that the low stability of the monomer is a consequence, and not the reason, of the oligomeric nature of TIM, and support the hypothesis that induced fit upon dimerization is a prerequisite for its biological function.

AGRADECIMIENTOS

A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Los integrantes del comité tutorial

Dr. Armando Gómez-Puyou, Dr. Miguel Costas Basin,
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Los miembros del jurado

Dr. Andrés Hernández Arana, Dr. Ruy Pérez Montfort,
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco,
Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Dr. Eduardo Horjales Rebedo,
Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Arturo Rojo Domínguez

La camaradería y amistad de mis compañeros de laboratorio

Adrián Kornhauser, Hugo Nájera.
Socorrito

Los sabios consejos de los Doctores

Miguel Costas y Rafael Zubillaga
Marieta Tuena y Armando Gómez-Puyou

La solidaridad, preocupación y ayuda de

Jorge Ramírez, también a Leo, Jorgito e Iván

La paciencia con que me introdujo a la ciencia

Dr. Georges Dreyfus Cortés

Toda la lata que le di a

Sra. María Elena, Sr. Lino y a mi amigo Hilario.

Los alquimistas

Eduardo, Pável y Jorge

Ariel González (ya aparécete)

La memoria de

Germán Cháñez

Los excelentes momentos con

Soledad y Jorge (gracias por todo), Pável y Andrea, Tania y Pablo,
Eduardo y Yareli, Bertha González, Gerardo Pérez, Alejandro Sosa,
Manuel Aguilar, Manuel Romero, Elena Hilario, Salomón, Carolina y
Cuahutemoc Gamboa, Güera y Miguel, Sr. Pepe y Sra. Alejandra
(gracias por su ayuda), Alejandro Montes, Héctor Ceceña, Héctor
Cabrera, Ema Cháñez, Rosenda Quiroz, Isabel Velazquez,
Georgina Garza, Leticia Ramírez, Nicolás Levín, Sra. Maru, Ember,
Oscar Flores, Horacio, Lenin, Jesús. Josefina Cárdenas (gracias)

Rosa y Orlando Contreras

Índice

	Página
Introducción	1
PLEGAMIENTO Y ASOCIACIÓN	1
TERMODINÁMICA DEL PLEGAMIENTO	3
Generalidades	3
Oligómeros	10
Intermediarios Estables	11
El glóbulo fundido	13
Posibles papeles del glóbulo fundido <i>in vivo</i>	15
BARRILES β/α	17
Generalidades	17
Plegamiento de los Barriles β/α	19
Generalidades	19
Mecanismo general para el plegamiento de los barriles β/α	20
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA	20
Generalidades	20
Catálisis	21
La naturaleza dimérica de la <i>TPI</i> es necesaria para su catálisis	23
Desnaturalización de la triosafosfato isomerasa	24
Objetivos	27
Justificación	28
Materiales y Métodos	29
Reactivos	29
Condiciones de sobre expresión	29
Purificación de la <i>sTPI</i> recombinante	29
Caracterización de la proteína	30
Condiciones de reversibilidad	31
Experimentos de desnaturalización	31
Intensidad de fluorescencia	31
Dicroísmo circular	32
Determinación de la fracción nativa (<i>N</i>)	32
Cinética de desnaturalización por dos pasos	33
Cromatografía líquida de exclusión molecular en presencia de desnaturalizantes	33
Ultracentrifugación analítica	34
Dispersión de luz dinámica	34

	Página
Efecto de la concentración de sal en la estabilidad del intermediario	34
Disociación por dilución	34
Análisis termodinámico de los datos de desnaturalización	35
Análisis de dos estados	35
Análisis de tres estados	37
Resultados y discusión	40
Tiempos de equilibrio y reversibilidad	40
Estructura secundaria y terciaria	42
Actividad catalítica	43
¿Es la desnaturalización de la <i>sTPI</i> , un proceso de dos estados?	45
Fracción nativa obtenida por experimentos cinéticos y al equilibrio	45
Unión de 8-anilino-naftaleno-1-sulfonato	48
Estado de asociación del intermediario	49
Efecto de la concentración de sal en la estabilidad del intermediario	51
El sitio activo del intermediario	51
Disociación por dilución	53
Análisis termodinámico de los datos de desnaturalización	56
Análisis de dos estados para la desnaturalización inducida por urea	56
Análisis de tres estados para la desnaturalización inducida por Gdn-HCl	57
Discusión general	60
Desnaturalización de la <i>TPI</i>	60
Plegamiento de otros barriles β/α	61
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Referencias	66

Índice de Figuras

Página

Figura 1. A Perspectiva de un segmento de cadena polipeptídica formada por dos residuos. B Posición de las conformaciones regulares de los polipéptidos en una gráfica de Ramachandran.	4
Figura 2. Estructura del cloruro de guanidinio (Gdn-HCl) (A) y la urea (B).	7
Figura 3. Estructura de la hoja β de los barriles "TIM", $(\beta\alpha)_8$ o (α/β) .	18
Figura 4. Estructura secundaria de la <i>sTPI</i> .	21
Figura 5. A. Mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa B. La molécula de 2-fosfoglicolato, el metil glioxal fosfato y de metilglioxal.	23
Figura 6. Reacción acoplada para la cuantificación de catálisis de la triosafosfato isomerasa.	30
Figura 7. Tiempo de equilibrio para la desnaturalización de la <i>sTPI</i> inducida por Gdn-HCl (A) y urea (B).	40
Figura 8. Desnaturalización al equilibrio de la <i>sTPI</i> seguida por cambios en la fluorescencia intrínseca. A. Cambios en la fluorescencia intrínseca seguidos en el λ_{\max} (320 nm) de la <i>sTPI</i> nativa B. Cambios en λ_{\max} .	42
Figura 9. Desnaturalización al equilibrio de <i>sTPI</i> seguida por cambios en el dicroísmo circular	43
Figura 10. Fracción nativa (X_N) de <i>sTPI</i> a partir de los datos espectroscópicos y de actividad catalítica.	44

Figura 11.

Experimento de dos pasos para la desnaturalización de *sTPI* equilibrada en cloruro de guanidinio. A. Cambios en la intensidad de fluorescencia a la λ_{\max} de la *sTPI* nativa. B. Cambios fraccionales asumiendo un comportamiento de dos estados

46

Figura 12.

Experimento de dos pasos para la desnaturalización de *sTPI* equilibrada en urea. A. Cambios en la intensidad de fluorescencia a la λ_{\max} de la *sTPI* nativa. B. Cambios fraccionales asumiendo un comportamiento de dos estados

47

Figura 13.

Unión del ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS) a la *sTPI* después de la desnaturalización inducida por cloruro de guanidinio o urea.

49

Figura 14.

Propiedades hidrodinámicas de *sTPI* en presencia de por cloruro de guanidinio.

50

Figura 15.

Efecto de la fuerza iónica en la desnaturalización al equilibrio de la *sTPI* inducida por cloruro de guanidinio. A. Muestras de *sTPI* equilibradas con concentraciones crecientes de Gdn-HCl. La concentración de cloruro fue ajustada a 1.5M ó 2.0M, agregando NaCl. B. Se agregó 100 μ M de ANS.

52

Figura 16.

Disociación por dilución.

54

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1 Diferencias entre los estados <i>N</i> y <i>U</i>	8
Tabla 2 Comportamiento de algunos oligómeros en la ruta de plegamiento y asociación.	11
Tabla 3. Proteínas en las que se ha encontrado al glóbulo fundido en la desnaturalización.	14
Tabla 4. Ensayos de reversibilidad de la <i>sTPI</i> .	41
Tabla 5 Análisis de dos estados para la desnaturalización de la <i>sTPI</i> en urea.	56
Tabla 6 Análisis de tres estados para la desnaturalización de la <i>sTPI</i> en Gdn-HCl y Gdn-HCl + NaCl	58

INTRODUCCIÓN

El mecanismo principal que lleva a la adquisición de la estructura y función de las proteínas es el plegamiento. Este proceso consiste en la transformación de la estructura primaria: la secuencia de aminoácidos - que se encuentra en múltiples conformaciones al azar - en la entidad tridimensional con actividad biológica a la cual satisface prácticamente una sola estructura. A pesar de que este proceso se ha estudiado ampliamente, la forma en que esta transición tridimensional lleva a la estructura con función biológica, permanece como uno de los enigmas de la bioquímica. En algunos casos, el plegamiento puede realizarse *in vitro* sin información adicional o entrada de energía; de ahí que sea posible estudiar el proceso en términos fisicoquímicos. Al plegamiento también se le conoce como la *segunda parte de código genético* pues toda la información necesaria para que el proceso se lleve a cabo se encuentra almacenada en la simple estructura primaria y en sus interacciones con el solvente que la contiene. Sumado a lo anterior, en la naturaleza se encuentra repetidamente el fenómeno de la oligomerización, en el cual además del plegamiento, se necesita del ensamblaje de subunidades. Existen numerosos ejemplos de enzimas en las cuales el estado de asociación interviene directamente en la activación, inhibición o cooperatividad de la catálisis.

El trabajo que se presenta a continuación, está centrado en el estudio de la ruta de plegamiento y asociación de una enzima homodimérica, el modelo más sencillo de un oligómero, la trifosfato isomerasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuando se desnaturaliza por desnaturalizantes.

PLEGAMIENTO Y ASOCIACIÓN

Cada polipéptido comienza su existencia al emerger su extremo amino terminal del ribosoma. Su secuencia aminoacídica deriva de la traducción de la secuencia específica que se encuentra entre el codón de inicio y término en el ARN mensajero. En algún momento muy temprano de su vida, el polipéptido se pliega para dar origen a la **estructura nativa (N)**, también referida como **estado plegado** que es la conformación en la cual pasará el resto de su existencia y que es la única capaz de realizar su función biológica específica. La conformación de mínima energía del polipéptido en *N* se determina por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Para identificar fácilmente a *N* es necesario definir al **estado**

INTRODUCCIÓN

El mecanismo principal que lleva a la adquisición de la estructura y función de las proteínas es el plegamiento. Este proceso consiste en la transformación de la estructura primaria: la secuencia de aminoácidos - que se encuentra en múltiples conformaciones al azar - en la entidad tridimensional con actividad biológica a la cual satisface prácticamente una sola estructura. A pesar de que este proceso se ha estudiado ampliamente, la forma en que esta transición tridimensional lleva a la estructura con función biológica, permanece como uno de los enigmas de la bioquímica. En algunos casos, el plegamiento puede realizarse *in vitro* sin información adicional o entrada de energía; de ahí que sea posible estudiar el proceso en términos fisicoquímicos. Al plegamiento también se le conoce como la *segunda parte de código genético* pues toda la información necesaria para que el proceso se lleve a cabo se encuentra almacenada en la simple estructura primaria y en sus interacciones con el solvente que la contiene. Sumado a lo anterior, en la naturaleza se encuentra repetidamente el fenómeno de la oligomerización, en el cual además del plegamiento, se necesita del ensamblaje de subunidades. Existen numerosos ejemplos de enzimas en las cuales el estado de asociación interviene directamente en la activación, inhibición o cooperatividad de la catálisis.

El trabajo que se presenta a continuación, está centrado en el estudio de la ruta de plegamiento y asociación de una enzima homodimérica, el modelo más sencillo de un oligómero, la trifosfato isomerasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuando se desnaturaliza por desnaturalizantes.

PLEGAMIENTO Y ASOCIACIÓN

Cada polipéptido comienza su existencia al emerger su extremo amino terminal del ribosoma. Su secuencia aminoacídica deriva de la traducción de la secuencia específica que se encuentra entre el codón de inicio y término en el ARN mensajero. En algún momento muy temprano de su vida, el polipéptido se pliega para dar origen a la **estructura nativa (N)**, también referida como **estado plegado** que es la conformación en la cual pasará el resto de su existencia y que es la única capaz de realizar su función biológica específica. La conformación de mínima energía del polipéptido en *N* se determina por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Para identificar fácilmente a *N* es necesario definir al **estado**

desplegado o **desnaturalizado**¹ (*U* del inglés *unfolding*), conjunto de conformaciones sensible al ambiente que poseen energías muy similares y en equilibrio rápido unas con otras (un "ensamble" de microestados). El estado *U* no es fácil de caracterizar. Algunas propiedades gruesas como el volumen hidrodinámico y el radio de giro pueden indicar con certeza su grado de compactación. Los espectros infrarrojo y de dicroísmo circular (CD) pueden indicar la estructura secundaria residual. La RMN puede resolver la estructura al nivel de residuos individuales con el mismo detalle que para *N*, debido a la heterogeneidad de las conformaciones que lo componen (Fersht 1998). Cuando la cadena naciente emerge del ribosoma, se encuentra precisamente en este estado. En algunos casos, el plegamiento hacia *N* es asistido, *i.e.* requiere de la ayuda de otras proteínas, entre ellas se encuentran la peptidil prolil *cis-trans* isomerasa y la proteína isomerasa de disulfuros; mientras que otro grupo de proteínas conocidas como chaperoninas, evitan la agregación irreversible de las proteínas durante condiciones ambientales extremas (Freedman 1992). Existen sin embargo, numerosos ejemplos en los que la adquisición de *N* a partir de la cadena sin estructura puede reproducirse *in vitro* de manera autónoma, sin información adicional o entrada de energía (Tanford 1970). La adquisición y estabilidad de estas estructuras está entonces determinada solamente por la secuencia de aminoácidos y las interacciones de ésta con el solvente que la contiene (Anfinsen 1973).

La estructura nativa del polipéptido puede sufrir muchos tipos de modificaciones postraduccionales. Entre ellas, se encuentra: (i) proteólisis; (ii) derivatización de aminoácidos específicos, que incluye acetilación, glucosilación, hidroxilación, metilación, nucleotidilación, fosforilación, ADP-ribosilación y (iii) la asociación de varias cadenas polipeptídicas con la misma

¹ Existen diferencias entre desnaturalizado y desplegado: el término desnaturalizado fue usado inicialmente como una definición operacional para designar "...un gran cambio a partir de la estructura nativa original..." que es no covalente, cooperativo y reversible en principio, tal vez no en la práctica. El término *desnaturalización* es utilizado a menudo para referirse a una variedad de alteraciones irreversibles pobremente entendidas en la estructura de la proteína que incluyen agregación, rearreglo de puentes disulfuro y ruptura de la cadena. El término desplegado se utiliza para referirse a un subconjunto de estados desnaturalizados *i.e.* conformaciones que están muy laxas y expuestas al solvente, con muy poca estructura o carentes de ella totalmente; estos estados se obtienen generalmente bajo fuertes condiciones desnaturalizantes. Los estados desnaturalizados compactos, se obtienen en condiciones desnaturalizantes débiles. Mientras que ambos términos son generalmente intercambiables, el avance experimental ha permitido dividir a los estados desnaturalizados en desplegados y compactos (Dill y Shortle 1991).

secuencia, o bien con secuencias diferentes, para formar un homo o hetero oligómero respectivamente (no todas las proteínas sufren de estos cambios; en procariontes las modificaciones ocurren básicamente en la transcripción y en eucariontes, por ejemplo, no todas las cadenas polipeptídicas se asocian para formar oligómeros). El producto de estos procesos es la **estructura nativa madura**, el estado de relevancia biológica. El orden en el cual ocurre la maduración de una proteína no puede ser predicho; sin embargo, las modificaciones generalmente son posteriores al plegamiento, porque el polipéptido plegado usualmente contiene ya toda la información necesaria para controlar el proceso. De acuerdo a lo anterior, los pasos que intervienen en la maduración de una proteína pueden ser divididos en plegamiento, modificaciones postraduccionales y asociación, si se trata de un oligómero.

El plegamiento es entonces cualquier proceso intramolecular por el cual el polipéptido, que inicialmente se encuentra en *U*, asume la estructura *N*, y la asociación es el proceso intermolecular mediante el cual polipéptidos parcial o completamente plegados se asocian para formar un oligómero.

TERMODINÁMICA DEL PLEGAMIENTO

Generalidades

Un polipéptido es un polímero de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. A partir del estudio de polímeros en general, se sabe que su comportamiento conformacional depende críticamente del solvente en el cual están disueltos (Dill y Shortle 1991). Si los monómeros son miscibles en el solvente, el polímero es libre de expandirse y exponerlos al solvente. Este solvente es referido como un "buen solvente". Cuando un polipéptido es disuelto en un buen solvente, la rotación alrededor de cada enlace entre el nitrógeno de la amida y el C_{α} (ángulo ϕ) y entre el C_{α} y el acilo (ángulo ψ) (Figura 1A) está permitida en los confines de las clases representadas en una gráfica de Ramachandran (Figura 1B), recordando que un par de átomos de la molécula no puede ocupar el mismo lugar al mismo tiempo (Kyte 1995). Como cualquier otra molécula orgánica en solución la conformación del polipéptido en un buen solvente cambia continuamente, de tal suerte que la rotación de sus enlaces ocurre casi al azar. Para un polipéptido esta condición se conoce como conformación al azar o "random coil". Este término incorpora inevitablemente el movimiento incontrolable y continuo de la conformación de la cadena. Un enrollamiento al azar es un tipo especial de *U*. El estado *U* de un polipéptido muestra un estado en el cual el polipéptido tiene un enrollamiento al azar o tan poco restringido

en su movimiento que su comportamiento es experimentalmente indistinguible de éste (Kyte 1995).

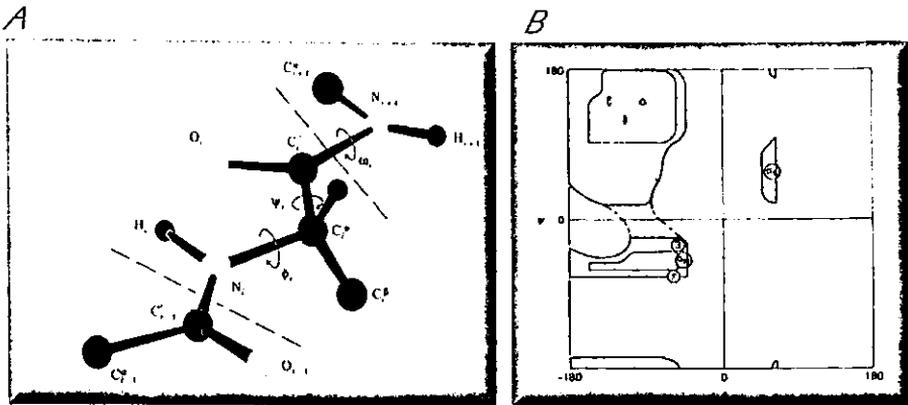


FIGURA 1.

A Perspectiva de un dipéptido. Se muestra la libertad de movimiento en los enlaces que participan en la molécula. Los límites de un residuo están señalados por las líneas discontinuas. La cadena polipeptídica se muestra en su conformación completamente extendida en donde todos los ángulos (ϕ , ψ y ω) son iguales a 180° . B Posición de las conformaciones regulares de los polipéptidos en una gráfica de Ramachandran. Las conformaciones regulares son: α_R (α -hélice de vuelta derecha); α_L (α -hélice de vuelta izquierda); • (hoja β paralela); ◊ (hoja β antiparalela); 3 (α -hélice 3_{10} de vuelta derecha); π (π -hélice de vuelta derecha).

Existen muy pocos buenos solventes para los polipéptidos que ocurren en la naturaleza, esto se debe a que estos últimos están diseñados para plegarse y para hacerlo deben ordenar su secuencia de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, definidos en un ordenamiento final particular por la secuencia de codones de nucleótidos que las codifica en el ADN, (Dill y Shortle 1991). Únicamente en soluciones de desnaturizante (ej. urea o sales de guanidinio) es posible obtener una mezcla de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos miscible; el agua en particular, es un mal solvente para los primeros, pero uno bueno para los segundos. Un "mal solvente" es aquel en el cual los monómeros de un polímero son escasamente solubles. En un mal solvente, el polímero se contrae para minimizar la exposición de sus monómeros. El efecto hidrofóbico es un evento en el cual se minimiza la exposición de un soluto hidrofóbico al agua. En consecuencia, a pH neutro y fuerza iónica de 0.2 M, condiciones comunes en la naturaleza el agua es un mal solvente para los polipéptidos (Dill y Shortle 1991); este hecho natural es esencial para la vida, pues de lo contrario (si el agua fuese un buen solvente) las proteínas no se plegarían y por tanto, no podrían expresar su función. Lo anterior presenta un problema experimental delicado. Si se

está estudiando el plegamiento de un polipéptido, tanto la estructura N como la U deben estar bien definidas, y el único U que puede ser definido con suficiente exactitud es el enrollamiento al azar. Por tanto, el estudio del plegamiento de un polipéptido es más informativo si el proceso es estudiado via la isomerización entre el enrollamiento al azar y la estructura N (renaturalización: $U \rightarrow N$) o viceversa (desnaturalización: $N \rightarrow U$) (Kyle 1995).

Un polipéptido sólo se plegará si la energía libre de N es menor que la de todos los otros estados accesibles en la vía de plegamiento. Debido a este requerimiento, por ejemplo, una cadena naciente no podrá plegarse hasta que exista un número suficiente de residuos para formar las interacciones no covalentes necesarias para superar la pérdida desfavorable de entropía que siempre acompaña al plegamiento. De la misma forma, un polipéptido desplegado (desnaturalizado) que no se ha modificado covalentemente, bajo las circunstancias apropiadas, puede renaturalizarse espontáneamente en su estructura N . La mayoría del conocimiento que se tiene en la actualidad sobre el plegamiento deriva precisamente del estudio de estas reacciones *in vitro*.

Si los únicos estados poblados significativamente en la transición son N y U , esto es, cuando no existen intermediarios, la isomerización configuracional que tiene lugar en el plegamiento de las proteínas puede ser representada adecuadamente con el siguiente equilibrio:



en donde N es el estado plegado del polipéptido y U el desplegado. Las constantes de velocidad k_{pleg} y k_{despleg} incluyen todos los eventos cinéticos entre los dos extremos del proceso. Esta reacción puede ser referida como plegamiento-desplegamiento, pero las propiedades termodinámicas como las constantes de equilibrio y los cambios en la energía libre (G), entalpía (H), entropía (S) y capacidad calorífica (C_p) deben ser referidas en la dirección en la que son cuantificadas, ya sea en el sentido del plegamiento o bien de la desnaturalización.

Debido a que los polipéptidos se pliegan a su estructura N , están prediseñados para ser razonablemente estables a temperaturas, concentraciones de solutos y valores de pHs que comúnmente se encuentran en la naturaleza; la concentración de U en estas circunstancias es tan baja, que no es posible cuantificarla, por tanto, las constantes de equilibrio y los cambios

termodinámicos asociados al proceso no pueden ser obtenidos bajo estas condiciones. La única solución a este problema es alterar el equilibrio sometiendo a la proteína a un perturbante. Las proteínas pueden desnaturalizarse someténdolas a cambios físicos o químicos. Los más comunes son por: (i) aumento o disminución de la temperatura; (ii) adición de desnaturalizantes químicos como la urea o sales de guanidinio (Gdn); (iii) variación del pH a extremos ácidos o alcalinos; o bien (iv) someténdolas a altas presiones (Fersht 1998). Incluso, dada la estabilidad de N , para disminuir la magnitud de k_{pleg} y poder cuantificarla, a menudo se utilizan combinaciones de estos tratamientos.

