

0055/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

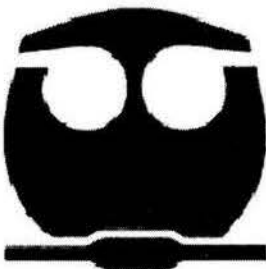
LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA BAJO
PRESIÓN HIDROSTÁTICA: ESTUDIO
COMPARATIVO DE DOS ESPECIES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**ADRIAN RIGOBERTO VÁZQUEZ
PÉREZ**



Tutor: DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO

2005

m 341992



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.

**LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA BAJO PRESIÓN
HIDROSTÁTICA: ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS ESPECIES.**

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco en el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|---|-----------------------------------|
| Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco | Facultad de Medicina, UNAM |
| Dr. Miguel Costas Basín | Facultad de Química, UNAM |
| Dr. Rosario Muñoz Clares | Facultad de Química, UNAM |

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (_____) y PAEP-UNAM (_____). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día _____ de _____ de 2005.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

| | | |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Presidente | Dr. Armando Gómez Puyou | I. de Fisiología Celular, UNAM |
| Vocal | Dr. Rafael Zubillaga Luna | U. A. Metropolitana-Iztapalapa |
| Secretario | Dr. Miguel Costas Basín | Facultad de Química, UNAM |
| Suplente | Dr. Enrique García Hernández | Instituto de Química, UNAM |
| Suplente | Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez | Facultad de Medicina, UNAM |

Agradecimientos

A Alejandro Fernández, por que desde el inicio mostró su gran calidez humana y de ahí parte todo lo que enseña. Por la paciencia en los millones de correcciones que tuviste que realizar, por la seguridad que imprimiste a todo el proyecto, por montón de cosas más, eres un gran amigo. Gracias.

A Hugo Nájera, por introducirme a la práctica científica, además de su constancia como amigo y por sus innumerables asesorías que concedió sin tregua.

A los Doctores Miguel Costas y Rosario Muñoz, ya que con sus consejos, opiniones y atinadas correcciones me motivaron a lograr aterrizar y concretar este trabajo.

A Mauricio Rodríguez Álvarez, por la amistad que necesariamente generó tantas discusiones, pláticas, replanteamientos, idearios, glosismos, diatribas, libelos, proyecciones, y hasta complacencias compartidas a lo largo de mi estancia.

A Mariana Peimbert por sus intervenciones y por sus constantes, siempre oportunas y bien recibidas opiniones.

A los doctores titulares del laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de proteínas, porque siempre tuvieron la amabilidad y atención de ayudarme en innumerables veces, ya técnicamente, ya anímicamente.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Armando Lucumí, que siempre tuvo un ánimo chévere para que la vaina saliera bien, a “Los Luises” por su refinado arte del ajere motivacional que siempre mantuvo cálido el ambiente laboratorio. A todos los demás, que participaron en hacer de un lugar de trabajo, una apacible estación.

A los revisores de la tesis, por que mostraron un esfuerzo excepcional en hacer este trabajo más perfectible, y lograron que contara con el rigor científico.

A mi madre, que para omitir páginas, agradeceré únicamente por su presencia y existencia.

A mis amigos que, como yo, estudian y empiezan a estudiar un posgrado.

A mi padre, porque me ofreció hospedaje y a veces consejo durante todo este período.

A mi hermana, porque se le quiere.

A mi chica, por llegar y permitirme estar.

**"Like all young men
I set out to be a genius,
but mercifully
laughter intervened."**

**"Al igual que todos los jóvenes
me propuse ser un genio,
pero afortunadamente
intervino la risa"**

Lawrence Durrell, Clea.

Tabla de contenidos

| | |
|--|------------|
| TABLA DE CONTENIDOS | I |
| INDICE DE ABREVIATURAS | III |
| RESUMEN | VI |
| ABSTRACT | VII |
| I – INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 1.1.- PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS. | 1 |
| 1.2.- LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA. | 3 |
| 1.2.1.- GENERALIDADES | 3 |
| 1.2.2.- LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE <i>ENTAMOEB</i> A <i>HISTOLYTICA</i> (EHTPI) | 5 |
| 1.2.3.- CARACTERÍSTICAS DE EHTPI Y SCTPI. | 6 |
| 1.2.4.- ESTUDIOS DEL PLEGAMIENTO DE BARRILES (α/β) ₈ (BARRILES TPI). | 8 |
| 1.2.4.1.-Estudios termodinámicos y cinéticos de la desnaturalización y renaturalización de la TPI. | 9 |
| 1.3.- EFECTO DE LA PRESIÓN SOBRE LAS PROTEÍNAS. | 12 |
| 1.3.1.- TERMODINÁMICA. | 12 |
| 1.3.2.- IMPLICACIONES ESTRUCTURALES. | 14 |
| 1.3.3.- VOLUMEN DE PROTEÍNAS. | 14 |
| 1.3.4.- PRESIÓN Y DISOCIACIÓN. | 17 |
| 1.3.5.- EFECTO DE LOS CODESNATURALIZANTES. | 18 |
| 1.3.6.- LA TPI BAJO PRESIÓN HIDROSTÁTICA. | 18 |
| II.- OBJETIVOS | 20 |
| 2.1. - GENERAL | 20 |
| 2.2. - PARTICULARES | 20 |
| III.-MATERIALES Y MÉTODOS. | 21 |
| IV.- RESULTADOS | 31 |
| 4.1.- RESULTADOS DE LA SCTPI. | 31 |
| 4.1.1.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES EN LA RENATURALIZACIÓN DE SCTPI. | 31 |
| 4.1.2.- LA SCTPI NATIVA CON PRESIÓN HIDROSTÁTICA. | 33 |
| 4.1.3.- EL INTERMEDIARIO MONOMÉRICO DE SCTPI BAJO PRESIÓN. | 34 |
| 4.1.4 ANÁLISIS TERMODINÁMICO. | 40 |
| 4.2.- RESULTADOS DE LA EHTPI. | 44 |
| 4.2.1.- ENSAYOS DE DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN DE EHTPI EN GDNHCL. | 44 |
| 4.2.2.- DESNATURALIZACIÓN DE LA ENZIMA NATIVA BAJO PRESIÓN. | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.3.- COMPORTAMIENTO DEL INTERMEDIARIO MONOMÉRICO DE LA EHTPI EN GDNHCL-PRESIÓN. | 51 |
| 4.2.4.- ANÁLISIS TERMODINÁMICO. | 55 |
| V.-DISCUSIÓN | 61 |
| 5.1.- AVANCES EN EL PLEGAMIENTO DE SctPI. | 61 |
| 5.2.- MECANISMO DE PLEGAMIENTO DE EHTPI. | 62 |
| 5.3.- COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE PLEGAMIENTO DE LA SctPI Y EHTPI. | 64 |
| 5.4.- COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS INTERMEDIARIOS MONOMÉRICOS DE EHTPI Y SctPI. | 65 |
| 5.5.- COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS DE LOS INTERMEDIARIOS MONOMÉRICOS DE EHTPI Y SctPI. | 66 |
| 5.6.- ANÁLISIS DE CAVIDADES DE LOS CRISTALES DE EHTPI Y SctPI. | 68 |
| 5.7.- COMPORTAMIENTO DEL ΔV RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE GDNHCL. | 69 |
| 5.8.- COLOFÓN. | 69 |
| VI.- CONCLUSIONES. | 70 |
| VII.- BIBLIOGRAFÍA. | 71 |

Índice de Abreviaturas

| Abreviatura | Descripción |
|---------------------|---|
| [X] | Concentración de "X". |
| \Delta V | Valor absoluto del cambio de volumen específico. |
| °C | Grados Celsius. (Centígrados) |
| Å | Ångstrom. (Unidad de longitud) |
| ASA | Area de superficie accesible al solvente. |
| BsTPI | Triosafosfato isomerasa de <i>Bacillus subtilis</i> . |
| CME | Centro de masa espectral. |
| CME _{obs.} | Centro de masa espectral observado. |
| CME _x | Centro de masa espectral de la especie "x". |
| rTPI | Triosafosfato isomerasa de conejo. |
| c-terminal | Extremo carboxi-terminal. |
| C _x | Concentración "x". |
| Da | Dalton, (Unidad de masa molecular) |
| DHAP | Dihidroxiacetona fosfato. |
| EDTA | Ácido Etil dietanoiltetraacético. |
| EhTPI | Triosafosfato isomerasa de <i>Entamoeba histolytica</i> . |
| F | Intensidad de fluorescencia en presencia de apagador. |
| F ₀ | Intensidad de fluorescencia en ausencia de apagador. |
| G | Gramo, (Unidad de masa) |
| G3P | Gliceraldehído-3-fosfato. |
| GdnHCl | Clorhidrato de Guanidinio (Agente desnaturante). |
| Glu | Glutamato o glutámico (Aminoácido) |
| His | Histidina (Aminoácido) |
| hTPI | Triosafosfato isomerasa de humano. |
| J | Joule. (unidad de energía) |
| K | Kilo. (10 ³) |
| k _{cat} | Constante de recambio. (Número de recambio) |
| K _d | Constante de Disociación. |
| K _{eq} o K | Constante de equilibrio. |
| K _m | Constante de Michaelis-Menten. |
| K _{sv} | Constante de Stern-Volmer. |
| L ó l | Litro, (Unidad de volumen) |
| Lis | Lisina (Aminoácido) |
| LmTPI | Triosafosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i> . |
| Ln | Logaritmo neperiano. |
| M | Molar (unidad de concentración, mol/litro) |
| m | Mili. (10 ⁻³) |
| M | Monómero o intermediario monomérico. |
| M | Pendiente de la ecuación. |
| MMTS | Metil-metano tiosulfonato. |
| Mol | Mol |
| N | Estado nativo de la proteína. |

| | |
|--|---|
| N | Número de moles. |
| Nm | Nanometro. (Unidad de distancia, 1×10^{-9} m). |
| n-terminal | Extremo amino-terminal. |
| P | Presión. |
| P_{1/2} | Presión de media transición. |
| P_{1/2H2O} | Presión de media transición en ausencia de desnaturizante. |
| P_{1/2xGdnHCl} | Presión de media transición a concentración "x" de desnaturizante. |
| Pa | Pascal. (Unidad de presión) |
| PDB | Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank). |
| pH | Potencial hidrógeno. ($\log 1/[H^+]$) |
| PoTPI | Triosafosfato isomerasa de Pollo. |
| Q | Apagador (Quencher). |
| R | Constante de los gases. |
| R | Anisotropía de la fluorescencia. |
| R_s | Radio de Stokes. |
| S | Entropía. |
| S | Segundo, (Unidad de tiempo) |
| ScTPI | Triosafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . |
| T | Temperatura. |
| TbTPI | Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> . |
| T_m | Temperatura de media transición. |
| TPI | Triosafosfato isomerasa. |
| U | Estado desplegado de la proteína. |
| V | Volumen específico. |
| V_M | Volumen específico del intermediario monomérico. |
| V_u | Volumen específico del estado desplegado. |
| X_x | Fracción molar de "x". |
| ΔCME | Cambio en el centro de masa espectral. |
| ΔC_p | Cambio en la capacidad calorífica a presión constante. |
| ΔE⁰ | Cambio en el potencial de reducción en condiciones estándar bioquímicas. |
| ΔG | Cambio en la energía libre. |
| ΔG[‡] | Cambio en la energía libre para la activación. (Energía de activación) |
| ΔG[‡]_{asoc.} | Cambio en la energía libre para la activación de la asociación. |
| ΔG[‡]_{disoc.} | Cambio en la energía libre para la activación de la disociación. |
| ΔG[‡]_u | Cambio en la energía libre para la activación del desplegamiento. |
| ΔG⁰ | Cambio en la energía libre en condiciones estándar químicas. |
| ΔG⁰ | Cambio en la energía libre en condiciones estándar bioquímicas. |
| ΔG_{ap} | Cambio de energía libre a presión P. |
| ΔG_{asoc.} | Cambio en la energía libre para la asociación. |
| ΔG_f | Cambio en la energía libre para el plegamiento. |
| ΔG_{H2O} | Cambio de energía libre en ausencia de desnaturizante. |
| ΔG_{p=0} | Cambio de energía libre a presión cero. |
| ΔG_{u-f total} | Cambio en la energía libre para la reacción de plegamiento en su totalidad. |
| ΔG_{xGdnHCl} | Cambio de energía libre a concentración "x" de desnaturizante. |
| ΔH | Cambio en la entalpía. |

| | |
|----------------------|---|
| $\Delta P_{1/2}$ | Cambio en la presión de media transición. |
| ΔS | Cambio en la entropía. |
| ΔV | Cambio en el volumen específico. |
| ΔV_{H_2O} | Cambio de volumen específico en ausencia de desnaturizante. |
| $\Delta V_{xGdnHCl}$ | Cambio de volumen específico a "x" concentración de desnaturizante. |
| $\Delta\alpha$ | Cambio en el factor de expansión térmica |
| $\Delta\kappa$ | Cambio en el factor de compresibilidad |
| α | Factor de expansión térmica. |
| κ | Factor de compresibilidad. |
| μ | Micro (prefijo, 1×10^{-6}) |

Resumen

La triosafosfato isomerasa (TPI) es una enzima ubicua, crítica para la glicólisis y catalíticamente perfecta. El tipo de plegado que presenta, llamado barril $(\alpha/\beta)_8$, se observa al menos en 10% de las estructuras reportadas en el banco de datos de proteínas (Protein Data Bank, PDB). Es por ésto que estudiar el mecanismo de plegamiento de los barriles α/β proveería un fuerte avance para entender los principios que rigen el mecanismo de plegamiento de las proteínas. A continuación se presenta un estudio comparativo sobre el mecanismo de plegamiento/desplegamiento de las TPI de *Entamoeba histolytica* (EhTPI) y *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI), utilizando clorhidrato de guanidinio (GdnHCl) y presión hidrostática como agentes desnaturizantes. Ambas enzimas parecen tomar una ruta de plegamiento semejante, presentando un intermediario monomérico expandido pero estructurado. A continuación, se realizó un estudio termodinámico del desplegamiento de los intermediarios de ambas enzimas utilizando presión hidrostática, obteniendo los parámetros termodinámicos ΔG , ΔV , y $P_{1/2}$. La semejanza en las propiedades obtenidas sugiere que los intermediarios podrían ser termodinámicamente equivalentes. Además, se reporta un aumento en el valor absoluto del ΔV respecto a la concentración de GdnHCl.

Las similitudes encontradas en la ruta de plegamiento de ambas enzimas podría indicar que la presencia de un intermediario monomérico expandido es un factor constante en el mecanismo de plegamiento de las TPI.

Abstract

Triosephosphate isomerase (TPI) is an ubiquitous and critical enzyme for the glycolysis pathway, and has been referred to as “catalytically perfect”. Its characteristic fold, the $(\alpha/\beta)_8$ barrel is observed at least in 10% of the reported structures in the Protein Data Bank (PDB) database. It is then understood why studying the folding mechanism of this α/β barrels would provide a substantial step towards the understanding of the general principles that govern protein folding. This thesis comprehends a comparative study of the folding/unfolding mechanism of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica* (EhTPI) y *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI), using guanidium hydrochloride and hydrostatic pressure as denaturing agents. Both enzymes appear to follow a similar folding pathway, where an expanded, yet structured, monomer is present. Following this, a thermodynamic study of the unfolding of both monomeric intermediates was achieved using hydrostatic pressure. The resulting thermodynamic parameters, such as ΔG , ΔV , y $P_{1/2}$, were obtained for this intermediates and were strikingly similar for both enzymes, suggesting that they may be thermodynamically equivalent. A constant increase of the absolute value of ΔV while the concentration of GdnHCl increases is also reported.

The similarities found in both enzyme folding pathways could indicate that the presence of an expanded monomeric intermediate in the folding pathway of this enzyme family could be a rather constant factor.

I – Introducción.

1.1.- Plegamiento de Proteínas.

Las proteínas necesitan plegarse para adquirir y ejercer su función biológica. Las proteínas se sintetizan como cadenas lineales de aminoácidos; sin embargo, al observar sus estructuras tridimensionales, éstas no son estructuras al azar. Anfinsen demostró, en su estudio sobre el replegamiento de la ribonucleasa, que la información para obtener una proteína plegada y funcional se encuentra contenida en el polipéptido, o mejor dicho, que es una propiedad de la secuencia de aminoácidos y del medio que le rodea (2). Desde una perspectiva cinética surge una cuestión interesante: si una proteína promedio probara todas las conformaciones posibles hasta llegar a su conformación específica de mínima energía (N); ésta invertiría un tiempo mayor a la edad del universo para plegarse, a esto se le conoce como la Paradoja de Levinthal (32).

Dado que las proteínas se pliegan en tiempos mucho más cortos que la edad del universo, debe existir alguna ruta o mecanismo de plegamiento que ataje este problema cinético. La búsqueda del mecanismo de plegamiento de las proteínas es un problema central en la bioquímica desde hace más de tres décadas. El diagrama más sencillo para el plegamiento de una proteína es el siguiente:



En la actualidad se han propuesto tres modelos que intentan explicar el mecanismo del plegamiento de proteínas (19):

1.- Nucleación-propagación: en el cual se propone que la estructura terciaria se obtiene partiendo de un núcleo inicial con estructura secundaria, del cual empieza a propagarse rápidamente el plegamiento hacia la totalidad de la proteína.

2.- Modelo jerárquico (difusión-difusión o modelo de esqueleto): en el cual aparecen primero los elementos de estructura secundaria para después acoplarse entre éstos y eventualmente formar la estructura terciaria.

3.- Colapso hidrofóbico: en el cual se propone una rápida compactación de la proteína propiciado por los aminoácidos hidrofóbicos, formando una especie de núcleo, a partir del cual se produciría la búsqueda y adquisición de elementos de estructura secundaria.

El modelo de nucleación implica la propagación continua desde un núcleo hasta la estructura final; sin embargo, la existencia de intermediarios en equilibrio contraindica y desfavorece este modelo (5, 33). La independencia de la formación de la estructura secundaria con respecto a la secuencia de aminoácidos que la constituye y la dependencia que tiene con los contactos terciarios, desfavorecen el modelo jerárquico (6, 7). El descubrimiento y estudio de glóbulos fundidos que poseen cantidades importantes de estructura secundaria indicarían que el colapso hidrofóbico tampoco parece ser el mecanismo universal de plegamiento (55-58). Es por esto que la evidencia favorece, por el momento, a un mecanismo intermedio entre el colapso hidrofóbico y la adquisición jerárquica de la estructura, es decir, un proceso simultáneo de adquisición de estructura secundaria, terciaria y compactación.

La visión actual del plegamiento de proteínas comprende la correlación de las propiedades termodinámicas con propiedades estructurales. Ésta converge en la teoría del panorama o superficie de energía, en la cual la energía de una proteína disminuye por un "embudo" energético de tal manera que la cadena tiende hacia conformaciones con menor energía, hasta llegar a la más estable, la cual es la estructura nativa (20).

1.2.- La Triosafosfato Isomerasa.

1.2.1.- Generalidades

La triosafosfato isomerasa (TPI) es una enzima dimérica en organismos mesófilos y tetramérica en organismos hipertermófilos (35). Cada subunidad tiene un peso molecular de 27 KDa aproximadamente (39). Es una enzima ubicua, clave en la vía glicolítica. La TPI cataliza la interconversión entre dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P, GAP) por medio de un intermediario enodiolato (34, 59). La TPI es una enzima muy estudiada en sus aspectos estructurales, catalíticos y cinéticos, y las estructuras cristalográficas de la enzima de 13 especies se encuentran ya disponibles en el banco de datos de proteínas (protein data bank, PDB).

Estructuralmente, la TPI es el prototipo de barril (α/β)₈, un tipo de plegado frecuente en la naturaleza (Figura 1). La estructura secundaria de la TPI consiste en ocho hebras β que alternan con una (a veces dos) hélice(s) α , plegándose a manera de barril. El sitio activo se encuentra en una cavidad localizada en uno de los extremos del barril. La enzima presenta una cinética clásica de Michaelis-Menten, sin ser regulada alostéricamente. Los residuos que unen el sustrato y los catalíticos se encuentran en la misma subunidad. No se le conocen cofactores, moduladores alostéricos, ni se ha detectado cooperatividad entre las subunidades. Además, es activa sólo como dímero (43, 68).

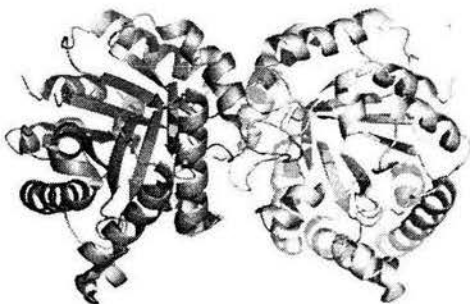
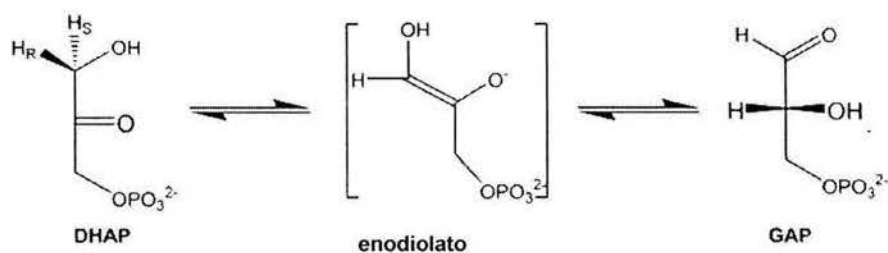


Figura 1.- Triosafosfato Isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI).

La relación k_{cat}/K_m de esta enzima resulta del orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, valor cercano al esperado para las reacciones que están limitadas por difusión ($10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), por lo que se le ha llamado a esta enzima el catalizador perfecto (10, 27). Se ha caracterizado el papel de los residuos críticos para la catálisis. En ScTPI, son Glu165, His95 y Lis12; en EhTPI son Glu174, His102 y Lis13 (3, 31, 34, 36, 79). El asa 3 de la otra subunidad tiene contacto con el sitio activo (39-41). El asa 6 tiene un importante papel en la retención del sustrato y la liberación del producto así como en el acomodo del residuo de glutamato catalítico. A esta asa se le ha determinado la entalpía de apertura-clausura, sugiriendo que la liberación de producto puede ser el paso energéticamente limitante (64, 65). La zona de bisagra responsable del movimiento del asa entera presenta también una región conservada y sensible a cambios en hidrofobicidad, así como un residuo crítico de prolina (80).