En cualquier estudio de plegamiento-desplegamiento las condiciones deben ser tales que el proceso permanezca reversible, i.e. que la transformación de N a U ocasionada por el incremento en la condición desnaturalizante sea tal que al regresar las condiciones experimentales a aquellas que favorecen la presencia de N , la estructura obtenida sea indistinguible de la cual se partió originalmente; en otras palabras, que la estructura de la cual se parte en la desnaturalización, sea la misma después de la renaturalización. Muchas proteínas - especialmente las pequeñas- se desnaturalizan reversiblemente (Kyte 1995). Esto es, al favorecer las condiciones del plegamiento (las que favorecen la presencia de la estructura biológicamente funcional) es posible obtener espontáneamente a la estructura nativa. Muchas proteínas de tamaño mayor se desnaturalizan irreversiblemente; a menudo se agregan o precipitan antes de que el desnaturalizante sea removido, que la solución calentada se enfríe o bien se retorne a la presión atmosférica. De hecho, cuando las proteínas se desnaturalizan a concentraciones elevadas, algunas tienden a precipitarse. Algunas veces, la renaturalización puede ser inducida por un lento retorno a las condiciones favorables (como en la diálisis vs. concentraciones decrecientes de desnaturalizante) (Fersht 1998). Si el objetivo del estudio tiene como fin el conocer los cambios energéticos asociados al proceso via la cuantificación de la constante de equilibrio, entonces la reacción debe ser reversible. Por tanto, en todos los estudios de plegamiento de proteínas, el primer resultado a presentar, es demostrar la completa reversibilidad del proceso. Como ejemplo, pocas desnaturalizaciones al incrementar la temperatura son completamente reversibles a pH neutro. Sin embargo, muchas de ellas que son irreversibles por coagulación en el intervalo de valores de pH entre 2 y 3, a menudo son reversibles a valores de pHs neutros o alcalinos. Lo anterior se debe presuntamente a que la coagulación se previene por repulsión de cargas entre los polipéptidos desplegados. Por el contrario, el número de estudios de desnaturalización por urea o sales de Gdn que permanecen reversibles es por mucho mayor que aquellos procesos seguidos por cambios en la temperatura o el pH (Kyte 1995).

Generalmente las proteínas (cuyas cistinas han sido reducidas a cisteínas) solubilizadas en soluciones concentradas de cloruro de Gdn (Gdn-HCl) o urea (Figura 2), se despliegan completamente.

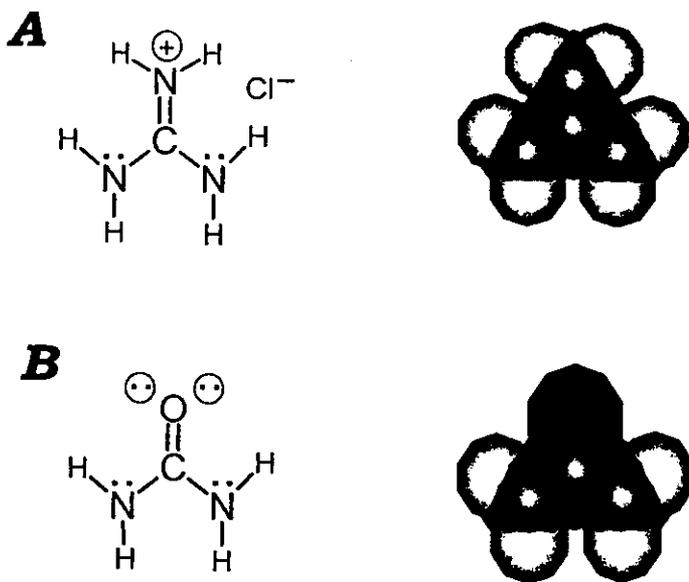


FIGURA 2.

Estructura del cloruro de guanidinio (Gdn-HCl) (A) y de la urea (B). A la izquierda se muestra la fórmula desarrollada; a la derecha la estructura en esferas llenas (CPK). El catión guanidinio (aminometanamida), se puede encontrar combinado con diferentes aniones: carbonato (HCO_3^-), cloruro (Cl^-), nitrato (NO_3^-), sulfato (HSO_4^-) y tiocianato (SCN^-).

Los cambios conformacionales causados por los desnaturalizantes pueden observarse mediante alteraciones en algunas propiedades de la proteína (Tabla 1).

El mecanismo de acción de los desnaturalizantes no se conoce a detalle, sin embargo, se sabe que estas moléculas favorecen la solvatación tanto de las cadenas laterales como del esqueleto polipeptídico (Dill y Shortle 1991). Las soluciones concentradas de Gdn o urea promueven la desnaturalización de una proteína al incrementar la estabilidad de U . Estos desnaturalizantes solubilizan todos los constituyentes de las proteínas, desde el esqueleto polipeptídico hasta sus cadenas laterales hidrofóbicas. Como primera aproximación, la energía

libre de transferencia de los aminoácidos en agua a soluciones de desnaturalizante² es proporcional a la concentración de desnaturalizante. Debido a que *U* está más expuesto al solvente que *N*, *U* es estabilizado preferentemente por el desnaturalizante (Kyte 1995).

PROPIEDAD	<i>N</i>	<i>U</i>
Peso molecular	Oligomérico ♣	De los polipéptidos constituyentes
Viscosidad intrínseca (cm ³ g ⁻¹)	3-5	15-100
Dispersión óptica rotatoria y Dicroísmo circular	Estructura secundaria regular	Sin estructura secundaria
Titulación ácido-base	Titulación de aminoácidos factible	No presenta cambios en pK _a
Velocidad de intercambio de hidrógeno en amidas ♦	Lenta y cuantificable	Muy rápida, no cuantificable
Espectro ultravioleta (270-300 nm)	Corrimientos espectrales de los aminoácidos aromáticos	Simple suma del espectro de Phe, Tyr y Trp
Propiedades hidrodinámicas ♥	Estructura compacta	Estructura laxa de mayor tamaño
Fluorescencia intrínseca	Ambiente específico de Phe, Tyr y Trp	Propiedades de Phe, Tyr y Trp semejantes a las obtenidas en agua
Función biológica	Presente	Ausente

TABLA 1.

Diferencias entre los estados *N* y *U*. ♣ Cuando se trata de una proteína oligomérica. ♦ Seguida por RMN. ♥ Obtenidas por experimentos de filtración o ultracentrifugación (velocidad de sedimentación o ultracentrifugación al equilibrio).

El estado desplegado posee una amplia libertad de conformaciones: este estado no es una estructura rígida, de hecho, algunos segmentos de la cadena polipeptídica se pueden mover

² A partir de cuantificaciones de la solubilidad de varios aminoácidos, así como del dipéptido y tripéptido de la glicina en soluciones de urea o Gdn-HCl, ha sido posible estimar las energías libres estándar de transferencia (ΔG°) de las cadenas laterales y del enlace peptídico entre el agua y las soluciones de estos perturbantes. (Dill y Shortle 1991)

con relación a otros y algunos grupos pueden rotar alrededor de los enlaces sencillos. El estado desplegado posee inherentemente una entropía configuracional elevada de acuerdo con la ecuación de Boltzmann $S = k \ln \Omega$ [en donde Ω es el número accesible de estados energéticos y k es la constante de Boltzmann (R , constante de los gases ideales, dividida por el número de Avogadro)]. Por el contrario, N está muy restringido conformacionalmente y posee por tanto muy poca S . Entonces, a medida que una proteína se pliega ($U \rightarrow N$) sufre un cambio desfavorable en S , la cual es balanceada por una ganancia en H debida a la formación de interacciones entre los aminoácidos y el ocultamiento de las cadenas laterales. Los cambios en S y H del agua deben ser sumados a los cambios en S y H de la proteína para obtener las propiedades termodinámicas globales de N y U (Fersht 1998).

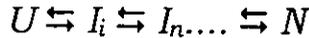
El equilibrio reversible para la desnaturalización de proteínas puede ser tratado por la termodinámica exactamente en el mismo sentido en que se haría para un equilibrio químico simple, excepto que existen algunas peculiaridades incluidas debidas a la multitud de interacciones débiles no covalentes que se forman o destruyen en el proceso (Fersht 1998). Cuando las propiedades de una proteína mencionadas en la Tabla 1 se cuantifican como función de un perturbante, es posible determinar cambios en el valor de la constante de equilibrio. Si se asume que los únicos conforméromos presentes en la transición son N y U , la constante de equilibrio está dada por:

$$K_{despleg} = \frac{[U]}{[N]} \quad \text{o bien} \quad K_{pleg} = \frac{[N]}{[U]}$$

a este proceso se le denomina como mecanismo "de un paso" o bien "de dos estados", puesto que sólo hay una transición y dos conforméromos presentes en la misma³.

Tanto para monómeros como para oligómeros el esquema puede complicarse, apareciendo estructuras intermedias estables,

³ La rapidez con la que cambia la concentración de N está compuesta de dos partes: N se transforma en U a una velocidad $k_{unl}[N]$, pero se recupera por la reacción inversa a una velocidad $k_{pleg}[U]$, el cambio total en la velocidad de la concentración de N es por consiguiente: $d[N]/dt = -k_{unl}[N] + k_{pleg}[U]$. Cuando las reacciones han llegado al equilibrio *i.e.* cuando la $[U]$ y $[N]$, ya no cambian con el tiempo, el coeficiente de las concentraciones será la *constante de equilibrio* K , la cual se deduce como $k = [U]/[N] = [U]_{eq}/[N]_{eq} = k_{unl}/k_{pleg}$.



el equilibrio más sencillo, en el cual sólo se observa un intermediario estable se representa por:



en donde *I* es el estado intermediario. Cuando esto sucede, el proceso se denomina como de "dos pasos" o bien "tres estados", pues existen dos equilibrios y tres conformeros (Kyte 1995).

Oligómeros

La estructura que se forma después de la asociación de subunidades para formar un oligómero se conoce como *estructura cuaternaria*. Las interacciones entre subunidades están guiadas y estabilizadas por las mismas fuerzas que estabilizan la estructura terciaria. Para algunas proteínas, la oligomerización tiene un papel regulatorio; estas enzimas pueden activarse o inhibirse de acuerdo al estado de asociación, que cambia de acuerdo a variaciones en la concentración de sustratos o moléculas regulatorias. Para otras proteínas, las subunidades aisladas pueden participar en funciones diferentes, pero relacionadas a la de su estado oligomérico. Algunos segmentos de vías metabólicas están organizados en complejos supramoleculares de enzimas que permiten la eficiente conducción de un intermediario metabólico de una enzima a la siguiente en la vía. Algunas otras asociaciones tienen como finalidad la protección (histonas) o formación de estructuras (cápsides de virus). Grandes asociaciones a menudo reflejan complejas funciones, ejemplos obvios de lo anterior son la F_0F_1 -ATP sintasa que se encarga de censar un gradiente electroquímico para sintetizar al ATP y los ribosomas que llevan a cabo la síntesis de proteínas.

Las entidades oligoméricas están ampliamente representadas en la naturaleza. Aún en rutas muy antiguas como la glucólisis, un número mayoritario de enzimas presentan esta característica, por ello el plegamiento y la asociación de oligómeros ha atraído la atención y esfuerzo experimental de muchos investigadores (Jaenicke 1987, 1996).

En algunos dímeros y otros oligómeros de orden mayor se ha observado una transición de dos estados ($U \rightleftharpoons N$), mientras que para otros se han identificado intermediarios en la ruta de plegamiento ($U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$) por medio de estudios cinéticos y/o al equilibrio. En la Tabla 2, se mencionan ejemplos de enzimas con ambas características.

Proteína	Estado de agregación	n°	Referencia
Represor de Arc	Homodímero	2	Bowie y Sauer 1989.
Factor de crecimiento β -neuronal	Homodímero	2	Timm y Neet 1992.
GroES	Homoheptámero	2	Boudker <i>et al.</i> 1997.
Aspartato transcarbamilasa	Heteropentámero	3	Bothwell y Schachman 1980.
Malato deshidrogenasa	Homodímero	3	Hecht y Jaenicke 1989.
Fosfofructocinasa I	Homotetrámero	3	Teschner y Garel 1989.
Aspartato aminotransferasa	Homodímero	3	Herold y Kirschner 1990.
Receptor de adenosina cíclica 3',5'-fosfato	Homodímero	3	Cheng <i>et al.</i> 1993.
Glutation transferasa	Homodímero	3	Saccetta <i>et al.</i> 1993.
Estradiol 17 β -deshidrogenasa	Homodímero	3	Mendoza-Hernández y Rendón 1996
Catalasa	Heterotetrámero	3	Rangel y Vázquez-Contreras en preparación

TABLA 2.

Comportamiento de algunos oligómeros en la ruta de plegamiento y asociación.
*confórmers en la ruta de plegamiento.

En muchos casos se ha observado competencia entre la agregación irreversible de los monómeros y su correcta asociación hacia el estado oligomérico *N*.



Por otra parte, cuando se aislan intermediarios monoméricos, en general no tienen la capacidad de expresar la actividad catalítica que se observa en el estado de agregación *N* (Jaenicke 1987, 1996), por lo tanto las enzimas oligoméricas son modelos de estudio exquisitos para el entendimiento de las consecuencias energéticas y funcionales de la asociación de proteínas.

Intermediarios estables

En el modelo de dos estados para el plegamiento de una proteína, en el cual los procesos de desnaturalización y plegamiento son completamente cooperativos, no hay intermediarios estables en el equilibrio. En el caso de proteínas en las cuales existen regiones de la cadena polipeptídica con estabilidad estructural independiente, este modelo no es apropiado.

Como resultado de esta idea, se ha propuesto que durante la transición tridimensional, existen estados transitorios -intermediarios cinéticamente accesibles-- que actúan como guías en el plegamiento. De ahí que una buena parte de los estudios de plegamiento se enfocan a la búsqueda de estos conformeros, pues si se llegan a conocer sus estructuras así como los cambios de energía asociados a su formación, será posible elucubrar sobre los factores que gobiernan el plegamiento por rutas productivas.

A pesar de que el plegamiento de proteínas monoméricas es generalmente un proceso de dos estados, existen proteínas para las cuales un aumento en la condición desnaturalizante alrededor de la transición N/U presentan conformaciones parcialmente desplegadas (Tabla 2 y 3). La presencia de intermediarios en la ruta de plegamiento ocasiona que el cambio en las propiedades estructurales de las proteínas al aumentar la condición desnaturalizante no sea monofásico, o bien que los patrones obtenidos por diferentes técnicas no sean coincidentes. Uno de los primeros ejemplos descritos fue el de la anhidrasa carbónica cuyo modelo molecular cristalográfico no presenta dominios. Para esta enzima se ha estudiado el corrimiento en la K_{pleg} (de velocidad), como función de la concentración de Gdn-HCl. Las alteraciones debidas a este perturbante, se cuantificaron por cambios en CD, absorción ultravioleta y rotación óptica (Wong y Tanford 1973). Los patrones obtenidos por estas técnicas no son coincidentes; además, estudios de la cinética de renaturalización de esta enzima sugieren que la reacción no es un proceso homogéneo de primer orden. A partir de estos resultados se ha concluido que en la transición existe al menos un intermediario (Wong y Tanford 1973).

Para algunas proteínas se ha propuesto que el mecanismo de plegamiento es a través dominios estructurales, en el cual ciertas unidades de estructura secundaria se pliegan independientemente y por separado para formar regiones globulares que finalmente colapsan en la estructura N . Este postulado es razonable cuando existen evidencias experimentales (por cristalografía o calorimetría) que hagan sospechar la evidencia de los dominios como en el caso de la piruvato cinasa (Doster y Hess 1981) o la 3-fosfoglicerato cinasa (Adams *et al.* 1985). El hecho es que las estructuras intermedias estables se han observado incluso cuando no hay razón para sospechar la existencia de dominios en el plegamiento.

Por más pequeña que sea la secuencia de aminoácidos es imposible pensar que una proteína pueda visitar todas las conformaciones posibles para plegarse correctamente. Por ejemplo, si una cadena polipeptídica tiene 100 residuos puede adoptar 10^{100} conformaciones (en promedio 10 conformaciones por residuo). Si la velocidad de transformación de una conformación en otra es muy rápida, del orden de 10^{-13} s, el tiempo promedio requerido para visitar todas las posibles conformaciones sería del orden 10^{77} años. El resultado de esta

estimación, resulta ser mayor que la edad del universo y, a pesar de ello, las proteínas generalmente adoptan su estructura tridimensional en intervalos de milisegundos-segundos. A este hecho se le conoce como la paradoja de Levinthal (1968), quien a finales de los años 60 sugirió la existencia de rutas preferenciales en el plegamiento de los polipéptidos para resolver la paradoja.

El glóbulo fundido

El glóbulo fundido (GF) es un estado de la cadena polipeptídica obtenido experimentalmente en la renaturalización de U o en la desnaturalización de N . Es un cónfórmero compacto cuya estructura permanece flexible y cambia constantemente; este estado conserva un alto porcentaje de la estructura secundaria observada en N . A la fecha, no ha sido posible cristalizar a ningún polipéptido en este estado y sus propiedades de RMN se parecen más a la estructura U que a la N . Lo anterior señala las largas fluctuaciones conformacionales en esta estructura compacta, particularmente en sus cadenas laterales (Dobson 1991). Como se mencionó anteriormente, el agua es un mal solvente para los polipéptidos, por lo cual este colapso es un evento esperado. En este estado condensado la entropía configuracional de U ha sido reducida significativamente debido a las restricciones impuestas por el volumen excluido (Dobson 1991).

Cuando algunas proteínas se someten a condiciones que difieren significativamente de aquellas que se observan *in vivo* (ver Tabla 3), el número de conformaciones estructuradas que pueden ser estables aumenta (ver Tabla 2). De ahí que para hacer evidente el estado intermediario sea necesario someter a la proteína a condiciones extremas. Es precisamente a partir de estas observaciones que se ha propuesto que el GF puede ser un intermediario en la vía de plegamiento *in vivo*.

Se ha argumentado en la literatura (Dill y Shortle 1991) que los estados intermediarios detectados en el plegamiento-desplegamiento de muchas proteínas bajo diversas circunstancias son ejemplos del estado GF. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la cuantificación de las mismas propiedades físicas no siempre es posible para todas las proteínas, en las mismas condiciones, por lo cual el asignar la presencia del mismo estado a todas ellas no es totalmente concluyente.

Proteína	Condiciones	Referencia
Anhidrasa carbónica	acidificación del pH (3.6)	Wong y Tanford, 1973.
Citocromo c	desnaturalización por Gdn-HCl (pH 3.0)	Stellwagen y Babul, 1975
Piruvato cinasa	desnaturalización por Gdn-HCl o Urea	Doster y Hess, 1981.
3-fosfoglicerato cinasa	desnaturalización por Gdn-HCl	Adams <i>et al.</i> , 1985.
mioglobina	desnaturalización por Gdn-HCl	Hugson <i>et al.</i> , 1990.
Ribonucleasa A	acidificación del pH	*
Lizosima (T4)	desnaturalización por Gdn-HCl	*
Inhibidor de tripsina	desnaturalización por Gdn-HCl	*
Hormona de crecimiento	desnaturalización por urea (pH 9.1)	*
Fragmento Fc de IgG	acidificación del pH (4.5), 64° C	*
Apomioglobina	acidificación del pH (4.3)	*
Toxina de difteria [†]	acidificación del pH (3-5), 0.15 M NaCl	*
Colicina A [∞]	acidificación del pH (4.0), 0.1 M KCl	*
Colicina E1 ^f	acidificación del pH (3.5), 0.1 M NaCl	*
Nucleasa estafilococal [#]	pH(7.0); 0.05 M NaCl	*
Rodanasa	desnaturalización por Gdn-HCl o urea	*
Aspartato aminotransferasa	desnaturalización por Gdn-HCl	*
Proteína de unión de retinol	pH 2.0	
α lactalbumina	desnaturalización por Gdn-HCl (pH 4.5)	Kuwajima, 1977.
α lactalbumina [∞]	desnaturalización por Gdn-HCl (pH 8.0)	Xie <i>et al.</i> , 1991.
β-lactamasa	desnaturalización por Gdn-HCl (pH 7.0)	Seminostov <i>et al.</i> , 1991.
Represor de Arc	Presurización y dilución	Silva <i>et al.</i> , 1992.
Dihidrofolato reductasa	Desnaturalización por urea	Jones <i>et al.</i> , 1994.

TABLA 3

Proteínas en las que se ha encontrado evidencia de la presencia de glóbulos fundidos en la desnaturalización. + Fragmento A.∞ Dominio del poro. f Péptido del canal. # Fragmento 1-128. ∞ En ausencia de Ca²⁺. Hay cuatro proteínas en las cuales es posible que el GF sea parte de su transición a N (β-lactalbúmina, parvalbúmina, interferón α y γ humano, Creighton 1992). *Recopilado en Creighton 1992.

Los intermediarios tipo GF se han detectado en proteínas que no tienen relaciones estructurales aparentes y bajo diversas condiciones, todas ellas extremas (Tabla 3). Diversas propiedades físicas se han cuantificado para este tipo de intermediarios. La mayor parte de la señal de dicroísmo circular (entre 200-240 nm) observada en la enzima nativa es retenida en el estado intermediario, lo cual sugiere que la estructura secundaria se conserva; esto es, las α-hélices y estructuras β se forman espontáneamente en la renaturalización o permanecen en la desnaturalización (Chan y Dill 1990). Por otra parte, en el estado intermediario la señal de CD entre 260-290 nm se pierde casi completamente, lo cual resulta de la pérdida de la asimetría en el ambiente que rodea a los fluoróforos intrínsecos de la proteína i.e. los aminoácidos aromáticos. Después de la formación del intermediario, el espectro de RMN se torna más sencillo, semejante al observado para el enrollamiento al azar. Esto es de esperarse ya que se pierde el ambiente particular que se encuentra alrededor de cada aminoácido (Ohgushi y Wada 1993). La intensidad de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos sufre apagamiento y

corrimiento a longitudes de onda mayores, lo cual demuestra la exposición parcial o total de estos residuos al solvente. En los casos en los que ha sido posible cuantificar la viscosidad intrínseca, tiempos de relajación rotacional y coeficientes de difusión de estos intermediarios, se ha observado que son indistinguibles de los que se observan en *N*, pero muy diferentes a los que se presentan en el enrollamiento al azar (Dolgikh *et al.* 1981; Ohgushi y Wada 1993). Estas observaciones en conjunto han permitido demostrar que el GF es una estructura globular compacta semejante a la que presenta *N*.

Si el GF define a los intermediarios que aparecen en la ruta cinética entre *N* y *U* entonces, el "modelo de condensación" (revisado en Kyte 1995) para el plegamiento de un polipéptido puede ser una buena aproximación para describir al proceso. En este modelo, el enrollamiento al azar espontáneamente colapsa bajo la influencia del efecto hidrofóbico para formar una estructura condensada que puede ser un GF. Este intermediario demuestra el número limitado de conformaciones accesibles en la condensación del polímero hacia la conformación *N*.

La alternativa al modelo de condensación es el "modelo de nucleación" (revisado en Kyte 1995); en el cual, la configuración metaestable asumida espontáneamente por un pequeño segmento del polipéptido es similar a aquella que el mismo segmento tiene en la estructura *N*. Este pequeño núcleo se asemeja a la configuración en la enzima *N* tanto en sus interacciones secundarias como terciarias. A partir de este núcleo, otros segmentos de la cadena difunden para producir la estructura *N*. La evidencia para esta propuesta deriva de observaciones en las cuales pequeños segmentos de polipéptido pueden asumir estados estructurados diferentes al enrollamiento al azar.

Posibles papeles del glóbulo fundido *in vivo*

En la sección anterior se mencionaron las características del GF encontrado en la vía de plegamiento de algunas proteínas *in vitro*, en condiciones que se alejan en gran medida de aquellas que se observan en los seres vivos. Pero ¿el GF tiene algún papel en el plegamiento *in vivo*? Para contestar esta pregunta hay que recordar que existen muchas diferencias entre las condiciones que se utilizan en los experimentos mencionados en la sección anterior y lo que ocurre en el ambiente celular. La temperatura, salinidad, capacidad amortiguadora de las soluciones, así como la concentración de proteína y cosolutos son muy diferentes en ambas situaciones. En los sistemas vivos, las proteínas pueden ser sometidas a diferentes condiciones, desnaturizantes leves como cambios en temperatura, pH, solubilidad en

membranas, etc. Debido a lo anterior, tiene sentido considerar los posibles papeles *in vivo* de proteínas ligeramente desnaturalizadas, incluyendo al GF.

1.- El tiempo típico requerido para la biosíntesis de una cadena polipeptídica es entre 10 y 100 seg. Este tiempo es en promedio mucho mayor que aquel que se necesita para la formación del GF (aproximadamente 1 seg.) (Creighton 1992), pero menor a aquel que algunas proteínas necesitan para llegar a *N*, el cual puede ser hasta de 10^3 s. Por lo tanto, una cadena naciente durante e inmediatamente después de su biosíntesis puede estar en el estado de GF (Creighton 1992). Tal vez, la naturaleza prefiera mantener a la cadena naciente en este estado, que es lo suficientemente flexible para ajustarse a eventos posteriores como oligomerización, transporte transmembranal, etc. Existen algunas evidencias que sustentan lo anterior: (i) la proteína de choque térmico (heat-shock) GroEL une y estabiliza al estado no nativo de cadenas nacientes; (ii) algunas proteínas de choque térmico unen subunidades inactivas de proteínas oligoméricas para prevenir su agregación inespecífica y/o transportarlas a su lugar de ensamblaje; y (iii) algunas proteínas de choque térmico que unen proteínas secretadas e importadas, están involucradas en los eventos de translocación transmembranal. De acuerdo a lo anterior, es razonable asumir que algunas proteínas de choque térmico, en particular GroEL, reconocen y unen a una proteína naciente en estado de GF (Creighton 1992). GroEL retarda el plegamiento cuando se agrega a la proteína en estado *U* (tiempo cero) o cuando se encuentra en estado de GF (después de 1 o 2 seg.) (Creighton 1992).

2.- Existen numerosos reportes de proteínas que no pueden ser translocadas a través de las membranas en su estado nativo, pero son competentes para la translocación cuando se encuentran en un estado no nativo susceptible a proteólisis. Las conclusiones a partir de estas observaciones involucran al GF como el conformero idóneo para la translocación (Creighton 1992).

3.- Es posible que el proceso de degradación en los lisosomas (en donde se ha descrito la participación de proteínas de choque térmico), a pH ácido o bien por medio de proteosomas (ej. sistema ubiquitina ATP dependiente), sea facilitado por la anterior desnaturalización proteica, la cual probablemente sea la transición al estado de GF (Creighton 1992).

Aunque todas las observaciones anteriores indican que los estados no nativos de las proteínas pueden jugar algún papel *in vivo*, la posibilidad de que realmente lo hagan, requiere todavía de mucha investigación.

BARRILES β/α

Generalidades

Dentro de la variabilidad estructural que se presenta en las proteínas, hay una forma de plegamiento ampliamente repetida en la naturaleza, conocida como barril β/α . Precisamente a esta familia estructural pertenece la enzima con la cual se realizó este trabajo.

Este patrón topológico se ha encontrado en más de 25 enzimas con actividades catalíticas diversas (aproximadamente el 10 % de las enzimas cristalizadas); En todas ellas, el sitio activo está localizado en el carboxilo terminal de la hoja β paralela central (Brändén y Tooze 1991). La primera proteína en la cual se describió esta estructura fue la trifosfato isomerasa (TPI) de pollo (Banner *et al.* 1975) de ahí el nombre de "TIM barrel". En general, la estructura secundaria está formada por ocho hebras β paralelas (con un ángulo de al rededor de 36°) en el interior de la proteína, que forman una red de puentes de hidrógeno (Figuras 3 y 4). Usualmente hay una α -hélice (a veces dos) entre cada hebra β vecina (Reardon y Farber 1995). La secuencia global de la estructura secundaria es por tanto un dominio $(\beta/\alpha)_8$ también conocido como barril β/α (ver Figuras 3 y 4). Aunque la estructura es conocida como barril, la hoja β no siempre es circular en una sección transversal; muchas de estas enzimas son elípticas con el eje mayor de la elipse en diferentes puntos de las hebras β . La longitud del barril varía considerablemente, desde uno pequeño (trifosfato isomerasa) hasta uno muy largo (xilosa isomerasa) (Reardon y Farber 1995). Además de su estructura básica $(\beta/\alpha)_8$, muchas de estas enzimas tienen dominios o estructuras secundarias típicas en las asas que conectan a las hebras β con las α -hélices. La localización de estas características estructurales junto con la forma del barril se ha utilizado para dividir a los barriles α/β en seis familias (Farber y Petsko 1990; Reardon y Farber 1995).

La familia A está formada por enzimas que tienen cualesquiera de las siguientes características: 1.- barriles casi circulares (flavocitocromo b_2 , glioxilato oxidasa y ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxidasa (RUBISCO)) o 2.- la presencia de una pequeña hélice entre la hebra 8 y la hélice 8 (flavocitocromo b_2 , glioxilato oxidasa y trimetilamina deshidrogenasa).

La familia B está formada por las siguientes enzimas: mandelato racemasa, muconato isomerasa, cloromuconato cicloisomerasa, α -amilasa, β -amilasa, oligo-1,6-glucosidasa, ciclodextrín glucosiltransferasa y piruvato cinasa (PK). El barril de todas ellas es elíptico con el eje mayor cercano a la hebra β_1 . Esta familia se divide en dos subfamilias, la primera formada por la cloromuconato cicloisomerasa y la mandelato racemasa, ambas carecen de la α -hélice

BARRILES β/α

Generalidades

Dentro de la variabilidad estructural que se presenta en las proteínas, hay una forma de plegamiento ampliamente repetida en la naturaleza, conocida como barril β/α . Precisamente a esta familia estructural pertenece la enzima con la cual se realizó este trabajo.

Este patrón topológico se ha encontrado en más de 25 enzimas con actividades catalíticas diversas (aproximadamente el 10 % de las enzimas cristalizadas); En todas ellas, el sitio activo está localizado en el carboxilo terminal de la hoja β paralela central (Brändén y Tooze 1991). La primera proteína en la cual se describió esta estructura fue la triosafosfato isomerasa (TPI) de pollo (Banner *et al.* 1975) de ahí el nombre de "TIM barrel". En general, la estructura secundaria está formada por ocho hebras β paralelas (con un ángulo de al rededor de 36°) en el interior de la proteína, que forman una red de puentes de hidrógeno (Figuras 3 y 4). Usualmente hay una α -hélice (a veces dos) entre cada hebra β vecina (Reardon y Farber 1995). La secuencia global de la estructura secundaria es por tanto un dominio $(\beta/\alpha)_8$ también conocido como barril β/α (ver Figuras 3 y 4). Aunque la estructura es conocida como barril, la hoja β no siempre es circular en una sección transversal; muchas de estas enzimas son elípticas con el eje mayor de la elipse en diferentes puntos de las hebras β . La longitud del barril varía considerablemente, desde uno pequeño (triosafosfato isomerasa) hasta uno muy largo (xilosa isomerasa) (Reardon y Farber 1995). Además de su estructura básica $(\beta/\alpha)_8$, muchas de estas enzimas tienen dominios o estructuras secundarias típicas en las asas que conectan a las hebras β con las α -hélices. La localización de estas características estructurales junto con la forma del barril se ha utilizado para dividir a los barriles α/β en seis familias (Farber y Petsko 1990; Reardon y Farber 1995).

La familia A está formada por enzimas que tienen cualesquiera de las siguientes características: 1.- barriles casi circulares (flavocitocromo b_2 , glioxilato oxidasa y ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxidasa (RUBISCO)) o 2.- la presencia de una pequeña hélice entre la hebra 8 y la hélice 8 (flavocitocromo b_2 , glioxilato oxidasa y trimetilamina deshidrogenasa).

La familia B está formada por las siguientes enzimas: mandelato racemasa, muconato isomerasa, cloromuconato cicloisomerasa, α -amilasa, β -amilasa, oligo-1,6-glucosidasa, ciclodextrin glucosiltransferasa y piruvato cinasa (PK). El barril de todas ellas es elíptico con el eje mayor cercano a la hebra β_1 . Esta familia se divide en dos subfamilias, la primera formada por la cloromuconato cicloisomerasa y la mandelato racemasa, ambas carecen de la α -hélice

final del barril, este espacio es ocupado por otros dos dominios. La segunda subfamilia está formada por la ciclodextrin glucosiltransferasa, la α -amilasa y la piruvato cinasa, estas enzimas están compuestas por tres o más dominios.

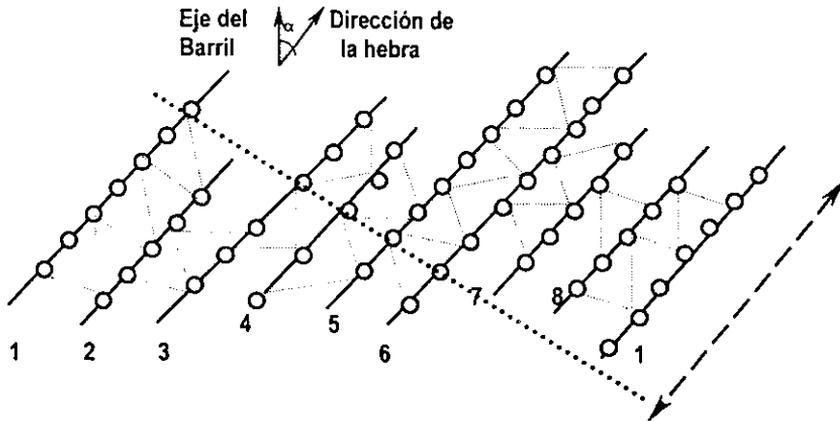


FIGURA 3.

Estructura de la hoja β de los barriles "TIM", $(\beta\alpha)_8$ o (α/β) . En este esquema se muestra la estructura desenrollada de las hebras β de la trifosfato isomerasa. Los círculos ejemplifican las posiciones de los residuos a lo largo del esqueleto, las líneas discontinuas muestran los puentes de hidrógeno entre las hebras. La hebra β N-terminal (número 1) se muestra dos veces en los extremos de la hoja β . La línea punteada conecta residuos que están opuestos en la hoja empezando por la izquierda con el número 7 de la hebra 1. Al otro lado de la hoja, esta línea conectaría con el residuo -1 de la hebra 1, ocho posiciones adelante del residuo 7. Si las hebras fuesen completamente verticales, sin ningún desfaseamiento, la línea punteada conectaría al residuo 7 de la hebra 1 en ambos lados de la hoja. El ángulo α (36°), muestra la inclinación de las hebras β con respecto a la vertical.

La familia C está formada por la N-(5'-fosforribosil) antranilato isomerasa (PRAI), la indol-3-glicerol fosfato sintasa (IGPS), la subunidad α de la triptofano sintasa (TS), la trifosfato isomerasa y la narbonina. Todas estas proteínas están compuestas por un solo dominio, el eje mayor de su barril está cercano a la hebra β 3 y contienen una pequeña α -hélice entre la hebra β 8 y la α -hélice 8. En la trifosfato isomerasa, esta α -hélice apunta hacia el grupo fosfato del sustrato (ver sección catálisis de la trifosfato isomerasa).

La familia D está formada por la fructosa bisfosfato aldolasa, 2-dehidro-3-deoxi-fosfogluconato aldolasa y N-acetilneuraminato liasa. Estas enzimas presentan una α -hélice que precede al barril.

La familia E está formada por la aldosa reductasa y 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta familia al igual que la F fueron agrupadas recientemente. Los barriles de las enzimas que

pertenecen a esta familia tienen el eje mayor cerca de la hebra $\beta 1$ y presentan asas muy largas después de las hebras $\beta 4$ y 7 .

La familia *F* está formada por la adenosin deaminasa y la fosfotriesterasa. Estas enzimas poseen un barril delgado diferente a todos los de las demás familias, además presentan un grupo de α -hélices entre la hebra $\beta 1$ y la α -hélice 1. Las α -hélices 1 y 4 son muy largas en ambas estructuras.

Además de las características estructurales, estas familias tienen sentido químico y metabólico. Todos los barriles que requieren flavín mononucleótido (FMN) como cofactor pertenecen a la familia *A*. Con excepción de la RUBISCO, todas las enzimas que requieren metales divalentes para su catálisis pertenecen a la familia *B* (la PK utiliza también K^+). Las enzimas de la familia *E* unen NAD^+ . Se ha sugerido que las vías metabólicas se desarrollan a partir de la duplicación de genes seguida por la especialización (Farber y Petsko 1990). La clasificación antes mencionada apoya esta idea: tres de los cuatro pasos finales en la biosíntesis del triptofano son catalizados por barriles $(\beta/\alpha)_8$ (PRAI, IGPS y TS), todas ellas pertenecen a la familia *C*; también la enolasa y PK que son enzimas consecutivas en la glucólisis pertenecen a la misma familia (*B*). La posible excepción a esta "regla" son la fructosa bisfosfato aldolasa y la triosafosfato isomerasa que no pertenecen a la misma familia, pero son consecutivas en la glucólisis.

Plegamiento de los Barriles β/α

Generalidades

El plegamiento de los siguientes barriles β/α presenta al menos un intermediario en su proceso de desplegamiento: la subunidad α de la triptofano sintasa (Matthews y Crisanti 1981; Miles *et al.* 1982; Stackhouse *et al.* 1988), la fosforribosilantranilato isomerasa (PRAI) de *S. cerevisiae* (Eder y Kirschner 1992), la indol-3-glicerol-fosfato sintasa (IGPS) de *Sulfolobus solfataricus* (Andreotti *et al.* 1997), y los dominios aislados de la PRAI e IGPS de la bienzima PRAI-IGPS de *E. coli* (Jassanoff *et al.* 1994; Sánchez del Pino y Fersht 1997). Se han predicho también intermediarios en estudios de simulación para la subunidad α de la triptofano sintasa (Godzik *et al.* 1992). El único barril β/α en donde no se han reportado intermediarios es en la aldolasa monomérica de *Staphylococcus aureus* (Rudolph *et al.* 1992). Mediante la combinación de estudios cinéticos y al equilibrio para la desnaturalización y renaturalización de algunos barriles $(\beta/\alpha)_8$ se ha propuesto un mecanismo general para su plegamiento (*ej.* Miles *et al.* 1982; Eder y Kirschner 1992; Jassanoff *et al.* 1994). En estos trabajos se incluye también el estudio del

contenido de estructura de segmentos aislados de los barriles obtenidos por proteólisis, los cuales pueden plegarse independientemente (Miles *et al.* 1982).

Mecanismo general para el plegamiento de los barriles β/α

A través de los resultados obtenidos para la complementación de los fragmentos obtenidos por proteólisis para la subunidad α de la triptofano sintasa (Miles *et al.* 1982) y PRAI (Eder y Kirschner 1992), así como estudios de la desnaturalización cinética y al equilibrio para la PRAI (Jassanoff *et al.* 1994) y la IGPS (Sánchez del Pino y Fersht 1997), se ha concluido que el mecanismo general para el plegamiento de los barriles β/α es un proceso en el cual la región menos estable que comprende al carboxilo terminal (α_6 - α_8) se desnaturaliza a muy bajas concentraciones de desnaturalizante. A este proceso le sigue a concentraciones mayores de desnaturalizante el desplegamiento de la región amino terminal, más estable y formada por la región β_1 - β_6 (Miles *et al.* 1982). A partir de estudios cinéticos, se ha propuesto un mecanismo 6 + 2 con dos diferentes unidades de plegamiento y se ha demostrado que el paso limitante para la renaturalización, el cual ocurre tardíamente en la vía de plegamiento, es la fusión de las dos unidades de plegamiento (Eder y Kirschner 1992).

TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

Generalidades

La triosafosfato isomerasa (TPI o TIM) (Figura 4) es un homodímero. Cada subunidad tiene una masa molecular cercano a 27kDa y se pliega en un dominio $(\beta/\alpha)_8$, que es el prototipo del barril α/β , o "TIM barrel". Esta enzima cataliza la interconversión de los productos provenientes de la catálisis de la aldolasa en la vía glucolítica, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el R-gliceraldehído 3-fosfato (GAP). Únicamente el GAP puede continuar en el camino de la oxidación de la glucosa hasta el piruvato, de tal forma que la TPI asegura la producción neta de ATP en la glucólisis; también participa en el máximo aprovechamiento de la degradación de los ácidos grasos para la obtención de energía después de la transformación del glicerol de los triacilglicéridos en DHAP, que nuevamente isomeriza a GAP y se incorpora a la glucólisis.

contenido de estructura de segmentos aislados de los barriles obtenidos por proteólisis, los cuales pueden plegarse independientemente (Miles *et al.* 1982).

Mecanismo general para el plegamiento de los barriles β/α

A través de los resultados obtenidos para la complementación de los fragmentos obtenidos por proteólisis para la subunidad α de la triptofano sintasa (Miles *et al.* 1982) y PRAI (Eder y Kirschner 1992), así como estudios de la desnaturalización cinética y al equilibrio para la PRAI (Jassanoff *et al.* 1994) y la IGPS (Sánchez del Pino y Fersht 1997), se ha concluido que el mecanismo general para el plegamiento de los barriles β/α es un proceso en el cual la región menos estable que comprende al carboxilo terminal ($\alpha_6-\alpha_8$) se desnaturaliza a muy bajas concentraciones de desnaturalizante. A este proceso le sigue a concentraciones mayores de desnaturalizante el desplegamiento de la región amino terminal, más estable y formada por la región $\beta_1-\beta_6$ (Miles *et al.* 1982). A partir de estudios cinéticos, se ha propuesto un mecanismo 6 + 2 con dos diferentes unidades de plegamiento y se ha demostrado que el paso limitante para la renaturalización, el cual ocurre tardíamente en la vía de plegamiento, es la fusión de las dos unidades de plegamiento (Eder y Kirschner 1992).

TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

Generalidades

La triosafosfato isomerasa (TPI o TIM) (Figura 4) es un homodímero. Cada subunidad tiene una masa molecular cercano a 27kDa y se pliega en un dominio $(\beta/\alpha)_6$, que es el prototipo del barril α/β , o "TIM barrel". Esta enzima cataliza la interconversión de los productos provenientes de la catálisis de la aldolasa en la vía glucolítica, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el R-gliceraldehído 3-fosfato (GAP). Únicamente el GAP puede continuar en el camino de la oxidación de la glucosa hasta el piruvato, de tal forma que la TPI asegura la producción neta de ATP en la glucólisis; también participa en el máximo aprovechamiento de la degradación de los ácidos grasos para la obtención de energía después de la transformación del glicerol de los triacilglicéridos en DHAP, que nuevamente isomeriza a GAP y se incorpora a la glucólisis.



FIGURA 4.

Estructura de la sTPI. Se muestran los residuos de triptofano (en amarillo) que se encuentran en las posiciones 90, 157 y 168 para cada una de las subunidades. Tomado de Lolis y Petsko (1990). Archivo del protein data bank (*pdb*): 1YPI. En negro se muestran las α -hélices y en gris las hojas β .

La TPI se ha encontrado en todos los organismos estudiados y actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 60 especies y la estructura tridimensional de nueve de ellas: *Gallus gallus* (gTPI) (Banner *et al.* 1975; Zhang *et al.* 1994); *Saccharomyces cerevisiae* (sTPI) (Lolis *et al.* 1990); *Trypanosoma brucei* (tbTPI) (Wierenga *et al.* 1991); *Escherichia coli* (eTPI) (Noble *et al.* 1993); *Homo sapiens* (hTPI) (Mande *et al.* 1994); *Bacillus stearothermophilus* (Delboni *et al.* 1995); *Plasmodium falciparum* (pTPI) (Velanker *et al.* 1997); *Vibrio marinus* (Alvarez *et al.* 1998) y *Trypanosoma cruzi* (Maldonado *et al.* 1998). Por otra parte, se conocen algunos rearreglos estructurales que se llevan a cabo en presencia de diversos análogos del sustrato (Davenport *et al.* 1991; Noble *et al.* 1993; Harris *et al.* 1997).

Catálisis

El sitio activo de la enzima se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad formada por las asas contiguas al extremo N-terminal de las hebras β (Banner *et al.* 1975) (Figura 4). La interconversión del GAP catalizada por la triosafosfato isomerasa es entre 10^8 y 10^9 veces más rápida que en ausencia de la enzima. La relación k_{cat}/K_m^4 para el GAP como

⁴La relación k_{cat}/K_m representa la constante de velocidad aparente de segundo orden (v) de la reacción entre enzima libre ($[E]$) y sustrato libre ($[S]$); $v = (k_{cat}/K_m) [E][S]$ (Fersht 1985).

substrato es de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; este valor es comparable al calculado para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión ($10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Knowles y Alberly 1977). Mecanísticamente, la función biológica de esta enzima consiste en disminuir las barreras energéticas que limitan la velocidad de protonación y deprotonación del GAP y la DHAP y/o estabilizar el intermediario *cis*-enediol(ato). El perfil de energía libre de la isomerización muestra que el estado de transición de energía más elevada, es la unión del GAP al sitio catalítico de la enzima (Knowles y Alberly 1977); a partir de estas observaciones, y de estudios de la catálisis al variar la viscosidad del solvente, se ha concluido que la velocidad de la reacción está limitada solamente por la difusión de los substratos y que no se debe a los ajustes conformacionales entre la proteína y el solvente para la catálisis o bien a rearreglos químicos entre los substratos y la enzima (Blacklow *et al.* 1988). De acuerdo a lo anterior, la TPI es un catalizador "perfecto" pues cualquier aumento en la velocidad de los eventos que cataliza no tendría efecto en la velocidad de la reacción (Knowles y Alberly 1977); experimentalmente esta característica tiene ventajas y desventajas para los estudios de plegamiento, de ellas se hará mención en secciones posteriores.

Para llevar a cabo la isomerización, el mecanismo de reacción comprende la formación de un intermediario *cis*-enediol(ato) (Figura 5) (Lodi y Knowles 1993).