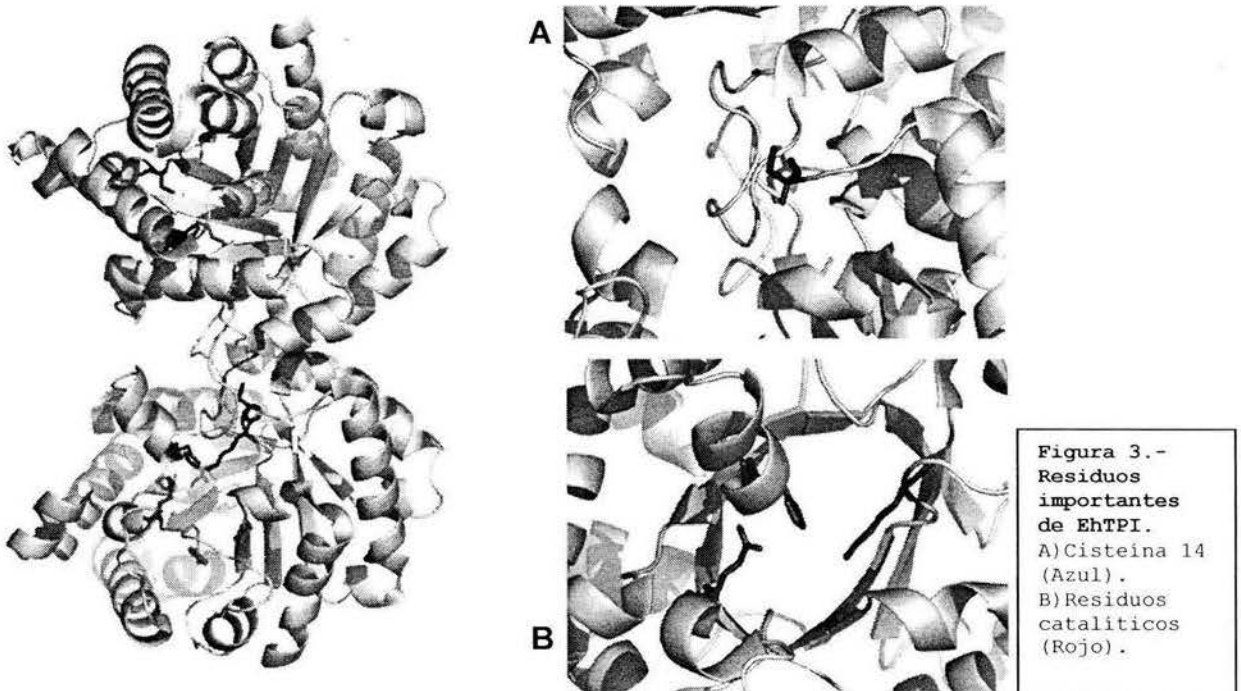
Figura 2.-Reacción catalizada por la TPI.



La TPI es activa únicamente como dímero, por lo que el sitio más propicio para abolir el funcionamiento de esta enzima en organismos patógenos es la interfase del dímero, la cual no es tan conservada como el sitio catalítico (78). Las TPI de organismos patógenos (*Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia*) presentan en la interfase un residuo de cisteína que sustituye a una metionina regularmente conservada en las demás TPI, indicando un lugar proclive al diseño de fármacos específicos (25).

1.2.2.- La Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba Histolytica* (EhTPI)

La EhTPI es una proteína de 261 aminoácidos, tiene 14 residuos adicionales y un residuo menos si se compara con la enzima de *Saccharomyces*. Estos residuos se encuentran en la cara del barril opuesta al sitio catalítico, en las asas 1, 2, 3, 6 y 8 previas a las hebras β , y en el asa 8 cercana al sitio catalítico. Los residuos catalíticos se presentan en la Figura 3 (38).



La EhTPI posee en su secuencia a la Cis14, localizada en la interfase y que forma un puente de hidrógeno con la His86 de la otra subunidad. Al realizar la derivatización de este residuo con metil-metano tiosulfonato (MMTS) se obtiene un monómero compacto con poca pérdida de estructura terciaria, y con la señal de elipticidad a 222 nm reducida 23%. El radio de Stokes (R_s) para el monómero derivatizado por MMTS es de 25.9-26.4 Å (62).

1.2.3.- Características de EhTPI y ScTPI.

Diversas características de ambas enzimas se resumen la siguiente tabla:

Tabla 1.- Características de EhTPI y ScTPI.

| Característica | EhTPI | ScTPI |
|--|---|--------------------------------------|
| Masa Molecular (Monómero) | 27936 Da | 26667 Da |
| K_m | 0.7mM | 1.5mM |
| k_{cat} | 1.45X10 ⁷ s ⁻¹ ^a | 1.58X10 ⁷ s ⁻¹ |
| Glu catalítico | 174 | 165 |
| His catalítica | 102 | 95 |
| Lis catalítica | 13 | 12 |
| No. Triptofanos | 5 (Trp12, Trp75, Trp166*, Trp177*, Trp200) | 3 (Trp90, Trp157*, Trp168*) |
| Radio de Stokes –Dímero (R_s)^b | 31.2 Å | 30.0 Å |
| ASA Total Dímero^c (PDB) | 19697 Å ² | 19356 Å ² |
| % Hidrofobicidad del ASA | 57% | 57% |
| ASA del Monómero (PDB) | 11361.36 Å ² | 11285.8 Å ² |
| ASA oculta al dimerizar. | 2753 Å ² | 3216 Å ² |

La EhTPI posee una afinidad ligeramente mayor que la ScTPI por el G3P, mientras que su velocidad máxima es prácticamente idéntica. La numeración de los residuos catalíticos muestra el desplazamiento por las inserciones y la supresión en la secuencia de la EhTPI; sin embargo, éstos corresponden estructuralmente al mismo sitio. La EhTPI posee 5 triptofanos contra 3 de la ScTPI, de los cuales 2 corresponden a posiciones estructuralmente equivalentes, el Trp75 de la EhTPI se encuentra en la región de la entrecara. El Radios de Stokes (R_s) de ambas enzimas es similar.

^a Para la reacción G3P→DHAP.

* Triptofanos en posición equivalente.

^b Calculado por cromatografía de exclusión en gel.

^c Análisis de Area Accesible a Solvente (ASA) realizado con NACCESS, Radios de VdW Richards 1977, Radio de la Sonda: 1.4 Å.

La EhTPI y la ScTPI comparten un 44.7% de identidad entre ellas. Una yuxtaposición de las dos estructuras presenta una desviación estándar media (RMSD) de 1.38Å (Figura 4). Esto se puede atribuir a que los residuos adicionales de EhTPI en las asas no generan grandes cambios en la estructura secundaria ni terciaria del esqueleto.

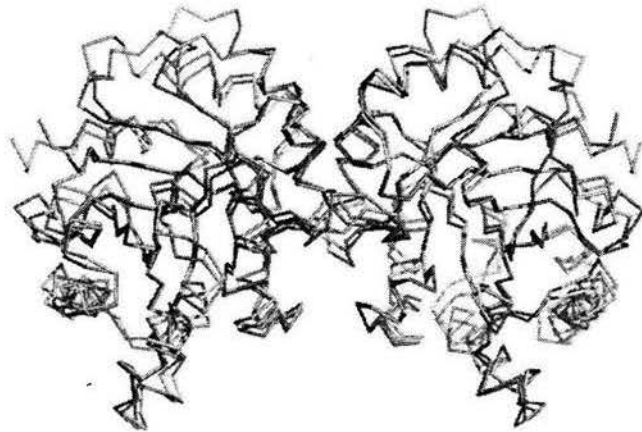


Figura 4.- Yuxtaposición del esqueleto de carbonos α de EhTPI y ScTPI.
RMSD $_{\alpha}$ =1.38 Å

En cuanto al Área accesible a solvente (ASA), de la tabla anterior se calcula que la EhTPI tiene un poco más de ASA (341\AA^2) que la ScTPI, y que el area oculta por la dimerización es considerablemente mayor (463\AA^2) en la ScTPI que en la EhTPI. Otro estudio de área accesible a solvente de la ScTPI indica que el área total de la proteína dimérica es de 17800\AA^2 , el área que se oculta en la dimerización es de 2500\AA^2 (por dímero) y que 57% de ésta es hidrofóbica, lo cual es un valor ligeramente más bajo al de otras TPI. Además, la ScTPI muestra menos volúmenes de cavidades totales accesibles a solvente (150\AA^3 , Método Connolly (16)) que la TPI de *Trypanosoma* (300\AA^3), y en ambas estas cavidades son altamente hidrofóbicas (78).

1.2.4.- Estudios del plegamiento de barriles $(\alpha/\beta)_8$ (Barriles TPI).

Los barriles α/β son el tipo de plegado más común en la naturaleza (47) y parecen compartir algunas características comunes si se relacionan por familias de actividades catalíticas (17). Sin embargo, resulta desconcertante la diversidad de funciones catalíticas que poseen estos barriles (47).

Diversos estudios de plegamiento en estas proteínas han propuesto que el plegamiento-desplegamiento no corresponde a un modelo simple de dos estados. En el desplegamiento en urea de la subunidad α de la triptofano sintasa (α -TS), dos intermediarios han sido observados (9, 18, 44, 67). En la fosforribosilantranilato isomerasa (ePRAI) y la indol-3-glicerol fosfato sintasa (sIGPS) también se presenta por lo menos un intermediario en equilibrio (84,85). Un estudio de los intermediarios de la α -TS y la sIGPS muestra que éstos presentan una estabilidad similar ($\Delta G_{I1-I2}=19.2$ kJ/mol y $\Delta G_{I-U}=18.8$ kJ/mol), lo que refuerza la hipótesis de que los barriles se pliegan de manera similar en eventos tardíos del proceso de plegamiento (22). En un estudio en el que se reacomodaron los segmentos (α/β) de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae*, se caracterizó el plegamiento de un cuarto de barril (formado por los segmentos 1 y 3), de la mitad del barril (formado por los segmentos 2, 4, 6, y 8) y de 2 barriles completos (uno formado por los segmentos 2, 4, 6, 8, 1, 3, 5, y 7, y el otro por los segmentos 1, 3, 5, 7, 2, 4, 6, y 8). El cuarto de barril y la mitad del barril presentaron una cantidad importante de estructura terciaria y secundaria, en el primer barril completo ocurre una oligomerización mayor a 2 subunidades por enzima, en tanto que el segundo barril se pliega prácticamente como la enzima nativa. Esto revela y favorece una hipótesis sobre la existencia de múltiples dominios de plegamiento en los barriles $(\alpha/\beta)_8$, en la que probablemente estos dominios correspondan a cada segmento α/β (69).

1.2.4.1.-Estudios termodinámicos y cinéticos de la desnaturalización y renaturalización de la TPI.

Los parámetros termodinámicos para el proceso de plegamiento-desplegamiento de la TPI de varias especies se resumen en la tabla 2:

Tabla 2.- Parámetros Termodinámicos del plegamiento de varias TPI (Todos los datos en kJ/mol) .

| Especie ^a | Conejo (rTPI) ⁽⁶¹⁾ | Humano (hTPI) (42, 43) | hTPI M14Q/R9 8Q ^(42, 43) | hTPI M14Q/R9 8Q/Q179 D/K193A/ 215P ^(42, 43) | BsTPI (42) | PoTPI ⁽⁴⁵⁾ | LmTPI (37) | LmTPI E65Q ⁽³⁷⁾ | TbTPI (37)* | ScTPI (45) | ScTPI ⁽⁴⁵⁾ | EhTPI (15) |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---|--|---------------|-----------------------|---------------|-------------------------------|----------------|------------------|-----------------------|---------------|
| ΔG^{\ddagger}_U | 65 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 39.7 | -- |
| ΔG_F | -5 | -- | -10.46 | -16.32 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -16.62 | -- |
| ΔG^{\ddagger}_F | 60 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 115.8 | -- |
| $\Delta G^{\ddagger}_{asoc.}$ | 38 | 59.92 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 102.5 | -- |
| $\Delta G^{\ddagger}_{disoc.}$ | 99 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 83.5 | -- |
| $\Delta G_{asoc.}$ | -60 | -- | -- | -- | -- | -61.09 | -- | -- | -- | -68.45 -79.88 | -70.28 | -11.74 |
| ΔG_{U-F} (Total) | -70 | -80.75 | -- | -- | -101.25 | -40.59 | -83.68 | -134.31 | -14.22 | -80.75 | -103.14 | -- |

Donde: ΔG^{\ddagger} , energía de activación, ΔG , diferencia en energía libre de Gibbs, U , desplegamiento, F , plegamiento, $asoc.$, asociación, $disoc.$, disociación.

Se observa en la Tabla 2 que el cambio de energía libre correspondiente a la asociación de los monómeros ($\Delta G_{asoc.}$) es mucho mayor al cambio de energía del plegamiento (ΔG_F), lo cual es señal de la gran importancia que tiene el proceso de dimerización para completar y mantener el plegado correcto de la enzima en el estado nativo (dimérico).

^a rTPI, BsTPI y LmTPI y ScTPI se hicieron en GdnHCl, hTPI y ScTPI en urea, hTPI y ScTPI por actividad, EhTPI y PoTPI por temperatura.

En un estudio de desplegamiento de la TPI seguido por accesibilidad a la alquilación, la enzima muestra tres subdominios de plegamiento con cooperatividad entre ellos (al estilo del modelo de Nucleación-Condensación), aunque esto representa solamente fases tempranas de desplegamiento, dadas las bajas concentraciones de GdnHCl utilizadas (72). La secuencia de desplegamiento de los dominios es todavía muy discutible por la falta de análisis cinéticos. En ciertos estudios el paso cinéticamente limitante es el de asociación-disociación; otros estudios en la TPI de *Saccharomyces* (8, 48, 76) corroboran que la dimerización y el plegamiento del monómero son fenómenos interrelacionados.

Un estudio de trifosfato isomerasa de conejo muestra un proceso de desplegamiento de la enzima que corresponde a un modelo de dos estados, sin intermediarios en equilibrio (60). Sin embargo, se observó un intermediario cinético claro en los experimentos de desplegamiento, tanto en urea como en GdnHCl. Este mismo estudio propone dos dominios de plegamiento, uno rápido y uno lento, correspondiendo el rápido a una mitad del barril (los primeros 120 aminoácidos, mitad C-terminal) y el lento a la segunda mitad (mitad N-terminal). El intermediario cinético posee un estabilidad muy pequeña, indicando que el paso estabilizante de la proteína es la dimerización.

Existe un estudio extenso del plegamiento de ScTPI realizado por Nájera (48), en el cual se observó el patrón de desplegamiento utilizando cloruro de guanidinio y urea. Usando GdnHCl se obtuvieron condiciones de equilibrio en el sentido de la renaturalización, con dos transiciones reversibles. Se observó un intermediario monomérico en equilibrio (aproximadamente en 0.6-0.7 M GdnHCl), por lo que el mecanismo de plegamiento que se propone es el siguiente:



La dependencia con la concentración de proteína de la primera transición, observada por actividad catalítica, indica que el primer paso es bimolecular (disociación-asociación de monómeros), y el segundo corresponde al desplegamiento del monómero. El intermediario monomérico posee un $R_s=30 \text{ \AA}$ (calculado por cromatografía de exclusión molecular) el cual es similar al radio de la proteína nativa. El intermediario retiene una cantidad considerable de estructura secundaria y terciaria. Usando urea, el intermediario no se distingue con claridad y se muestra un pequeño hombro a 2.5 M de GdnHCl. Los parámetros termodinámicos obtenidos son: $\Delta G_f=-16.59 \pm 0.71 \text{ kJ/mol}$ para el plegamiento de cada monómero y $\Delta G_{\text{asoc}}=-70.26 \pm 1.08 \text{ kJ/mol}$ para la asociación de los mismos, resultando un $\Delta G_{\text{total}}=-103.44 \text{ kJ/mol}$.

Existen estudios preliminares de la desnaturalización de la TPI de *Entamoeba histoytica* por GdnHCl (Fernández Velasco, comunicación personal) sin lograr condiciones de reversibilidad. En un análisis de desplegamiento por temperatura se observan claramente dos fases (15). La primera fase se siguió por actividad y dicroísmo circular, ya que se lograron condiciones de reversibilidad para el intervalo de temperatura de 20°C a 50°C. La dependencia de la T_m de la primera fase respecto a la concentración de proteína demostró que ésta corresponde a la disociación. De este estudio se obtuvieron las entalpías y el ΔC_p de este proceso, los cuales fueron utilizados para estimar la energía libre de disociación a 25°C ($\Delta G_{\text{disoc.}}= 11.74 \text{ kJ/mol}$).

1.3.- Efecto de la Presión sobre las proteínas.

1.3.1.- Termodinámica.

Desde la perspectiva fisicoquímica, las proteínas son macromoléculas que, como todo sistema químico, obedecen al **principio de Le Chatelier** (4, 26). Este principio establece que si un sistema es compresible, en caso de ejercerle presión, cambiará la composición de las especies en equilibrio para reducir su volumen específico al mínimo posible* (4):

De las ecuaciones fundamentales de la termodinámica:

$$d(\Delta G) = (\Delta V) dp - (\Delta S) dT \quad (A)$$

Donde:
 ΔV = Cambio de volumen.
 ΔG = Cambio en la energía libre.
 ΔS = Cambio en la entropía.
 K = Constante de equilibrio
 p = Presión.
 R = Ctte. de los gases.
 T = Temperatura.

Si mantenemos T constante:

$$\left(\frac{\partial(\Delta G)}{\partial p} \right)_T = \Delta V \quad (B)$$

Como $\Delta G = -RT \ln K$:

$$\left(\frac{\partial(-RT \ln K)}{\partial p} \right)_T = \Delta V \quad (C)$$

Como R y T son constantes, se reorganiza:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = \frac{-\Delta V}{RT} \quad (D) \text{ Principio de Le Chatelier}$$

En el caso de las proteínas, esta reducción del volumen específico del sistema proteína-solvente representaría dos posibles fenómenos (1, 30):

1) Donde la macromolécula en sí se comprimiría, generando una población de

* En realidad el principio es más general: establece que en caso de cualquier perturbación de un sistema en equilibrio, el sistema cambiará las proporciones de las especies en equilibrio para reducir la perturbación al mínimo posible, en este caso la perturbación se genera por presión hidrostática.

proteínas comprimidas (Ej.- Proteína Nativa → Proteína Comprimida).

2) Un desplazamiento en el equilibrio de poblaciones hacia la de menor volumen o con interacciones más cercanas con el solvente (Ej.- Proteína Nativa-Solvente → Proteína Desnaturalizada-Solvente).

Las primeras observaciones de proteínas bajo presión fueron realizadas por Bridgman en 1914, quien estudió la albúmina de huevo y encontró irreversibilidad en el proceso (12). El primer experimento reversible fue realizado por Suzuki con la albúmina (73). Los primeros diagramas p - T fueron realizados por Brandts quien observó una curvatura en el comportamiento del ΔG (11). Posteriormente Hawley observó un comportamiento similar y propuso que de la ecuación A, integrada de P_0 a P y de T_0 a T se obtiene:

$$\Delta G = \frac{\Delta\kappa}{2}(P - P_0)^2 + \Delta\alpha(P - P_0)(T - T_0) - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \Delta V(P - P_0) - \Delta S(T - T_0) + \Delta G_0$$

Definiendo:

$$\Delta\alpha = \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_P = - \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial P} \right)_T \quad \Delta\kappa = \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial P} \right)_T \quad \Delta C_p = T \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right)_P$$

Donde $\Delta\alpha$ (coeficiente de expansión térmica), $\Delta\kappa$ (factor de compresión) y ΔC_p se consideran constantes. Esta ecuación tiene el comportamiento elíptico (Figura 5) que predice la desnaturalización en frío, efecto que observó Bridgman desde 1914 (28).

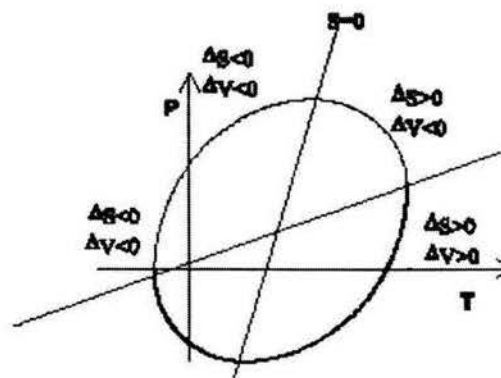


Figura 5.-Comportamiento elíptico del ΔG de desnaturalización por presión-temperatura.

El efecto del pH en estos diagramas fue estudiado por Zipp y Kauzmann, y concluyeron que la forma elíptica de la función anterior no concuerda perfectamente con los datos experimentales, indicando que el fenómeno observado corresponde a una función más compleja (83).

1.3.2.- Implicaciones Estructurales.

Respecto a la relación estructura-estabilidad de las proteínas bajo presión, se ha encontrado una correlación clara en donde una proteína más compacta y menos compresible (κ pequeño) será mucho más estable a la presión que una flexible y laxa (κ grande, (30)). Otros estudios han demostrado que existe estructura secundaria residual en el estado desnaturalizado por presión (51, 52) y que generalmente las hojas β son mucho más estables a la presión que las hélices α , aunque esto puede obedecer a que son menos compresibles. Otros estudios han mostrado que en proteínas desnaturalizadas por presión la estructura terciaria se pierde completamente (51) y su radio de giro es menor que el de una proteína desestructurada expandida al azar (54), aunque este puede llegar a ser el doble del determinado para la estructura nativa (51). La accesibilidad a agentes específicos a grupos tiol a presiones de 100 MPa y el entrecruzamiento entre moléculas por puentes disulfuro a presiones de 400 MPa, son indicativos de una importante modificación de la estructura terciaria en el estado desnaturalizado inducido por presión hidrostática (74, 75).

1.3.3.- Volumen de proteínas.

El volumen específico de una proteína en solución (sistema proteína-solvente) está basado generalmente en 3 términos (30) :

- a) El volumen constitutivo de los átomos.
- b) El volumen vacío o “muerto” generado por el empacamiento imperfecto

entre los átomos.

- c) La disminución de volumen que resulta de la solvatación de la cadena peptídica y de los residuos de aminoácidos.

Las contribuciones de signo negativo del cambio de volumen específico (ΔV) que se observa en el desplegamiento parcial o completo de una proteína se puede explicar por los siguientes efectos (70):

- 1) Hidratación de las cargas originadas por la pérdida de puentes salinos y su consecuente disminución en volumen (Menor distancia en la interacción carga-solvente que en la interacción carga-carga)
- 2) Solvatación de grupos polares expuestos al solvente.
- 3) Pérdida de volúmenes muertos entre átomos o grupos en la estructura plegada.

El cambio de volumen para el desplegamiento de una proteína es negativo y de magnitud pequeña (menos del 1% del volumen total de la proteína), lo cual contradice el modelo clásico propuesto por Privalov que estima que el proceso de plegamiento de una proteína es similar al de la transferencia de grupos hidrofóbicos de un medio no polar a agua, ya que la transferencia de estos grupos tradicionalmente se asociaba a cambios de volumen grandes y de valor positivo (11, 28). Sin embargo, estudios recientes ponen esto a discusión. El aumento de ΔV respecto a la temperatura, así como el cambio pequeño y positivo de ΔV respecto al pH observado por Hawley tampoco concuerdan con el modelo clásico (83).