A partir de estudios cinéticos, genéticos y estructurales, se ha propuesto que la catálisis de la TPI involucra un mecanismo ácido-base, en el que el carboxilato del Glu 165⁵ y el imidazol de la His 95 realizan las protonaciones y desprotonaciones necesarias para la formación del enediol(ato) (Knowles 1991). Existen otros residuos que participan en la unión del sustrato, por ejemplo, la lisina 12 interactúa con el macrodipolo formado por dos α -hélices, una de ellas modifica el pK de la His 95, mientras que el macrodipolo positivo de la otra permite la unión del fosfato del sustrato. Para asegurar al máximo su función, la enzima cuenta con una asa móvil que oculta al sustrato del solvente evitando la formación del subproducto tóxico metilgloxal, que se genera cuando la reacción se lleva a cabo en solución. Los residuos involucrados en la unión y catálisis del sustrato están contenidos en cada monómero, sin embargo, las asas de los carboxilos terminales de cada monómero contienen tanto residuos del sitio activo como de la interfase. (Wierenga *et al.* 1992).

⁵La numeración se refiere a la secuencia de la TPI de levadura.

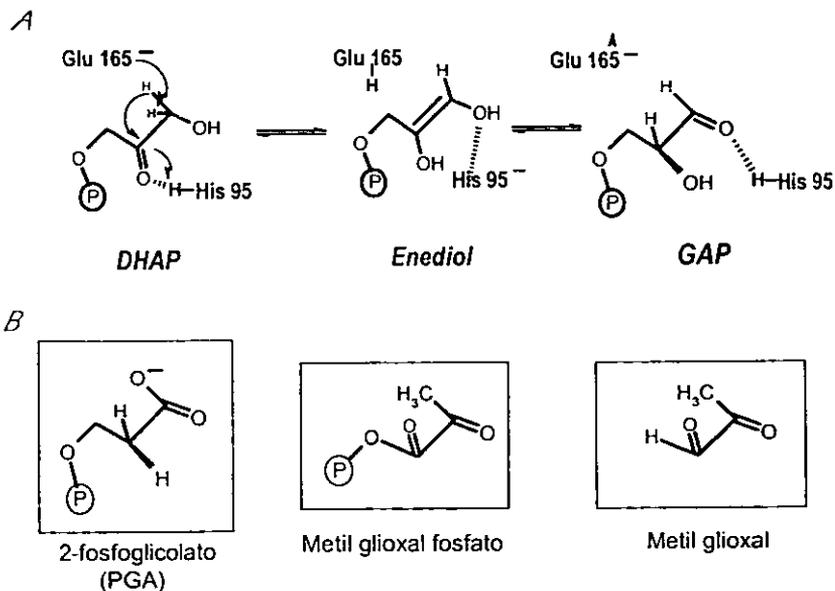


FIGURA 5.

A. Mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa. B⁺ representa a la base catalítica (Glu 165) y HA al ácido catalítico (His 95). DHAP dihidroxiacetona fosfato; GAP R-gliceraldehído 3-fosfato. **B.** Se muestran las moléculas del inhibidor (análogo del sustrato) 2-fosfoglicolato (PGA) y de los subproductos metil glioxal fosfato y metilglioxal (piruvaldehído o acetilformaldehído).

La naturaleza dimérica de la TPI es necesaria para su catálisis

La naturaleza oligomérica de algunas enzimas está claramente relacionada con sus propiedades catalíticas. En el caso de la TPI esta relación no es tan clara.

Los siguientes datos sugieren que la oligomerización –en este caso dimerización– se requiere para la catálisis eficiente de la TPI: (i) a la fecha no se han reportado TPI monoméricas silvestres; la triosafosfato isomerasa es homodimérica en los mesófilos y termófilos estudiados y homotetramérica en los archeas hipertermofílicos *Pyrococcus woeisi* y *Methanothermus fervidus* (Kohlhoff *et al.* 1996), así como en la enzima bifuncional 3-fosfoglicerato-cinasa/triosafosfato isomerasa de *Thermotoga maritima* (Schuring *et al.* 1995). (ii) Estudios cinéticos de las mutantes monoméricas construidas por ingeniería genética de los residuos de la interfase en la enzima de *T. brucei* (Borchert *et al.* 1994; Schliebs *et al.* 1997) y de humano (hTPI) (Mainfroid *et al.* 1996b), muestran una *k_{cat}* de dos a tres órdenes de magnitud menor que la que se observa en las enzimas silvestres respectivas. (iii) Durante la renaturalización de la enzima de conejo (cTPI) en

sistemas con bajo contenido de agua, el intermediario que se observa en la renaturalización no presenta actividad catalítica apreciable (Fernández-Velasco *et al.* 1995). (iv) Las renaturalizaciones de la cTPI (Waley 1973; Zabori *et al.* 1980) y sTPI (Nájera *et al.* en preparación) en soluciones acuosas, se ajustan adecuadamente a un modelo de tres estados en el cual la única entidad catalítica es el dímero nativo (*N*). Recientemente, por medio de experimentos de transferencia isotópica, se ha reportado evidencia de interacción entre los sitios activos del dímero (Harris *et al.* 1998).

Desnaturalización de la triosafosfato isomerasa

En 1973 Waley describió que la velocidad de renaturalización de cTPI, a bajas concentraciones de proteína (100 ng mL^{-1}), depende de la concentración de enzima sin embargo, a concentraciones mayores de cTPI, la reacción es independiente de la concentración (Waley 1973). Con este estudio y un trabajo posterior con la gTPI (McVitie *et al.* 1977) se concluyó que el paso limitante en la renaturalización es precisamente la asociación de los monómeros; más adelante, se cuantificaron las constantes de velocidad de primer y segundo orden para el proceso y se supuso que los monómeros plegados son intermediarios del plegamiento que no poseen actividad catalítica durante la renaturalización (Zabori *et al.* 1980). Sun y colaboradores (1992) realizaron experimentos de hibridación entre monómeros de diferentes especies y encontraron que la interfase formada en heterodímeros conejo/levadura y levadura/pollo conllevan a una enzima funcional, mientras que los heterodímeros conejo/pollo no. El mismo grupo (Sun *et al.* 1993) efectuó experimentos de proteólisis limitada en la sTPI y encontraron que después del tratamiento la enzima permanece catalíticamente activa con los fragmentos resultantes unidos no covalentemente. Uno de los fragmentos obtenidos contiene residuos del asa catalítica, por lo cual la enzima tratada reduce su K_m y k_{cat} . Por experimentos de desnaturalización, disociación y renaturalización estos autores encontraron que los fragmentos pueden reasociarse en estructuras catalíticamente activas.

Restringiendo el contenido de agua se ha estudiado la dimerización y reactivación de la cTPI en micelas invertidas (Garza-Ramos *et al.* 1992). Estos autores reafirmaron el hecho de que la dimerización es necesaria para la actividad catalítica y encontraron que la reactivación depende críticamente de la cantidad de agua en las micelas. Modificando la cantidad de agua en este sistema, Fernández-Velasco y colaboradores (1995) encontraron que para el plegamiento de los monómeros se necesita más agua que para su asociación. A partir de observaciones en un sistema modelo (tripsina y su inhibidor) concluyeron que a 2.0 % de agua en las micelas pueden llevarse a cabo las interacciones proteína-proteína. En estas mismas condiciones la

asociación de los monómeros de la cTPI no se lleva a cabo, por lo cual dedujeron que después de la colisión los monómeros deben sufrir un cambio conformacional para formar al dímero catalíticamente activo y que, por tanto, en estas condiciones hay una barrera cinética que impide la formación de dímeros activos a partir de monómeros plegados (Fernández-Velasco *et al.* 1995). Por medio de la técnica de FRET (fluorescence resonance energy transfer), Sepúlveda-Becerra y colaboradores (1996) estudiaron la renaturalización-reasociación de la cTPI en micelas invertidas inducida por Gdn-HCl. Al mezclar los monómeros marcados con IAEDANS y FITC observaron un incremento en el FRET durante la renaturalización en las micelas, lo cual fue interpretado como la formación de un dímero inactivo en los primeros minutos de la dilución del desnaturalizante. Se ha estudiado la desnaturalización de la cTPI inducida por cambios en la presión hidrostática y seguida por cambios en FRET (Rietveld y Ferreira 1996); se encontró que la disociación y desnaturalización son eventos que ocurren simultáneamente, este proceso no es dependiente de la concentración de proteína.

Estudiando el efecto de la mutación H47N en la interfase de la tbTPI se encontró que al modificar residuos que tienen contactos con la otra subunidad (en este caso la histidina 47 hace un puente de hidrógeno mediado por agua con el asparagina 85 de la otra subunidad) el dímero resultante es menos estable que el de la enzima silvestre (Borchert *et al.* 1993a). El mismo grupo diseñó una mutante monomérica de la tbTPI (monoTIM) cambiando 15 residuos del asa 3 (ver Figura 4) o asa de la interfase por un fragmento de 8 residuos. Encontraron que esta mutante posee actividad catalítica independiente de la concentración de proteína, pero su afinidad por el sustrato es 20 veces menor y su k_{cat} 10^3 menor que los mismos parámetros para la enzima silvestre (Borchert *et al.* 1994). Recientemente, se han construido otras mutantes monoméricas de la tbTPI para conocer la estabilidad de los monómeros. En una de estas mutantes, la RE-TIM (Schliebs *et al.* 1997), se han sustituido sólo dos residuos de la interfase, la tirosina 75 por arginina (R) y la glicina 76 por glutamato (E). Estos residuos están también localizados en el asa 3. Esta mutante presenta actividad residual y su estabilidad térmica es menor que la de la enzima silvestre. A partir de estos resultados, los autores propusieron que estos los monómeros aparentemente silvestres tienen cierta estabilidad y son catalíticamente activos. De la misma forma, se infirió que estas subunidades tienen asas flexibles que se rigidizan en la interfase cuando se lleva a cabo la dimerización, lo cual causa un incremento de 10^3 veces en la k_{cat} y un decremento de 10 veces en la K_m (Schliebs, *et al.* 1997).

Basados en estudios de la desnaturalización por urea de la enzima silvestre y mutantes monoméricas de hTPI, Mainfroid y colaboradores (1996a) propusieron un mecanismo de tres

estados ($N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$) para la desnaturalización al equilibrio. Este modelo fue confirmado posteriormente estudiando el efecto estabilizador de mutaciones en el comportamiento del dímero y una mutante monomérica (Mainfroid *et al.* 1996b). El mismo modelo de tres estados fue propuesto para la desnaturalización de la cTPI inducida por Gdn-HCl (Rietveld y Ferreira 1998), en donde datos al equilibrio fueron ajustados a una transición de dos estados y datos cinéticos fueron usados para estimar las propiedades del monómero asumido en la transición. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se detectaron intermediarios en el equilibrio. Finalmente, Gokhale y colaboradores (1999) estudiaron la desnaturalización de la pTPI inducida por urea y Gdn-HCl. En este último desnaturalizante observaron un intermediario. Desgraciadamente, la agregación del intermediario en estas condiciones no permitió la caracterización termodinámica del proceso.

OBJETIVOS.

El objetivo general de este proyecto es caracterizar el patrón de plegamiento y asociación de la triosafosfato isomerasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentro de los objetivos particulares de este proyecto se tienen los siguientes:

- i. Determinar el modelo de desnaturalización de la triosafosfato isomerasa en urea y cloruro de guanidinio.
- ii. Calcular el cambio en la energía libre para la disociación y desnaturalización en ausencia de desnaturalizante, así como el ΔG_{tot} del proceso.
- iii. Comparar los datos obtenidos al utilizar los dos agentes desnaturalizantes.
- iv. Comparar estos resultados con los obtenidos para otros barriles $(\beta/\alpha)_8$.

JUSTIFICACIÓN.

La formación espontánea de la estructura de un oligómero consiste del plegamiento intramolecular y la posterior asociación intermolecular de las subunidades que lo constituyen. En la actualidad se tiene información detallada sobre la ruta de plegamiento de enzimas monoméricas y general de algunas oligoméricas. La mayoría de estos estudios han generado información sobre el fenómeno de plegamiento. El estudio global del plegamiento y la asociación es mucho más complicado, pues para ello se requiere de condiciones experimentales que permitan que los procesos de desnaturalización y renaturalización sean reversibles, sólo de esta manera es posible calcular constantes de equilibrio que permitan conocer la ruta que sigue la secuencia primaria para adoptar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria adecuadas. Desde el punto de vista biológico, la mayoría de las enzimas son de carácter oligomérico, por lo tanto, es muy importante generar información sobre el ensamblaje de enzimas constituidas por diversos componentes polipeptídicos.

¿Cómo describir el plegamiento y la asociación de un oligómero?

La manera más sencilla, es utilizando la estructura más simple en la cual se vean involucrados ambos fenómenos. El modelo a utilizar en este trabajo, es la enzima triosafosfato isomerasa debido a las siguientes razones:

- 1.- Esta enzima está presente en todos los organismos.

OBJETIVOS.

El objetivo general de este proyecto es caracterizar el patrón de plegamiento y asociación de la triosafosfato isomerasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentro de los objetivos particulares de este proyecto se tienen los siguientes:

- i. Determinar el modelo de desnaturalización de la triosafosfato isomerasa en urea y cloruro de guanidinio.
- ii. Calcular el cambio en la energía libre para la disociación y desnaturalización en ausencia de desnaturalizante, así como el ΔG_{tot} del proceso.
- iii. Comparar los datos obtenidos al utilizar los dos agentes desnaturalizantes.
- iv. Comparar estos resultados con los obtenidos para otros barriles $(\beta/\alpha)_8$.

JUSTIFICACIÓN.

La formación espontánea de la estructura de un oligómero consiste del plegamiento intramolecular y la posterior asociación intermolecular de las subunidades que lo constituyen. En la actualidad se tiene información detallada sobre la ruta de plegamiento de enzimas monoméricas y general de algunas oligoméricas. La mayoría de estos estudios han generado información sobre el fenómeno de plegamiento. El estudio global del plegamiento y la asociación es mucho más complicado, pues para ello se requiere de condiciones experimentales que permitan que los procesos de desnaturalización y renaturalización sean reversibles, sólo de esta manera es posible calcular constantes de equilibrio que permitan conocer la ruta que sigue la secuencia primaria para adoptar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria adecuadas. Desde el punto de vista biológico, la mayoría de las enzimas son de carácter oligomérico, por lo tanto, es muy importante generar información sobre el ensamblaje de enzimas constituidas por diversos componentes polipeptídicos.

¿Cómo describir el plegamiento y la asociación de un oligómero?

La manera más sencilla, es utilizando la estructura más simple en la cual se vean involucrados ambos fenómenos. El modelo a utilizar en este trabajo, es la enzima triosafosfato isomerasa debido a las siguientes razones:

- 1.- Esta enzima está presente en todos los organismos.

- 2.- Es un homodímero, i.e. el modelo más sencillo de asociación, de hecho no es todavía claro el por qué la *TPI* sólo es activa como dímero, ya que los aminoácidos involucrados en la catálisis se encuentran contenidos en el monómero. Es probable que las interacciones en la interfase sean necesarias para mantener a los aminoácidos catalíticos en una posición adecuada, o para mantener la estabilidad del barril. A partir de la magnitud relativa de la energía de asociación y de plegamiento de los monómeros en este trabajo se pretende dilucidar cuál de estas opciones es la correcta, pues de hecho, un número importante de aminoácidos de la interfase se encuentran conservados a lo largo de la escala evolutiva.
- 3.- Se conoce la secuencia de aminoácidos para alrededor de 60 especies, lo que facilita la comparación de regiones importantes en el proceso de plegamiento y asociación.
- 4.- Se conoce la estructura cristalográfica de nueve de ellas, esta información revela la estructura tridimensional de la molécula, así como las regiones que intervienen en la asociación y la posición de aminoácidos específicos, como el triptofano.
- 5.- La *TPI* es la enzima representativa de la estructura barril β/α (del total de las proteínas cristalizadas aproximadamente el 10% poseen esta estructura), por lo cual su estudio permite elucidar sobre la historia evolutiva de esta estructura.
- 6.- Manifiesta una actividad catalítica elevada, hecho que facilita el seguimiento de los fenómenos cinéticos durante el proceso de plegamiento y asociación.
- 7.- Contamos con las herramientas de biología molecular para la sobre expresión de enzimas de diferentes fuentes. La purificación de estas enzimas es relativamente sencilla, lo cual permite obtener grandes cantidades de enzima, así como la comparación entre diferentes especies.
- 8.- Se utilizó a la *TPI* de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo ya que presenta un alto porcentaje de renaturalización bajo diferentes condiciones. Esta ventaja permite obtener constantes cinéticas y de equilibrio, lo que en otros oligómeros no es posible, pues el proceso de renaturalización no es reversible ya que se forman agregados intermoleculares irreversibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El cloruro de guanidinio (Gdn-HCl) fue obtenido de Boehringer GmbH Mannheim; la urea de Aldrich y el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido de GIBCO BRL. Los demás reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

Condiciones de sobre expresión

Las células de *E. coli*, cepa JM103 las cuales contienen al plásmido pKK223-3ytm para expresar a la sTPI, fueron generosamente donadas por el Dr. David P. Heitmeyer (Harvard University, Cambridge, U.S.A.) al Dr. Ruy Pérez-Montfort (UNAM). El crecimiento celular se llevó a cabo a 37 °C en medio Luria-Bertani complementado con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. El cultivo se indujo cuando $A_{600} = 1.0$ por la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido a una concentración final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El crecimiento continuó por 12 h más. Todo el protocolo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Purificación de la sTPI recombinante

(1) La pastilla que contiene a las células provenientes del cultivo (2 ó 3 L), se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y fluoruro de *p*-metilsulfonil (PMSF) 20 mM/ dimetilsulfóxido (DMSO)); (2) Las células se lisaron por cambios de presión en una prensa de French (3x a 1500 psi); (3) El lisado se centrifugó 1 h a 4 °C y 63,000 x g; (4) El sobrenadante, se fraccionó con sulfato de amonio en el rango de saturación 65-90 % y se resuspendió y dializó contra amortiguador A (10 mM trietanolamina (TEA), 1.0 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1.0 mM ditioneitol (DTT), pH 7.6) por aproximadamente 12 h. (5) La solución se filtró a través de una membrana Millipore Gs (poro: 0.22 μm). El protocolo cromatográfico se llevó a cabo en un sistema de FPLC (Pharmacia, Biotech). (6) La muestra fue aplicada a una columna de Sefacril S-300 (16 mm x 70 cm) preequilibrada con amortiguador A complementado con 1.0 mM de azida de sodio. (7) Las fracciones que contenían la mayor actividad específica se reunieron y aplicaron a una columna de MonoQ 10/10 (Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con amortiguador A. La proteína fue eluida con un gradiente lineal de 0-100 mM de cloruro de sodio en el mismo amortiguador. (8) Las fracciones con mayor actividad específica se reunieron y se ajustó el pH a 8.0, se repitió la diálisis (a pH 8.0) y el

dializado se aplicó a la columna de MonoQ, preequilibrada con amortiguador A (a pH 8.0). (9) La proteína fue eluida con un gradiente lineal de 0-150 mM de cloruro de sodio en el mismo amortiguador.

Las fracciones resultantes de la purificación fueron analizadas por actividad catalítica y por geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) en presencia de SDS teñidos con plata. Las fracciones que contenían a la *sTPI* se reunieron y dializaron contra TEA 100 mM/ EDTA 10 mM/ DTT 1 mM (TED 100/10/1) pH 7.4

Caracterización de la proteína

La concentración de proteína fue determinada por cuantificaciones de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de absorción $A_{280}^{1\%_{1cm}} = 10$ (Norton y Hartman, 1972), y eventualmente por el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.* 1951; Hartree, 1972) utilizando albúmina sérica de bovino como estándar.

La actividad catalítica de la *sTPI* se siguió por medio de la oxidación del ácido nicotín adenin dinucleótido (NADH) a una absorbancia a 340 nm, en un sistema acoplado a la α -glicerolfosfato deshidrogenasa (GPH) a 25 °C (Rozacky *et al.* 1971) (Figura 6).

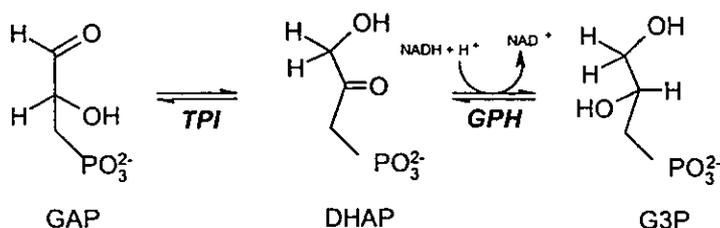


FIGURA 6

Reacción acoplada para la cuantificación de catálisis de la triosafosfato isomerasa. NAD⁺, NADH: nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado y reducido respectivamente); GPH: α -glicerolfosfato deshidrogenasa; G3P: glicerol-3-fosfato.

Las condiciones de reacción para la producción de DHAP fueron las siguientes: TED 100/10/1 pH 7.4, D,L gliceraldehido-3-fosfato 1.5-3.0 mM, α -glicerolfosfato deshidrogenasa 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y NADH 0.2 mM.

La electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó de acuerdo a Laemmli (1970).

Condiciones de reversibilidad

La reversibilidad de la desnaturalización (renaturalización) fue ensayada por medio de dos protocolos:

Dilución: A.- Muestras de *sTPI* (50-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), se equilibraron (24 h para Gdn-HCl y 48 h para urea) en concentraciones de desnaturizante representativas del patrón de desnaturalización (esto es, en la transición y en las regiones previa y posterior). B.- La renaturalización fue iniciada por simple dilución de las muestras de *sTPI* en TED 100/10/1 pH 7.4 durante 24 h.

Elución-centrifugación: se repitió el paso A. En el protocolo de la renaturalización, se equilibraron columnas de Sefadex G50 fine (1 mL) con 3 mL de TED 100/10/1 pH 7.4. Las columnas se centrifugaron 1 min a 7,500 x g a 4 °C en una centrifuga clínica; posteriormente se aplicó a cada una de ellas 100 μL de las muestras de *sTPI* incubadas al tiempo de equilibrio en el desnaturizante y se repitieron las condiciones de centrifugación.

Experimentos de desnaturalización

Intensidad de fluorescencia (IF)

Las muestras de *sTPI* fueron incubadas a 25 °C en TED 20/1/1 pH 7.4 durante el tiempo de equilibrio previamente determinado para cada desnaturizante. Los cambios en la fluorescencia se siguieron utilizando un espectrofluorómetro ISS PCI (ISS, Champaign, IL, USA) termorregulado a 25 °C. La fluorescencia intrínseca de *sTPI* se cuantificó excitando la muestra a 280 nm, con una ventana de 4.0 nm, y la emisión fue colectada con un paso de luz de 4.0 nm entre 300 y 400 nm. La longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}) de la enzima nativa es 320 nm, de ahí que la intensidad observada en la λ_{max} se utilizó como 100 % para normalizar los datos. La fluorescencia del 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS) se cuantificó excitando la muestra a 360 nm, con un paso de luz de 4.0 nm, y la emisión fue colectada con una ventana de 4.0 nm entre 400 y 560 nm. Los cambios en la fluorescencia del ANS se siguieron a 480 nm (longitud de onda de máxima emisión del fluoróforo). El valor de la fluorescencia de la enzima

disociación. En cuanto al paso 2, en ausencia de desnaturante y a 2 ng de *sTPI* mL⁻¹, el dímero nativo es estable por al menos 24 h (ver Resultados) y la reasociación tiene una vida media del orden de horas ($k_{asos} = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, Nájera *et al.* en preparación). La disociación durante este paso podría manifestarse como un trazo cóncavo en el curso temporal de la oxidación del NADH, mientras que la reasociación como un trazo convexo. El cambio en la fracción de dímeros catalíticos debido a la dilución del desnaturante y la proteína durante los ensayos de actividad catalítica (paso 2) se descartó a partir de la linealidad del curso temporal. Todos estos hechos implican que en la escala de tiempo de los pasos 1 y 2, el equilibrio entre las moléculas inactivas y activas no es perturbado significativamente. Es importante mencionar que con este protocolo la posible contribución de dímeros inactivos en equilibrio rápido con la enzima nativa no puede ser cuantificada.

Cinética de desnaturalización por dos pasos

El experimento de dos pasos se llevó a cabo de acuerdo a Mücke y Schmid (1994). El ensayo de desnaturalización se inició diluyendo muestras de *sTPI* (200 µg mL⁻¹) equilibradas en diferentes concentraciones de desnaturante a las mismas condiciones, *i.e.* 50 µg mL⁻¹ en TED 20/1/1 pH 7.4 y una concentración de desnaturante de 3.0 M de Gdn-HCl o 7.0 M de urea. La cinética de desnaturalización se siguió por el apagamiento en la fluorescencia a 320 nm (excitando la muestra a 280 nm). Los trazos cinéticos obtenidos se describen por funciones exponenciales y fueron analizados como simples decaimientos exponenciales usando el programa GraFit 3.09b (Erithacus Software, Staines, U.K.).

Cromatografía líquida de exclusión molecular en presencia de desnaturante

Las propiedades hidrodinámicas de *sTPI* en la transición entre el estado *N* y el *U* fueron analizadas por cromatografía de filtración zonal (Uversky 1993). Las muestras previamente equilibradas a cada concentración de desnaturante se aplicaron a una columna Superdex 200HR (resolución de peso molecular: $1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$; dimensiones: 10 x 300 mm), equilibrada en las mismas condiciones de solvente que la muestra que se aplica. Las muestras fueron eluidas a un flujo de 1 mL min⁻¹ y sus absorbencias se cuantificaron a 280 nm usando un sistema de HPLC Beckman modelo 126/168 (sistema Gold). Ocho proteínas con radio de Stokes (*R_s*) conocido se utilizaron para calibrar la columna.

Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de sedimentación al equilibrio se efectuaron en una ultracentrifuga Beckman Optima XL-A. Antes del experimento, las muestras de *sTPI* se equilibraron durante 24 h en TED 20/1/1 pH 7.4 en presencia o ausencia de 1.0 M de Gdn-HCl; posteriormente, se dializaron contra el amortiguador respectivo. Una porción del dializado se utilizó como referencia. Los experimentos de sedimentación al equilibrio se llevaron a cabo a 12,000 rpm y 20 °C. Los barridos a 280 nm separados cada 0.001 cm se realizaron cada 4 h hasta que la diferencia entre barridos consecutivos fuera cero. Los juegos de datos se analizaron por regresión no lineal. El volumen específico parcial de la *sTPI* se estimó a partir de la composición de aminoácidos.

Dispersión dinámica de luz

Por medio de dispersión dinámica de luz se cuantificaron el coeficiente de difusión traslacional promedio y los radios hidrodinámicos correspondientes para *sTPI* en amortiguador y en 1.0 M de Gdn-HCl. La iluminación fue producida con un láser de argón (Spectra Physics 2060-4S, Mountain View, CA, USA), operado a una longitud de onda de 514.5 nm. El haz de luz se enfocó al centro de una cubeta cilíndrica que contenía las muestras (1.5 mg mL^{-1} en 3 mL), a 90 ° de la dirección de detección. La luz dispersada fue detectada con un fotomultiplicador (THORN EMI 9863/100, England) y las señales eléctricas fueron preamplificadas con un preamplificador/discriminador (ALV/PM-PD, Germany).

Efecto de la concentración de sal en la estabilidad del intermediario

Los experimentos de desnaturalización inducida por Gdn-HCl se llevaron a cabo de la siguiente manera: Muestras de *sTPI* ($50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) fueron incubadas como se describió anteriormente, excepto que diferentes concentraciones de NaCl fueron agregadas para mantener constante la concentración de (Gdn-HCl + NaCl).

Disociación por dilución

Muestras de diferentes concentraciones de *sTPI* fueron incubadas 24 h en TED 100/10/1 a 25 °C. La actividad catalítica se cuantificó de dos formas diferentes dependiendo de la concentración de proteína en la incubación. La actividad catalítica de las muestras concentradas, se cuantificó agregando una alícuota de éstas a la celda de actividad para mantener constante la

Desarrollando el binomio, reorganizando, igualando a cero y resolviendo la ecuación de segundo grado resultante, se obtiene una expresión cuya raíz positiva describe la transición en términos de la constante de equilibrio, las señales de los conformeros y la concentración de proteína.

$$Y = (4PtY_N - K(Y_U - Y_N) \pm [(K(Y_U - Y_N) - 4PtY_N)^2 - 16P^2Y_N^2 + 8KPtY_U(Y_U - Y_N)]^{1/2}) / 4Pt \quad (9)$$

Dado que la constante de equilibrio se puede obtener a partir de la expresión: $\Delta G = -RT \ln K_{eq}$ ($R = 1.98717 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), entonces con la ecuación 9 y la 1 se obtiene una expresión que permite ajustar los datos experimentales para obtener el valor de ΔG^{\ddagger}_0 y m . Todo el razonamiento desarrollado anteriormente tiene detrás la suposición de que el cambio en ΔG como función del desnaturizante es una línea recta (ecuación 1).

Análisis de tres estados

La desnaturización de tres estados de una proteína dimerica con un intermedio monomérico está dada por:



en donde N representa a los dímeros en la conformación nativa, M a los monómeros plegados y U a los monómeros desplegados; las constantes de equilibrio para el paso bimolecular y unimolecular están dadas respectivamente por:

$$K_{N \rightarrow M} = \frac{[M]^2}{[N]} \quad \text{y} \quad K_{M \rightarrow U} = \frac{[U]}{[M]} \quad (11)$$

A cualquier concentración de desnaturizante, la proteína total (Pt) expresada en base a monómeros, está dada por: $Pt = 2[N] + [M] + [U]$; las fracciones mol (X) de cada uno de los conformeros (N , M y U) se definen como:

$$X_N = \frac{2[N]}{Pt}, \quad X_M = \frac{[M]}{Pt} \quad \text{y} \quad X_U = \frac{[U]}{Pt} \quad (12)$$

términos de las señales de los confórmers y las fracciones mol X_M y X_U , substituyendo los valores de estas fracciones por las ecuaciones 14 y 15 respectivamente, la ecuación obtenida describe la transición en términos de las constantes de equilibrio, las señales de los confórmers y la concentración de proteína:

$$Y = Y_N + [Y_M - Y_N + (Y_U - Y_N)K_2] \left[\frac{-K_1(1 + K_2) \pm [K_1^2(1 + K_2)^2 + 8PtK_1]^{1/2}}{4Pt} \right] \quad (18)$$

Si se asume que tanto $\Delta G_{N \rightleftharpoons M}$ como $\Delta G_{M \rightleftharpoons U}$ varían linealmente con la concentración de desnaturalizante (ecuación 1), esto es:

$$\Delta G_{N \rightleftharpoons M} = \Delta G_{N \rightleftharpoons M}^{H_2O} - m_{N \rightleftharpoons M} \{desnaturalizante\}$$

y

$$\Delta G_{M \rightleftharpoons U} = \Delta G_{M \rightleftharpoons U}^{H_2O} - m_{M \rightleftharpoons U} \{desnaturalizante\} \quad (19)$$

en donde $\Delta G_{N \rightleftharpoons M}^{H_2O}$ y $\Delta G_{M \rightleftharpoons U}^{H_2O}$ son los valores del cambio en la energía libre en ausencia de desnaturalizante (*i.e.* en agua) para el monómero plegado y desplegado, respectivamente y $m_{U \rightleftharpoons N}$ y $m_{M \rightleftharpoons U}$ son el cambio en ΔG^{H_2O} como función del desnaturalizante (*i.e.* la pendiente) para cada reacción parcial. Dado que la constante de equilibrio se puede despejar de la expresión: $\Delta G = -RT \ln K_{eq}$, la ecuación 18 se puede expresar en términos del cambio en la energía libre en ausencia de desnaturalizante de acuerdo a 19. Con este tratamiento se obtiene una expresión que permite ajustar los datos experimentales para obtener los valores de ΔG^{H_2O} para el paso bimolecular ($N \rightleftharpoons 2M$) y unimolecular ($M \rightleftharpoons U$), además de las m respectivas. Todo el razonamiento desarrollado anteriormente, tiene detrás la suposición de que el cambio en ΔG_x como función del desnaturalizante tiene un comportamiento lineal.

Las variables a ajustar en este tratamiento son los pares $\Delta G^{H_2O} - m$, y las señales de los confórmers para el paso bi y unimolecular (siete parámetros). Las señales del dímero nativo (Y_N) y del monómero desnaturalizado (Y_U) se pueden inferir de los patrones de desnaturalización, por lo cual los parámetros a ajustar se reducen a cinco.

RESULTADOS

Tiempos de equilibrio y reversibilidad

Los tiempos de equilibrio para la desnaturalización de la *sTPI* fueron determinados por fluorescencia intrínseca. Al seguir los cambios en la longitud de onda de máxima emisión (λ_{\max}), se encontró que el tiempo de equilibrio para la desnaturalización inducida por Gdn-HCl es de 24 h mientras que para urea es de 48 h (Figuras 7 A y B, respectivamente). Por lo tanto, todos los experimentos de desnaturalización que se muestran en este trabajo fueron previamente equilibrados en estas condiciones.

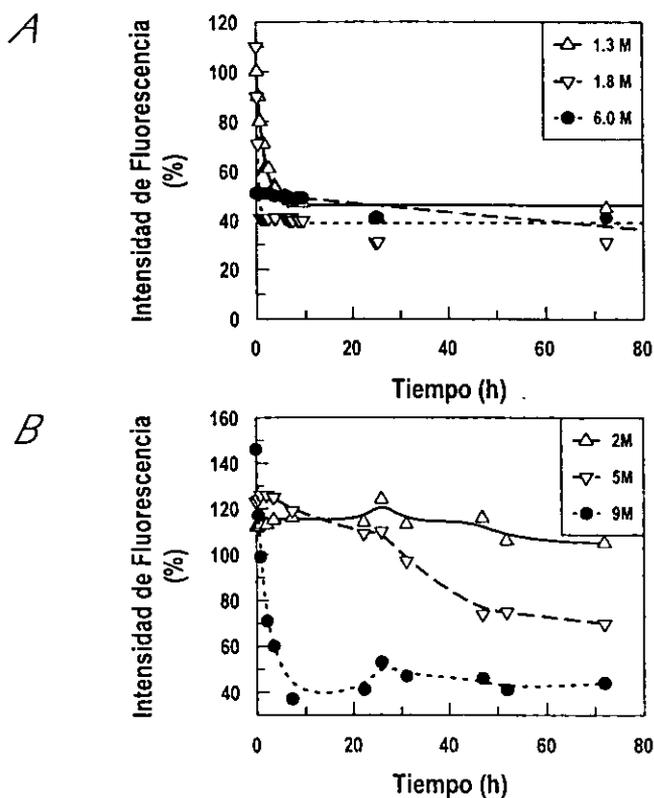


Figura 7.

Tiempo de equilibrio para la desnaturalización de la *sTPI* inducida por Gdn-HCl (A) y urea (B). El cambio en la fluorescencia intrínseca de muestras ($50 \mu\text{g } sTPI \text{ mL}^{-1}$) fue seguido a lo largo del tiempo. Se muestran concentraciones de desnaturalizante representativas.

Los ensayos de reversibilidad se llevaron a cabo en una variedad de condiciones, las cuales incluyen diferentes concentraciones de proteína y de desnaturalizante residual en la renaturalización (Tabla 4).

[Desnaturalizante Inicial] (M)	[Proteína] (mg mL ⁻¹)	[Desnaturalizante residual] (M)	Actividad recuperada (%)
Urea			
2	1	0.1	100
4	1	0.2	99
6	1	0.3	98
8	1	0.4	97
4	0.5	0.1	100
6	0.33	0.1	99
8	0.25	0.1	98
Gdn-HCl			
1	1	0.05	100
2	1	0.1	100
4	1	0.2	100
6	1	0.3	100
4	0.5	0.1	102
6	0.33	0.1	99

Tabla 4.

Ensayos de reversibilidad de la *sTPI*. Muestras de *sTPI* (50 µg mL⁻¹) fueron incubadas al tiempo de equilibrio (24 h en Gdn-HCl y 48 h en urea); posteriormente, la proteína y el desnaturalizante se diluyeron a las concentraciones indicadas y se cuantificó la actividad catalítica en presencia de las concentraciones de desnaturalizante residual señaladas (ver "Materiales y Métodos"). En todos los casos, el error experimental es menor al 10 %.

Tomando en cuenta el error experimental (aproximadamente 10 %), en todas las condiciones ensayadas, la actividad catalítica de la enzima nativa y la renaturalizada es la misma. En el protocolo de dilución, la reversibilidad total se observa a partir de una concentración de 0.33 µg *sTPI* mL⁻¹ en la renaturalización, cuando la concentración residual de desnaturalizante es menor a 0.1 M de urea o 60 mM de Gdn-HCl. Para el protocolo de elución-centrifugación, la recuperación de la actividad catalítica es del 100 % y la pérdida de proteína en este protocolo es sólo del 10 %; hasta el momento, no ha sido cuantificada la concentración residual de desnaturalizante después de la filtración.

La reversibilidad del proceso también fue cuantificada (cuando las condiciones experimentales así lo permitieron) siguiendo los espectros de fluorescencia intrínseca de la enzima nativa y la renaturalizada. Se encontró que, dentro del error experimental (>10 %), los valores de λ_{max} , intensidad de fluorescencia y SMC (centro de masa espectral) son semejantes

en ambos casos; por lo tanto, la estructura terciaria de la enzima renaturalizada es semejante a la de la nativa.

Estructura secundaria y terciaria

La Figura 8 muestra el patrón de la desnaturalización al equilibrio de la *sTPI* determinado por el cambio en los espectros de fluorescencia al variar la concentración de desnaturalizante. Tanto el Gdn-HCl como la urea inducen un decremento en la intensidad de fluorescencia (Figura 8A) así como un corrimiento al rojo en λ_{max} (Figura 8B). El cambio en λ_{max} entre la enzima nativa y la incubada en concentraciones elevadas de desnaturalizante es de 320 a 350 nm lo cual indica la completa exposición de los residuos de triptofano al solvente en ambos casos.

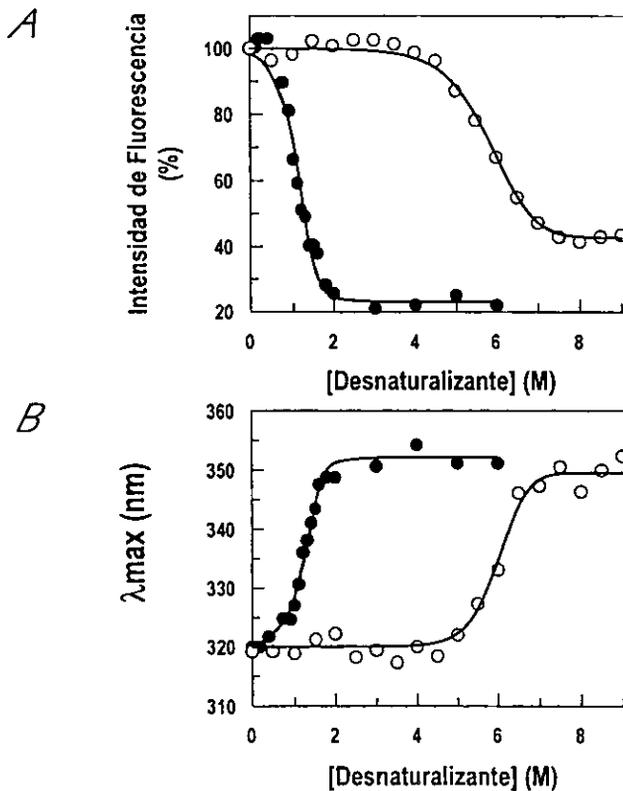


Figura 8

Desnaturalización al equilibrio de la *sTPI* seguida por cambios en la fluorescencia intrínseca. Las muestras ($50 \mu\text{g } sTPI \text{ mL}^{-1}$) fueron incubadas al tiempo de equilibrio en concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio (●) o urea (○). (A) Cambios en la fluorescencia intrínseca seguidos en la λ_{max} (320 nm) de la *sTPI* nativa; la intensidad de fluorescencia a esta longitud de onda fue asignada como 100 %. (B) Cambios en λ_{max} . Las curvas son el resultado del ajuste de los datos experimentales utilizando las ecuaciones 11 y 23 para urea y Gdn-HCl, respectivamente.

Para conocer las alteraciones de la estructura secundaria en la desnaturalización al equilibrio de la *sTPI*, se siguió el cambio en la elipticidad de la solución a 222 nm como función de la concentración de Gdn-HCl o urea (Figura 9).

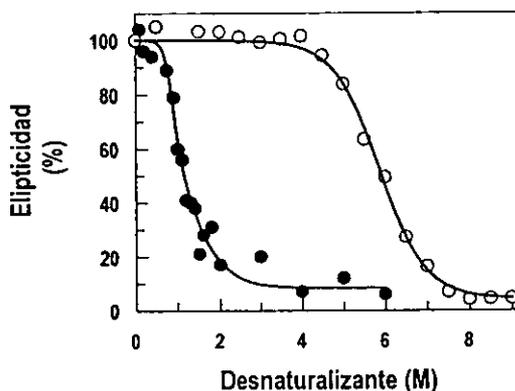


Figura 9.

Desnaturalización al equilibrio de *sTPI* seguida por cambios en el dicroísmo circular. Las muestras ($50 \mu\text{g sTPI mL}^{-1}$) fueron incubadas al tiempo de equilibrio en concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio (●) o urea (○). La elipticidad de la enzima nativa a 222 nm fue asignada como 100 %. Las curvas son el resultado del ajuste de los datos experimentales utilizando las ecuaciones 11 y 23 para urea y Gdn-HCl, respectivamente.

A partir de la similitud de los resultados obtenidos por fluorescencia y DC para ambos desnaturalizantes (comparar Figuras 8 y 9) es claro que los cambios en la estructura secundaria y terciaria son eventos concertados, *i.e.* muestran transiciones monofásicas y se llevan a cabo en el mismo intervalo de concentración de desnaturalizante.

Como se ha observado para otras proteínas (Pace 1975) se requiere de una menor concentración de Gdn-HCl que de urea para la desnaturalización de hecho, en el caso específico de *sTPI*, la transición es más cooperativa en el primer desnaturalizante, *i.e.* el intervalo de concentraciones en el cual ocurre la transición, es más pequeño en Gdn-HCl que en urea.

Actividad catalítica

Como se mencionó en la introducción, la actividad catalítica de la *TPI* se atribuye únicamente al dímero *N*. Aunque a partir de mutaciones de uno o varios aminoácidos de la interfase ha sido posible obtener monómeros estables (Borchert *et al.* 1994; Mainfroid *et al.*

1996b; Schliebs *et al.* 1997), así como moléculas con pequeños rearrreglos en el sitio activo del dímero (Raines *et al.* 1986, Joseph-McCarthy *et al.* 1994), se ha observado que estas mutaciones producen un decremento en la *kcal* de dos o tres órdenes de magnitud. Por lo tanto, las cuantificaciones de la actividad catalítica de las muestras usadas para los experimentos indicados en las Figuras 8 y 9 pueden ser utilizadas para calcular la fracción mol de dímeros nativos (X_N) en ambas transiciones. Dos obstáculos experimentales dificultan la determinación directa de la catálisis de la *TPI* en las condiciones usadas para los experimentos de fluorescencia o DC: (i) la α -glicerolfosfato deshidrogenasa, enzima acoplante en el ensayo de la catálisis de la *TPI*, se inactiva a altas concentraciones de desnaturalizante y (ii) ya que la *TPI* es una enzima muy activa (limitada solo por difusión), la catálisis es cuantificada normalmente con concentraciones de enzima cuatro órdenes de magnitud menores que las utilizadas para los experimentos de las Figuras 8 y 9. Para evitar los efectos de la elevada concentración de *TPI* y desnaturalizantes en el ensayo de actividad se utilizó el protocolo descrito en la sección "Materiales y Métodos". La disminución en los dímeros activos inducida por urea y Gdn-HCl se muestra en la Figura 10.

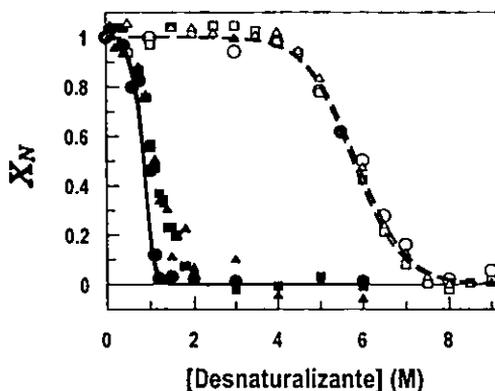


Figura 10

Fracción nativa (X_N) de *sTPI* a partir de los datos espectroscópicos y de actividad catalítica. Las muestras ($50 \mu\text{g } sTPI \text{ mL}^{-1}$) fueron incubadas al tiempo de equilibrio en concentraciones crecientes de Gdn-HCl (símbolos cerrados) o urea (símbolos abiertos); después la actividad catalítica (\bullet y \circ) fue cuantificada con $2 \text{ ng } sTPI \text{ mL}^{-1}$ y bajas concentraciones de desnaturalizante. La actividad catalítica de la enzima nativa fue asignada como 1.0 (ver detalles en "Materiales y Métodos"). Los valores de X_N para la transición de dos estados fueron calculados con la ecuación 20 y los datos de fluorescencia (\blacktriangle y \triangle) o DC (\blacksquare y \square) mostrados en las Figuras 8 y 9. Las líneas continuas coincidentes corresponden a la $X_N(\text{Gdn-HCl})$ calculada utilizando la ecuación 18. Las líneas discontinuas corresponden a la $X_N(\text{urea})$ calculada utilizando la ecuación 9.

¿Es la desnaturalización de la sTP1 un proceso de dos estados?