Actualmente, la magnitud, y a ciertas temperaturas, incluso el signo del cambio de volumen (ΔV) siguen en discusión y presentan divergencia experimental. Esta divergencia de lo esperado teóricamente con lo observado es conocida como la *Paradoja del volumen de proteínas* (13, 14). En general, muchas proteínas se desnaturalizan por presión y este cambio de volumen tiene que ser negativo de

acuerdo al principio de Le Chatelier, lo cual indica que el sistema proteína desnaturalizada-solvente tiene menor volumen que el sistema proteína nativa-solvente (por lo menos en temperaturas bajas y pHs no extremos). El efecto de la temperatura es considerable sólo en aquellas proteínas que tienen un coeficiente de expansión térmica elevado. En estas proteínas una temperatura elevada puede manifestar un cambio de volumen positivo* (63).

La magnitud pequeña del ΔV (10-250 mL/mol, 0.5-1% del volumen específico de una proteína típica) puede ser explicada como el resultado de dos cantidades casi equivalentes pero de signo contrario que se cancelan; donde las contribuciones negativas al cambio de volumen (mencionadas anteriormente) son contrarrestadas por efectos positivos como la exposición de grupos hidrofóbicos, resultando en un ΔV neto pequeño (30, 63). Observando el efecto de sustituciones de aminoácidos en el ΔV se dedujo que la adición de aminoácidos hidrofóbicos (aumentando el área hidrofóbica de desplegamiento, (23)) no modifica en gran magnitud el ΔV . Otra investigación aumentó la cantidad de cargas netas de la proteína (que favorecería el efecto de la electroconstricción, (77)) y se observó que tampoco se tiene un gran impacto en el valor absoluto del ΔV . Sin embargo, un estudio de mutantes en Snasa en las cuales se aumentó el volumen de sus cavidades (24) muestra un aumento considerable en el valor absoluto del ΔV de desplegamiento de la proteína, lo que favorece la hipótesis que propone la desaparición de volúmenes muertos (efecto de volumen excluido) como la característica de mayor aporte al ΔV en la desnaturalización de una proteína.

Un estudio de desplegamiento de proteínas seguidas por NMR enfatiza la necesidad de no ignorar el cambio de compresibilidad ($\Delta\kappa$) entre el estado nativo y desnaturalizado, que por lo general se supone que es cero. El efecto intrínseco de la presión en el factor de compresibilidad es desconocido, aunque

* Esto es, por supuesto, suponiendo que el modelo elíptico de Hawley es correcto.

parece ser que la proteína menos compresible es la desnaturalizada y la más compresible es la nativa (54).

1.3.4.- Presión y disociación.

La disociación de proteínas oligoméricas por presión (efecto que se observa a 100-200 MPa) precede generalmente al desplegamiento de los monómeros que las conforman (efecto observado generalmente de 400 a 800 MPa). El efecto se atribuye a que los contactos de van der Waals son imperfectos entre subunidades, lo que origina espacios entre ellas. Esto significa mayores volúmenes muertos y por ende un ΔV de disociación mayor, porque el volumen del sistema decrecerá cuando las moléculas de solvente se acomoden respecto a cada entrecara de cada subunidad (50). Los ΔV observados son de valor negativo y bastante grandes (30-250 mL/mol, (30)).

El efecto de la concentración de proteína en la presión de disociación media ($P_{1/2}$) se puede elucidar al considerar la dependencia de la constante de equilibrio respecto a la concentración, y están establecidos por la siguiente ecuación (66):

$$\Delta P_{1/2} = (2.302RT / \Delta V^0) \log(C_1 / C_2) \quad (E)$$

Se ha observado (60, 71) que algunas proteínas oligoméricas no responden al efectos de concentración teórico ($\Delta P_{1/2\text{calc}} \neq \Delta P_{1/2\text{obs}}$) por lo que si no siguen el comportamiento termodinámico esperado, significaría que no sólo se encuentran las dos poblaciones homogéneas intercambiando subunidades (equilibrio homogéneo o estocástico), sino una población heterogénea donde cada miembro tiene su propia presión de disociación. A esto se le llama "equilibrio determinista" (21).

1.3.5.- Efecto de los codesnaturalizantes.

El uso de los codesnaturalizantes o cosolventes, como urea o GdnHCl, aunados a la presión hidrostática ha generado diversos resultados. Generalmente, la utilización de pequeñas concentraciones de cosolventes, como la urea o el GdnHCl, junto con la presión hidrostática, presenta un efecto aditivo simple, y aparentemente sin cambiar el signo del cambio en volumen. Al utilizar la combinación de codesnaturalizante con presión se han observado los siguientes fenómenos: recuperación de intermediarios cinéticos o en equilibrio (glóbulos fundidos); desviaciones del modelo de dos estados; captura de intermediarios y estados desnaturalizados específicos a la presión; desplegamiento de enzimas oligoméricas antes de disociarse (53, 81, 82).

El efecto de concentraciones crecientes de urea en el desplegamiento de la nucleasa estafilocócica (Snasa) ha mostrado una disminución lineal del $P_{1/2}$, disminución del ΔG y comportamiento irregular del ΔV (29).

1.3.6.- La TPI bajo presión hidrostática.

El primer trabajo de presión sobre la TPI fue realizado en TPI de conejo (rTPI hasta 347 MPa (60)) y se observó un comportamiento heterogéneo (equilibrio determinista) en la desnaturalización por presión. Esto es: se observa una enorme histéresis entre las curvas de presurización y despresurización ($\Delta P_{1/2} = 138$ MPa). Además, ambas transiciones son independientes de la concentración de proteína. La conclusión a la que llegan los autores es la siguiente: el desplegamiento de la TPI no se comporta clásicamente en secuencia disociación-desnaturalización, sino que la TPI pierde estructura terciaria y secundaria concomitante a una etapa de disociación extremadamente lenta.

Nájera y colaboradores describen un ciclo de presurización-despresurización con $0.75 \mu\text{M}$ ($200 \mu\text{g/ml}$) de ScTPI (49), en el cual se sometió a la enzima nativa

a un ciclo de presión hidrostática hasta 380 MPa (Figura 6), con una resolución de 34 MPa por salto y un tiempo de equilibrio de 60 minutos en cada presión.

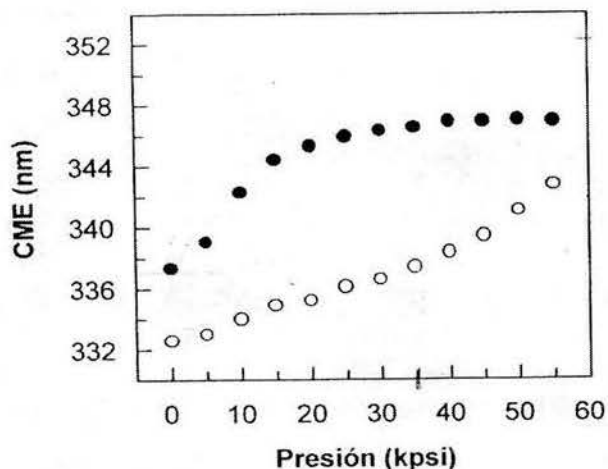


Figura 6.- Presurización-despresurización de ScTPI nativa:
 ○ Presurización.
 ● Despresurización.
 Concentración de ScTPI : 200µg/ml.
 Gráfica tomada de la referencia 49.
 1 kpsi = 6.4 MPa.

En este experimento se observa una marcada histéresis, en la muestra equilibrada a 380 MPa el cambio observado es de 12 nm, que corresponde a un cambio estructural grande. La diferencia del centro de masa espectral (CME, página 23) entre la enzima antes y después de un ciclo de presión (Δ CME) es de 4 nm, lo que indica que el proceso de desplegamiento-replegamiento fue irreversible.

Por otra parte, no se observa la desnaturalización completa de la proteína (CME a 347 MPa < 352 nm, lo que corresponde a la exposición total de triptofanos al solvente). A la fecha, todavía no se han encontrado las condiciones para el análisis termodinámico de las TPI bajo presión hidrostática.

II.- Objetivos

2.1. - General:

Caracterizar termodinámicamente el proceso de desplegamiento y replegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica* (EhTPI) y *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI), utilizando presión hidrostática y GdnHCl como desnaturalizantes, para realizar así una comparación del proceso de plegamiento y desplegamiento de ambas.

2.2. - Particulares:

- 1.- Caracterizar el plegamiento por presión del intermediario de ScTPI.
- 2.-Caracterizar termodinámicamente el plegamiento bajo presión-GdnHCl del intermediario monomérico de ScTPI.
- 3.-Determinar la ruta de plegamiento de EhTPI en GdnHCl.
- 4.-Caracterizar termodinámicamente el plegamiento bajo presión-GdnHCl de los intermediarios que se encuentren, o bien del proceso en general.
- 5.-Caracterizar las propiedades conformacionales de los intermediarios y/o del proceso de plegamiento general de ScTPI y EhTPI.

III.-Materiales y Métodos.

Materiales.

El clorhidrato de guanidinio se obtuvo de Boehringer-Manheim, el etanol grado uvasol, la trietanolamina, el EDTA, el ditioneitol, la acrilamida, y demás reactivos se obtuvieron de Sigma. El amortiguador de trabajo contiene 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, y 1 mM de ditioneitol (T/E/D 100/10/1) a pH de 7.4 y 25 °C salvo donde se especifique otra cosa.

Normalización de los datos.

Los datos se normalizaron de acuerdo a la ecuación:

$$\alpha = \frac{y(x) - y(x_D)}{y(x_M) - y(x_D)}$$

Donde: $y(x)$, señal a $[x]$ de GdnHCl; $y(x_D)$ señal de la enzima desnaturalizada; $y(x_M)$ señal del monómero plegado.

Purificación de ScTPI.

La producción, expresión y purificación de la ScTPI se realizaron de acuerdo a Vázquez-Contreras *et al.* (76).

Purificación de EhTPI.

1.-Revitalización de las células: Se revitalizan las células de *E. coli* BL21 con el plásmido pet31121 que tiene insertado el gen de EhTPI al sembrarse en caja de petri con medio LB sólido-ampicilina (200 mg/L) por 24 horas a 37 °C.

2.-Crecimiento bacteriano: Algunas colonias de la caja se pasan a un inóculo de medio líquido Luria broth-ampicilina. El inóculo se agita a 37 °C

por 6 hrs. o cuando se obtiene una absorbencia mayor a 0.7 UA a 512 nm. Se decanta el inóculo en cada matraz de medio de crecimiento y se deja crecer en agitación por 4 hrs a 37 °C. El cultivo es inducido con IPTG (0.2 mM) cuando el cultivo alcanzó una absorbencia de 0.6-0.8 a 512 nm. Se deja crecer por 12 hrs. más a 37 °C.

3.-Tratamiento de las células: Se centrifugan las células a 6000 g por 10 minutos a 4 °C. Las células se resuspenden en amortiguador TRIS HCl 20 mM pH 8.0 / 0.2 mM PMSF. Las células suspendidas se rompen por ultrasonicación. Se centrifuga la solución sonicada a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se ultracentrifuga por 1 hora a 63000 g.

4.-Separación de proteínas: El sobrenadante ultracentrifugado se precipita al llevarlo a 60% de saturación de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$. Esta solución al 60% de saturación se centrifuga por 15 minutos a 17000 g a 4°C. El sobrenadante se lleva a 90% de saturación de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$.

5.-Separación de proteínas-Cromatografía de exclusión molecular: La solución al 90% de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ se centrifuga por 15 minutos a 17000 g a 4°C. El paquete se resuspende con 1 mL de TED 10/1/1 pH 7.4. Se dializa la suspensión contra TED 10/1/1 pH 7.4. Se carga en la columna de exclusión molecular Sephacryl 300 equilibrada con TED 10/1/1 pH 7.4. Se seleccionan las fracciones para la siguiente cromatografía.

6.-Separación de proteínas-Cromatografía de Intercambio Aniónico: Se carga la selección anterior a una columna de intercambio aniónico Mono Q equilibrada con TED 10/1/1 pH 7.4 y se eluye con un gradiente de 0-10% de TED 10/1/1 pH 7.4 1M de NaCl (gradiente 0-100mM). Si se considera suficientemente pura, se dializa y guarda en TED 100/10/1, de no estarlo, se repite la cromatografía equilibrando la columna con TED 100/10/1 pH 8.0. Se estima la concentración de proteína por método

espectrofotométrico con un $\epsilon_{280}=36440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pace et al 1994.).

Determinación de la actividad catalítica de la TPI.

Se preparan celdas de 1000 μL , con una mezcla de reacción que contiene amortiguador TED 100/10/1, 2.6 mM de gliceraldehído-3-fosfato, 10 μgr de Glicerofosfato deshidrogenasa, 0.2 mM NADH y 2 ng de TPI. Las mediciones se realizan observando el decremento de la absorbencia del NADH a 340 nm en función del tiempo en un espectrofotómetro Beckman DU7500 a 25 °C. Cualquier dilución realizada de enzima en GdnHCl se realizó manteniendo la concentración del desnaturizante. No se observaron comportamientos curvos que indiquen reactivación o inactivación de la enzima en la celda.

Ensayos de Dicroísmo circular.

Se utilizaron muestras de TPI en amortiguador de trabajo a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se realizaron las lecturas en un espectropolarímetro JASCO siguiendo la señal a una longitud de onda $\lambda=222 \text{ nm}$ respecto al tiempo por 10 minutos en cada lectura.

Ensayos de Espectroscopía de Fluorescencia intrínseca.

Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro ISS PC1. En los espectros de fluorescencia intrínseca de la TPI se utilizó como longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 280 nm. La emisión comprende el intervalo de 300 nm a los 400 nm. Se mantuvo la temperatura a 25 °C. De estos espectros de emisión se obtuvo el centro de masa espectral (CME) mediante la siguiente fórmula:

$$CME = \frac{\Sigma(\lambda)(I_{\lambda})}{\Sigma(I_{\lambda})}$$

Ensayos de Anisotropía de la Fluorescencia intrínseca.

Las mediciones de anisotropía de fluorescencia se realizaron con $\lambda_{ex}=295\text{nm}$ y $\lambda_{em}=340$, obteniendo así la anisotropía relativa a los triptofanos de la proteína. La anisotropía se define de la siguiente manera:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}}$$

Apagamiento de la Fluorescencia.

A soluciones de TPI (110 $\mu\text{g/mL}$, 2000 μL), se les tomaron espectros con una $\lambda_{ex}=295$ nm colectando la emisión de 305 a 405 nm cada vez que se añadieron volúmenes pequeños (menos del 10% del volumen inicial) de una solución madre de acrilamida 6.67M en agua a la celda de lectura. Se tomaron los valores máximos de cada espectro para graficar la fluorescencia sin apagador (F_0) sobre la fluorescencia a una concentración de dada de Apagador (F) contra la concentración de apagador ([Q]). Y se ajusta a la siguiente expresión:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

Se utilizaron concentraciones de acrilamida de 0 a 200 mM. En todas las muestras analizadas se observó comportamiento lineal indicando ausencia de otros efectos.

Ensayos de Presión hidrostática.

Se utilizó una celda de alta presión unida a un sistema automatizado de

aplicación de presión por inyección de Etanol (Marca APP), la celda está acoplada a un espectrofluorómetro ISS PC-1. Las ventanas internas de la celda son de Zafiro y permiten elevar la presión en la celda hasta los 400 MPa. Se realizaron ensayos automatizados de toma de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca ($\lambda_{\text{ex}}=280\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=300$ a 400 nm) realizando incrementos de 17 MPa hasta los 172 MPa, de ahí incrementos de 34 MPa hasta llegar a 345 MPa. Los espectros se obtuvieron tanto en el sentido de la presurización como de la despresurización, para completar el ciclo. La concentración de proteína es particular a cada experimento. En caso de uso de clorhidrato de guanidinio como codesnaturalizante, se equilibraron las muestras por lo menos durante 24 horas antes de introducirse a la celda de presión.

Ensayos de desnaturalización-renaturalización por presión hidrostática de ScTPI.

De acuerdo con los resultados de Nájera (49), la concentración de desnaturalizante en la cual se obtiene la fracción más alta de intermediario es de 0.7M de GdnHCl. Por lo tanto, el protocolo seguido para la obtención del intermediario consistió en incubar a la proteína en condiciones desnaturalizantes (4.5-6M GdnHCl) por lo menos 1 hora, diluir a la concentración de GdnHCl especificada (0.5 a 0.9M) e incubar la muestra por 24 horas. Ésta fue la preparación de enzima utilizada en la celda de presión, en presencia de amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4, a 25°C.

Curvas de renaturalización de ScTPI en GdnHCl.

Se desnaturalizó a la proteína en 3M de GdnHCl por 2 horas; después ésta se diluyó en alícuotas con la concentración de GdnHCl deseada. Estas alícuotas se equilibraron por 24 horas antes de realizarles los

ensayos de anisotropía y de apagamiento de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Curvas de renaturalización de EhTPI en GdnHCl.

Para el sentido de la desnaturalización, se prepararon las muestras de EhTPI a una concentración dada de GdnHCl, dejándolas equilibrar por 24 horas. En el de renaturalización, se desnaturalizó por 30 minutos en 5M GdnHCl, luego se renaturalizó ajustando la concentración a cada muestra a la necesaria con GdnHCl, dejando equilibrar estas alícuotas por 24 hrs. La concentración de EhTPI fue de 110 $\mu\text{g/mL}$ a pH 7.4 en amortiguador TED 100/10/1. Se realizaron tomas de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca ($\lambda_{\text{ex}}=280\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=300$ a 400 nm), anisotropías y experimentos de apagamiento en las condiciones ya expuestas. El mismo procedimiento se realizó para los ensayos de actividad, pero en estos la concentración en la incubación fue de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Cinética de desnaturalización-renaturalización de EhTPI.

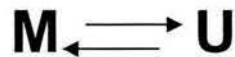
Para el sentido de la desnaturalización, se prepararon las alícuotas de EhTPI a una concentración dada de GdnHCl (1 o 1.2M GdnHCl) dejando equilibrar y tomando lecturas a las 24 y 48 horas. En el sentido de la renaturalización, se desnaturalizó por 30 minutos en 5M de GdnHCl, luego se renaturalizó ajustando la concentración a cada alícuota a 1 y 1.2M de GdnHCl. Las muestras se prepararon con 120 $\mu\text{g/mL}$ de EhTPI. Se siguió la desnaturalización de EhTPI respecto al tiempo determinando el centro de masa espectral (CME) a partir del espectro de fluorescencia así como la anisotropía de fluorescencia.

Obtención del Radio de Stokes de EhTPI.

Se prepararon dos muestras. En la primera se preparó una solución de 133 µg/ml de EhTPI en 1M GdnHC. Para la segunda se desnaturalizó a la enzima en 5M GdnHCl por 30 minutos, después se diluyó a una concentración final de 1M GdnHCl con una concentración final de enzima de 124 µg/ml. Estas alícuotas se inyectaron a una columna analítica de exclusión molecular Sephacryl 75, equilibrada previamente con una solución 1M de GdnHCl, a 25°C. Se detecta el perfil de elución por medio de absorbencia a 280 nm. Se realizaron inyecciones de las alícuotas a las 24 y las 48 horas, se analizan las curvas de elución de acuerdo a la calibración previa.

Análisis y obtención de la ecuación de ΔG y ΔV en función de la Presión: Modelo de dos estados unimolecular.

En un modelo de dos estados unimolecular:



el valor de una observable cualquiera (en este caso CME) va a depender del CME para el monómero (CME_M) y de la enzima desnaturalizada (CME_u) y de las fracciones mol respectivas (X_M y X_u):

$$CME_{obs} = CME_m X_m + CME_u X_u \quad (1)$$

Donde:

CME_{obs}: Centro de masa espectral observado.

CME_m: Valor del CME espectral para el monómero.

CME_u: Valor del CME espectral para la forma desnaturalizada.

X_x: Fracción Molar de "x".

Como: $X_m = 1 - X_u$. Entonces:

$$CME_{obs} = CME_m - CME_m X_u + CME_u X_u \quad (2)$$

Utilizando factor común y reorganizando en función de X_u :

$$X_u = \frac{CME_{obs} - CME_m}{CME_u - CME_m} \quad (3)$$

que es equivalente para cualquier observable (elipticidad, fluorescencia, absorbencia, actividad).

La constante de desplegamiento para la reacción $M \leftrightarrow U$ se define:

$$K_{eq} = \frac{[U]}{[M]} = \frac{[U]}{\frac{[P_{tot}]}{[M]}} = \frac{X_u}{X_m} \frac{[P_{tot}]}{[M]} \quad (4)$$

Como $X_n = 1 - X_u$. Entonces sustituimos:

$$K_{eq} = \frac{X_u}{1 - X_u} \quad (5)$$

Sustituimos X_u y $1 - X_u$ con la ecuación (3), en la ecuación (5), el rearrreglo queda así:

$$K_{eq} = \frac{CME_{obs} - CME_m}{CME_u - CME_{obs}} \quad (6)$$

La Energía Libre de Gibbs se puede expresar así:

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K_{eq} \quad (7)$$

El $\Delta G^{0'}$ es modificado por la presión (ΔG_{ap}), suponiendo que el cambio de volumen (ΔV) es constante, el ΔG_{ap} es función del ΔG a presión atmosférica ($\Delta G^{0'}_{P=0}$) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{ap} = \Delta G_{P=0}^{\sigma} + P\Delta V \quad (8)$$

Sustituyendo (8) en (7) y al despejar K_{eq} tenemos que:

$$K_{eq} = e^{-\left(\frac{\Delta G_{P=0}^{\sigma} + P\Delta V}{RT}\right)} \quad (9)$$

Al substituir, (9) en (6) y despejando en función de la observable (CME_{obs}) resulta la ecuación de ajuste:

$$CME_{obs} = \frac{CME_m + CME_u e^{-\left(\frac{\Delta G_{P=0}^{\sigma} + P\Delta V}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{P=0}^{\sigma} + P\Delta V}{RT}\right)}} \quad (10)$$

Que es una ecuación de ajuste, sin embargo se observó que el CMEu no se comporta de manera lineal y se realizó el siguiente procedimiento.

Caso: CME_u varía con la presión.

Si se observa una tendencia con pendiente de CME_u , ésta se puede substituir CME_u por su función lineal dependiente de la presión:

$$CME_u = CME_{u(P=0)} + m_{CME_u}(P) \quad (11)$$

Sustituyendo CME_u por su función lineal (11) en la ecuación general (10) resulta en:

$$CME_{obs} = \frac{CME_m + (CME_{u(P=0)} + m_{CME_u}(P))e^{-\left(\frac{\Delta G_{P=0}^{\sigma} + P\Delta V}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{P=0}^{\sigma} + P\Delta V}{RT}\right)}} \quad (12)$$

Con ésta ecuación se realizaron los ajustes convirtiendo la presión de Psi a Pascales (1 Psi= 6894.76 Pa), y utilizando una R expresada en: 8.31447 Pa m³/K mol y una T= 298 K, los datos obtenidos se convirtieron a kJ/mol y a cm³ (mL), se dejaron como parámetros de ajuste ΔG , ΔV , CME_n , $CME_{u(p=0)}$, y m_{CMEu} , a menos que se indique lo contrario.

Cálculo de la presión de transición media ($P_{1/2}$).

Del ajuste anterior se obtienen el ΔV y el $\Delta G_{P=0}$. A partir de estos valores se calcula la presión de transición media ($P_{1/2}$).