Como se mencionó en la introducción, el modelo más simple para la desnaturalización de un dímero ($N \rightleftharpoons 2U$) describe la transición entre el dímero nativo (N) y los monómeros desnaturalizados (U) como un proceso de dos estados, sin la presencia de intermediarios en la transición, i.e. $X_N + X_U = 1$; en donde X_N y X_U denotan la fracción mol de las especies al equilibrio. Un criterio utilizado comúnmente para verificar si la transición es descrita adecuadamente por un mecanismo de dos estados es la comparación de X_N (o X_U) determinada a partir del cambio en diferentes propiedades de la enzima al variar la condición perturbante (Ginsburg y Carroll 1965; Thomson *et al.* 1989). Si la variable observada (Y) presenta aditividad (ecuación 6), substituyendo $X_U = 1 - X_N$, la fracción de dímeros puede obtenerse a partir de:

$$X_N(x) = \frac{Y(x) - Y_U}{Y_N - Y_U} \quad (20)$$

en donde Y_N e Y_U denotan el valor de Y para el dímero y el monómero desnaturalizado respectivamente (ver más adelante sección "Análisis termodinámico de los datos de desnaturalización"). En las ecuaciones 6 y 20, Y_N e Y_U pueden o no depender de la concentración de desnaturalizante. En el siguiente análisis, ambas se tomaron como constantes. Los datos de fluorescencia y DC se utilizaron para calcular $X_N(x)$ a partir de la ecuación 20 y se compararon con los valores experimentales de $X_N(x)$ obtenidos por cuantificación de la actividad catalítica (Figura 10). En ambos desnaturalizantes los valores de X_N son casi coincidentes. Debe notarse que en Gdn-HCl los valores de X_N obtenidos a partir de la cuantificación de la actividad catalítica decrecen a concentraciones de desnaturalizante ligeramente menores que las calculadas con los datos de fluorescencia y DC utilizando la ecuación 20. Lo anterior sugiere un proceso de dos estados en la desnaturalización por urea y la presencia de un intermediario en el proceso inducido por Gdn-HCl.

Fracción nativa obtenida por experimentos cinéticos y al equilibrio

Para evaluar el proceso de dos estados observado en la transición de la desnaturalización de la sTP1 se utilizó el método cinético propuesto por Mücke y Schmidt (1994). Este método, llamado de "dos pasos", se basa en la observación de que muchas proteínas

nativas se desnaturalizan más lentamente que los intermedios cuando son transferidas a condiciones completamente desnaturalizantes. En el paso I de este protocolo, muestras de *sTPI* se incubaron al tiempo de equilibrio en diferentes concentraciones de desnaturalizante. En el paso II, las muestras provenientes del paso (I) fueron transferidas a condiciones desnaturalizantes constantes *i.e.* 3.0 M Gdn-HCl (Figura 11A) o 7.5 M de urea (Figura 12A).

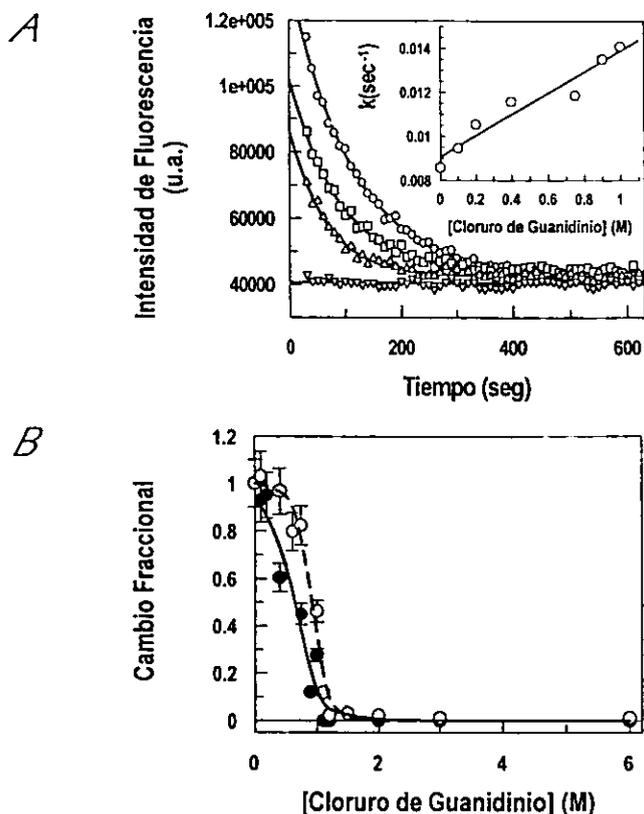


Figura 11.

Experimento de dos pasos para la desnaturalización de *sTPI* equilibrada en cloruro de guanidinio. (A) cambios en la intensidad de fluorescencia a la λ_{max} de la *sTPI* nativa: Las muestras ($200 \mu\text{g sTPI mL}^{-1}$) fueron equilibradas con concentraciones crecientes de desnaturalizante (paso I). El segundo paso en la desnaturalización (II) se inició por la dilución de las muestras (O: *sTPI* nativa; □: 0.4 M; Δ: 1.0 M y ∇: 6.0M de Gdn-HCl), con amortiguador y/o desnaturalizante a condiciones idénticas (a $50 \mu\text{g sTPI mL}^{-1}$ y 3.0M de Gdn-HCl). Las líneas representan el ajuste a la ecuación 3. El recuadro muestra las constantes de velocidad aparentes para la desnaturalización (k) como función de la concentración de Gdn-HCl en el paso I. (B) cambios fraccionales asumiendo un comportamiento de dos estados: (●) los cambios fraccionales a partir de los experimentos cinéticos se calcularon utilizando la ecuación 20 y las amplitudes obtenidas a partir del ajuste de la cinética de desnaturalización a la ecuación 21. (○) Los cambios fraccionales fueron calculados utilizando la ecuación 20 y los valores de muestras mantenidas a la misma concentración de Gdn-HCl en los pasos I y II (controles).

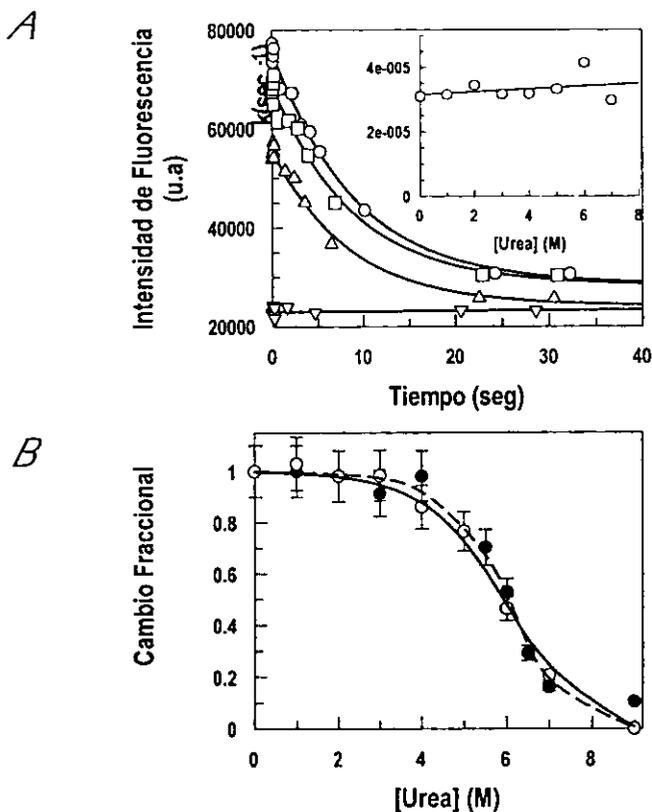


Figura 12

Experimento de dos pasos para la desnaturalización de *sTPI* equilibrada en urea. (A) cambios en la intensidad de fluorescencia a la λ_{\max} de la *sTPI* nativa: Las muestras ($200 \mu\text{g sTPI mL}^{-1}$) fueron equilibradas con concentraciones crecientes de desnaturalizante (paso I). El segundo paso en la desnaturalización (II) se inició por la dilución de las muestras (○: *sTPI* nativa; □: 4.0 M; △: 5.0 M y ▽: 9.0 M de urea), con amortiguador y/o desnaturalizante a condiciones idénticas (a $50 \mu\text{g sTPI mL}^{-1}$ y 7.5M de urea). Las líneas representan el ajuste a la ecuación 3. El recuadro muestra las constantes de velocidad aparentes para la desnaturalización (k) como función de la concentración de Gdn-HCl en el paso I. (B) cambios fraccionales asumiendo un comportamiento de dos estados: (●) los cambios fraccionales a partir de los experimentos cinéticos se calcularon utilizando la ecuación 20 y las amplitudes obtenidas a partir del ajuste de la cinética de desnaturalización a la ecuación 21. (○) Los cambios fraccionales fueron calculados utilizando la ecuación 20 y los valores de muestras mantenidas a la misma concentración de Gdn-HCl en los pasos I y II (controles).

Inmediatamente se siguió el cambio en la fluorescencia intrínseca para determinar la amplitud del proceso (intensidad de fluorescencia vs. tiempo). La cinética de desnaturalización se ajustó a un decaimiento exponencial sencillo usando la ecuación:

$$Y = Y_0 e^{-kt} + Y_\infty \quad (21)$$

en donde Y_0 es la amplitud, k es la constante de velocidad de desnaturalización aparente y Y_∞ es el valor de la intensidad a tiempo infinito. Los valores de Y_∞ son semejantes (42841 ± 1048 y 26954 ± 2466 u.a. para Gdn-HCl y urea respectivamente) para todas las muestras y están muy cercanos a los valores al equilibrio de las muestras a 3.0 M o 7.5 M de urea (Figuras 11A y 12A, respectivamente), lo cual indica que en el paso II se alcanza el equilibrio. El valor de k depende de la concentración de Gdn-HCl en el paso I (recuadro en Figura 11A); por el contrario, en urea k es independiente de la concentración de desnaturalizante (Figura 12A). La amplitud en el paso II es una cuantificación directa de la fracción de moléculas nativas en las muestras (Mücke y Schmidt 1994). La comparación de los valores de X_N obtenidos a partir de las amplitudes de los trazos cinéticos y la ecuación (20) y los obtenidos a partir de los experimentos de fluorescencia intrínseca al equilibrio (manteniendo la misma concentración de desnaturalización en los pasos I y II) muestra que en urea los valores de X_N obtenidos a partir de los datos cinéticos y al equilibrio son coincidentes (Figura 12B), lo que sugiere que en este desnaturalizante solo están presentes moléculas nativas y desnaturalizadas. Por otra parte, en Gdn-HCl los valores de X_N obtenidos a partir de las amplitudes están desplazados a concentraciones menores de desnaturalizante que los obtenidos por datos al equilibrio (Figura 11B). Por lo tanto, una fracción de la fluorescencia observada al equilibrio en Gdn-HCl es debida a la presencia de un intermediario que se desnaturaliza más rápido que la enzima nativa.

Unión de 8-anilino-naftaleno-1-sulfonato

Para determinar la presencia de intermediarios en la transición, se cuantificó el cambio en la fluorescencia extrínseca del 8-anilino-naftaleno-1-sulfonato (ANS) (Rosen y Weber 1969) en varias concentraciones de los desnaturalizantes. La unión del ANS a regiones hidrofóbicas presentes en los intermediarios del plegamiento está acompañada de un gran incremento en su fluorescencia (Ptitsyn *et al.* 1990; Semisotnov *et al.* 1991; Silva *et al.* 1992). Mientras que en urea no se observaron cambios significativos en la fluorescencia del ANS (Figura 13), en la región de

de desnaturante que la muestra. Los perfiles de elución (Figura 14) muestran que al incrementar la concentración de Gdn-HCl hasta 1.0 M (concentración donde se encontró el máximo de unión de ANS), el radio de Stokes promedio (R_s) sufre un pequeño decremento (recuadro en la Figura 14). Este resultado es compatible con la presencia de un intermediario monomérico compacto. Al aumentar aún más la concentración de Gdn-HCl se observa un aumento en el R_s , indicando la completa desnaturación de las cadenas polipeptídicas.

La masa molecular de la *sTPI* nativa determinada por sedimentación al equilibrio es 53.9 kDa, valor que concuerda perfectamente con el obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos de los dos monómeros. Por otra parte, en presencia de 1.0 M de Gdn-HCl la masa molecular aparente decrece a 36.5 kDa sugiriendo la monomerización parcial de *sTPI*. Para ir más lejos en la caracterización del intermediario, se realizaron experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) de la *sTPI* en amortiguador y 1.0 M de Gdn-HCl. El radio de giro (R_G) obtenido para la *sTPI* nativa en ausencia de Gdn-HCl fue de 28.9 Å. En presencia del desnaturante, los experimentos de DLS muestran una distribución asimétrica centrada a un R_G menor de 28.9 Å. Esta observación es consistente con la presencia de dos especies en solución, *i.e.* con la mezcla de moléculas dimericas y monoméricas. Desgraciadamente, los tamaños de estas especies están tan cercanos que no fue posible estimar sus R_G ni sus concentraciones relativas.

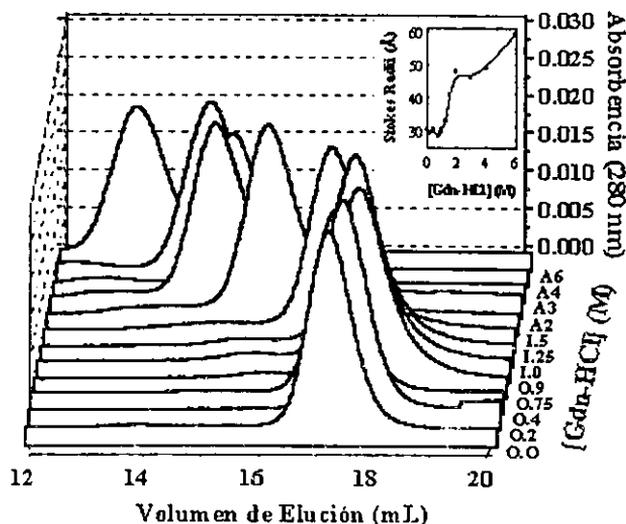


Figura 14

Propiedades hidrodinámicas de *sTPI* en presencia de cloruro de guanidinio. Las muestras de *sTPI* (145 mg mL⁻¹) equilibradas en concentraciones crecientes de desnaturante fueron inyectadas en una columna Superdex 200 HR previamente equilibrada a la misma concentración de Gdn-HCl. El recuadro muestra el cambio en el radio de Stokes con la concentración de desnaturante.

Efecto de la concentración de sal en la estabilidad del intermediario

¿Por qué en la transición inducida por Gdn-HCl se estabiliza un intermediario mientras que en urea el proceso es de dos estados?

Esta diferencia puede ser explicada al considerar la naturaleza iónica del Gdn-HCl y el alto contenido de puentes de sal (4) y de hidrógeno (21) entre los monómeros de la *sTPI* (Lolis *et al.* 1990; Wierenga *et al.* 1992). Se sabe que una fuerza iónica moderada puede producir un efecto de apantallamiento que minimiza las interacciones electrostáticas en las proteínas (Monera *et al.* 1994). Para explorar esta posibilidad se ensayó la desnaturalización inducida por Gdn-HCl en presencia de altas concentraciones de cloruro (Gdn-HCl + NaCl). Se encontró que el incremento en la concentración de Gdn-HCl + NaCl produce un corrimiento en los patrones de actividad catalítica hacia concentraciones menores de desnaturalizante, mientras que los patrones por fluorescencia se corren a concentraciones mayores (Figura 15A).

Como se observó en los experimentos realizados en concentraciones variables de cloruro (Figuras 8 a 10), los cambios en la fluorescencia permanecen monofásicos; pero la falta de coincidencia de las dos pruebas, observada claramente a altas concentraciones de Gdn-HCl + NaCl (Figura 15A) evidencia el carácter de tres estados de la desnaturalización de la *sTPI* inducida por Gdn-HCl. El incremento en la concentración de intermediario es corroborado por el aumento en la fluorescencia del ANS, la cual aumenta con la concentración de Gdn-HCl + NaCl (Figura 15B). Al parecer, las interacciones electrostáticas desnaturalizante-proteína presentes en Gdn-HCl y ausentes en urea, determinan la existencia del intermediario en el primer desnaturalizante.

El sitio activo del intermediario

A partir de los resultados de los experimentos de actividad catalítica para la desnaturalización con Gdn-HCl (Figura 10) no es posible determinar si el intermediario que aparece en la transición presenta actividad catalítica, pero para el mismo experimento en presencia de NaCl (Figura 15A) es claro que, en condiciones en las cuales es el conformero mayoritario (2.0 M Cl⁻ y 0.75 M Gdn-HCl, Figura 15A), el intermediario carece de actividad. En estas mismas condiciones (2.0 M Cl⁻) la enzima nativa sufre de un pequeño apagamiento en la intensidad de fluorescencia ($\approx 15\%$), pero su actividad catalítica no es perturbada de manera significativa. Para conocer los cambios provocados por la monomerización en el sitio activo de la

sTPI equilibrada en Gdn-HCl, se llevaron a cabo experimentos en presencia de 2-fosfoglicolato análogo del estado de transición de la catálisis de la enzima (Figura 5).

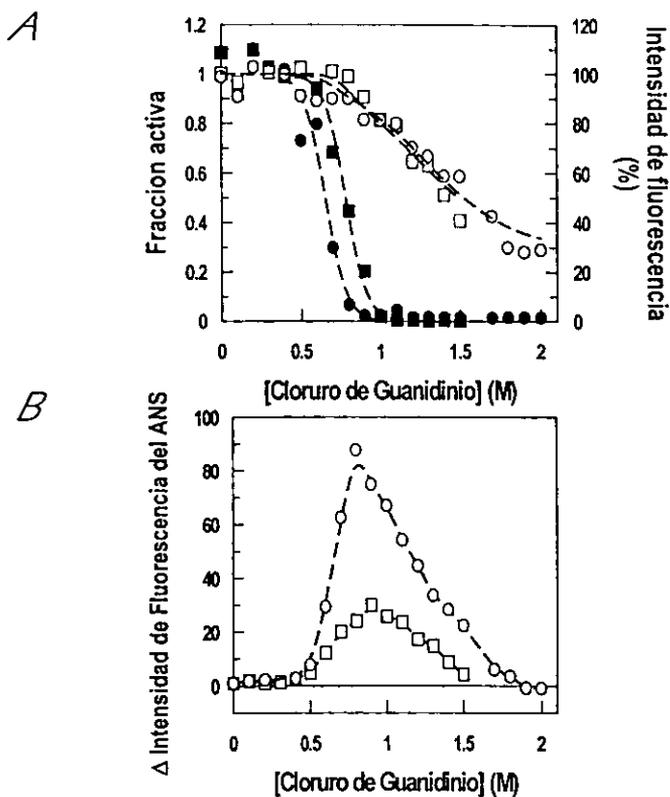


Figura 15.

Efecto de la fuerza iónica en la desnaturación al equilibrio de la *sTPI* inducida por cloruro de guanidinio. Las muestras de *sTPI* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) fueron equilibradas con concentraciones crecientes de Gdn-HCl y la concentración de cloruro fue ajustada a 1.5 M (● y ○) ó 2.0 M (■ y □), agregando NaCl. Posteriormente, (A) se cuantificó el cambio en la intensidad de fluorescencia (símbolos abiertos) y la actividad catalítica (símbolos cerrados). Las curvas son el resultado del ajuste simultáneo de los datos de fluorescencia y actividad a la ecuación 18. (B) Se agregó $100 \mu\text{M}$ de ANS (concentración final). La diferencia en la intensidad de fluorescencia del ANS (excitación a 360 nm, emisión a 480 nm) en presencia y ausencia de *sTPI* nativa se asignó como 1.0.

La unión de este compuesto conlleva al apagamiento de la fluorescencia del triptofano 167 ubicado en el sitio activo de la *TPI* (revisado en Rietveld y Ferreira 1996). Se calculó la constante de afinidad por PGA en muestras incubadas a diferentes concentraciones de Gdn-HCl y, una vez conocida la concentración necesaria del compuesto, se estudió su efecto en la fluorescencia intrínseca en varias condiciones: el análogo se incluyó durante el tiempo de equilibrio o bien se adicionó inmediatamente antes de la cuantificación de la fluorescencia intrínseca. Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos señalan que la afinidad del confórmero por el análogo disminuye más de 1×10^3 veces, pero no son concluyentes, *i.e.* no hay diferencia significativa en la región de la transición en el patrón de desnaturalización obtenido en ausencia o presencia de PGA. En estas condiciones no es posible conocer las propiedades de unión del monómero que aparece en la transición por el sustrato.

Disociación por dilución

La energía libre de la disociación en ausencia de desnaturalizantes puede ser obtenida a partir de experimentos de dilución (Kurganov 1967). Tomando ventaja de la elevada *k_{cat}* de la *sTPI*, el efecto de la dilución puede seguirse por cuantificaciones de la actividad catalítica a concentraciones de proteína muy bajas. La trifosfato isomerasa es un dímero compacto, la enzima de *T. brucei*, conejo y *E. histolytica* son estables a la concentración de proteína más baja que se ha cuantificado, 185, 74 y 7.4 pM respectivamente (Zabori *et al.* 1980; Borchert *et al.* 1993a; Landa *et al.* 1997). Por otra parte, un decremento en la actividad a bajas concentraciones de proteína se ha observado en mutantes de interfase de *T. brucei* (Borchert *et al.* 1993a) y de humano (Mainfroid *et al.* 1996a). En este último estudio, la energía libre para la disociación de la enzima silvestre se obtuvo considerando el equilibrio $N \rightleftharpoons 2U$. Dado que la actividad catalítica de la *TPI* se atribuye únicamente a la enzima nativa, su cuantificación está directamente relacionada con la fracción de dímeros funcionales por lo cual, en el presente trabajo, la *sTPI* se incubó a varias concentraciones (3.7 pM – 0.2 μM) durante 24 h y, posteriormente, se cuantificó la actividad catalítica. Se encontró que la actividad catalítica específica permanece constante en el intervalo de concentraciones estudiado (Figura 16), por lo tanto, a partir de estos datos es posible predecir el valor mínimo de la energía libre necesaria para la disociación.

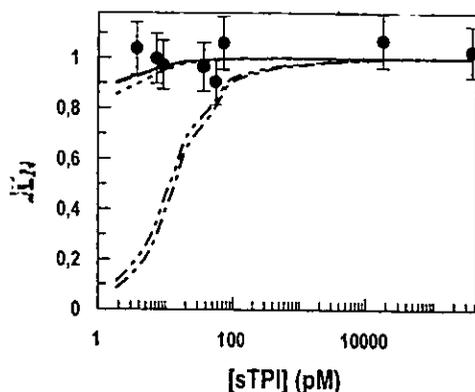


FIGURA 16.

Disociación por dilución. Las muestras de *sTPI* fueron incubadas a diferentes concentraciones de proteína por 24 horas. Después se cuantificó la actividad catalítica (●). Para el valor de la actividad específica a la mayor concentración de proteína utilizada se asignó $X_N = 1$. La fracción nativa de *sTPI* predicha a diferentes concentraciones de proteína fue calculada utilizando las ecuaciones 23 a 25 con $\Delta G^{H_2^0}$ en el intervalo de 17 a 20 kcal mol⁻¹ para la desnaturalización con urea (-----) o para Gdn-HCl: $\Delta G_1^{H_2^0} = 18.0$ kcal mol⁻¹ y $\Delta G_2^{H_2^0} = 0.5$ kcal mol⁻¹ (- · - · -), o $\Delta G_1^{H_2^0} = 10.0$ kcal mol⁻¹ (· · · · ·) o bien $\Delta G_1^{H_2^0} = 10.0$ kcal mol⁻¹ y $\Delta G_2^{H_2^0} = 0.5$ kcal mol⁻¹ (- - - -) o $\Delta G_1^{H_2^0} = 10$ kcal mol⁻¹ (- · - · -).