En $P_{1/2}$ la concentración de monómero es igual a la de enzima desnaturalizada ($[M]=[U]$), por lo que la constante de equilibrio es igual a 1:

$$K_{eq} = \frac{[U]}{[M]} = 1 \quad (13)$$

por lo tanto $\ln(K_{eq}) = \ln(1) = 0$, entonces $\Delta G_{ap}=0$, por lo que según la ecuación (13) resulta:

$$0 = \Delta G_{P=0} + P_{1/2}\Delta V \quad (14)$$

Despejando $P_{1/2}$:

$$P_{1/2} = \frac{-\Delta G_{P=0}}{\Delta V} \quad (15)$$

IV.- Resultados

4.1.- Resultados de la ScTPI.

4.1.1.- Propiedades estructurales en la renaturalización de ScTPI.

Como ya se expuso, el plegamiento de la ScTPI está bien estudiado y caracterizado, ya que se siguió el fenómeno con varios desnaturalizantes y con varias técnicas. Con el objeto de extender el estudio del desplegamiento con otras técnicas espectroscópicas como la anisotropía y el apagamiento de la fluorescencia, se realizó un ensayo de renaturalización de la ScTPI hacia diferentes concentraciones de GdnHCl, y se observaron las propiedades de polarización (y anisotropía) de la fluorescencia para determinar el estado de asociación (propiedades de estructura cuaternaria) y la accesibilidad de los triptofanos al apagador acrilamida (propiedades de estructura terciaria). Los resultados se muestran en el siguiente gráfico:

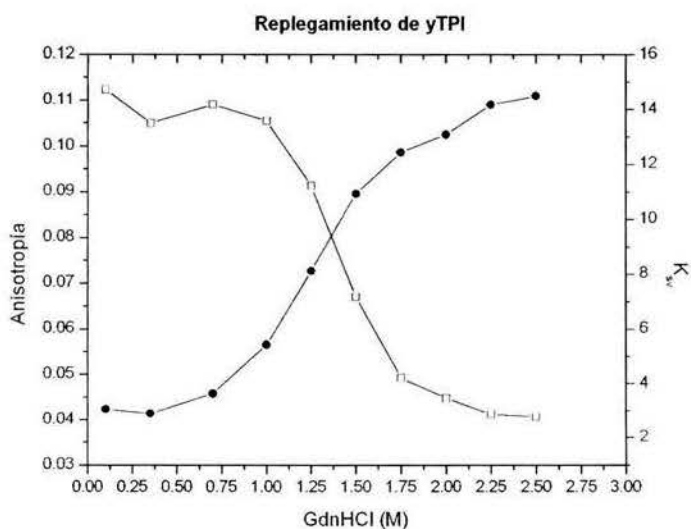


Figura 7 .- Replegamiento de ScTPI observado por apagamiento y anisotropía de la fluorescencia intrínseca.
●.- Constante de Stern-Volmer.
□.- Anisotropía.

Se observa una sola transición por los dos métodos. Al comparar estos resultados con los valores de radio de Stokes obtenidos por cromatografía en gel, actividad, y centro de Masa, reportados por Nájera *et al.* (49, Figura 8) es claro que la anisotropía y el apagamiento son insensibles a la primera transición lo que indica que el intermediario (0.7M GdnHCl) posee el mismo valor de anisotropía ($r \approx 0.11$) y la misma accesibilidad al apagador que la enzima nativa ($K_{sv} \approx 3$ M).

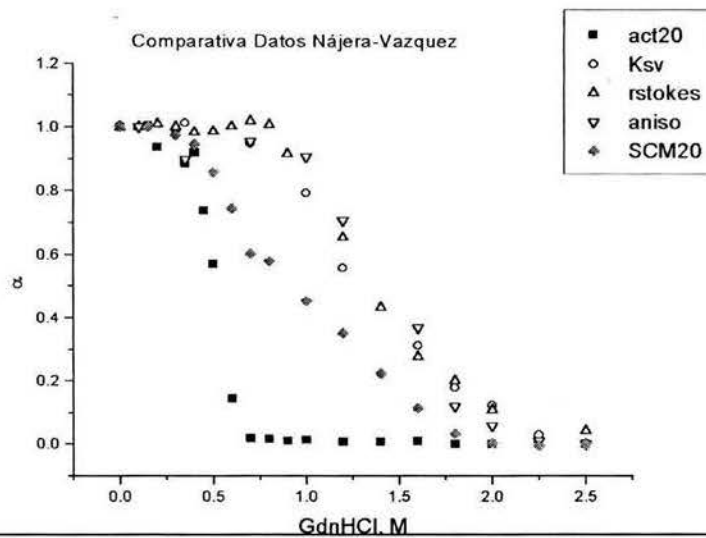


Figura 8.- Comparativa de los datos obtenidos por Nájera y los obtenidos por anisotropía y apagamiento de la fluorescencia. ■.- Actividad Catalítica. ○.- Constante de Stern-volmer. △.- Radio de Stokes. ▽.- anisotropía. ◆.- Centro de Masa Espectral.

Lo que podemos deducir de la comparación es lo siguiente: la anisotropía y el radio de Stokes, utilizados para determinar cambios en el tamaño y el estado de asociación de las moléculas, se comportan de manera idéntica. La constante de Stern-Volmer, parámetro que precisa la accesibilidad de los triptofanos al apagador e indica el estado de la estructura terciaria de la enzima, tiene el mismo valor en el dímero nativo y en el intermediario. Indicando que el monómero es una enzima de tamaño, radio de giro o volumen molar similar a la enzima nativa, y sin embargo, retiene una cantidad importante de estructura en las regiones cercanas a los triptofanos. Para caracterizar las propiedades termodinámicas de este intermediario monomérico, se decidió utilizar la presión hidrostática como agente perturbante.

4.1.2.- La ScTPI Nativa con Presión Hidrostática.

Se realizó un experimento con ScTPI nativa, a una concentración de ScTPI de 110 $\mu\text{g/mL}$, añadiendo un primer ciclo de presurización hasta 206 MPa, manteniendo la presión 15 minutos en cada salto (Figura 9). El objeto de este primer ciclo era observar si al llevar a la enzima a una presión más pequeña, se presenta una menor histéresis o reversibilidad en el proceso.

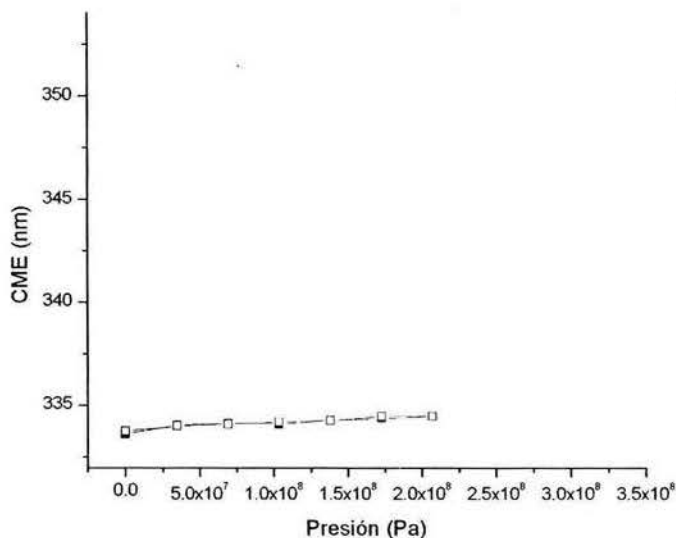


Figura 9.- Primer ciclo de la ScTPI Nativa.

Se utiliza esta escala para comparar con resultados posteriores.

□.- Presurización.

■.- Despresurización.

Se observa que en este primer ciclo no hay un efecto de la presión en la estructura hasta los 206 MPa. Después de este primer ciclo se llevó a la misma muestra a un ciclo hasta los 345 MPa, con toma de espectros a los 15 y 30 minutos, donde se observó lo siguiente (Figura 10):

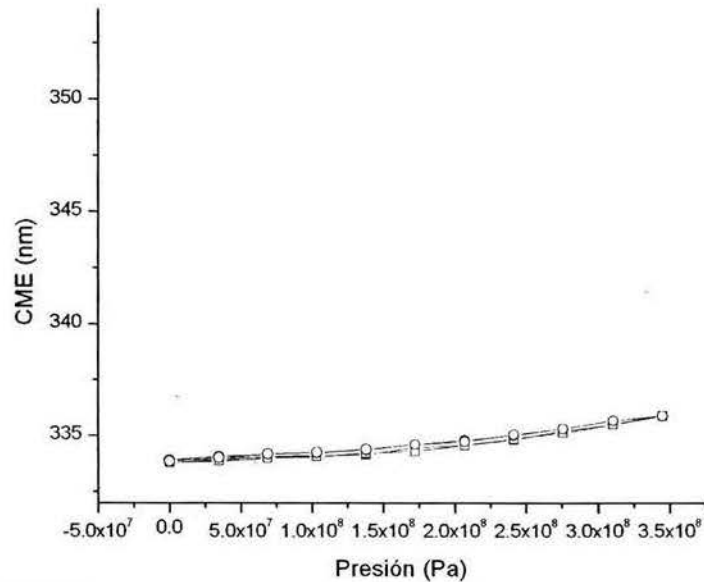


Figura 10.-ScTPI Nativa en el segundo ciclo de presurización-despresurización.

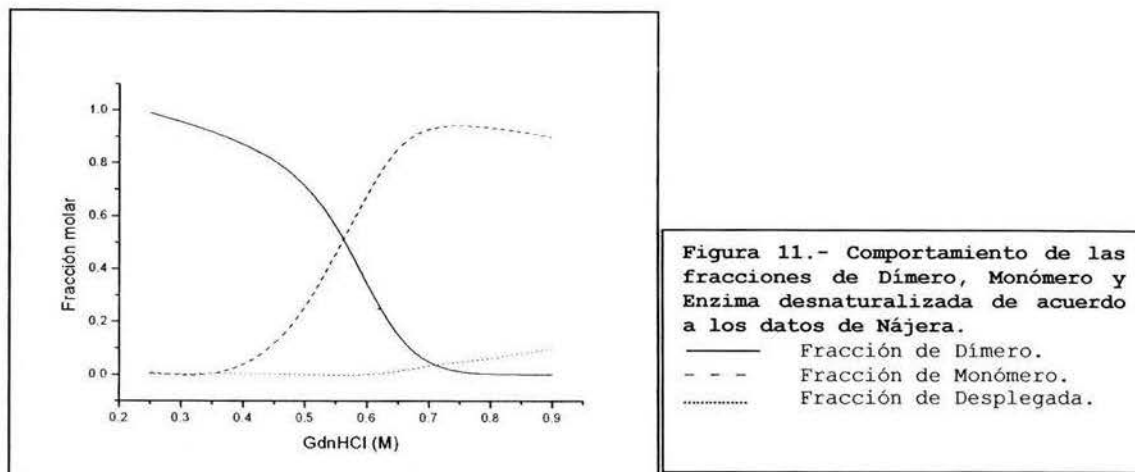
■.- Presurizando, 15 minutos. □.- presurizando, 30 minutos. ●.- Despresurizando, 15 minutos. ○.- Despresurizando, 30 minutos. Se utiliza esta escala para comparar con resultados posteriores.

El cambio de CME es muy pequeño (primer ciclo: 0.5nm, segundo ciclo, alrededor de 2nm), por lo que se estima que no se lleva a cabo la desnaturalización completa de la proteína (CME≠354 nm). No se observa histéresis, pero tampoco hay una transición clara. Esto se puede atribuir a que la enzima se mantuvo únicamente por 30 minutos en cada presión, por lo que podría no encontrarse al equilibrio. Sin embargo, los datos de Nájera muestran que aún utilizando tiempos largos de incubación en cada presión no es claro si se llegará a observar una transición coincidente en los dos sentidos.

4.1.3.- El intermediario monomérico de ScTPI bajo presión.

En la renaturalización de la ScTPI, de acuerdo con los datos de Nájera *et al* (49), en 0.7M de GdnHCl se obtiene una fracción casi completa de intermediario monomérico en equilibrio. Se construyó la siguiente simulación, utilizando una concentración de proteína de 110 µg/mL, de acuerdo a las constantes de equilibrio proporcionadas por el trabajo de Nájera *et al* (Figura 11). Esto, para

estimar las proporciones relativas de dímero nativo, intermediario monomérico y enzima desplegada en diferentes concentraciones de GdnHCl:



Con base en este análisis, se preparó una muestra de ScTPI renaturalizada en 0.7M GdnHCl. Posteriormente, a esta muestra se llevó a desnaturalización por presión hidrostática, con tiempos de equilibrio de 5, 30 y 60 minutos en cada cambio de presión (Figura 12).

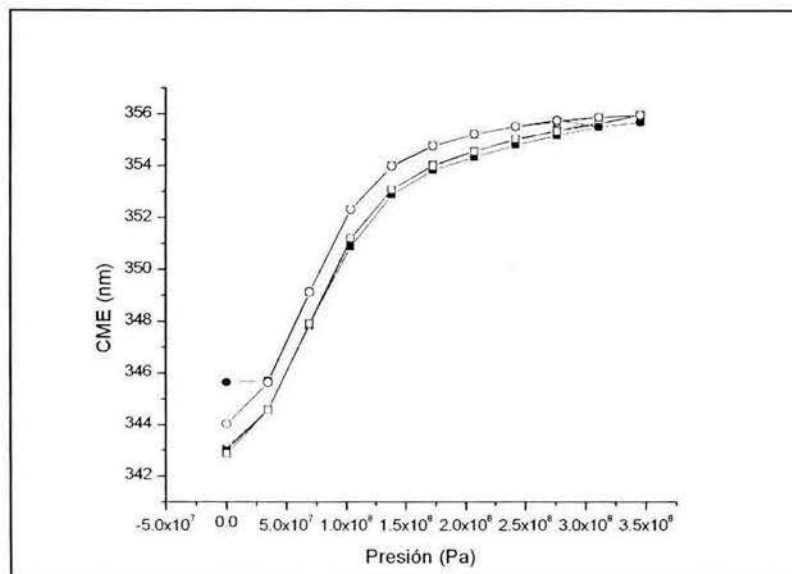


Figura 12.- Determinación de Tiempo de equilibrio en la desnaturalización-renaturalización por presión del intermediario monomérico de ScTPI.

- .- Presurización, 5 minutos. ▣.-Presurización, 30 minutos. □.- Presurización, 60 minutos.
- .- Despresurización, 5 minutos. ⊙.- Despresurización, 30 minutos.
- .- Despresurización, 60 minutos.

Se observa una transición clara, con un Δ CME de 10 nm, con una muy ligera histéresis. A presiones elevadas, el CME que se observa corresponde al esperado para la exposición de triptofanos al agua (CME \approx 354nm), lo que sugiere una desnaturalización completa de la enzima. No se observan cambios detectables en el CME en cualquier presión entre los 5 y 60 minutos, por lo que se optó por suponer que a los 30 minutos la muestra ya está en equilibrio. La proteína que pasó por el ciclo de presión recuperó prácticamente el mismo espectro que la enzima nativa (Δ CME=1nm), por lo que se considera que el proceso es completamente reversible.

Se procedió a documentar el efecto de la concentración de proteína en la histéresis, ya que aún a 0.7M de GdnHCl tenemos aproximadamente 10% de la concentración total de proteína en la forma dimérica. Se realizaron dos experimentos, uno a 26 μ g/mL y otro a 334 μ g/mL de concentración de ScTPI:

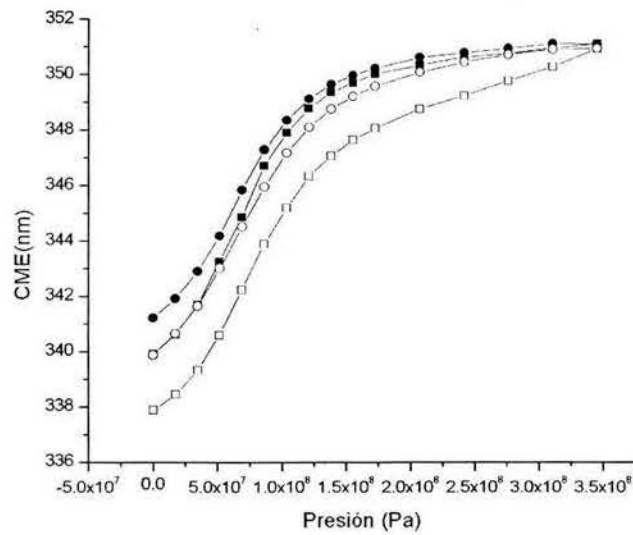


Figura 13.- Efecto de la concentración de proteína en la transición del intermediario.

■.-Presurizando, 26 μ g/mL, 30 minutos. ●.- Despresurizando, 26 μ g/mL, 30 minutos. □.- Presurizando, 334 μ g/mL, 30 minutos. ○.- Despresurizando, 334 μ g/mL, 30 minutos.

Se observa un marcado efecto en la histéresis del proceso: 1) en el experimento con una baja concentración de proteína, donde se tiene una menor cantidad de dímero (X_{DCalc} : 0.04833), las transiciones son prácticamente coincidentes; 2) en el de mayor concentración (X_{DCalc} : 0.13535), se observa una histéresis mayor. Es de notar que en el sentido de la despresurización la curva de mayor concentración es coincidente la presurización a menor concentración, una posible explicación de esto es que el efecto pro-histerético se deba a la presencia del dímero nativo.

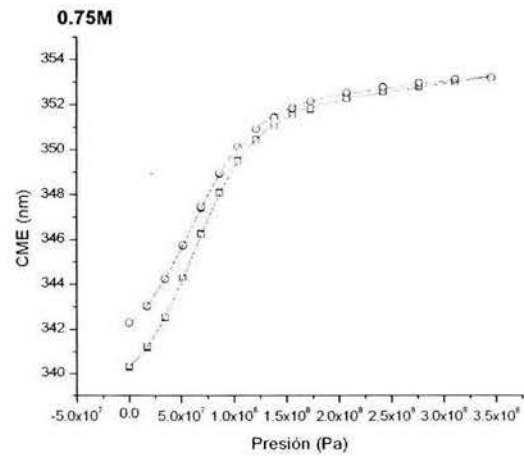
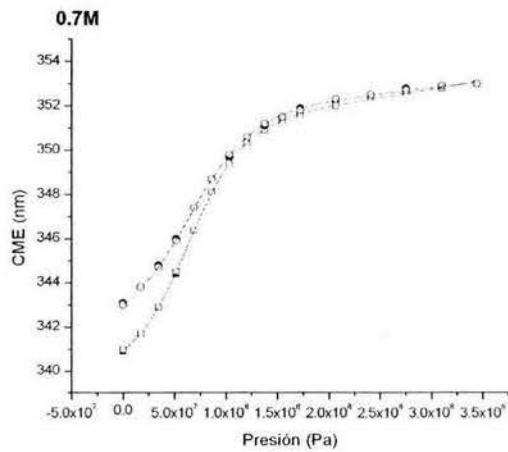
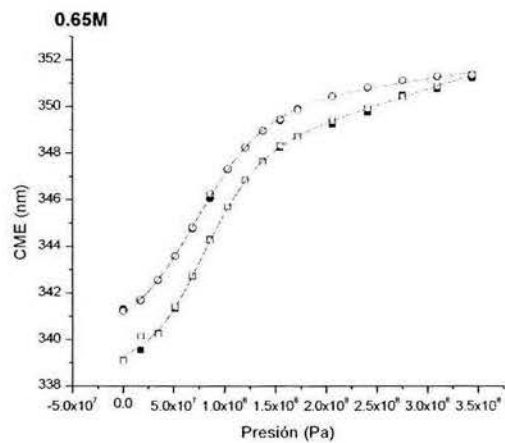
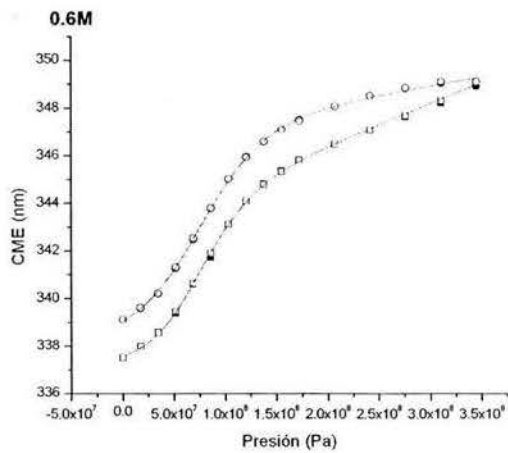
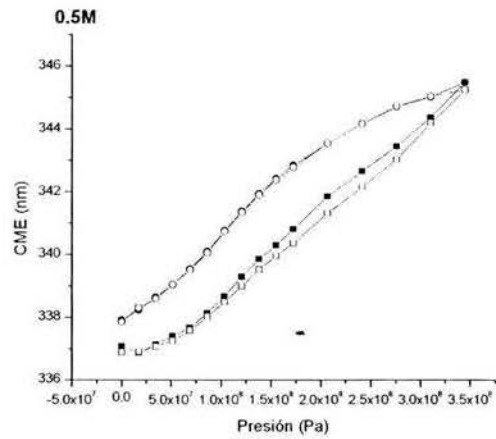
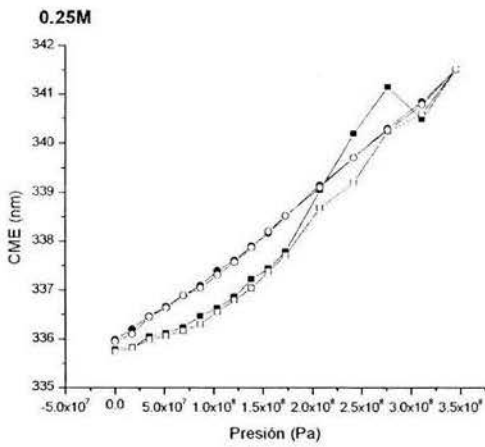
De acuerdo con la ecuación E, y tomando un ΔV de disociación promedio entre los valores reportados para la disociación de oligómeros (-130 ml/mol), se presenta en la tabla 3 el cambio de presión de transición media ($\Delta P_{1/2}$) esperado para un fenómeno de dimerización con este cambio de concentración ($C_1/C_2=334/26$) y se compara con el observado:

Tabla 3.- Comparación del $P_{1/2}$ calculado contra el experimental.

| Datos | $\Delta P_{1/2}$ (MPa) |
|--|------------------------|
| Teórico-Ecuación | 48.6 |
| Experimental con datos de Presurización | 3.6 |
| Experimental con datos de Despresurización | 1 |

De estos datos se deduce que el proceso observado no corresponde a un proceso de disociación-asociación, esto es, el intermediario es monomérico y la transición corresponde al desplegamiento del mismo.

Se realizó una serie de experimentos renaturalizando desde 0.25M GdnHCl hasta 1.1M de GdnHCl. A todas las muestras se les sometió a la desnaturalización por presión hidrostática.



Continúa en la siguiente página

Figura 14.- Efecto de la concentración de GdnHCl en la histéresis y en la reversibilidad de la desnaturalización por presión del intermediario monomérico. [TPI]=110 µg/mL.
 Se muestran los ajustes de una primera serie de datos hechos con la ecuación 12 como se discutirá más adelante, excepto en 0.25 y 0.5 donde no ajusta.
 ■.- Presurización, 15 minutos. □.- Presurización, 30 minutos. ●.-Despresurización, 15 minutos. ○.-Despresurización, 30 minutos.