Para un proceso de disociación/desnaturalización de dos estados (ecuación 2), despejando $[N]$ y $[U]$ de la ecuación 4 y substituyendo en la ecuación 5, la constante de equilibrio puede escribirse como

$$K_{eq} = \frac{2(Pt - X_N Pt)^2}{X_N Pt} \quad (22)$$

de tal forma que la fracción de dímeros X_N se obtiene de:

$$x_N = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4}}{2} \quad (23)$$

en donde

Análisis termodinámico de los datos de desnaturalización

Análisis de dos estados para la desnaturalización inducida por urea

Las evidencias presentadas anteriormente sugieren que la desnaturalización inducida por urea para la *sTPI*, aparentemente puede ser descrita como un proceso de dos estados; por el contrario, en Gdn-HCl se observa un intermediario.

Utilizando el método de la extrapolación lineal (ver "Materiales y Métodos"), los resultados obtenidos para la desnaturalización de *sTPI* con urea no dependen de los estimados iniciales y no son significativamente diferentes si el ajuste se realiza (a) individualmente para una concentración de proteína; (b) simultáneamente para la misma concentración de proteína y diferentes técnicas (IF y DC); (c) simultáneamente para diferentes concentraciones de proteína y una sola técnica (IF o DC); (d) simultáneamente para diferentes concentraciones de proteína y las dos técnicas (IF y DC). Incluso los valores obtenidos no son significativamente diferentes si en el ajuste se incluye una dependencia lineal de la señal de *N* y/o *U* con la concentración de desnaturalizante. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para el ajuste, a cada concentración de proteína y sin dependencia en las señales de *N* o *U* con la concentración de urea, para la desnaturalización de la *sTPI* seguidos espectroscópicamente. El ΔG^{H_2O} tiene un valor promedio de $17.0 \pm 0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ con una pendiente promedio de $-1.6 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

[Proteína] µg ml ⁻¹	Experimento	<i>m</i> kcal mol ⁻¹ M ⁻¹	ΔG^{H_2O} kcal mol ⁻¹	χ^2	<i>C</i> _{1/2} M
50	IF	-1.1 ± 0.1	17.8 ± 0.8	4.0	5.8
	DC	-1.7 ± 0.1	17.6 ± 0.8	9.9	5.9
100	IF	-2.0 ± 0.3	19.6 ± 2.1	14.0	6.0
	DC	-1.4 ± 0.1	15.4 ± 0.5	7.1	5.9
200	IF	-1.6 ± 0.1	16.5 ± 0.9	5.0	6.0
	DC	-1.3 ± 0.1	14.3 ± 0.4	6.3	5.9
Promedio IF		-1.6 ± 0.4	17.9 ± 1.5		
Promedio DC		-1.4 ± 0.2	15.8 ± 1.7		
Promedio Total		-1.5 ± 0.1	16.9 ± 1.6		
Ajuste Megaglobal*		-1.6 ± 0.1	17.0 ± 0.4	21.7	

TABLA 5

Análisis de dos estados para la desnaturalización de la *sTPI* en urea. Método de la extrapolación lineal. Los valores de ΔG^{H_2O} y *m* fueron obtenidos a partir del ajuste de los datos de IF y CD obtenidos a 25 °C (Figuras 8 y 9) a la ecuación 9. En los ajustes: $Y_N = 100$ y $Y_U =$ al valor promedio de los valores de *Y* en el intervalo 8.0 – 9.0M de urea. *Ajuste simultáneo para los datos de IF, DC y actividad (Figura 10) a toda *Pt*.

$C_{1/2}$ es la concentración de desnaturalizante a la cual ocurre el 50 % de la desnaturalización.

Los ajustes de los datos experimentales son buenos a juzgar por el criterio de χ^2 y las líneas en las Figuras 8A y 9. La coincidencia del patrón de desnaturalización obtenido por diferentes técnicas, la determinación de la fracción nativa por experimentos cinéticos, la unión del ANS, así como el cálculo de X_N a partir de experimentos de dilución sugieren que la transición de *sTPI* en urea está descrita adecuadamente por un modelo de dos estados. Por otra parte, la posición de la transición de dos estados para proteínas monoméricas, determinada por métodos no calorimétricos, es independiente de la concentración de proteína (revisado en Ragone 2000); por el contrario en los oligómeros la variación de la concentración de proteína, produce un corrimiento del punto medio de la transición ($C_{1/2}$). Es precisamente este hecho el único que señala que el proceso en urea no está perfectamente descrito por el modelo de dos estados. Lo anterior puede deberse a que en la transición exista un intermediario no sencillo de caracterizar o bien a que el proceso se cuantificó en un pseudoequilibrio. En cuanto a la primera posibilidad, se realizaron los ajustes de los datos de desnaturalización de *sTPI* en urea (para IF y DC), por medio de un modelo de tres estados ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$). Los valores obtenidos a partir de este tratamiento son inaceptables; los errores para los parámetros de ajuste, son cuando menos un orden de magnitud mayor que los valores obtenidos en el proceso. En cuanto a la segunda posibilidad, actualmente se estudian desviaciones del comportamiento de dos estados clásico.

Análisis de tres estados para la desnaturalización inducida por Gdn-HCl

Los datos experimentales presentados en las secciones anteriores, muestran que cuando la *sTPI* se desnaturaliza con Gdn-HCl existe un intermediario monomérico (*M*). Los valores obtenidos para el ajuste de la desnaturalización de *sTPI* con Gdn-HCl utilizando este modelo, dependen críticamente de los estimados iniciales, aún si el ajuste se realiza con cualquiera de las siguientes variaciones: (a) individualmente para una concentración de proteína; (b) simultáneamente para la misma concentración de proteína y diferentes técnicas (IF y DC); (c) simultáneamente para diferentes concentraciones de proteína y una sola técnica (IF o DC); (d) simultáneamente para diferentes concentraciones de proteína y las dos técnicas (IF y DC). Incluso, los valores obtenidos son significativamente diferentes si en el ajuste mencionado en cualquiera de los casos anteriores se varía la señal de *M* entre 50 y 120, o si se incluye una dependencia de la señal de *N*, *M* o *U* con la concentración de desnaturalizante (individual o simultáneamente). Cabe señalar que a pesar de que los ajustes no convergen (Tabla 6A), el

resultado siempre está alrededor de 11 kcal mol⁻¹ ($\Delta G_{N \leftrightarrow M}^{H2O} = \Delta G_{N \leftrightarrow M}^{H2O} + 2\Delta G_{M \leftrightarrow U}^{H2O}$) y con pendientes que varían desde valores positivos hasta negativos. Para ambos casos, los errores son inaceptables.

Aunque el ajuste de los experimentos realizados con concentraciones crecientes de Gdn⁺ + Cl⁻ no fue satisfactorio (Figuras 8 y 9), siguiendo este mismo procedimiento para los experimentos en presencia de Cl⁻ constante (Figura 15), el valor de ΔG^{H_2O} obtenido a partir del ajuste simultáneo de los datos de actividad y fluorescencia, es de 18.2 y 22.2 kcal mol⁻¹ para 1.5 y 2.0 M de Gdn-HCl + NaCl respectivamente (Tabla 6B). Este es el único caso en el que los valores de los pares $\Delta G^{H_2O} - m$ obtenidos de los ajustes de la desnaturalización de la sTPI en Gdn-HCl dieron valores aceptables, *i.e.* con errores razonables.

[Proteína] µg mL ⁻¹	Experimento	$\Delta G_{N \leftrightarrow M}^{H2O}$ kcal mol ⁻¹	$m_{N=2M}$	$\Delta G_{M \leftrightarrow U}^{H2O}$ kcal mol ⁻¹	$m_{N=2M}$	$\Delta G_{N \leftrightarrow U}^{H2O}$ kcal mol ⁻¹	χ^2
A							
50	IF	10.1±6.6	0.3±2.0	0.4±3.1	-1.7±0.9	10.8	7.3
	DC	11.1±0.2	0.3±2.0	0.3±3.1	-1.8±0.9	11.7	7.5
100	IF	10.0±32.2	3.3±16.1	0.3±15.3	-3.2±8.4	10.5	9.0
	DC	10.1±17.2	3.1±20.0	0.2±14.4	-2.9±9.3	10.5	7.7
200	IF	12.8±0.4	-3.2±0.2	-0.6±0.2	-0.6±0.0	11.6	2.8
	DC	10.7±0.2	0.3±2.0	0.3±2.1	-1.9±0.9	11.4	6.5
Promedio IF						10.6 ± 0.3	
Promedio DC						11.2 ± 0.4	
Promedio Total						11.1 ± 0.1	
Megaglobal*		8.8±0.2	-0.6±0.0	1.4±0.1	-1.9±0.0	11.6	56.6
B							
1.5 M Gdn-HCl+NaCl	IF	13.5±0.8	-6.9±0.9	2.4±1.2	-1.9±0.0	18.2	22.9
2.0M Gdn-HCl+NaCl	IF	16.4±1.2	-12.9±1.8	2.9±0.1	-2.2±0.0	22.2	39.4

TABLA 6.

Análisis de tres estados para la desnaturalización de la sTPI en presencia de Gdn-HCl y Gdn-HCl + NaCl. Método de la extrapolación lineal. (A) Los valores de ΔG^{H_2O} y m se obtuvieron a partir del ajuste de los datos (Figura 8 y 9) a la ecuación 18 a 25 °C. (B) Los valores de ΔG^{H_2O} y m fueron obtenidos ajustando simultáneamente los datos de actividad catalítica y fluorescencia en Gdn-HCl + NaCl (Figura 15) a la ecuación 18. Para los datos de actividad $Y_N = 100$ y $Y_M = Y_U = 0$, por otra parte, para los datos de fluorescencia $Y_N = Y_M = 100$ y Y_U = al promedio de los valores de Y en el intervalo 1.8 – 2.0 M de Gdn-HCl. *Ajuste simultáneo para los datos de IF, DC y actividad (Figura 10) a toda P_t . En ambos casos, los parámetros iniciales fueron $\Delta G_{N \leftrightarrow M}^{H_2O} = 15$, $m_{N=2M} = -2$, $\Delta G_{M \leftrightarrow U}^{H_2O} = 2$ y $m_{N=2M} = -1$.

Estos resultados reflejan la incapacidad de los procedimientos estándar para resolver la forma particular de la transición mostrada en las Figuras 8, 9 y 10, en donde a

Discusión general

Desnaturalización de la TPI

La desnaturalización y renaturalización de la TPI de varias especies se han estudiado exhaustivamente (Waley 1973, Mc Vittie *et al.* 1977; Zabori *et al.* 1980; Sun *et al.* 1992; Garza-Ramos *et al.* 1992; Sun *et al.* 1993; Borchert *et al.* 1993a; Borchert *et al.* 1994; Borchert *et al.* 1995a; Fernández-Velasco *et al.* 1995; Mainfroid *et al.* 1996a, b; Sepúlveda-Becerra *et al.* 1996; Rietveld y Ferreira 1996; Schliebs, *et al.* 1997; Rietveld y Ferreira 1998) (ver sección desnaturalización de la TPI en la Introducción). A la fecha, sólo se han reportado datos termodinámicos para la desnaturalización de la hTPI y la cTPI (Mainfroid *et al.* 1996a,b; Rietveld y Ferreira 1998), para las cuales se ha propuesto un modelo de tres estados ($N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$). En ambos casos, la desnaturalización de la enzima silvestre se ha modelado como una transición de dos estados; la información de las propiedades del intermediario monomérico se obtuvo a partir de la desnaturalización de dos estados de mutantes monoméricas (Mainfroid *et al.* 1996a,b) o fue calculada a partir de experimentos al equilibrio y energías de activación de la enzima nativa (Rietveld y Ferreira 1998). A pesar de ello, no se observaron intermediarios en el equilibrio. En este trabajo se detectó un intermediario en experimentos al equilibrio con Gdn-HCl, mientras que en urea se observó un proceso de dos estados. Basados en diversas técnicas que cuantifican la estructura de la proteína a diferentes niveles, se calcularon los cambios en la energía libre para ambas transiciones. Recientemente, se reportó la desnaturalización de la pTPI con urea y Gdn-HCl. En ese trabajo, se encontró la presencia de un intermediario caracterizado como un agregado, en el intervalo 0.8 – 1.2 M de Gdn-HCl (Gokhale *et al.* 1999).

Los datos presentados en esta tesis muestran que en urea el sitio activo así como la estructura secundaria y terciaria se pierden en un proceso cooperativo de dos estados en el cual el dímero nativo se disocia y desnaturaliza sin intermediarios detectables en el equilibrio con un $\Delta G^{H_2^0}$ promedio de 17.0 ± 0.4 kcal mol⁻¹. Por otra parte, en Gdn-HCl, las siguientes evidencias muestran la presencia de un intermediario: (i) la no coincidencia de la fracción de enzimas nativas determinadas por experimentos cinéticos y al equilibrio y (ii) por el máximo en la unión de ANS en el punto medio de la transición (1.0 M Gdn-HCl).

Los experimentos de cromatografía líquida de exclusión molecular, dispersión de luz dinámica y ultracentrifugación al equilibrio indican que este intermediario es un monómero compacto. Los datos de actividad, fluorescencia y CD muestran comportamientos aparentemente monofásicos y transiciones casi coincidentes, lo cual indica que en Gdn-HCl la disociación y

desnaturalización de la *sTPI* se llevan a cabo a la misma concentración de desnaturalizante. Para estructuras transición, fue imposible después de un análisis exhaustivo obtener los parámetros termodinámicos. Los experimentos en presencia de concentraciones elevadas de Gdn-HCl + NaCl no muestran coincidencia entre los patrones obtenidos por fluorescencia y actividad catalítica, lo cual sugiere un incremento en la concentración del intermediario; el aumento en la fluorescencia del ANS en estas condiciones comprueba el incremento en la fracción de intermediario. Es probable que el incremento en la concentración del intermediario no se deba a la desestabilización del dímero, sino al incremento en la estabilidad del monómero plegado.

Debe notarse que con el error experimental, los valores de ΔG obtenidos en urea (17.0 ± 0.4 kcal mol⁻¹) son compatibles con los datos obtenidos por experimentos de dilución. Estos valores pueden ser comparados con los obtenidos para *hTPI* usando mutantes en la interfase ($\Delta G_1^{H_2O} = 13.8$ kcal mol⁻¹ y $\Delta G_2^{H_2O} = 2.5$ kcal mol⁻¹) (Mainfroid *et al.* 1996a) y para la *cTPI* usando información de estudios cinéticos ($\Delta G_1^{H_2O} = 14.6$ kcal mol⁻¹ y $\Delta G_2^{H_2O} = 1.2$ kcal mol⁻¹) (Rietveld y Ferreira 1998). En estas especies las interacciones cuaternarias producen más del 75 % del total de la estabilidad conformacional de la enzima (Mainfroid *et al.* 1996a). Nótese que la interacción entre subunidades es mayor en *sTPI*. Los valores obtenidos para $\Delta G_2^{H_2O}$ están por debajo de la estabilidad conformacional de proteínas monoméricas, las cuales fluctúan entre 5.0 y 15 kcal mol⁻¹ (Pace 1990). Este hecho (Mainfroid *et al.* 1996a) ha sido utilizado para proponer la hipótesis de que la dimerización es esencial para lograr la máxima estabilidad conformacional de la *sTPI*. En cuanto a la catálisis, el análisis estructural de las mutantes monoméricas señala que aunque la estructura tridimensional del barril está bien conservada, tres asas en el carboxilo terminal están flexibles (Borchert *et al.* 1993b, 1995b). Estos resultados, y el análisis de una mutante adicional diseñada como un análogo del monómero silvestre (Schiebs *et al.* 1977) sugieren que la dimerización produce la rigidez necesaria en las asas catalíticas requerida para la creación de la cavidad del sitio activo. Por muchos años no hubo evidencia de la comunicación entre los dos sitios activos en el dímero; sin embargo, experimentos recientes de transferencia isotópica indican interacciones sitio-sitio en el dímero (Harris *et al.* 1998).

Plegamiento de otros barriles β/α .

Resulta interesante comparar los resultados experimentales obtenidos en este trabajo con aquellos obtenidos para otros barriles β/α (ver sección "barriles β/α " en la Introducción). El

plegamiento de monómeros presenta al menos un intermediario en la subunidad α de la triptofano sintasa (Matthews y Crisanti 1981; Miles y Ogasahara 1982; Stackhouse 1988), en la fosforibosilantranilato isomerasa (PRAI) de *S. cerevisiae* (Eder y Kirschner 1992), en la indol-3-glicerol-fosfato sintasa (IGPS) de *Sulfolobus solfataricus* (Andreotti *et al.* 1997) y en los dominios aislados PRAI y IGPS de la bienzima PRAI-IGPS de *E. coli* (Jasanoff *et al.* 1994; Sánchez del Pino y Fersht 1994). Un mecanismo similar de plegamiento se ha propuesto para estas enzimas (Miles y Ogasahara 1982; Eder y Kirschner 1992; Jasanoff *et al.* 1994). También se han predicho intermediarios en la simulación de la *TPI* y la subunidad α de la triptofano sintasa (Godzik *et al.* 1992). El único barril β/α en donde no se han reportado intermediarios es la aldolasa monomérica de *Staphylococcus aureus*.

En los barriles β/α la estabilidad del monómero varía entre 2.15 kcal mol⁻¹ para la aldolasa (Rudolph *et al.* 1992) y 13.6 - 10.7 kcal mol⁻¹ para la subunidad α de la triptofano sintasa (Matthews y Crisanti 1981, Stackhouse *et al.* 1988). Vale la pena mencionar que la subunidad α de la triptofano sintasa es un monómero muy estable, aunque normalmente forma parte de un tetrámero $\alpha_2\beta_2$, mientras que barriles monoméricos como la aldolasa de *S. aureus* ($\Delta G_{des}^{H_2O} = 2.15$ kcal mol⁻¹) (Rudolph *et al.* 1992) y la IGPS de *Sulfolobus solfataricus* ($\Delta G_{des}^{H_2O} = 3.5-6.09$ kcal mol⁻¹) (Andreotti *et al.* 1997) están en el límite de la estabilidad observada en proteínas monoméricas. Ya que en la naturaleza existen barriles β/α funcionales y marginalmente estables, es poco probable que la naturaleza dimérica de la *TPI* se deba a la baja estabilidad del monómero. Por lo tanto, la ocurrencia común de los barriles β/α con una gama de actividades catalíticas no es debida a la evolución convergente hacia una topología estable. De hecho, a partir de las ecuaciones 36 y 38 se puede concluir (ver Figura 16) que para una proteína dimérica con una energía libre de disociación de 18 kcal mol⁻¹, la estabilidad del monómero puede fluctuar entre 0.5 y 10 kcal mol⁻¹ sin cambios significativos en el patrón de actividad vs. concentración, aún a concentraciones pM. En otras palabras, para un dímero con una *K_d* muy baja, aparentemente no hay presión evolutiva para mantener un monómero muy estable. Por lo tanto, vale la pena considerar que la baja estabilidad del monómero es una consecuencia y no la razón de la naturaleza dimérica de la *TPI*. *A priori*, la posibilidad de que exista una *TPI* monomérica (silvestre o construida por el hombre) capaz de funcionar eficientemente no puede ser descartada; sin embargo, a la fecha solamente se han reportado *TPIs* oligoméricas; más aún, las *TPIs* muy antiguas como la de *Pyrococcus woesei* y *Methanothermus fervidus* (Kohlhoff *et al.* 1996), así como la enzima bifuncional 3-fosfoglicerato-cinase/triosafosfato isomerasa de *Thermotoga maritima* (Schuring *et al.* 1995), son tetraméricas.

Si la estabilidad no es la razón principal para la naturaleza dimérica de la *TPI*, es probable que la asociación se requiera para el ajuste adecuado del sitio catalítico en el interior del barril (Schliebs *et al* 1997), o bien que la comunicación entre los sitios activos en el dímero es un requisito para una catálisis eficiente (Harris *et al.* 1998); por lo tanto, en el caso de la *TPI* la oligomerización incrementa las habilidades funcionales de la enzima.

El único camino para responder a la tan arraigada pregunta de la bioquímica:

¿cómo se pliegan las proteínas?

es acumulando información sobre los cambios en la estructura y función de los conformeros que aparecen en la transición entre el estado nativo y desnaturalizado. Ganarle tiempo al tiempo es, además, estudiar simultáneamente los procesos que intervienen en la asociación de monómeros para formar oligómeros.

Conclusiones

- ♦ Este es el primer reporte de un intermediario al equilibrio y de una estimación de los cambios en energía libre del proceso en la desnaturalización de la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- ♦ En urea el dímero nativo de *sTPI* se disocia y desnaturaliza en un proceso de dos estados sin intermediarios detectables con un ΔG^{\ddagger}_2 de 17.0 ± 0.4 kcal mol⁻¹.
- ♦ En Gdn-HCl se presenta un estado intermediario capaz de unir ANS. Experimentos de filtración en gel, centrifugación al equilibrio y dispersión de luz dinámica indican que este intermediario es un monómero compacto.
- ♦ Los datos espectroscópicos y de actividad catalítica para la desnaturalización en Gdn-HCl se analizaron en términos de un modelo de tres estados con la presencia de un intermediario monomérico. Por medio del método de extrapolación lineal, después de un análisis exhaustivo, no fue posible determinar los cambios en la energía libre del proceso.
- ♦ Es posible incrementar la fracción de intermediario que aparece en la desnaturalización por Gdn-HCl en experimentos a concentraciones elevadas y constantes de (Gdn-HCl + NaCl).
- ♦ En ausencia de desnaturalizantes, la actividad catalítica de *sTPI* permanece constante en el intervalo de 7.4 pM a 0.2 μ M, estos resultados son compatibles con el ΔG^{\ddagger}_2 obtenido para dos estados en urea, así como los reportados para la enzima de humano y de conejo.
- ♦ En las tres especies, levadura, conejo y humano, la asociación de los monómeros provee mas del 75 % de la energía del proceso de plegamiento/asociación y los monómeros son marginalmente estables (1.2 a 2.5 kcal mol⁻¹), a partir de esta observación se ha propuesto en la literatura que la *TPI* es un dímero debido a razones de estabilidad.
- ♦ Alternativamente, proponemos que para un dímero como la *TPI* ($K_d \geq 0.02$ pM), no existe presión evolutiva para mantener monómeros muy estables, de hecho existen barriles β/α monoméricos funcionales y marginalmente estables. Estas consideraciones sugieren que la baja estabilidad de los monómeros de la *TPI* es la consecuencia y no la razón de su carácter oligomérico y apoya la idea de que el acomodo de los sitios catalíticos al realizarse la dimerización, es un prerequisite para su función biológica.

Perspectivas.

1.- Durante los estudios realizados en esta tesis, encontramos que todas las trifosfato isomerasas que tenemos disponibles (*S. cerevisiae*, *T. brucei*, conejo y *E. histolytica*) pasan por un intermediario que une ANS en la desnaturalización con guanidinio (cloruro y tiocianato). Este hecho es muy interesante, pues como se mencionó durante la discusión, la presencia de un intermediario se ha encontrado para muchos barriles β/α . Un análisis sobre esta observación puede llevar a conclusiones sobre la historia evolutiva de la TPI en particular y de los barriles β/α en general. Así mismo, extender el estudio sobre el intermediario que aparece en esta transición permitirá elucidar sobre si pertenece a la familia del glóbulo fundido o no.