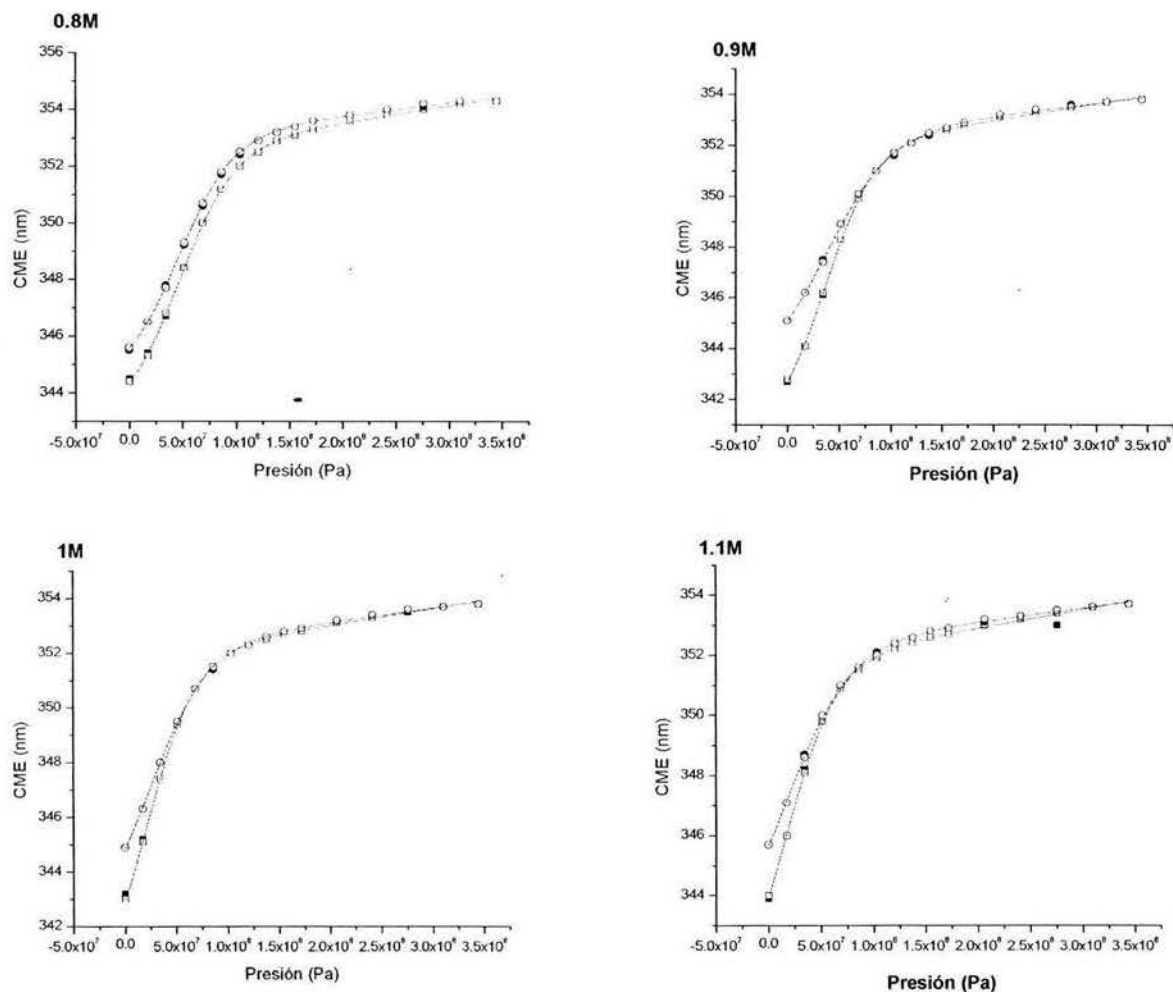


Figura 14.- Efecto de la concentración de GdnHCl en la histéresis y en la reversibilidad de la desnaturalización por presión del intermediario monomérico. [TPI]=110 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se muestran los ajustes de la primera serie de datos hechos con la ecuación 12, como se discutirá más adelante.
 ■.- Presurización, 15 minutos. □.- Presurización, 30 minutos. ●.-Despresurización, 15 minutos. ○.-Despresurización, 30 minutos.

Los resultados muestran que en presencia de una mayor concentración del dímero nativo (concentraciones bajas de GdnHCl) se favorece una mayor histéresis, en tanto que con una mayor presencia del monómero con algo de enzima desnaturalizada (concentraciones altas de GdnHCl) se obtienen transiciones sin histéresis, al equilibrio y prácticamente reversibles.

En concentraciones mayores a 0.65M GdnHCl se observa una sola transición con poca histéresis, por lo que se optó por realizar el ajuste a la ecuación 12 (Ver Materiales y Métodos) con las concentraciones desde 0.7 M hasta 1.1 M de GdnHCl. Para el análisis termodinámico de estos experimentos.

4.1.4 Análisis Termodinámico.

Para realizar los ajustes a la Ecuación 12 se utilizaron los espectros obtenidos después de 30 minutos de incubación en cada presión, dejando libre al ajuste del centro de masa del intermediario monomérico (CME_M). El modelo no representa correctamente los datos de presurización a concentraciones muy bajas de GdnHCl (0.25M a 0.65 M), ya que presentan una histéresis marcada. Por lo que para el análisis del cambio de energía libre para el desplegamiento del intermediario (ΔG_U) y el cambio de volumen entre el estado desnaturalizado y el nativo (ΔV) y la presión de media transición ($P_{1/2}$) se utilizaron los ajustes de los experimentos desde 0.6 M hacia las concentraciones más altas (0.7-1.1 M). En la siguiente tabla se presentan los resultados de los ajustes de dos series de experimentos:

Tabla 4.- Resultado de los ajustes de los experimentos de la figura 14*.

| [GdnHCl] (M) | PRESURIZANDO | | | | | DESPRESURIZANDO | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------|-----------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------|-----------------|
| | ΔG_U (J/Mol) | Desv. Std. | ΔV (ml/mol) | Desv. Std. | $P_{1/2}$ (MPa) | CME_M (nm) | ΔG_U (J/Mol) | Desv. Std. | ΔV (ml/mol) | Desv. Std. | $P_{1/2}$ (MPa) | CME_M (nm) |
| 0.7 | 5676.8 | ± 164.3 | -93.5 | ± 2.1 | 60.7 | 340 | 4917.8 | ± 215.2 | -80.7 | ± 2.7 | 60.9 | 341.9 |
| 0.7* | 5886.8 | ± 152.3 | -92.2 | ± 1.94 | 63.8 | 338.2 | 5142.7 | ± 195.3 | -83.2 | ± 2.45 | 61.8 | 340.2 |
| 0.75* | 5343.2 | ± 107.7 | -89 | ± 1.39 | 60.0 | 339.1 | 4995.1 | ± 198.0 | -85.9 | ± 2.53 | 58.1 | 341.02 |
| 0.8 | 4584.3 | ± 215.1 | -97.9 | ± 3.03 | 46.8 | 340.5 | 3531.4 | ± 233.1 | -77.2 | ± 2.9 | 45.7 | 342.4 |
| 0.8* | 4835.4 | ± 187.9 | -100 | ± 2.66 | 48.3 | 338.5 | 4443.7 | ± 209.9 | -93.6 | ± 2.88 | 47.5 | 339.7 |
| 0.9 | 3760.4 | ± 265 | -105 | ± 4.0 | 35.8 | 340.7 | 2900.9 | ± 259 | -80.3 | ± 3.3 | 36.1 | 342.9 |
| 0.9* | 3979.8 | ± 305.5 | -99.7 | ± 4.43 | 39.9 | 340 | 4602.9 | ± 242.7 | -95.9 | ± 3.28 | 48 | 341.8 |
| 1 | 2189.3 | ± 254 | -104 | ± 3.8 | 21 | 339.4 | 2211.2 | ± 295.5 | -89.4 | ± 3.9 | 24.7 | 341.9 |
| 1.1 | 1639.2 | ± 254 | -103 | ± 4.4 | 15.9 | 340 | 1408 | ± 400 | -83 | ± 4.9 | 16.9 | 342 |

*.-Datos de una segunda serie de experimentos.

Se intentó utilizar en CME del monómero como parámetro fijo, pero la calidad de los ajustes disminuye sensiblemente. A continuación se presentan los regráficos (Figuras 15,16,17) utilizando todos los datos tabulados.

* Las desviaciones estándar del ajuste del CME_m , CME_{uH_2O} , y del $mCME_u$ son dos órdenes de magnitud menores a los valores resultantes, por lo que se omitieron en las tablas de ajustes.

Los valores de ΔG obtenidos se utilizaron para obtener, mediante una extrapolación lineal, el valor de ΔG en ausencia de GdnHCl:

$$\Delta G_{XGdnHCl} = \Delta G_{H_2O} + m [GdnHCl]$$

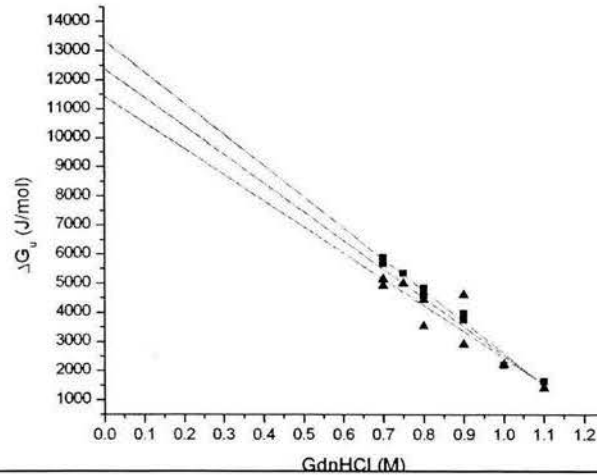


Figura 15.- Comportamiento del ΔG_u respecto a la concentración de GdnHCl.

■.- Datos de Presurización. ▲.- Datos de despresurización.

Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

A continuación se presenta una tabla que resume los datos del ajuste lineal:

| | ΔG_{H_2O} (J/mol) | m (J/mol)/M | R |
|--------------------------------|------------------------------|------------------|--------|
| Datos Presurización. | 13360 ± 493 | -10764 ± 573 | .98051 |
| Datos Despresurización. | 11436 ± 1338 | -8989 ± 1556 | .82651 |
| Ambos. | 12398 ± 775 | -9877 ± 901 | .88234 |

El comportamiento del ΔV se presenta en el siguiente gráfico:

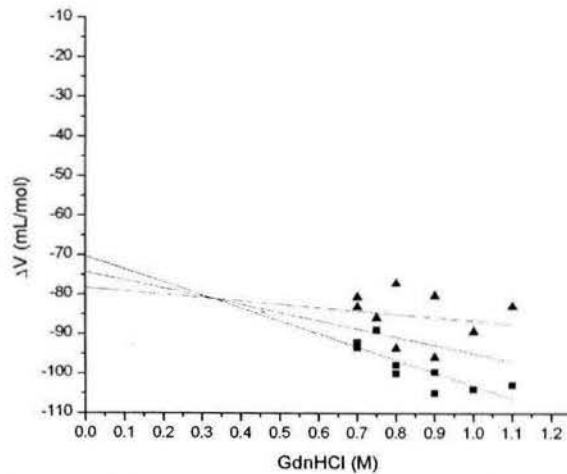


Figura 16.- Comportamiento del ΔV respecto a la concentración de GdnHCl.

■.- Datos de presurización. ▲.- Datos de despresurización.

Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Se observa una tendencia lineal con pendiente negativa del ΔV respecto a la concentración de GdnHCl, el cual representa el efecto intrínseco de la GdnHCl sobre el volumen molar. Se extrapola a nula concentración de GdnHCl de acuerdo a:

$$\Delta V_{XGdnHCl} = \Delta V_{H_2O} + m [GdnHCl]$$

A continuación se presenta una tabla con los resultados del ajuste lineal:

| | ΔV_{H_2O} (mL/mol) | m (J/mol)/M | R |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------|--------|
| Datos Presurización. | -70.2 ± 8 | -32.9 ± 9 | .64634 |
| Datos Despresurización. | -78 ± 14 | -8 ± 17 | .03285 |
| Ambos. | -74 ± 13 | -20 ± 15 | .09773 |

El comportamiento de $P_{1/2}$ se presenta en la siguiente gráfica:

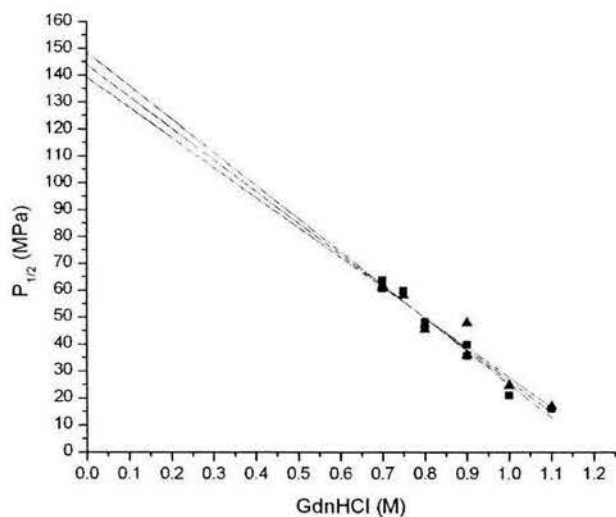


Figura 17.- Comportamiento de la Presión de transición media respecto a la concentración de GdnHCl.

■.- Datos de presurización. ▲.- Datos de despresurización.

Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Los resultados de la extrapolación se resumen en la siguiente tabla:

| | $P_{1/2H_2O}$ (MPa) | m (MPa)/M | R |
|--------------------------------|------------------------|-----------------|--------|
| Datos Presurización. | 148.5 ± 7 | -123.4 ± 8 | .97124 |
| Datos Despresurización. | 139.3 ± 9 | -111.6 ± 11 | .9340 |
| Ambos. | 143.9 ± 6 | -117.5 ± 7 | .95103 |

4.2.- Resultados de la EhTPI.

4.2.1.- Ensayos de Desnaturalización y Renaturalización de EhTPI en GdnHCl.

En contraste con la abundante información disponible para el plegamiento-desplegamiento de la ScTPI en GdnHCl, la EhTPI ha sido mucho menos estudiada. Para caracterizar el proceso de desplegamiento de EhTPI en GdnHCl. Se realizaron ensayos de desnaturalización y renaturalización de la enzima en GdnHCl, determinando la actividad catalítica respecto al tiempo a las 24, 48, 144 y 288 horas de incubación:

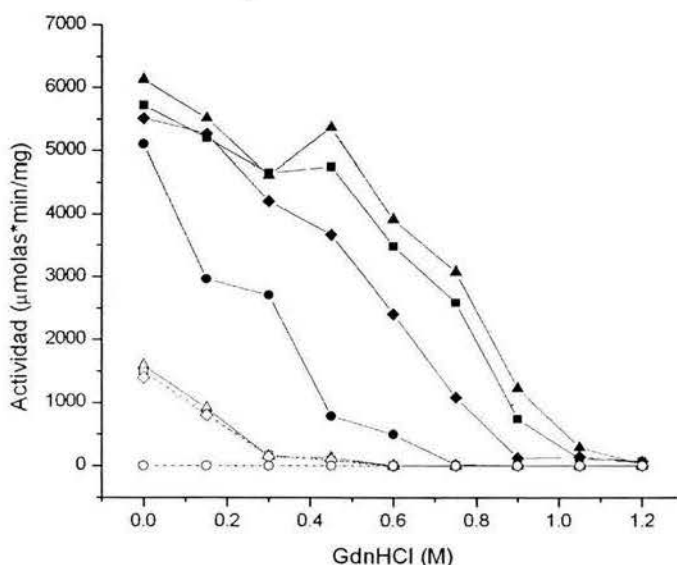


Figura 18.- Seguimiento por actividad de la desnaturalización de la EhTPI. Símbolos llenos representan el sentido de la desnaturalización:▲.- 24 horas.■.- 48 horas.◆.- 144 horas.●.- 288 horas. Símbolos vacíos representan el sentido de la renaturalización:△.- 24 Horas.□.- 48 Horas.◇.- 144 Horas.○.- 288 Horas.

Se aprecia en este experimento que desde las concentraciones más bajas de GdnHCl (50 mM), la actividad de la enzima renaturalizada nunca se recupera en su totalidad, incluso a tiempos largos, lo que indica un proceso irreversible. Cabe notar que en el lapso de tiempo entre las lecturas de 144 y 288 horas, la

actividad cae abruptamente en los dos sentidos, lo que nos indica que puede existir un fenómeno de agregación a tiempos largos, lo cual impide que los datos de desnaturalización y renaturalización coincidan. En ambos casos, la actividad es nula a concentraciones mayores de 1M de GdnHCl, lo que nos puede indicar que a estas concentraciones la enzima se ha disociado, o bien, desplegado por completo.

Al realizar un ensayo de la desnaturalización y renaturalización en GdnHCl de la EhTPI siguiendo el proceso por centro de masa del espectro de fluorescencia; con tiempos de incubación de 24 y 48 horas, se obtuvo el resultado que se presenta en el siguiente gráfico:

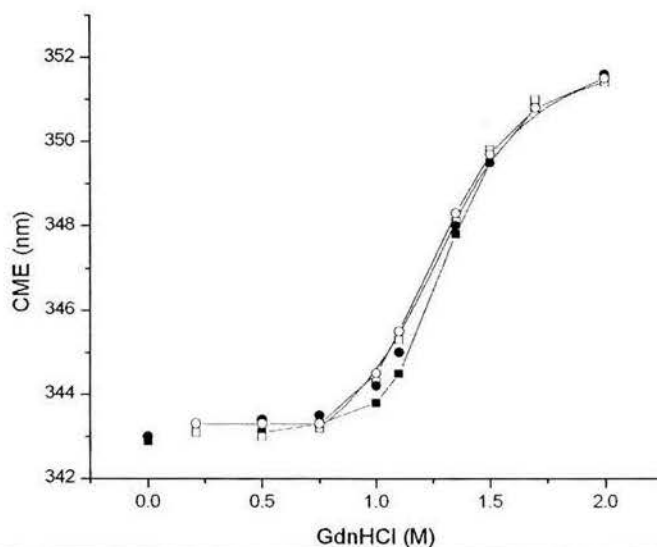


Figura 19.- Comportamiento del CME en la desnaturalización-renaturalización en GdnHCl de EhTPI.
■.- Sentido de la desnaturalización, 24 Horas. □.- Sentido de a desnaturalización, 48 horas. ●.- Sentido de la renaturalización, 24 horas. ○.-Sentido de la renaturalización, 48 horas.

En este experimento se observa una sola transición, que ocurre entre 0.7-2 M GdnHCl aproximadamente. Se observa una muy ligera histéresis que desaparece a las 48 horas al acercarse el CME de las muestras en desnaturalización al valor de las muestras en renaturalización. El valor del CME de ambos sentidos es el mismo en concentraciones bajas de GdnHCl, por lo que el proceso aquí observado es reversible. No se observa cambio en el CME de 0-

0.8 M de GdnHCl, siendo que en 0.8 M GdnHCl ya se perdió totalmente la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto, se supone que la técnica espectroscópica no es sensible a la transición que se observó anteriormente por actividad catalítica, y es sensible solamente a la segunda transición.

Para determinar en cual de los dos sentidos se llega al equilibrio con mayor rapidez., se realizó un ensayo cinético para determinar el tiempo de equilibrio de la enzima tanto en el sentido de la desnaturalización como en el de renaturalización en 1 y 1.2 M de GdnHCl; ya que de acuerdo con el experimento anterior, es la región donde se observa mayor histéresis. La transición se siguió mediante el cambio en anisotropía y centro de masa de fluorescencia, y los resultados se presentan a continuación:

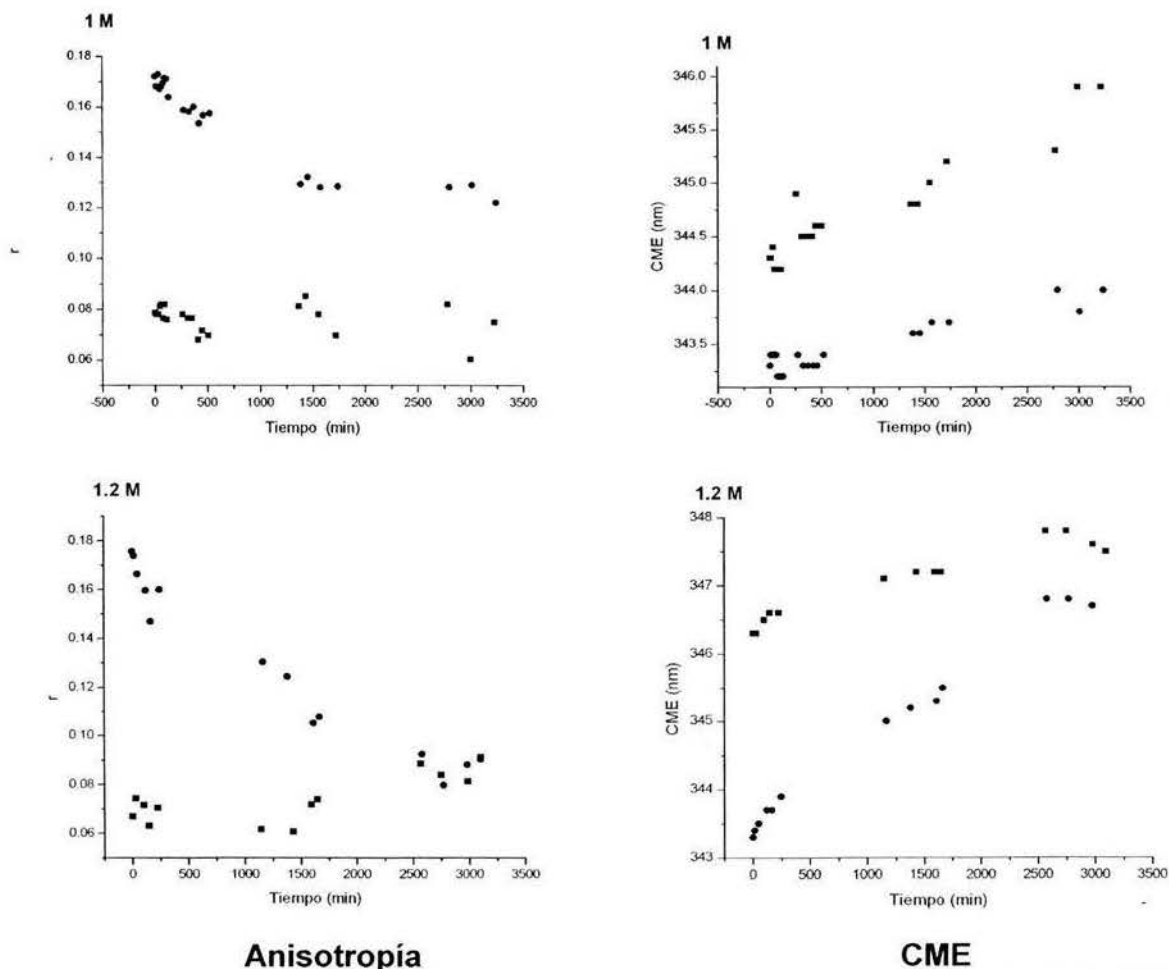


Figura 20.- Cinética de Desnaturalización y Renaturalización de EhtPI seguido por anisotropía de fluorescencia y Centro de masa espectral.

■.- Sentido de la renaturalización. ●.- Sentido de la desnaturalización.

Los valores de anisotropía que se observan a tiempos largos en ambas concentraciones de GdnHCl ($r \approx 0.08$) no corresponden al de una enzima completamente desnaturalizada ($r \approx 0.04$), y esto también se observa en el centro de masa (CME $\approx 345-346$ nm comparado contra ≈ 354 nm de una enzima completamente desnaturalizada). Estos datos sugieren que a estas concentraciones no se ha logrado la desnaturalización completa de la proteína. En el sentido de la renaturalización, el centro de masa y la anisotropía se estabilizan de inmediato (tiempos menores a 1 minuto) en ambas concentraciones de GdnHCl. En el sentido de la desnaturalización se observa que lentamente, tanto la anisotropía como el centro de masa, se acercan a los valores de la enzima renaturalizada. De estos experimentos (Figuras 19 y 20) se deduce que en el sentido de la renaturalización, la segunda transición se encuentra en equilibrio desde tiempos menores a las 24 horas, mientras que en el sentido de la desnaturalización el sistema se equilibra en un tiempo cercano o mayor a las 48 horas. Se observó un fenómeno visible de agregación al intentar medir las muestras en tiempos mayores a las 48 horas.

Ya que se obtuvo el tiempo y el sentido en el cual el proceso se encuentra en equilibrio, se decidió realizar un experimento en el sentido de la renaturalización en GdnHCl, siguiendo el fenómeno por diferentes técnicas como son: anisotropía, centro de masa espectral, apagamiento de triptofanos con acrilamida y dicroísmo circular. Las lecturas espectroscópicas se realizaron a las 24 horas de reposo en condiciones de renaturalización. El resultado se presenta en la siguiente gráfica:

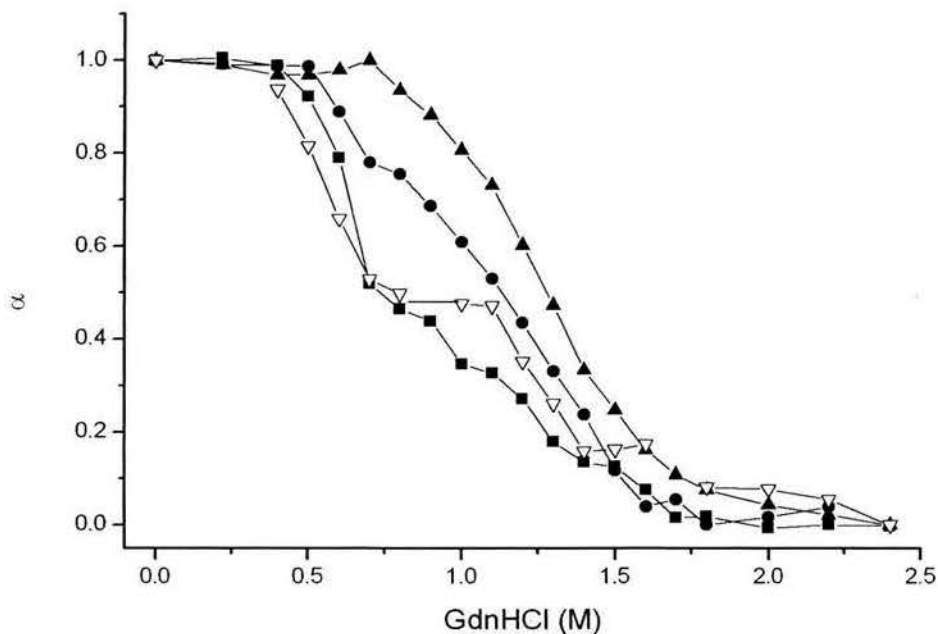


Figura 21.- Renaturalización de EhTPI seguida por múltiples técnicas espectroscópicas.
Clave: ■.- Anisotropía de Fluorescencia. ●.- Apagamiento con acrilamida.▲.-Centro de masa espectral.▽.- Dicroísmo Circular.

Con dicroísmo y anisotropía se observa una primera transición que ocurre de 0.4 M a 0.8 M de GdnHCl; el centro de masa no presenta cambios en este intervalo y se observa una pequeña transición al analizar el apagamiento de la fluorescencia. Recordando que la actividad en el sentido de la renaturalización está totalmente abolida en concentraciones mayores a 0.75 M de GdnHCl, se propone que esta primera transición corresponde a la disociación de la enzima. Se observa un intermediario en 0.7-0.8 M de GdnHCl. Al seguir el centro de masa, la anisotropía, el dicroísmo y el apagamiento se observa una segunda transición a partir de 0.7-0.8 M hasta 1.8 M GdnHCl. En un experimento posterior se observará que la concentración de proteína no tiene ningún efecto sobre esta segunda transición al desnaturar bajo presión. Con lo anterior, y dado que el intermediario presenta el 50% del cambio en la señal de dicroísmo

(lo que indica una gran pérdida de estructura secundaria), un aumento de la constante de Stern-Volmer (indicando pérdida de estructura terciaria) y una caída de la mitad de la señal de anisotropía de la enzima nativa (lo que indica una muy probable monomerización), se propone que éste es un intermediario monomérico. En consecuencia, esta segunda transición se atribuye a la desnaturalización del intermediario monomérico (M) hasta el estado completamente desplegado (D), por lo que el esquema o ruta de plegamiento general de la enzima es el siguiente:



Al realizar ensayos de cromatografía de exclusión molecular en gel para obtener el radio de Stokes de muestras en el sentido de la desnaturalización y renaturalización a 1 M de GdnHCl, donde todavía se tiene una gran mayoría de enzima en forma de intermediario monomérico a las 24 y 48 horas, se obtuvo lo siguiente:

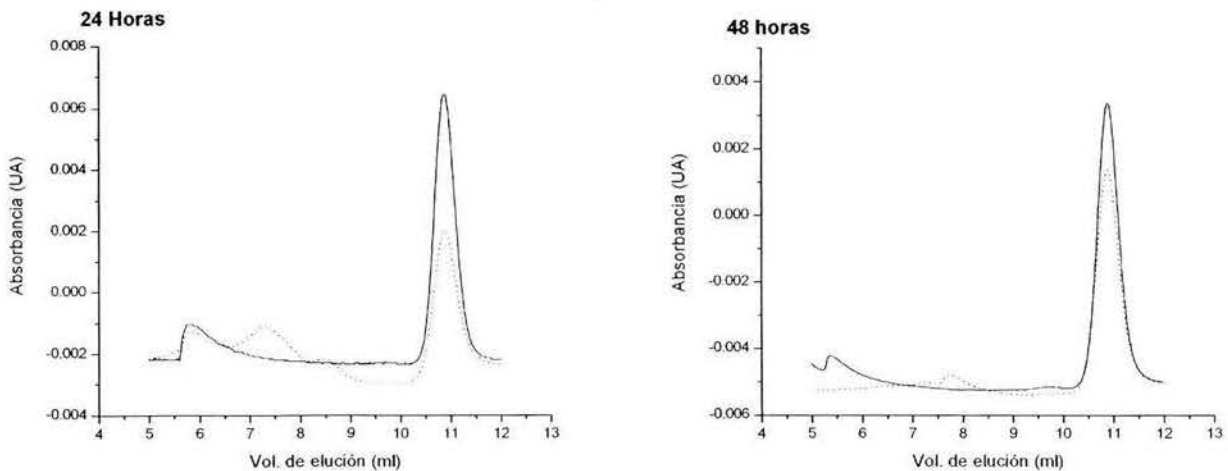


Figura 22.- Perfil de Elución del intermediario monomérico de EhTPI a las 24 y 48 horas de tiempo de incubación. Línea continua.- EhTPI en el sentido de la desnaturalización. Línea discontinua.- EhTPI en sentido de la renaturalización.

Se observa que la enzima en condiciones desnaturalizantes y renaturalizantes conservan el mismo volumen de elución a las 24 y a las 48 horas. Este volumen de elución corresponde al radio de Stokes de la enzima nativa (31.2Å) conforme a lo reportado por Rodríguez *et al.* (62). Esto indicaría que el intermediario, al

igual que en el caso de la enzima de levadura, es un monómero expandido. Se observa también la presencia de agregados (picos de densidad óptica a volúmenes menores) en todas las preparaciones, lo que corrobora que existe un proceso de agregación.

4.2.2.- Desnaturalización de la enzima nativa bajo presión.

Se sometió a una muestra de EhTPI nativa a un ciclo de presurización hasta los 350 MPa en amortiguador TED 100/10/1 a pH de 7.4:

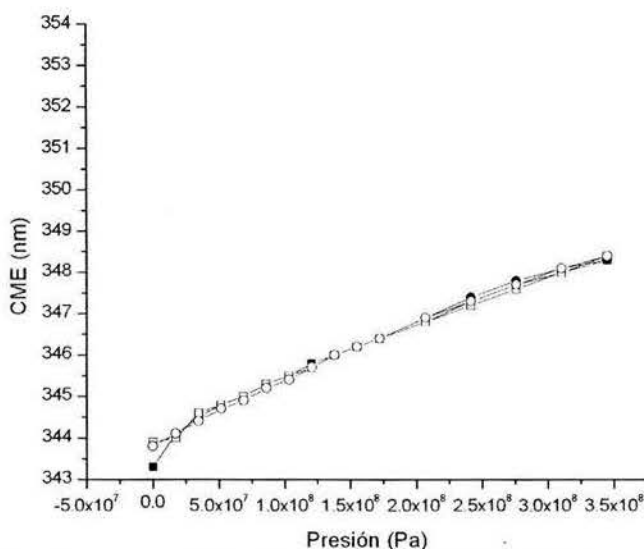


Figura 23.- Desnaturalización por presión hidrostática de EhTPI Nativa a pH 7.4.
Clave: ■.- Presurización, lectura a los 15 minutos. □.- Presurización, lectura a los 30 minutos. ●.- Despresurización, lectura a los 15 minutos. ○.-Despresurización, lectura a los 30 minutos. La escala se mantiene para comparación.

En este gráfico se observa que no hay una transición cooperativa. El cambio en el CME es pequeño (≈ 4 nm), por lo que se deduce que en las presiones empleadas no se logra la desnaturalización completa de la proteína, indicando que la enzima es muy estable, que no se está al equilibrio, o bien, que la proteína nativa es compresible.

4.2.3.- Comportamiento del intermediario monomérico de la EhTPI en GdnHCl-presión.

Para determinar el tiempo de equilibrio bajo presión, se realizó un experimento desnaturalizando a la EhTPI en 0.5M GdnHCl por 24 horas, con el objeto de desestabilizarla. Posteriormente se sometió la muestra a un ciclo -de presurización, con un tiempo de equilibrio de 90 minutos en cada salto de presión:

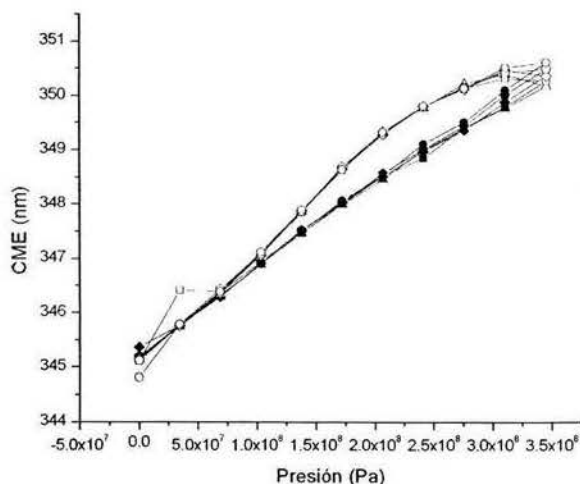


Figura 24.- Determinación de Tiempo de equilibrio en la desnaturalización-renaturalización por presión del intermediario monomérico de EhTPI en 0.5 M GdnHCl. pH= 7.4
Símbolos llenos, presurización: ▲.- 1 minutos. ■.- 5 minutos. ◆.- 30 minutos. ♠.- 60 minutos. ●.- 90 minutos.
Símbolos vacíos, despresurización: △.-1 minutos. □.- 5 minutos. ◇.- 30 minutos. ☆.- 60 minutos. ○.- 90 minutos.

Se observa histéresis entre los datos obtenidos en la presurización y la despresurización. Por otra parte, la forma de las curvas es diferente en ambos sentidos. El cambio en centro de masa es considerable (alrededor de 5 nm) aunque todavía alejado del valor de una proteína desnaturalizada. De este gráfico también se observa que no hay cambio en el centro de masa a tiempos de equilibrio mayores a 15 minutos en ninguno de los dos sentidos, de donde se infiere que en este tiempo se alcanzó el equilibrio en una presión dada.

Se realizó un ensayo del efecto de la concentración de proteína en la desnaturalización por presión hidrostática del intermediario de EhTPI, a concentraciones de EhTPI de 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 446 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Renaturalizando la enzima en 1.2 M de GdnHCl, dado que en esta concentración de GdnHCl nos encontramos en la transición que corresponde a la desnaturalización del intermediario monomérico:

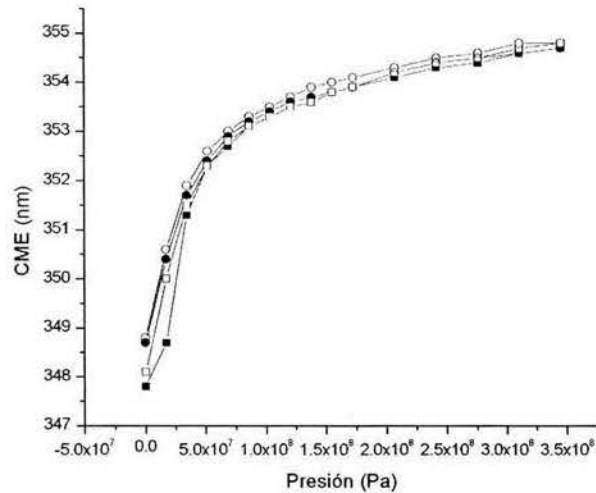


Figura 25.- Efecto de la concentración de proteína en la desnaturalización-renaturalización por presión del intermediario monomérico de EhTPI en 1.2M GdnHCl. Se presentan los datos recolectados a los 30 minutos de equilibrio en cada valor de presión. Símbolos llenos representan el experimento a 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ■.- Presurizando. ●.- Despresurizando. Símbolos vacíos representan el experimento a 446 $\mu\text{g}/\text{mL}$. □.- Presurizando. ○.- Despresurizando.

Se observa una transición clara, única y sin histéresis, el CME final corresponde al de una proteína completamente desnaturalizada. El efecto de la concentración de proteína en la presión de transición media es nulo, por lo que se infiere que la transición observada corresponde a una reacción unimolecular, lo que se esperaría si el fenómeno observado correspondiera a la desnaturalización del intermediario monomérico.

Al igual que en el caso del intermediario de ScTPI, se realizaron ensayos de desnaturalización bajo presión con enzima renaturalizada a diferentes concentraciones de GdnHCl desde 0.7 hasta 1.2M de GdnHCl:

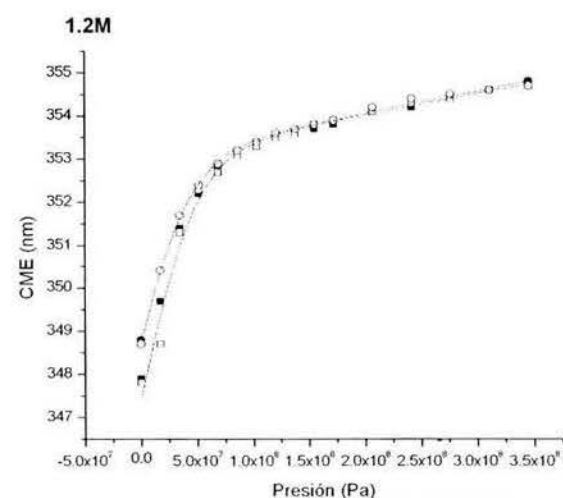
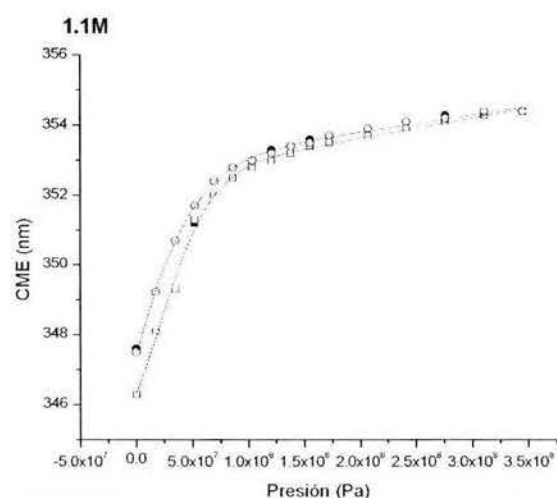
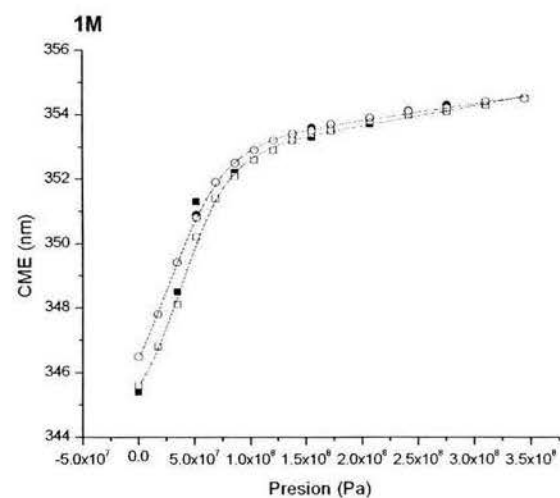
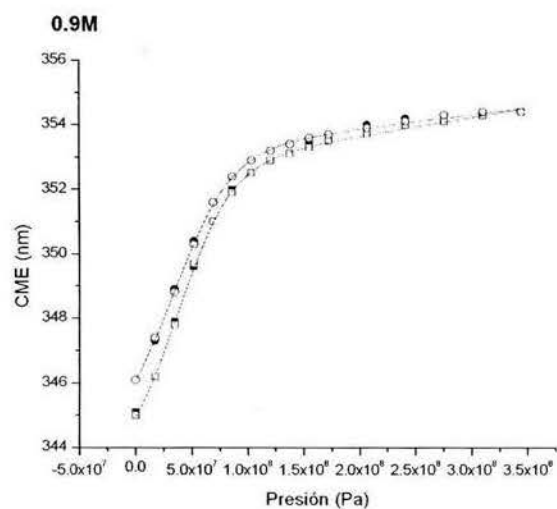
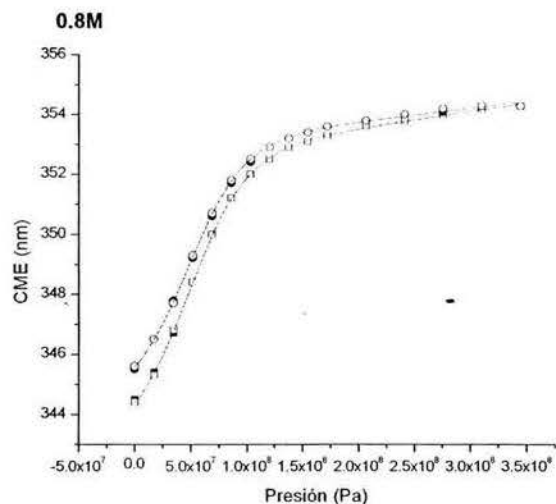
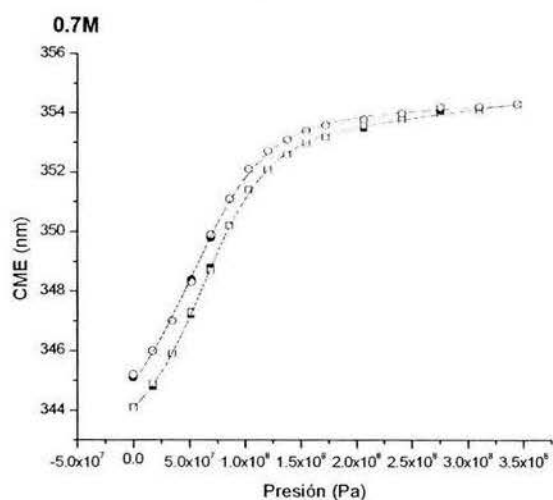


Figura 26.- Desnaturalización del intermediario monomérico de EhTPI por presión en diferentes concentraciones de GdnHCl.

Se muestran los ajustes a la ecuación 12 en cada gráfico, permitiendo el ajuste libre de cada parámetro, excepto el experimento a 1.2M GdnHCl donde se muestra el ajuste con el CME del intermediario como parámetro fijo.

Clave: ■.- Presurización, lectura a los 15 minutos. □.- Presurización, lectura a los 30 minutos. ●.- Despresurización, lectura a los 15 minutos. ○.-Despresurización, lectura a los 30 minutos.

Se observa una histéresis muy pequeña en todos los experimentos, la cual se reduce hasta desaparecer en los experimentos de 1.2 M de GdnHCl. Al igual que en el caso de ScTPI, la menor presencia de forma dimérica se relaciona con la desaparición de la histéresis del proceso. El centro de masa de la enzima después de un ciclo de presurización-despresurización se encuentra a 1 nm o menos del centro de masa original, por lo que se considera que este proceso es reversible. Se observan transiciones completas en los experimentos de 0.7 y 0.8M de GdnHCl, lo que indica que en esas concentraciones se encuentra la mayor proporción de intermediario monomérico. Se utilizaron todos estos datos para proceder al análisis termodinámico.

4.2.4.- Análisis Termodinámico.

Se realizó el análisis termodinámico de los experimentos mencionados de acuerdo a la ecuación 12, con una primera aproximación utilizando los datos sin fijar el centro de masa espectral del intermediario monomérico (CME_M) con los siguientes resultados:

Tabla 6.- Ajuste utilizando los datos con el CME_M libre.

| [GdnHCl] | PRESURIZANDO | | | | | | DESPRESURIZANDO | | | | | |
|-------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------|-----------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------|-----------------|
| | ΔG_U (J/Mol) | Desv. Std. | ΔV (ml/mol) | Desv. Std. | $P_{1/2}$ (MPa) | CME_M (nm) | ΔG_U (J/Mol) | Desv. Std. | ΔV (ml/mol) | Desv. Std. | $P_{1/2}$ (MPa) | CME_M (nm) |
| 0.7 | 5176.0 | ±188.2 | -86.5 | ±2.4 | 59.8 | 342.5 | 4901.5 | ±188.1 | -88.7 | ±2.46 | 55.3 | 343 |
| 0.8 | 4359.0 | ±178.7 | -95.9 | ±2.5 | 45.5 | 343 | 4491.4 | ±279.3 | -98.5 | ±3.96 | 45.6 | 344.4 |
| 0.9 | 3678.2 | ±306.9 | -104.0 | ±4.6 | 35.4 | 343.2 | 3141.7 | ±306.1 | -97.0 | ±4.39 | 32.4 | 344.2 |
| 1 | 4241.6 | ±565.1 | -117.0 | ±9.2 | 36.3 | 344.3 | 2546.7 | ±280.5 | -100.0 | ±4.09 | 25.5 | 344.2 |
| 1.1 | 2347.8 | ±819.1 | -111.0 | ±1.3 | 21.2 | 344.1 | 1280.7 | ±89.2 | -110.0 | ±4.02 | 11.6 | 340.5 |
| 1.2* | 436.0 | ±595.8 | -119.0 | ±8.6 | 3.66 | * | -116.9 | ±79 | -108.0 | ±4.42 | -1.08 | * |

*Se ajustó con valor promedio de 343.5.