2.- Los experimentos de dos pasos mencionados anteriormente, son también un blanco interesante a estudiar. Dado que en el laboratorio contamos con un fluorómetro con los aditamentos necesarios para estudiar el proceso en periodos de tiempo muy pequeños (mseg), es de gran interés conocer los primeros eventos cinéticos de la desnaturalización de la TPI; en este estudio se podría incluir al ANS como un sensor extra de los cambios que ocurren en el proceso.

3.- Como se mencionó anteriormente, la renaturalización de la TPI se realizó por experimentos de elución-centrifugación. Este protocolo es de mucha utilidad pues con poca pérdida de proteína permite remover rápidamente al desnaturalizante; un estudio interesante con este protocolo es la hibridación de enzimas de diferentes especies.

4.- En los estudios que realizamos en presencia de altas concentraciones de ion cloruro, se encontró una condición en donde el intermediario monomérico es el conformero mayoritario. Esto permitirá determinar con mayor detalle las propiedades del intermediario, por ejemplo, cuantificación de la estructura secundaria, radio de giro, etc.

5.- Dado que en los experimentos de unión de PGA, no se obtuvieron resultados concluyentes, se antoja retomar el experimento para comparar las características de este conformero con las mutantes monoméricas que se han obtenido a partir de la TPI de humano y *Trypanosoma brucei* y especular si son equivalentes o no (ver introducción).

6.- La combinación de urea y guanidinio puede proveer de información adicional sobre los procesos que ocurren en la asociación y desnaturalización de la TPI.

7.- El formalismo resumido en el "Apéndice" puede ser también aplicado, además de lo que aquí se discute, en otros casos como son: (a) en donde el dímero nativo se desnaturalice a través de un intermediario dímérico o bien (b) para proteínas monoméricas que se desnaturalicen con o sin la presencia de intermediarios. Estos casos actualmente se analizan en detalle.

8.- Empezar estudios de calorimetría diferencial de barrido de la sTPI en presencia y ausencia de desnaturalizante.

Referencias

- Adams, B., Burgess, R.J., y Pain, R.H. (1985). *Eur. J. Biochem.*, **152**, 715-720.
- Alvarez, A., Zeelen, J.Ph., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, I., Wierenga, R.K. y Maes, D. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2199-2206.
- Andreotti, G., Cubellis, M.V., Di Palo, M., Fessas, D., Sannia, G. y Marino, G. (1997) Stability of a thermophilic TIM-barrel enzyme: indole-3-glycerol phosphate synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.*, **223**, 259-264.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Willson, I.A., Conan, P.H., Furth, A.J., Milmar, J.D., Offord, R.E., Priddle, J.D. y Waley, S.G. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using aminoacid sequence data. *Nature*, **255**, 609-614.
- Blacklow, S.C., Raines, R.T., Lim, W.A., Zamore, P.D. y Knowles, J.R. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry*, **27**, 1158-1167.
- Borchert, T.V., Abagyan, R., Jaenicke, R. y Wierenga, R.K. (1994). Design, creation, and characterization of a stable, monomeric Triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1515-1518.
- Borchert, T.V., Abagyan, R., Rada Kishan, J.V., Zeelen, J.Ph. y Wierenga, R.K. (1993b). The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: The correct modeling of an eight-residue loop. *Structure* **1**, 205-213.
- Borchert, T.V., Pratt, K., Zeelen J. P., Callens M., Noble M.E.M., Opperdoes, F.R., Michels, P.A.M. y Wierenga, R.K. (1993a) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem* **211**, 703-710.
- Borchert, T.V., Zeelen, J.Ph., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R. y Wierenga, R.K. (1995a). An interphase point-mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *FEBS Letters*, **367**, 315-318.
- Bothwell, M.A. y Schachman, H.K. (1980). Equilibrium and kinetic studies of the association of catalytic and regulatory subunits of aspartate transcarbamoylase. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1962-1970.
- Boudker, O., Todd, M.J. y Freire, E. (1997). The structural stability of the Co-chaperonin GroES. *J. Mol. Biol.*, **272**, 770-779.
- Bowie, J.U. y Sauer, R.T. (1989). Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer. *Biochemistry*, **28**, 7139-7143.
- Brändén C.I. (1991) The TIM barrel-the most frequently occurring folding motif in proteins. *Curr. Op. Struc. Biol.*, **1**, 978-983.
- Brändén, C.I. y Tooze, J. (1991). Introduction to protein structure. New York: Garland Publishing Inc.
- Creighton, T.E. (1992). Protein folding. W.H. Freeman and company, N.Y. 547 pp.
- Chan, H.S. y Dill, K.A. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6388-6392.
- Cheng, X., Gonzalez, M.L. y Lee, J.C. (1993) Energetics of intersubunit interactions of *Escherichia coli* adenosine cyclic 3',5'- phosphate receptor protein. *Biochemistry*, **32**, 8130-8139.
- Davenport, R.C., Bash, P.A., Seaton, B.A., Karplus, M., Petsko, G.A. y Ringe, D. (1991). Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxymate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry*, **30**, 5821-5826.
- Delboni, L.F., Mande, S.C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F.M.D., Martial, J.A., y Hol, W.G.J. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 2594-2604.
- Dill, K.A. y Shortle, D. (1991). Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem.*, **60**, 795-825.

- Dobson, C.M. (1991). Characterization of protein folding intermediates. *Curr. Op. Struc. Biol.*, 1, 22-27.
- Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Seminostov, G.V., Venyaminov, S.Y. y Pütsyn, O.B. (1981). *FEBS Letters*, 136, 311-315.
- Doster, W. y Hess, B. (1981). *Biochemistry*, 20, 772-780.
- Eder, J. y Kirschner, K. (1992). Stable structures of eightfold β -barrel proteins: fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry*, 31, 3617-3625.
- Farber, G.K. and Petsko, G.A. (1990). The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 228-234.
- Fernández-Velasco, D.A., Sepúlveda-Becerra, M., Galina, A., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., y Gómez-Puyou, A. (1995) Water requirements in monomer folding and dimerization of Triosephosphate isomerase in reverse micelles. Intrinsic fluorescence of conformers related to reactivation. *Biochemistry*, 34, 361-369.
- Fersht, A.R. (1994). Characterizing transition states in protein folding: An essential step in the puzzle. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 5, 79-84.
- Fersht, A.R. (1998). Protein stability en Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Freedman, R.B. (1992). En "Protein folding" Creighton, T.E. Ed W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Gracy, R.W. (1992). Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.*, 208, 389-395.
- Ginsburg, A. y Carroll, W.R. (1965). Some specific anion effects in the conformation and thermal stability of ribonuclease. *Biochemistry*, 4, 2159-2174
- Godzik, A. Skolnick, J. y Kolinski, A. (1992). Simulations of the folding pathway of triosephosphate isomerase-type α/β barrel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2629-2633.
- Gokhale, S.R., Ray, S.S., Balaram, H. & Balaram, P. (1999). *Biochemistry*, 38, 423-431.
- Goto, Y. y Fink, A. (1989). Conformational states of β -lactamase: molten globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry*, 28, 945-952.
- Green, R.F. y Pace, C.N. (1974). Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin, and β -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.*, 249, 5388-5393.
- Harris, T.K., Abeygunawardana, C. Y Mildvan, A.S. (1997). NMR studies of the role of hydrogen bonding in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 36, 14661-14675.
- Harris, K.T., Cole, N.R., Comer, I.F. & Mildvan, S.A. (1998). *Biochemistry*, 37, 16828-16838.
- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48, 422-427.
- Hecht, K. y Jaenicke, R. (1989). Malate dehydrogenase from the extreme halophilic archaeobacterium *Halobacterium marismortui* in various denaturants. *Biochemistry*, 28, 4979-4985.
- Herold, M. y Kirschner, K. (1990). Reversible dissociation and unfolding of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli*: characterization of a monomeric intermediate. *Biochemistry*, 29, 1907-1913.
- Ibarra-Molero, B. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1996). A model-independent, nonlinear extrapolation procedure for the characterization of protein folding energetics from solvent-denaturation data. *Biochemistry*, 35, 14689-14702.
- Ilzhaki, L.S., Evans, P.A., Dobson, C.M. y Radford, S.E. (1994). Tertiary interactions in the folding pathway of hen lysozyme: kinetic studies using fluorescent probes. *Biochemistry*, 33, 5212-5220
- Jaenicke, R. (1996). Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Current topics in cellular recognition* (Stadtman E.R. y Chock, P.B., Eds.), 34, 209-314.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 49, 117-237.
- Jasanoff, A., Davis, B. y Fersht, A.R. (1994). Detection of intermediate in the folding of the (β)₈-barrel N-(5-phosphoribosyl) antranilate isomerase from *Escherichia coli* *Biochemistry*, 33, 6350-6355.

- Joseph-McCarthy, D., Rost L.E., Komives, E.A. y Petsko G. A. (1994) Crystal structure of the mutant yeast triosephosphate isomerase in which the catalytic base glutamic acid 165 is changed to aspartic acid. *Biochemistry*, 33, 2824-2829.
- Kyte, J. (1995). Structure in Protein Chemistry. Garland Publishing, Inc. New York & London. 606 pag.
- Knowles, J.R. y Albery, W.J. (1977) Perfection in enzyme catalysis: the energetics of Triosephosphate isomerase. *Accounts of Chem. Res.* 10, 105-111.
- Knowles, J.R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350, 121-124.
- Kohlhoff, M., Dahm, A. y Hensel, R. (1996). Tetrameric Triosephosphate isomerase from hyperthermophilic archaea. *FEBS Letters*. 383, 245-250.
- Kurganov, B.I. (1967) Kinetic method of calculating the association constants of protein molecules. *Mol. Biol.* 1, 17-27.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Landa, A., Rojo-Dominguez, A., Jiménez, L. y Fernández-Velasco, D.A. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur. J. Biochem.* 247, 348-355.
- Levinthal, C. (1968). *J. Chim. Phys.* 85, 44
- Lodi, P.J. y Knowles, J.R. (1993). Direct evidence for the exploitation of an α -helix in the catalytic mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 32, 4338-4343.
- Lois, E. y Petsko G.A. (1990). Crystallographic analysis of the complex between Triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5 Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry*, 29, 6619-6625.
- Lois, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. y Petsko, G. (1990). Structure of yeast Triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 29, 6609-6618.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Mainfroid, V., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A. y Goraj, K. (1996b). Stabilization of human Triosephosphate isomerase by improvement of stability of individual α -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry*, 35, 4110-4117.
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Bearengard, M., Frère, J.M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial J.A. y Goraj. K. (1996a). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441-456.
- Maldonado, E., Soriano-Garcia, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Perez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic Trypanosomes. *J. Mol. Biol.* 283, 193-203.
- Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. y Hol, W.G.J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase related human genetic disorders and comparison with the tripanosomal enzyme. *Prot. Sci.*, 3, 810-821.
- Matthews, C.R. y Crisanti, M.M. (1981). Urea-induced unfolding of the α subunit of tryptophan synthase: evidence for a muly state process. *Biochemistry*, 20, 784-792.
- Mc Vittie, J.D., Esnouf, M.P. y Peacocke A.R. (1977) The denaturation-renaturation of chicken muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* 81, 307-315.
- Mendoza-Hernández, G. y Rendón, J.L. (1996). Human placental estradiol 17 β -dehydrogenase: structural and catalytic changes during urea denaturation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1297, 219-227.
- Miles, E.W., Yutani, K. y Ogasahara, K. (1982). Guanidine Hydrochloride induced unfolding of the α subunit of tryptophan syntase and two α proteolytic fragments: evidence for stepwise unfolding of the α domains. *Biochemistry*, 21, 2586-2592.
- Monera, O.D., Kay, C.M. y Hodges, R.S. (1994) Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Science*, 3, 1984-1991.
- Mücke, M y Schmid, F.X. (1994) A kinetic method to evaluate the two-state character of solvent-induced protein denaturation. *Biochemistry*, 33, 12930-12935.

- Myers, J.F., Pace, C.N. y Scholtz, J.M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.*, **44**, 2138-2148.
- Neet, K.E y Timm, D.E. (1994). Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.*, **3**, 2167-2174.
- Noble, M.E.M., Zeelen, J.Ph., Wierenga, R.K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.-C. y Martial, J.A. (1993). Structure of Triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog.*, **D49**, 403-417.
- Noble, M.E.M., Zeelen, J.Ph. y Wierenga, R.K. (1993). Structure of the open and closed state of the trypanosomal Triosephosphate isomerase, as observed in new crystal form: implications for the reaction mechanism. *Proteins*, **16**, 311-326.
- Norton, I.L. y Hartman, F.C. (1972). Halocetol Phosphates. A comparative study of the active site of yeast and muscle triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **11**, 4435-4441.
- Ohgushi, M. y Wada, A. (1993). *FEBS Letters*, **164**, 21-24.
- Pace, C.N (1975). The stability of globular proteins. *Crit. Rev. Biochem.* **3**, 1-43.
- Pace, C.N (1990). Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci.* **15**, 14-17.
- Plitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E. y Razgulyaev, O.I. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.* **262**, 20-24.
- Plitsin, O.B. (1995). *Trens Biochem. Sci.* **20**, 376.
- Ragone, R (2000) How protein concentration affects unfolding curves of oligomers. *Biopolymers*, **53**, 221-225.
- Raines, R.T., Sutton, E.L., Strauss, D.R., Gilbert, W. y Knowles, J.R. (1986) Reaction energetics of a mutant triosephosphate isomerase in which the active-site glutamate has been changed to aspartate. *Biochemistry*. **25**, 7142-7154.
- Reardon, D. y Farber, G.K. (1993). The structure and evolution of $\alpha\beta$ barrel proteins. *FASEB J.* **9**, 497-502.
- Rietveld, A.W.M. y Ferreira, S. (1996). Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: persistent heterogeneity of protein dimer. *Biochemistry*, **35**, 7743-7751.
- Rietveld, A.W.M. y Ferreira, S. (1998). Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, **37**, 933-937.
- Rosen, C.G. y Weber, G. (1969) Dimer formation from 1-anilino-8-naphtalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry*, **8**, 3915-3920.
- Rozacky, E.E. Sawyer, T.H. Barton, R.A. y Gracy, R.W. (1971). Studies of human triosephosphate isomerase. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 312-320.
- Rudolph, R., Siebedritt, R. y Kiefhaber, T. (1992). Reversible unfolding and refolding behavior of monomeric aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Protein Sci.*, **1**, 654-666.
- Sacchetta, P., Aceto, A., Bucciarelli, T., Dragani, B., Santarone, S., Allocati, N. y Di Ilio, C. (1993). Multiphasic denaturation of glutathione transferase B1-1 by guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* **215**, 741-745.
- Sánchez del Pino, M.M. y Fersht, A.R. (1997). Nonsequential unfolding of the $\alpha\beta$ barrel protein indole-3-glycerol-phosphate synthase. *Biochemistry*, **36**, 5560-5565.
- Santoro, M.M. y Bolen, D.W. (1992). A test of the linear extrapolation of unfolding free energy changes over an extended denaturant concentration range. *Biochemistry*, **31**, 4901-4907.
- Schellman, J.A. (1978). Solvent denaturation. *Biopolymers*, **17**, 1305-1322.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. y Wierenga, R.K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of Triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*, **36**, 9655-9662.



- Schüring, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R. y Knowles, J. (1995). Phosphoglycerate kinase and Triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* from a covalent bifunctional enzyme complex. *The EMBO Journal*, **14**, 442-451.
- Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F. y Gilmanshin, R.I. (1991). Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, **31**, 119-128.
- Sepúlveda-Becerra, M.A., Ferreira, S.T., Strasser, R.J., Garzón-Rodríguez, W., Beltrán, C., Gómez-Puyou, A. y Drazon, A. *Biochemistry*, **35**, 15915-15922.
- Silva, J.L., Silveira, C.F., Correia Jr, A. y Pontes, L. (1992). Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. *J. Mol. Biol.* **223**, 545-555.
- Stackhouse, T.M., Onuffer, J.J., Matthews, C.R., Ahmed, S.A. y Wiles, E.W. (1988). Folding of homologous proteins: conservation of the folding mechanism of the α subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and interspecies hybrids. *Biochemistry*, **27**, 824-832.
- Sun, A.-Q., Yüksel, K.U. y Gracy, R.W. (1992). Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20168-20174.
- Sun, A.-Q., Yüksel, K.U. y Gracy, R.W. (1993). Limited proteolysis of triosephosphate isomerase and characterization of the catalytically active peptide complex. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26872-26878.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, **24**, 1-95.
- Teschner, W. y Garel, J.-R. (1989). Intermediates on the reassociation pathway of phosphofructokinase I from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **28**, 1912-1916.
- Thomson, J.A., Shirley, B.A., Grimsley, G.R. y Pace, C.N. (1989). Conformational stability and mechanism of folding of ribonuclease T1. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11614-11619.
- Timm, D.E. y Neel, K.E. (1992). Equilibrium denaturation studies of mouse β -nerve growth factor. *Protein Sci.*, **1**, 236-244.
- Uversky, V.N. (1993). Use of fast protein size liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry*, **32**, 13288-13298.
- Velanker, S.S., Ray, S.S., Gokhale, R.S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy M.R.N. (1997). Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure*, **5**, 751-761.
- Waley, S. (1973). Refolding of Triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* **135**, 165-172.
- Wetlaufer, D.B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **70**, 697.
- Wierenga, R.K., Noble, M.E.M. y Davenport, R.C. (1992). Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and Trypanosomal Triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.*, **224**, 1115-1126.
- Wierenga, R.K., Noble, M.E.M., Vriend, G., Nauche, S. y Hol, W.G.J. (1991). Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2-4 ammonium sulphate. *J. Mol. Biol.*, **220**, 995-1015.
- Wong, K. Y Tanford, C. (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 8518-8523.
- Zabori, S., Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1980) Folding and association of Triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch* **35c**, 999-1004.
- Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E.A., Liu, K.D., Knowles, J.R., Petsko, G.A. y Ringe, D. (1994). Crystal structure of recombinant chicken Triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8 Å resolution. *Biochemistry*, **33**, 2830-2837.

studies the unfolding of the wild-type enzymes showed monophasic patterns, and was modeled as a two-state transition; information on the properties of the monomer was obtained from the two-state unfolding of monomeric mutants [18,19] or from equilibrium and activation energies of the wild type enzyme [21]. Clear evidence for a different unfolding behavior in urea and Gdn-HCl has been reported in a very recent study of *Plasmodium falciparum* TIM, where an intermediate characterized as an aggregate was observed in Gdn-HCl [23]. Here, in an effort to contribute to our understanding of the unfolding behavior of oligomers, we study the denaturation of *Saccharomyces cerevisiae* TIM (sTIM) in urea and Gdn-HCl.

Materials and Methods. *E. coli* cells (strain JM103) containing the pKK223-3ytim plasmid expressing sTIM, were a generous gift of Dr. David P. Heitmeyer (Harvard University, Cambridge, U.S.A.) to Dr. Ruy Pérez-Montfort (UNAM, México). The cell pellet of a culture (18h at 37°C) was suspended in 10mM Tris-HCl pH 8.0/20mM PMSF/DMSO and lysed in a French press cell at 4°C. The lysate was ultracentrifuged and the pellet from the 65 to 90% ammonium sulfate fraction was dialyzed overnight against buffer A (10 mM TEA/1.0 mM EDTA/1.0 mM DTT, pH 7.6). The filtrate was loaded on a Sephacryl S-300 (equilibration and elution in buffer A plus 1.0 mM Na₂S₂O₃); fractions were loaded on a Pharmacia Biotech MonoQ 10/10 column (equilibrated in buffer A) and eluted with 0-100 mM NaCl; fractions were adjusted to pH 8.0, dialyzed and loaded in the MonoQ column (equilibrated at pH 8.0) and eluted with 0-150 mM NaCl. A single band with a $V_{m,0} = 8,000 \mu\text{mol} (\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ was observed in SDS/PAGE [25] stained with silver. sTIM concentration was determined by absorbance at 280 nm [26]. Activity was followed by a coupled-enzyme assay [27]. For equilibrium unfolding times and reversibility experiments, samples (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were equilibrated in the pre-, post- and denaturing regions of both unfolding transitions. Equilibrium times (24 and 48 hours for Gdn-HCl and urea respectively) were determined from wavelength of maximal emission (λ_{max}) (data not shown). Renaturation was started by dilution of samples in TED 100/10/1 pH 7.4. After 24 hours, catalytic activity and intrinsic fluorescence (IF) spectra of native and renatured sTIM are the same, showing that within experimental error both transitions are fully reversible.

Unless otherwise stated, spectroscopic and hydrodynamic measurements were carried out at 25 °C with 50 $\mu\text{g sTIM mL}^{-1}$ in TED 20/1/1 pH 7.4. Fluorescence was monitored in a ISS PC1 Spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL, USA); the excitation/emission range (4.0 nm bandwidth) was 280/300-450 nm for IF and 360/400-560 nm for 8-aniline-1-naphthalenesulfonate (ANS) fluorescence. Circular dichroism (CD) at 222nm was monitored with an AVIV 62HDS spectropolarimeter using 0.1 cm pathlength cells. Reference sample signals were subtracted in all spectroscopic measurements. Two-step kinetic unfolding experiments were done according to Mücke and Schmid [28]; in step I, samples (200 $\mu\text{g sTIM mL}^{-1}$) were equilibrated in different concentrations of denaturant and in step II samples were diluted to 50 $\mu\text{g sTIM mL}^{-1}$. Denaturant concentration in step II, was maintained constant in equilibrium measurements, and adjusted to 3.0 M Gdn-HCl or 7.5 M urea in kinetic measurements. Fast protein size-exclusion liquid chromatography experiments [29], were carried out in a Superdex 200HR column equilibrated with the concentration of denaturant used in

- [22] Gao X.G., Garza-Ramos G., Saavedra-Lira E., Cabrera N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Perez-Montfort R. and Gomez-Puyou A. (1998). *Biochem J.* 332, 91-96.
- [23] Gokhale, S.R., Ray, S.S., Balam, H. and Balam, P. (1999). *Biochemistry*, 38, 423-431.
- [24] Gopal, B., Ray, S.S., Gokhale, S.R., Balam, H., Murthy, M.R.N. and Balam, P. (1999). *Biochemistry*, 38, 478-486.
- [25] Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
- [26] Norton, I.L. and Hartman, F.C. (1972). *Biochemistry* 11, 4435-4441.
- [27] Rozacky, E.E. Sawyer, T.H. Barton, R.A. and Gracy, R.W. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 312-320.
- [28] Mücke, M. and Schmid, F.X. (1994). *Biochemistry*, 33, 12930-12935.
- [29] Uversky, V.N. (1993). *Biochemistry*, 32 13288-13298.
- [30] Rosen, C.G. and Weber, G. (1969). *Biochemistry*, 8, 3915-3920.
- [31] Pitsin, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E. and Razgulyaev, O.I. (1990). *FEBS Letters*, 262, 20-24.
- [32] Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F. and Gilmanshin, R.I. (1991). *Biopolymers*, 31, 119-128.
- [33] Silva, J.L., Silveira, C.F., Correia, Jr. A. and Pontes, L. (1992). *J. Mol. Biol.*, 223, 545-555.

Received on January 13, 2000, accepted on January 28, 2000