Se observa que el modelo se ajusta correctamente con todos los datos. Se utilizaron todos los datos para los análisis del cambio de energía libre de desplegamiento (ΔG_U), cambio en volumen (ΔV) y presión de transición media ($P_{1/2}$) respecto a la concentración de GdnHCl.

Los valores de ΔG obtenidos se utilizaron para obtener, mediante una extrapolación lineal, el valor de ΔG en ausencia de GdnHCl:

$$\Delta G_{XGdnHCl} = \Delta G_{H_2O} + m [GdnHCl]$$

* Los datos de 1.2M pueden desviarse un poco del ajuste dado que, como se observa en el gráfico anterior, antes de aplicar presión nos encontramos en medio de la transición con una fracción importante de enzima desplegada por lo que se utilizó para el ajuste el CME_M en el que convergen todos los ajustes anteriores.

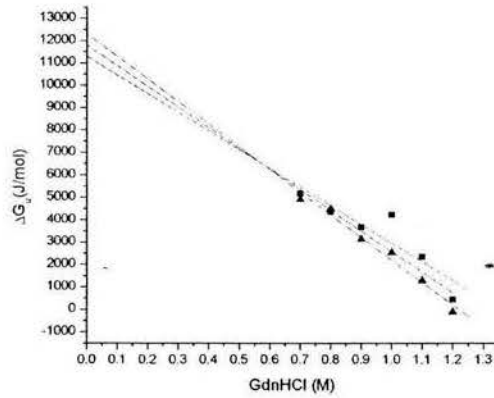


Figura 27.- Comportamiento de los ΔG_u obtenidos respecto a la concentración de Guanidina. ■.- Datos obtenidos en el sentido de la presurización. ▲.- Datos obtenidos en el sentido de la despresurización. Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Los resultados se resumen a la siguiente tabla:

| | $\Delta G_{u\ H_2O}$ (J/mol) | m (J/mol)/M | R |
|-------------------------|---------------------------------|------------------|--------|
| Datos Presurización. | 11290 ± 1857 | -8334 ± 1924 | .9071 |
| Datos Despresurización. | 12294 ± 732 | -10091 ± 758 | .9889 |
| Ambos. | 11792 ± 1105 | -9212 ± 1145 | .86607 |

El comportamiento del ΔV se presenta en el siguiente gráfico:

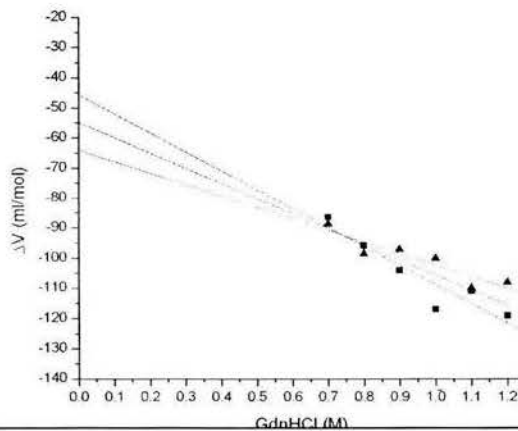


Figura 28.- Comportamiento del ΔV obtenido respecto a la concentración de Guanidina. ■.- Datos obtenidos en el sentido de la presurización. ▲.- Datos obtenidos en el sentido de la despresurización. Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Se extrapoló a ausencia de GdnHCl de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta V_{XGdnHCl} = \Delta V_{H_2O} + m [GdnHCl]$$

Los resultados de la extrapolación se resumen en la siguiente tabla:

| | ΔV_{H_2O} (mL/mol) | m (J/mol)/M | R |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------|--------|
| Datos Presurización. | -45 ± 11.74 | -63.1 ± 12 | .9329 |
| Datos Despresurización. | -63 ± 7.8 | -38 ± 28 | .9214 |
| Ambos. | -54 ± 9 | -50 ± 9 | .75982 |

El comportamiento de $P_{1/2}$ se presenta en la siguiente gráfica:

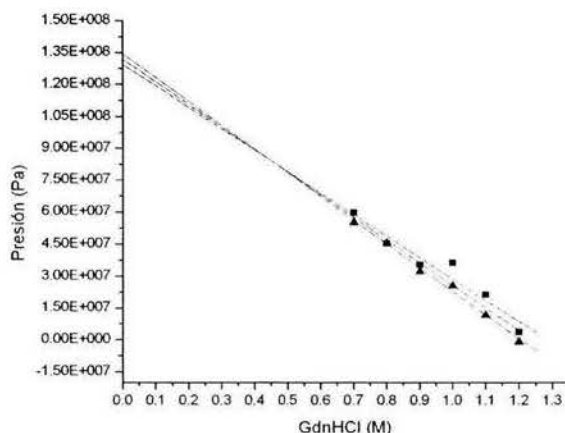


Figura 29.- Comportamiento de las $P_{1/2}$ obtenidas respecto a la concentración de Guanidina.

■.- Datos obtenidos en el sentido de la presurización. ▲.- Datos obtenidos en el sentido de la despresurización. Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Se extrapoló a ausencia de GdnHCl de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{1/2XGdnHCl} = P_{1/2H_2O} + m [GdnHCl]$$

Los resultados de la extrapolación se resumen en la siguiente tabla:

| | $P_{1/2H_2O}$ (MPa) | m (MPa)/M | R |
|--|------------------------|----------------|-----|
| | | | |

| | | | |
|--------------------------------|----------|---------------|-------|
| Datos Presurización. | 129 ± 12 | -100.8 ± 12.6 | .9714 |
| Datos Despresurización. | 134 ± 4 | -111 ± 4 | .9970 |
| Ambos. | 132 ± 8 | -106 ± 8 | .9464 |

De acuerdo a los ajustes anteriores, se tomaron los valores convergentes de CME_N para presurización (343 nm) y para la despresurización (344.2 nm) y se ajustaron los datos fijando el parámetro CME_M obteniendo:

Tabla 7.- Ajustes de los datos utilizando el CME_M fijo.

| [GdnHCl] | PRESURIZANDO | | | | | DESPRESURIZANDO | | | | |
|------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------|
| | ΔG_U (J/Mol) | Desv. Std. | ΔV (ml/mol) | Desv. Std. | $P_{1/2}$ (MPa) | ΔG_U (J/Mol) | Desv. Std. | ΔV (ml/mol) | Desv. Std. | $P_{1/2}$ (MPa) |
| 0.7 | 5059.4 | ±55.3 | -85.1 | ±1.1 | 59.5 | 5037.4 | ±56.8 | -90.3 | ±1.2 | 55.8 |
| 0.8 | 4384.3 | ±47.4 | -96.3 | ±1.1 | 45.5 | 4213.8 | ±73.7 | -94.9 | ±1.8 | 44.4 |
| 0.9 | 3400.8 | ±68.3 | -99.9 | ±2 | 34.0 | 3160.3 | ±60.7 | -97.2 | ±1.8 | 32.5 |
| 1 | 2715.6 | ±129.6 | -94.6 | ±4.1 | 28.7 | 2531.4 | ±47.6 | -100.0 | ±1.6 | 25.3 |
| 1.1 | 1605.5 | ±131.1 | -103.0 | ±5.3 | 15.6 | 1053.9 | ±81.0 | -107.0 | ±3.7 | 9.85 |
| 1.2 | 42.1 | ±49.2 | -113.0 | ±2.8 | .373 | -166.1 | ±77.8 | -108.0 | ±4.4 | -1.54 |

Se realiza el mismo tratamiento a los valores de ΔG_U extrapolando de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta G_{XGdnHCl} = \Delta G_{H_2O} + m [GdnHCl]$$

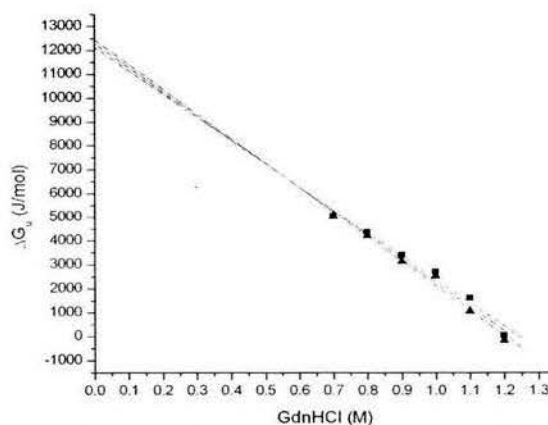


Figura 30.- Comportamiento de las ΔG_U obtenidas respecto a la concentración de Guanidina.

■.- Datos obtenidos en el sentido de la presurización. ▲.- Datos obtenidos en el sentido de la despresurización. Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

| | $\Delta G_{u\ H_2O}$ (J/mol) | m (J/mol)/M | R |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------|--------|
| Datos Presurización. | 12125 ± 700 | -9745 ± 725 | .9890 |
| Datos Despresurización. | 12444 ± 579 | -10321 ± 600 | .9933 |
| Ambos. | 12284 ± 463 | -10033 ± 480 | .97757 |

El comportamiento del ΔV se presenta en el siguiente gráfico:

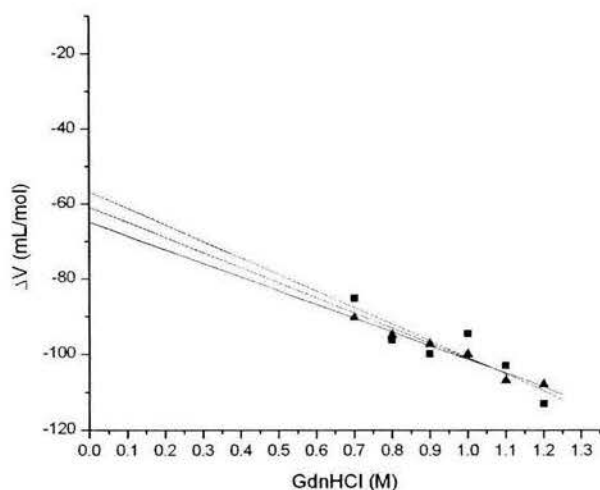


Figura 31.- Comportamiento de las ΔV obtenidas respecto a la concentración de Guanidina. ■.- Datos obtenidos en el sentido de la presurización. ▲.- Datos obtenidos en el sentido de la despresurización. Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Se extrapola a nula concentración de GdnHCl de acuerdo a:

$$\Delta V_{XGdnHCl} = \Delta V_{H_2O} + m [GdnHCl]$$

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

| | ΔV_{H_2O} | m (J/mol)/M | R |
|--|-------------------|------------------|-----|
| | | | |

| | (mL/mol) | | |
|--------------------------------|----------------|----------------|--------|
| Datos Presurización. | -56 ± 11.0 | -44.1 ± 11 | .8874 |
| Datos Despresurización. | -64.9 ± 3 | -36 ± 3 | .9848 |
| Ambos. | -61 ± 5 | -40 ± 5 | .84184 |

El comportamiento de las $P_{1/2}$ se presenta en el siguiente gráfico:

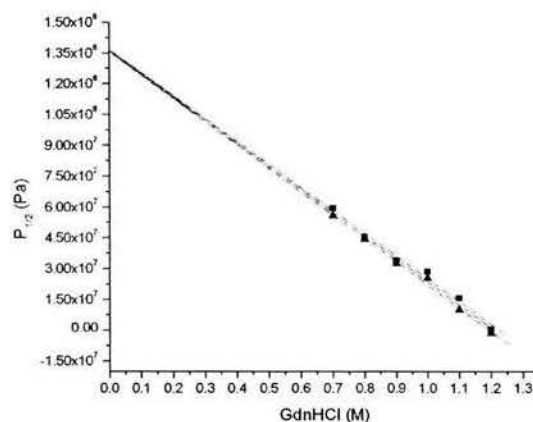


Figura 32.- Comportamiento de las $P_{1/2}$ obtenidas respecto a la concentración de Guanidina.
 ■.- Datos obtenidos en el sentido de la presurización. ▲.- Datos obtenidos en el sentido de la despresurización. Las líneas representan al ajuste a la ecuación de una recta con cada serie de datos, y con ambas.

Los resultados de la extrapolación se resumen en la siguiente tabla:

| | $P_{1/2H_2O}$ (MPa) | m (MPa)/M | R |
|--------------------------------|------------------------|------------------|--------|
| Datos Presurización. | 136.6 ± 6.4 | -111.6 ± 6.6 | -.9930 |
| Datos Despresurización. | 135.6 ± 4.2 | -113.6 ± 4.3 | -.9971 |
| Ambos. | 136.1 ± 4.3 | -112.6 ± 4.5 | -.9845 |

De acuerdo a los coeficientes de correlación (R), se muestra que los datos ajustados con el CME_M fijo resultan mucho mejores que los que se hicieron con CME_M como parámetro ajustable, se utilizaron los primeros para comparaciones posteriores.

V.-Discusión

5.1.- Avances en el plegamiento de ScTPI.

El plegamiento de la ScTPI ya ha sido ampliamente caracterizado en GdnHCl por medio de actividad catalítica, centro de masa, radio de Stokes y dicroísmo circular. Estos resultados derivaron en la propuesta de un intermediario monomérico, ya que el perfil de actividad en la primera transición depende de la concentración de proteína, lo cual indica que este primer evento es bimolecular. El intermediario obtenido al final de esta transición ($\approx 0.7M$ GdnHCl) es, por lo tanto, el monómero inactivo (49).

El radio de Stokes del intermediario es igual al del dímero nativo, lo cual podría sugerir que el intermediario también es dímero. Al respecto, cabe aclarar que el intermediario presenta una gran disminución en estructura secundaria con respecto a la enzima nativa (52% de la señal a 222 nm). Esta pérdida en la estructura debería de aumentar el radio de Stokes de la molécula, lo cual no se observa. Estas evidencias indican que el intermediario de ScTPI es monomérico (49)

En este trabajo, al utilizar nuevas técnicas espectroscópicas como la anisotropía y el apagamiento de la fluorescencia, se obtuvo como resultado el comportamiento idéntico de la anisotropía y el radio de Stokes. Ambas técnicas se utilizan para determinar el estado de oligomerización de las proteínas, y en este caso los valores de radio de Stokes y anisotropía son iguales a los de la enzima nativa, lo que se puede explicar mediante la propuesta del intermediario como un "monómero expandido". La constante de Stern-Volmer (K_{sv} o constante de apagamiento) se comporta de manera similar: el valor de la K_{sv} es similar para la enzima nativa dimerica que para el intermediario monomérico, indicando que, por lo menos a nivel de los triptofanos, no se ha perdido una cantidad importante de estructura terciaria o secundaria. Es decir, se propone que el

intermediario es un monómero expandido, pero bien estructurado en las regiones cercanas a los triptofanos.

La independencia con la concentración de proteína en la desnaturalización por presión hidrostática del intermediario de ScTPI corroboró que éste es monomérico. Se observó que la presencia del dímero tiene una importante influencia en la histéresis del proceso, sin embargo, se obtuvieron las condiciones para realizar el análisis termodinámico. Se obtuvieron los parámetros termodinámicos extrapolados a cero concentración de GdnHCl. El valor de ΔG_{uH_2O} ($12.4 \pm .8$ kJ/mol) obtenido de la extrapolación es cercano al reportado para el desplegamiento del monómero reportado por Nájera ($16.6 \pm .7$ kJ/mol). El ΔV obtenido es el primero que se reporta para una TPI y su valor (-74 ± 13 mL) es un valor similar al de otras proteínas del mismo peso molecular, la magnitud y signo resultó dentro de lo que se encuentra comúnmente entre todas las proteínas estudiadas por este método (63). Lo que implica que la pérdida de la estructura secundaria y terciaria en el monómero expandido no tuvo una influencia importante en el ΔV . La extrapolación de la presión de transición media (143.9 ± 6 MPa) posee un valor predictivo y de referencia en caso de que se obtengan estudios de monómeros desnaturalizados por presión en ausencia de desnaturalizantes. En general, se profundizó en el mecanismo de plegamiento de esta enzima y se calcularon parámetros termodinámicos que habían sido difíciles de obtener para esta enzima; además, corroboramos el mecanismo de plegamiento propuesto por Nájera *et al* (49).

5.2.- Mecanismo de Plegamiento de EhTPI.

Al comparar el cambio respecto al tiempo en el centro de masa y la anisotropía de la enzima en condiciones desnaturalizantes y renaturalizantes, se encontró que la enzima llega al equilibrio rápidamente en el sentido de la renaturalización (Figuras 19 y 20). De acuerdo a la figura 18, al seguir el desplegamiento por actividad, la enzima presenta una sola transición que no se estabiliza en el

tiempo y presenta histéresis, aunada a un proceso colateral de agregación, lo que indica que la monomerización es irreversible. Esta primera transición comprende de 0 a 0.8M GdnHCl aproximadamente. Al seguir el proceso de desplegamiento por anisotropía de fluorescencia, se observa una primera transición (0.4-0.75 M GdnHCl aproximadamente) con una pérdida del 50% de la señal, y una segunda transición (0.8-1.8 M GdnHCl aproximadamente). El cambio en la primera transición se puede atribuir tanto a un proceso de monomerización, como al efecto de libre giro (efecto de hélice) de un triptofano con un gran aporte respecto al rendimiento cuántico de todos los triptofanos de la proteína. La disminución de la anisotropía en la segunda transición correspondería al desplegamiento total de la proteína. La señal de dicroísmo a 222nm se comporta de la misma manera que la anisotropía: se observan dos transiciones, la primera (0.4-0.75 M GdnHCl) con una pérdida del 50% de la señal, representando un proceso con una gran pérdida de la estructura secundaria, y la segunda transición (1.0-1.8 M), que correspondería a la pérdida casi total de la estructura secundaria. El apagamiento de la fluorescencia presenta una primera transición (0.5-0.7M GdnHCl) con un aumento de la K_{sv} de 1.78 M^{-1} a 3.73 M^{-1} , implicando una ligera pérdida de estructura terciaria. Se observa una segunda transición (0.8-1.8M GdnHCl) que es propia de la desnaturalización total de la enzima, terminando en la total accesibilidad de los triptofanos a la acrilamida ($K_{sv}=11.23$). Si se sigue el mismo proceso registrando el centro de masa de la enzima (Figuras 19 y 21) es precisamente en 0.9 M GdnHCl donde se observa el inicio de la única transición observada, por lo que los triptofanos en el intermediario y en la enzima nativa poseen la misma accesibilidad al solvente.

Por otra parte, al renaturalizar la enzima en concentraciones de 0.7 a 1.2 M GdnHCl y someterla a un ciclo de presión se observa una sola transición, independiente de la concentración de proteína y al equilibrio. Observándose transiciones completas en las concentraciones de 0.7 -0.8M GdnHCl (Figura 24).

De acuerdo a todo lo anterior, podemos aseverar que la EhTPI presenta un intermediario al equilibrio en concentraciones de GdnHCl cercanas a 0.75-0.8M de GdnHCl. La carencia de actividad, la independencia de la desnaturalización por presión a la concentración de enzima y sus características espectroscópicas (50% de señal de dicroísmo a 222 nm, mayor accesibilidad al apagador acrilamida, fuerte cambio en la señal de anisotropía) indican que la naturaleza de este intermediario es monomérica. Los experimentos de filtración en gel precisan que éste posee un radio de Stokes similar al de la enzima dimerica nativa. La presencia de este intermediario permite proponer que el esquema o ruta de desplegamiento-replegamiento de la EhTPI es:



5.3.- Comparación de los mecanismos de plegamiento de la ScTPI y EhTPI.

El esquema de plegamiento encontrado en este trabajo para EhTPI es igual al propuesto por Nájera para la ScTPI, en el cual se presenta la mayor cantidad de intermediario a 0.7M GdnHCl. Es interesante que ambas enzimas presenten un intermediario en concentraciones semejantes de GdnHCl y que lleguen al equilibrio rápidamente en el sentido de la renaturalización. En ambos casos el radio de Stokes del intermediario es igual al de la enzima nativa, lo cual concluye que ambas enzimas poseen una ruta de plegamiento muy similar. Sin embargo, no se ha obtenido una reversibilidad completa en el caso de EhTPI, cosa que sí se obtuvo en el caso de ScTPI, esto puede deberse a que la reasociación de EhTPI esté comprometida por algunos contactos perdidos, por un desajuste en las superficies de contacto que evita la correcta dimerización de la enzima o al apareamiento incorrecto de monómeros mal plegados, lo cual se refleja en el fenómeno de agregación observado en tiempos mayores a las 48 horas. Esta irreversibilidad evita que se pueda analizar termodinámicamente la primera transición.

La similitud en la ruta de plegamiento de EhTPI y ScTPI puede representar el hecho de que estas dos enzimas compartan un ancestro común que poseyera el mecanismo de plegamiento que se observa y aún se mantiene en las dos enzimas. En el plegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, (86) se encuentra un intermediario monomérico, sumándose a una serie de triosafosfato isomerasas (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania Mexicana*) que presentan este tipo de intermediario, lo cual manifiesta un aspecto común en el plegamiento en GdnHCl de estas enzimas, y que tal vez sea una constante en el plegamiento de las TPI en general. Cabe aclarar que en la TPI de *T. cruzi* y *T. brucei*, se ha propuesto la existencia de un segundo intermediario dimérico (86).

5.4.- Comparación de las propiedades estructurales de los intermediarios monoméricos de EhTPI y ScTPI.

A continuación se presenta una tabla con las propiedades estructurales de los intermediarios monoméricos de las dos enzimas en 0.7 M GdnHCl:

Tabla 8.- Propiedades espectroscópicas del monómero de ambas especies.

| Propiedad | EhTPI | ScTPI |
|--|---------|----------|
| Actividad ($\mu\text{molas min}^{-1}$ mg^{-1}) | Nula | Nula |
| CME (nm) | 343.2* | 340.5 |
| Anisotropía | 0.1112 | 0.1090* |
| K_{sv} (M^{-1}) | 3.787 | 3.702 |
| Dicroísmo a 222 nm (% Señal de la nativa) | 50% | 52% |
| Radio de Stokes | 31.2 Å* | 30.0 Å * |

*Valores idénticos a la enzima nativa.

El valor del radio de Stokes en ambos monómeros, similar al de sus respectivas enzimas nativas, parece sugerir que ambos monómeros son expandidos, ya sea por una expansión general del monómero o tal vez la desestructuración de algún segmento. Es interesante que ambos monómeros han perdido aproximadamente el 50% de la estructura secundaria a 222nm, lo que es una pérdida grande de hojas β . La anisotropía es similar en ambos monómeros, sin embargo el valor del intermediario de la ScTPI es idéntico al de la enzima nativa, esto se puede dar en el caso de que la enzima nativa posea una región donde tenga un triptofano de alto rendimiento cuántico libre en rotación de cadena lateral. El cambio de anisotropía es muy grande entre la enzima nativa y el monómero de EhTPI (0.17 a 0.11 aproximadamente) lo que sí representa el cambio esperado de anisotropía correspondiente a la monomerización. El valor de la constante de Stern-Volmer de los intermediarios es ligeramente mayor que el de sus enzimas nativas (1.5 y 1.7 aproximadamente), lo que indica que ambas perdieron un poco de estructura terciaria y esto facilita la accesibilidad del apagador acrilamida. Sin embargo, el cambio en CME en EhTPI es nulo respecto a la enzima nativa, lo que podría indicar un rearrreglo mayor en el cual los triptofanos cambiaron sus rendimientos cuánticos sin cambiar en mayor grado la accesibilidad al solvente (88). En el caso de ScTPI se observa una exposición de los triptofanos al solvente ya que el cambio en CME es cercano a la mitad del cambio total.

5.5.- Comparación de las propiedades termodinámicas de los intermediarios monoméricos de EhTPI y ScTPI.

A continuación se presenta una tabla con las propiedades termodinámicas de los dos intermediarios obtenidas del desplegamiento bajo presión de ambas, presentado los datos de EhTPI con CME_M fijo y para ScTPI los de CME_M libre:

Tabla 9.- Propiedades Termodinámicas de los monómeros en ambas especies.

| PROPIEDAD | EhTPI | | | ScTPI | | |
|---|--------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|-------------|
| | Presurizando | Despresurizando | Ambos | Presurizando | Despresurizando | Ambos |
| Set de Datos | | | | | | |
| ΔG_{uH_2O} (J/mol) | 12125 ± 700 | 12444 ± 579 | 12284 ± 463 | 13360 ± 493 | 11436 ± 1338 | 12398 ± 775 |
| $m\Delta G$ (J mol ⁻¹ M ⁻¹) | -9745 ± 725 | -10321 ± 600 | -10033 ± 480 | -10764 ± 573 | -8989 ± 1556 | -9877 ± 901 |
| ΔV_{H_2O} (ml/mol) | -56 ± 11.0 | -64.9 ± 3 | -61 ± 5 | -70.2 ± 8 | -78 ± 14 | -74 ± 13 |
| $m\Delta V$ (ml/mol /M) | -44.1 ± 11 | -36 ± 3 | -40 ± 5 | -32.9 ± 9 | -8 ± 17 | -20 ± 15 |
| $P_{1/2H_2O}$ (MPa) | 136.6 ± 6.4 | 135.6 ± 4.2 | 136.1 ± 4.3 | 148.5 ± 7 | 139.3 ± 9 | 143.9 ± 6 |
| $mP_{1/2}$ (MPa/M) | -111.6 ± 6.6 | -113.6 ± 4.3 | -112.6 ± 4.5 | -123.4 ± 8 | -111.6 ± 11 | -117.5 ± 7 |

El ΔG_{uH_2O} para EhTPI es bastante constante en el sentido de la presurización y la despresurización (12.1 y 12.4 kJ/mol) presentando una diferencia de 0.3 kJ/mol. En el caso de ScTPI, éstos difieren en 1.9 kJ/mol (13.4 y 11.4 kJ/mol). Sin embargo, el valor promedio de los ΔG_{uH_2O} de EhTPI y ScTPI es muy similar en los dos intermediarios (alrededor de 12.3 kJ/mol), mostrando que ambos intermediarios tienen estabilidad similar. La dependencia del ΔG respecto a la concentración de GdnHCl ($m\Delta G$) es similar en la EhTPI (-10033 J mol⁻¹M⁻¹) y en la ScTPI (-9877 J mol⁻¹M⁻¹). El ΔV_{H_2O} para EhTPI (-61 ml/mol) y el de la ScTPI (-74 ml/mol) es prácticamente igual. La dependencia del ΔV con la concentración de GdnHCl ($m\Delta V$) de EhTPI (-40 ml mol⁻¹ m⁻¹) es dispar a la de ScTPI (-20 ml mol⁻¹M⁻¹). La $P_{1/2H_2O}$ es prácticamente la misma en EhTPI (136.1 MPa) y ScTPI (143.9 MPa), lo que es un indicio más de similitud de estos intermediarios. La dependencia de la $P_{1/2}$ respecto a la concentración de GdnHCl ($mP_{1/2}$) en la EhTPI (-112.6 MPa/M) y en ScTPI (-117.5 MPa/M) se mantiene en valores casi idénticos. Se concluye que en ambos intermediarios el ΔG_{H_2O} , ΔV_{H_2O} , $P_{1/2H_2O}$ y las dependencias de éstos con el desnaturizante son muy similares, por lo que termodinámicamente pudieran ser especies equivalentes.

5.6.- Análisis de cavidades de los cristales de EhTPI y ScTPI.

Actualmente, se atribuye la magnitud del ΔV del desplegamiento de una proteína a la cantidad y dimensión de las cavidades e invaginaciones que ésta posee. Por ello, se decidió analizar las estructuras cristalográficas del dímero de EhTPI (1M6J), del monómero obtenido al eliminar uno de los monómeros del mismo archivo PDB (EHMONO), del dímero de ScTPI (1YPI) y del monómero obtenido de la misma forma (SCMONO). Se utilizaron estos PDBs para su evaluación en un servicio de búsqueda y estimación de cavidades llamado CAST (87) obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 10.-Análisis informático utilizando CAST:

| Especie | Vol. Cavidades e invaginaciones (MS). | Vol. Obtenido accesible a agua (SA). |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| EhTPI (1M6J) Dímero. | 4371.04 Å ³ | 530.1 Å ³ |
| ScTPI (1YPI) Dímero. | 4270.03 Å ³ | 405.112 Å ³ |
| EhTPI (EHMONO) Monómero. | 2270.75 Å ³ | 371.242 Å ³ |
| ScTPI (SCMONO) Monómero. | 2127.33 Å ³ | 320.492 Å ³ |

La primera columna representa tanto las cavidades como las invaginaciones de la estructura cristalina de las proteínas de interés, por lo que es éste valor el que es de interés. Los valores de volumen para los dímeros de EhTPI y ScTPI son muy similares, lo que indica que la forma dimérica de ambas enzimas posee un “volumen muerto” muy similar. Los valores de volumen de los monómeros del cristal también son similares. Estos resultados parecen sugerir que la transición hacia intermediario monomérico no afecta el promedio de las cavidades de ambas. Si suponemos que las cavidades son la principal influencia para la magnitud del ΔV de una proteína, estos resultados concuerdan y a la vez ofrecen una explicación plausible a los valores de ΔV similares para la EhTPI y ScTPI que se presentan en este trabajo.

5.7.- Comportamiento del ΔV respecto a la concentración de GdnHCl.

Existen en la literatura muy pocos trabajos que reporten el comportamiento del ΔV respecto a la GdnHCl. Generalmente lo consideran como constante, o bien, trabajos sin la suficiente cantidad de datos para distinguir un comportamiento claro (53, 82). Sin embargo, en este trabajo se observa que en todas las series de datos analizados, se tiene una pendiente negativa. Esto es, que el ΔV se vuelve más negativo o bien, que el valor absoluto del ΔV ($|\Delta V|$) siempre aumenta respecto a la concentración de GdnHCl. Ya que el ΔV de desplegamiento está definido como la diferencia de volumen molar de la proteína desnaturalizada y la monomérica:

$$\Delta V_d = V_u - V_m$$

El aumento del $|\Delta V|$ se puede generar de 2 maneras:

1.- Que el valor de V_m aumente, es decir, que la GdnHCl modifique el empaquetamiento de la biomolécula, generando más “huecos” en la proteína, o bien, que la GdnHCl desplace o rearregle las moléculas de agua que ocupaban huecos en la proteína. Estos efectos causarían el aumento del V_m .

2.- Que la GdnHCl interactúe con la proteína en estado desnaturalizado, participando en una mejor interacción proteína-solvente, disminuyendo así el V_u .

5.8.- Colofón.

En general, se obtuvieron muchos indicios que aclaran el panorama general del plegamiento de estas enzimas. Y se obtuvieron parámetros novedosos que sirven como punto de partida para realizar estudios comparativos posteriores que lleven a comprender en su totalidad las características generales y finas que se asocian al proceso de plegamiento de la ScTPI.

VI.- Conclusiones.

- Se corroboró y extendió el modelo de plegamiento de la ScTPI en GdnHCl, ahora con la adición de los datos obtenidos por anisotropía y apagamiento de la fluorescencia.
- Se caracterizó termodinámicamente el desplegamiento del intermediario monomérico de ScTPI, obteniendo el ΔG , ΔV y $P_{1/2}$ del proceso.
- Se obtuvo la ruta de plegamiento de la EhTPI en GdnHCl, donde se observó un proceso de disociación que lleva a un intermediario monomérico y su posterior desplegamiento.
- Se caracterizó espectroscópicamente a este intermediario, describiéndolo como un intermediario monomérico expandido, ligeramente desestructurado.
- Se obtuvieron los parámetros termodinámicos asociados al desplegamiento del monómero de EhTPI, obteniendo el ΔG , ΔV y $P_{1/2}$ del proceso.
- La comparación de los parámetros termodinámicos y espectroscópicos de ambas enzimas muestra que las dos son especies muy similares, lo que podría representar un intermediario común al plegamiento de las TPI.
- Se observó constantemente un comportamiento decreciente del ΔV respecto a la concentración de GdnHCl.

VII.- Bibliografía.

1. **Akasaka, K.** 2003. Highly fluctuating protein structures revealed by variable-pressure nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **42**:10875-85.
2. **Anfinsen, C. B.** 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**:223-30.
3. **Aqvist, J., and M. Fothergill.** 1996. Computer simulation of the triosephosphate isomerase catalyzed reaction. *J Biol Chem* **271**:10010-6.
4. **Atkins, P. W.** 1990. *Physical Chemistry*, 4th ed, vol. Oxford University Press.
5. **Baldwin, R. L., and H. Roder.** 1991. Characterizing protein folding intermediates. *Curr Biol* **1**:218-20.
6. **Baldwin, R. L., and G. D. Rose.** 1999. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem Sci* **24**:26-33.
7. **Baldwin, R. L., and G. D. Rose.** 1999. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem Sci* **24**:77-83.
8. **Benitez-Cardoza, C. G., A. Rojo-Dominguez, and A. Hernandez-Arana.** 2001. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**:9049-58.
9. **Bilsel, O., J. A. Zitzewitz, K. E. Bowers, and C. R. Matthews.** 1999. Folding mechanism of the alpha-subunit of tryptophan synthase, an alpha/beta barrel protein: global analysis highlights the interconversion of multiple native, intermediate, and unfolded forms through parallel channels. *Biochemistry* **38**:1018-29.
10. **Blacklow, S. C., R. T. Raines, W. A. Lim, P. D. Zamore, and J. R. Knowles.** 1988. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by ³¹P NMR. *Biochemistry* **27**:1158-67.
11. **Brandts, J. F., R. J. Oliveira, and C. Westort.** 1970. Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation of ribonuclease A. *Biochemistry* **9**:1038-47.
12. **Bridgman, P. W.** 1914. Coagulation of Albumen by Pressure. *J Mol Biol* **14**:511-512.
13. **Chalikian, T. V.** 2003. Volumetric properties of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**:207-35.
14. **Chalikian, T. V., and R. Filfil.** 2003. How large are the volume changes accompanying protein transitions and binding? *Biophys Chem* **104**:489-99.
15. **Cisneros Armas, D. A.** 2003. Termodinámica de la disociación de la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba Hystolitica*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
16. **Connolly, M. L.** 1992. Shape distributions of protein topography. *Biopolymers* **32**:1215-36.
17. **Copley, R. R., and P. Bork.** 2000. Homology among (betaalpha)(8) barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J Mol Biol* **303**:627-41.
18. **Crisanti, M. M., and C. R. Matthews.** 1981. Characterization of the slow steps in the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry* **20**:2700-6.
19. **Daggett, V., and A. R. Fersht.** 2003. Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem Sci* **28**:18-25.
20. **Dinner, A. R., A. Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson, and M. Karplus.** 2000. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci* **25**:331-9.
21. **Erijman, L., and G. Weber.** 1991. Oligomeric protein associations: transition from stochastic to

- deterministic equilibrium. *Biochemistry* **30**:1595-9.
22. **Forsyth, W. R., and C. R. Matthews.** 2002. Folding mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: a test of the conservation of folding mechanisms hypothesis in (beta(alpha))(8) barrels. *J Mol Biol* **320**:1119-33.
23. **Frye, K. J., C. S. Perman, and C. A. Royer.** 1996. Testing the correlation between delta A and delta V of protein unfolding using m value mutants of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **35**:10234-9.
24. **Frye, K. J., and C. A. Royer.** 1998. Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure. *Protein Sci* **7**:2217-22.
25. **Garza-Ramos, G., R. Perez-Montfort, A. Rojo-Dominguez, M. T. de Gomez-Puyou, and A. Gomez-Puyou.** 1996. Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem* **241**:114-20.
26. **Gross, M., and R. Jaenicke.** 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur J Biochem* **221**:617-30.
27. **Harris, T. K., R. N. Cole, F. I. Comer, and A. S. Mildvan.** 1998. Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **37**:16828-38.
28. **Hawley, S. A.** 1971. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry* **10**:2436-42.
29. **Herberhold, H., C. A. Royer, and R. Winter.** 2004. Effects of chaotropic and kosmotropic cosolvents on the pressure-induced unfolding and denaturation of proteins: an FT-IR study on staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **43**:3336-45.
30. **Heremans, K.** 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu Rev Biophys Bioeng* **11**:1-21.
31. **Jogl, G., S. Rozovsky, A. E. McDermott, and L. Tong.** 2003. Optimal alignment for enzymatic proton transfer: structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:50-5.
32. **Karplus, M.** 1997. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Fold Des* **2**:S69-75.
33. **Kim, P. S., and R. L. Baldwin.** 1990. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* **59**:631-60.
34. **Knowles, J. R.** 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**:121-4.
35. **Kohlhoff, M., A. Dahm, and R. Hensel.** 1996. Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett* **383**:245-50.
36. **Komives, E. A., L. C. Chang, E. Lolis, R. F. Tilton, G. A. Petsko, and J. R. Knowles.** 1991. Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95. *Biochemistry* **30**:3011-9.
37. **Lambeir, A. M., J. Backmann, J. Ruiz-Sanz, V. Filimonov, J. E. Nielsen, I. Kursula, B. V. Norledge, and R. K. Wierenga.** 2000. The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur J Biochem* **267**:2516-24.
38. **Landa, A., A. Rojo-Dominguez, L. Jimenez, and D. A. Fernandez-Velasco.** 1997. Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* **247**:348-55.
39. **Lolis, E., T. Alber, R. C. Davenport, D. Rose, F. C. Hartman, and G. A. Petsko.** 1990. Structure of yeast triosephosphate

- isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**:6609-18.
40. **Lolis, E., and G. A. Petsko.** 1990. Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry* **29**:6619-25.
 41. **Lolis, E., and G. A. Petsko.** 1990. Transition-state analogues in protein crystallography: probes of the structural source of enzyme catalysis. *Annu Rev Biochem* **59**:597-630.
 42. **Mainfroid, V., S. C. Mande, W. G. Hol, J. A. Martial, and K. Goraj.** 1996. Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**:4110-7.
 43. **Mainfroid, V., P. Terpstra, M. Beauregard, J. M. Frere, S. C. Mande, W. G. Hol, J. A. Martial, and K. Goraj.** 1996. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol Biol* **257**:441-56.
 44. **Matthews, C. R., and M. M. Crisanti.** 1981. Urea-induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase: evidence for a multistate process. *Biochemistry* **20**:784-92.
 45. **McVittie, J. D., M. P. Esnouf, and A. R. Peacocke.** 1977. The denaturation-renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur J Biochem* **81**:307-15.
 46. **Morgan, C. J., D. K. Wilkins, L. J. Smith, Y. Kawata, and C. M. Dobson.** 2000. A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J Mol Biol* **300**:11-6.
 47. **Nagano, N., C. A. Orengo, and J. M. Thornton.** 2002. One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol* **321**:741-65.
 48. **Najera, H., M. Costas, and D. A. Fernandez-Velasco.** 2003. Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J* **370**:785-92.
 49. **Nájera-Peña, H.** 2003. Caracterización cinética y termodinámica del plegamiento y la asociación de la Triosafosfato Isomerasa. PhD. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
 50. **Paladini, A. A., Jr., and G. Weber.** 1981. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry* **20**:2587-93.
 51. **Panick, G., R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frye, and C. A. Royer.** 1998. Structural characterization of the pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of staphylococcal nuclease by synchrotron small-angle X-ray scattering and Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Mol Biol* **275**:389-402.
 52. **Peng, X., J. Jonas, and J. L. Silva.** 1994. High-pressure NMR study of the dissociation of Arc repressor. *Biochemistry* **33**:8323-9.
 53. **Perrett, S., and J. M. Zhou.** 2002. Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochim Biophys Acta* **1595**:210-23.
 54. **Prehoda, K. E., E. S. Mooberry, and J. L. Markley.** 1998. Pressure denaturation of proteins: evaluation of compressibility effects. *Biochemistry* **37**:5785-90.
 55. **Ptitsyn, O.** 1996. How molten is the molten globule? *Nat Struct Biol* **3**:488-90.
 56. **Ptitsyn, O. B.** 1995. How the molten globule became. *Trends Biochem Sci* **20**:376-9.
 57. **Ptitsyn, O. B.** 1995. Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem* **47**:83-229.

58. **Ptitsyn, O. B.** 1995. Structures of folding intermediates. *Curr Opin Struct Biol* **5**:74-8.
59. **Richard, J. P.** 1991. Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance. *Biochemistry* **30**:4581-5.
60. **Rietveld, A. W., and S. T. Ferreira.** 1996. Deterministic pressure dissociation and unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**:7743-51.
61. **Rietveld, A. W., and S. T. Ferreira.** 1998. Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* **37**:933-7.
62. **Rodriguez-Romero, A., A. Hernandez-Santoyo, L. del Pozo Yauner, A. Kornhauser, and D. A. Fernandez-Velasco.** 2002. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* **322**:669-75.
63. **Royer, C. A.** 2002. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta* **1595**:201-9.
64. **Rozovsky, S., G. Jogl, L. Tong, and A. E. McDermott.** 2001. Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: ligand release in relation to active site loop dynamics. *J Mol Biol* **310**:271-80.
65. **Rozovsky, S., and A. E. McDermott.** 2001. The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **310**:259-70.
66. **Ruan, K., and G. Weber.** 1988. Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure. *Biochemistry* **27**:3295-301.
67. **Saab-Rincon, G., C. L. Froebe, and C. R. Matthews.** 1993. Urea-induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase: one-dimensional proton NMR evidence for residual structure near histidine-92 at high denaturant concentration. *Biochemistry* **32**:13981-90.
68. **Schliebs, W., N. Thanki, R. Jaenicke, and R. K. Wierenga.** 1997. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**:9655-62.
69. **Shukla, A., and P. Guptasarma.** 2004. Folding of beta/alpha-unit scrambled forms of *S. cerevisiae* triosephosphate isomerase: Evidence for autonomy of substructure formation and plasticity of hydrophobic and hydrogen bonding interactions in core of (beta/alpha)8-barrel. *Proteins* **55**:548-57.
70. **Silva, J. L., D. Foguel, and C. A. Royer.** 2001. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci* **26**:612-8.
71. **Silva, J. L., M. Villas-Boas, C. F. Bonafe, and N. C. Meirelles.** 1989. Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J Biol Chem* **264**:15863-8.
72. **Silverman, J. A., and P. B. Harbury.** 2002. The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha)8 barrel. *J Mol Biol* **324**:1031-40.
73. **Suzuki, K., Y. Miyosawa, and C. Suzuki.** 1963. Protein denaturation by high pressure. Measurements of turbidity of isoelectric ovalbumin and horse serum albumin under high pressure. *Arch Biochem Biophys* **101**:225-8.
74. **Tanaka, N., Kunugi, S.** 1996. Structure of pressure-induced "denatured" state of proteins. *High Pressure Bioscience and Biotechnology* **1**:153- 156.
75. **Tanaka, N., K. Nakajima, and S. Kunugi.** 1996. The pressure-induced structural change of bovine alpha-lactalbumin as studied by a

- fluorescence hydrophobic probe. *Int J Pept Protein Res* **48**:259-64.
76. **Vazquez-Contreras, E., Zubillaga, R.A., Mendoza-Hernandez, G., Costas, M., Fernandez-Velasco, D.A.** 2000. Equilibrium unfolding of yeast Triose Phosphate isomerase: A monomeric intermediate in Guanidine-HCl and Two-State Behavior in Urea. *Protein and Peptide Letters* **7**.
77. **Yidugiris, G. J., D. M. Truckses, J. L. Markley, and C. A. Royer.** 1996. High-pressure denaturation of staphylococcal nuclease proline-to-glycine substitution mutants. *Biochemistry* **35**:3857-64.
78. **Wierenga, R. K., M. E. Noble, and R. C. Davenport.** 1992. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **224**:1115-26.
79. **Wierenga, R. K., M. E. Noble, G. Vriend, S. Nauche, and W. G. Hol.** 1991. Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J Mol Biol* **220**:995-1015.
80. **Xiang, J., J. Sun, and N. S. Sampson.** 2001. The importance of hinge sequence for loop function and catalytic activity in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **307**:1103-12.
81. **Zhou, J. M., L. Zhu, and C. Balny.** 2000. Inactivation of creatine kinase by high pressure may precede dimer dissociation. *Eur J Biochem* **267**:1247-53.
82. **Zhou, J. M., L. Zhu, C. Balny, and S. Perrett.** 2001. Pressure denaturation of the yeast prion protein Ure2. *Biochem Biophys Res Commun* **287**:147-52.
83. **Zipp, A., and W. Kauzmann.** 1973. Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry* **12**:4217-28.
84. **Jasanoff A, Davis B, Fersht AR.** 1994. Detection of an intermediate in the folding of the (beta alpha)8-barrel N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **33**(20):6350-5.
85. **Sanchez del Pino MM, Fersht AR.** 1997. Nonsequential unfolding of the alpha/beta barrel protein indole-3-glycerol-phosphate synthase. *Biochemistry*. **36**(18):5560-5.
86. **Chanez-Cardenas M.E., Fernandez-Velasco D.A., Vazquez-Contreras E., Coria R., Saab-Rincon G., Perez-Montfort R.** 2002. Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch Biochem Biophys*. **399**(2):117-29.
87. **Liang J., Edelsbrunner H., Woodward C.,** 1998, Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci*. **7**(9):1884-97.
88. **Lakowickz J.R.,** 1999, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers.