

03081  
9  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

***"El agua en la renaturalización de enzimas. Plegamiento y Asociación de la  
Triosafofato Isomerasa en micelas invertidas."***

**Daniel Alejandro Fernández Velasco**

Tesis para obtener el grado de:

**Doctor en Investigación Biomédica Básica  
(Orientación: Bioquímica )**

México, D.F.  
(1995)

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Daniel Alejandro Fernández Velasco  
Doctorado en Investigación Biomédica Básica

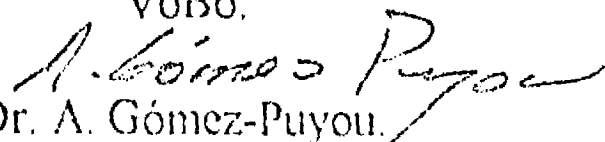
En este trabajo se estudia la posibilidad de utilizar micelas invertidas, para estabilizar intermediarios monoméricos en la formación de la enzima dimérica triosafosfato isomerasa (TPI). La TPI desnaturalizada por cloruro de guanidina, se reactiva al diluir el desnaturalizante mediante la transferencia de la enzima a micelas invertidas formadas por *n*-octano, hexanol, bromuro de cetiltrimetilamonio, y agua. Cuando la concentración de TPI en las micelas es cercana a 2µg/mL y el contenido de agua es mayor al 4.0%, se observa reactivación cercana al 80%. En 3.0% de agua, la reactivación es cercana al 10%. Si la TPI desnaturalizada, se incubaba en micelas invertidas con un contenido de agua igual o mayor al 5.0% por unos cuantos segundos y posteriormente se disminuye el contenido de agua a 3.0%; se obtiene una reactivación entre el 35 y el 50%. Esto es, una breve exposición de la TPI desnaturalizada a micelas invertidas con concentraciones de agua elevada, producen una cantidad significativa de estructuras competentes para la formación de dímeros catalíticamente activos. De acuerdo a datos cinéticos (Garza-Ramos G., Tuena de Gómez Puyou, M., Gómez-Puyou A., & Gracy R.W. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 389-395), estas estructuras corresponden a monómeros de la TPI. Después de una transición de 5 a 2% de agua, los monómeros competentes se estabilizan por al menos 30 minutos; el aumento posterior en la cantidad de agua, da lugar a la dimerización y aparición de la actividad catalítica. Modificando la cantidad de agua en las micelas invertidas, fue posible determinar que la cantidad de agua necesaria para el plegamiento del monómero es mayor a la requerida para la dimerización. Experimentos con un sistema modelo, muestran que en micelas invertidas con 2.0 % de agua, las interacciones proteína-proteína tienen lugar. Por lo tanto, la ausencia de dimerización de la TPI en micelas con esta concentración de agua, sugiere que después de la colisión, los monómeros que interactúan, deben sufrir rearrreglos conformacionales que resultan en la formación del dímero catalíticamente activo. Cuando la concentración de agua es de 6.0%, el espectro de fluorescencia intrínseca de la TPI nativa, desnaturalizada, o el de los monómeros competentes para la dimerización, son diferentes. En el curso temporal durante la reactivación, la fluorescencia intrínseca y la aparición de la actividad cambian en paralelo. No se detectaron diferencias en la fluorescencia intrínseca de los conformeros competentes e improductivos, ambos espectros se modifican con el contenido de agua. La falta de interconversión entre los monómeros competentes y los dímeros activos en micelas invertidas con un contenido de agua bajo, sugieren que en estas condiciones; existe una barrera cinética entre ambos estados.

Vo.Bo.  
Dr. A. Gómez-Puyou

FALLA DE ORIGEN

Daniel Alejandro Fernández Velasco  
Doctorado en Investigación Biomédica Básica

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

VoBo.  
  
Dr. A. Gómez-Puyou.

FALLA DE ORIGEN

**A mi familia.**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Armando Gómez-Puyou.**

**Los experimentos de fluorescencia intrínseca fueron realizados en colaboración con la M. en B. Marisa Sepúlveda y el Dr. A. Darszon del Instituto de Biotecnología de la UNAM**

**El sustentante recibió becas de DGAPA UNAM y del SNI durante el desarrollo del trabajo descrito y la elaboración de la presente tesis.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Gómez-Puyou y la Dra. Marietta Tuena.

A los cuates (especialmente a los del laboratorio y a Héctor)

A Rosy.

A Adrián.

## INDICE

INTRODUCCION.....	3
PLEGAMIENTO Y ASOCIACION.....	5
-Estabilidad de la conformación nativa.....	6
-Hidratación y plegamiento.....	7
-Asociación e Hidratación.....	13
-Intermediarios estables.....	15
-Cinética y rutas de plegamiento.....	15
-Cinética de renaturalización de oligómeros.....	17
INTERACCIONES AGUA-PROTEINA.....	20
-Modificaciones en la hidratación.....	25
-Micelas invertidas.....	27
-Comportamiento enzimático en micelas invertidas.....	28
TRIOSA FOSFATO ISOMERASA.....	32
-Plegamiento y asociación de la TPI en sistemas acuosos.....	38
-Plegamiento y asociación de la TPI en micelas invertidas.....	39
OBJETIVOS.....	41
RESULTADOS.....	
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	46

## INTRODUCCION

Para ser biológicamente activas, las proteínas deben adoptar una conformación particular. Al modificar las condiciones del solvente es posible modificar el arreglo no covalente entre la proteína y el solvente hacia un estado carente de estructura tridimensional específica. La transición entre ambos estados puede realizarse *in vitro* de manera reversible, por lo tanto, la estructura tridimensional está determinada por la información genética contenida en la estructura primaria. La segunda parte del código genético, esto es, el mecanismo por el cual la estructura primaria determina la estructura tridimensional es aún *terra incognita*. En términos generales, el plegamiento involucra el rearrreglo de la cadena polipeptídica y las moléculas de agua presentes en la solución. El trabajo que se presenta a continuación, está centrado en la manipulación del plegamiento y la asociación de subunidades al modificar la cantidad de agua en contacto con una enzima oligomérica

La introducción consta de tres secciones:

I) Plegamiento y asociación de proteínas. Estudios al equilibrio para determinar la contribución de la hidratación en ambos fenómenos. Intermediarios estables. Cinética y rutas de plegamiento en monómeros y oligómeros.



**II) Características estructurales de las interacciones agua-proteína. Consecuencias funcionales de la hidratación. Micelas invertidas y solventes orgánicos. Comportamiento enzimático en micelas invertidas.**

**III) Triosafofato isomerasa. Propiedades estructurales y mecanismo catalítico. Reactivación en soluciones acuosas y en micelas invertidas.**

## PLEGAMIENTO Y ASOCIACION

La traducción del material genético en el ribosoma produce cadenas sin estructura que adoptan, generalmente de manera espontánea, la estructura tridimensional que les permite reconocer y/o transformar a una molécula entre las miles que componen la célula. En algunos casos, el plegamiento al estado nativo requiere la ayuda catalítica de otras proteínas, como la peptidil prolil cis-trans isomerasa y la proteína isomerasa de disulfuros; mientras que otro grupo de proteínas conocidas como chaperoninas, evitan la agregación irreversible de las proteínas durante condiciones ambientales extremas (Freedman 1992). Existen sin embargo, numerosos ejemplos en los que la adquisición de la conformación nativa a partir de la cadena sin estructura puede reproducirse *in vitro* de manera autónoma, sin información adicional o entrada de energía (Tanford 1968, Pace 1975, Creighton 1993).. La adquisición y estabilidad de estas estructuras está entonces determinada por la secuencia lineal de aminoácidos y las condiciones del solvente (Anfinsen 1973).

Durante la formación de la estructura activa, algunas proteínas unen con alta afinidad a otras proteínas. Como resultado de esta unión, se hacen posibles los cambios conformacionales requeridos para la adopción o regulación de una actividad biológica específica. De hecho, es necesario señalar que buena parte de las reacciones catalizadas en la célula se llevan a cabo por enzimas oligoméricas. En la formación de oligómeros biológicamente activos, tienen lugar el plegamiento intramolecular y la asociación entre subunidades. El plegamiento de estas proteínas es especialmente interesante, ya que en la gran mayoría la función biológica está regulada por las interacciones entre subunidades (Jaenicke 1987).

### **Estabilidad de la conformación nativa.**

Pequeñas variaciones en las condiciones ambientales causan alteraciones conformacionales localizadas que no perturban significativamente la estructura nativa de las proteínas. Sin embargo, si el cambio en alguna variable (temperatura, pH, presión, o concentración de desnaturizante) excede un valor crítico, la proteína se desnatura cooperativamente (Creighton 1993). Cuando el solvente se modifica hacia condiciones fisiológicas, la proteína desplegada se renaturaliza espontáneamente; por lo que la adopción de la estructura nativa es reversible. En estas condiciones, la transición está determinada por las diferencias en energía entre los estados. (Privalov 1992).

En proteínas globulares pequeñas, el paso entre el estado nativo y el desnaturizado es monofásico, el cambio en la señal observada se ajusta a una sola transición. En algunos casos se ha encontrado que la función biológica y diversas señales estructurales cambian de manera simultánea (Pace 1975); por lo tanto, al aumentar la condición desnaturizante se modifica solamente la proporción entre proteínas en el estado nativo y en el desnaturizado, sin la presencia significativa de estructuras intermedias estables. El plegamiento puede entonces ser descrito como la transición reversible entre dos estados N (Nativo) y D (Desnaturizado) (Privalov, 1992). Para un conjunto de condiciones ambientales definidas (temperatura, pH, presión y concentración de solutos), es posible determinar la relación de estas dos poblaciones en el equilibrio:  $K_{eq} = [N] [D]^{-1}$

A partir de la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ), es posible calcular la estabilidad de la conformación nativa, esto es, el trabajo implicado en la formación o ruptura de esta estructura, a partir de la diferencia en energía libre ( $\Delta G^0$ ) entre el estado nativo y el desnaturizado.

$\Delta G^0 = G^0_{\text{Nat}} - G^0_{\text{Dca}} = -RT \ln K_{\text{eq}}$ , en donde T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases ideales.

Tanford (1968) propuso que el estado desnaturalizado se define operacionalmente como el resultante del deterioro cooperativo y generalizado de la estructura nativa, sin cambios en la estructura covalente. Esta definición no especifica las condiciones de desnaturalización. Sin embargo, el  $\Delta G$  es una propiedad de estado, y por tanto su valor debe ser independiente de la variable que se utilice para modificar la reacción, siempre y cuando el estado final (proteína nativa) y el estado inicial (proteína desnaturalizada) sean iguales en las diferentes condiciones. En la ribonucleasa T1, el valor del  $\Delta G^0$  a pH 7.0 obtenido ya sea por desnaturalización térmica, o mediante experimentos independientes de desnaturalización química (concentraciones elevadas de urea); muestra una diferencia del 2% (Hu *et al*, 1992) por lo tanto, los estados sin estructura definida, producidos por diversos agentes desnaturalizantes, son termodinámicamente equivalentes. Esto no implica que los conformeros producidos mediante extremos de temperatura o mediante diversos agentes químicos sean iguales; de hecho, la cadena desdoblada puede unir, con diferente afinidad y en diferentes regiones, detergentes o desnaturalizantes; sin embargo, las diferencias en energía entre estos conformeros es despreciable en relación a la diferencia de energías entre el estado nativo y el desnaturalizado (Dill y Shortle 1991).

### **Hidratación y plegamiento**

El número de conformeros posibles en el estado desnaturalizado es muy alto, por lo que el plegamiento a una conformación específica en el estado nativo trae consigo un aumento en el

orden del sistema. El aumento en las restricciones conformacionales durante el plegamiento, origina una disminución en la entropía de la cadena polipeptídica ( $S_{\text{Conf Nat}} < S_{\text{Conf Desn}}$ ;  $\Delta S_{\text{conf}} < 0$ ). En condiciones fisiológicas, el plegamiento es una reacción espontánea ( $G_{\text{Nat}} < G_{\text{Desn}}$ ;  $\Delta G < 0$ ). La disminución en la entropía de la cadena se opone al plegamiento ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ )<sup>1</sup>. En consecuencia, los cambios desfavorables debidos a las restricciones de la cadena se compensan energéticamente por las nuevas interacciones intraproteicas y la expulsión de las moléculas de agua del solvente cuando se forma la estructura compacta. (Privalov 1992).

Las interacciones favorables y desfavorables al estado nativo, se han estudiado por medio del análisis termodinámico de la desnaturalización por temperatura (Privalov 1979, 1982).

La capacidad calorífica a presión constante ( $C_p$ ) determina la energía necesaria para aumentar la temperatura de una solución ( $C_p = (\partial H / \partial T)_p$ ). Numerosos estudios calorimétricos de la desnaturalización de proteínas pequeñas (20 kDa) inducida por temperatura, muestran que la  $C_p$  de las proteínas nativas aumenta linealmente con la temperatura. Cuando la temperatura excede un valor crítico, la desnaturalización de la proteína se hace aparente como un pico definido de absorción de calor. A temperaturas mayores (cuando la proteína se encuentra completamente desnaturalizada), la  $C_p$  de la proteína es mayor que en el estado nativo (Privalov 1992). A nivel molecular, las diferencias en energía entre el estado nativo y el desnaturalizado se deben únicamente al rearrreglo no covalente de los átomos de la proteína y el solvente. Durante la desnaturalización tiene lugar la solvatación generalizada de la mayor parte de la molécula, mientras que durante el plegamiento, algunas interacciones solvente-proteína se remplazan por interacciones intramoleculares. La  $C_p$  determinada para el estado nativo y el desnaturalizado,

---

<sup>1</sup> $\Delta H$  Cambio en entalpía.

son cercanas a la sumatoria de las contribuciones de compuestos modelo de la cadena polipeptídica y las cadenas laterales expuestas al solvente en ambos estados (el área expuesta en el estado nativo se determina a partir de la estructura cristalográfica, mientras que para el cálculo sobre el estado desnaturalizado, se utiliza una cadena extendida) (Privalov 1992).

El valor de la  $C_p$  de las proteínas está gobernada por el área no polar expuesta al agua, i.e. el cambio positivo en la  $C_p$  durante la desnaturalización, (aprox  $1.8 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) es proporcional al área no polar escondida en el interior de la proteína nativa y expuesta al solvente durante la desnaturalización (Privalov y Makhatadze 1990). La capacidad calorífica determina la dependencia de la entropía y la entalpía con respecto a la temperatura<sup>2</sup>. Ya que la  $C_p$  de la proteína en el estado nativo y en el desnaturalizado es grande, la entalpía ( $H$ ) y el término entrópico ( $TS$ ) de estos estados varían hasta en  $700 \text{ kcal mol}^{-1}$  en el intervalo entre  $0$  y  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 1 A,B); los cambios en ambas variables se cancelan, de manera que la energía libre resultante (Figura 1 C), es un orden de magnitud menor; la estabilidad neta, obtenida de la diferencia en energía libre entre el estado nativo y el desnaturalizado, es cercana a las  $-15 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Figura 1 D). El cálculo de la estabilidad neta de la conformación nativa en términos de las interacciones primarias que la estabilizan, resulta complicado; un error del 2% en un término de  $700 \text{ kcal/mol}$ , es de magnitud equivalente a la máxima estabilidad observada (Creighton 1993).

---

<sup>2</sup> $C_p = (\partial H / \partial T)_p = (T \partial S / \partial T)$

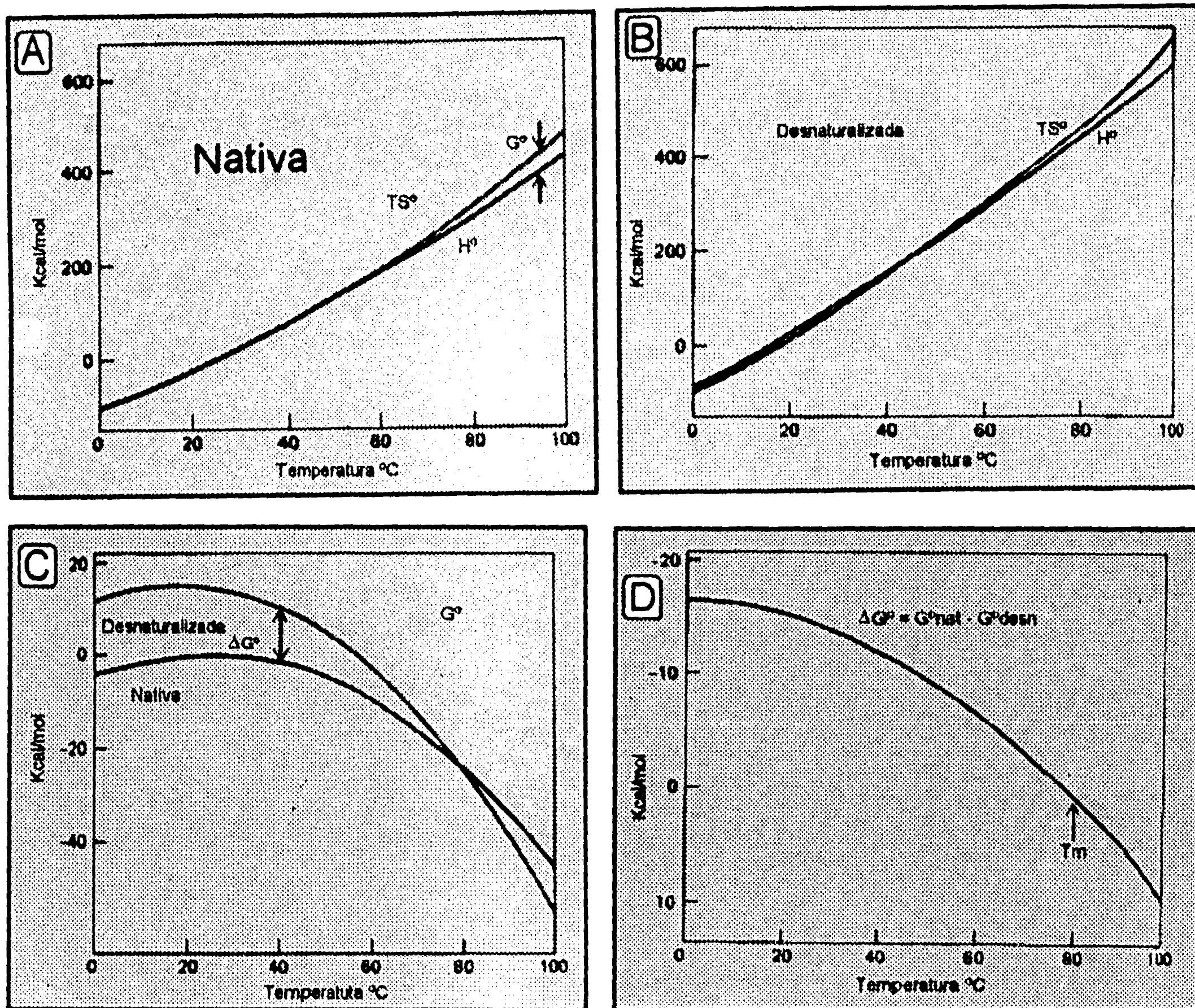


Figura 1. Parámetros termodinámicos de las formas nativa y desnaturalizada de la lisozima como función de la temperatura. Contribuciones entálpica y entrópica para la lisozima nativa (A) y desnaturalizada (B). Energía Libre de ambos estados (C). Diferencia de energías debida al plegamiento (D). Tomado de Creighton 1992. Datos originales de Pfeil y Privalov 1976.

El  $\Delta G$  entre la proteína nativa y la desnaturalizada muestra un máximo como función de la temperatura<sup>1</sup>. Las proteínas se desnaturalizan "por frío" (a temperaturas cercanas o inferiores a

<sup>1</sup>El máximo se obtiene en  $(\partial\Delta G/\partial T)_p = -\Delta S = 0$

los 0°C.) y "por calor" a temperaturas superiores al máximo en estabilidad. La máxima estabilidad se obtiene cuando  $S_{\text{Nat}} = S_{\text{Des}}$ . A esta temperatura, la estabilidad de la proteína está dada por la diferencia en entalpía entre el estado nativo y el desnaturalizado. La desnaturalización por frío es exotérmica, sin embargo, el  $\Delta C_p$  es similar al obtenido al desnaturalizar a temperaturas elevadas; de esta manera, los estados desnaturalizados por ambos extremos de temperatura son indistinguibles entre sí desde el punto de vista termodinámico (Griko *et al* 1988).

La desnaturalización de proteínas muestra características comunes a la disolución de solutos no polares en agua (Kauzmann 1959): En ambos casos: 1) El  $\Delta C_p$  es elevado (por lo que  $\Delta H$  y  $\Delta S$  dependen fuertemente de la temperatura), 2) El comportamiento de  $\Delta G$  vs temperatura presenta un máximo (por lo que existe una temperatura de máxima estabilidad correspondiente a un mínimo en la solubilidad de los solutos no polares) y 3) Existe una temperatura  $T_S^*$  (cercana a los 100 °C); en la que  $\Delta S$  muestra valores semejantes para diferentes solutos no polares o para diferentes proteínas; de manera semejante,  $\Delta H$  muestra un valor común a la temperatura  $T_H^*$  (Privalov y Gill 1988). Debido a estas similitudes, se han propuesto modelos en los que la dependencia con temperatura de la solvatación del interior no polar de la proteína se compara con la transferencia al agua de cristales o líquidos no polares (Baldwin 1986, Privalov y Gill 1988, Murphy y Gill 1991). Existe controversia entre los modelos presentados, y en el papel de la hidratación en los parámetros termodinámicos mencionados (Murphy *et al* 1990, Muller 1990, Costas *et al* 1994)

Recientemente Privalov y Makhatadze (1993) calcularon, a partir de información estructural y datos experimentales de transferencia de compuestos modelo, los cambios



energéticos asociados a la hidratación en la desnaturalización. En este análisis, la hidratación de los grupos polares y los aromáticos desestabiliza al estado nativo, mientras que la hidratación de las cadenas laterales alifáticas favorece al estado plegado. Las interacciones favorables al plegamiento (puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals), casi no varían con temperatura, mientras que el componente entrópico aumenta en magnitud al aumentar la temperatura. Esto causa la desnaturalización a temperaturas elevadas, mientras que la hidratación de los grupos polares y no polares aumenta en magnitud al disminuir la temperatura, causando la desnaturalización por frío (Figura 2).

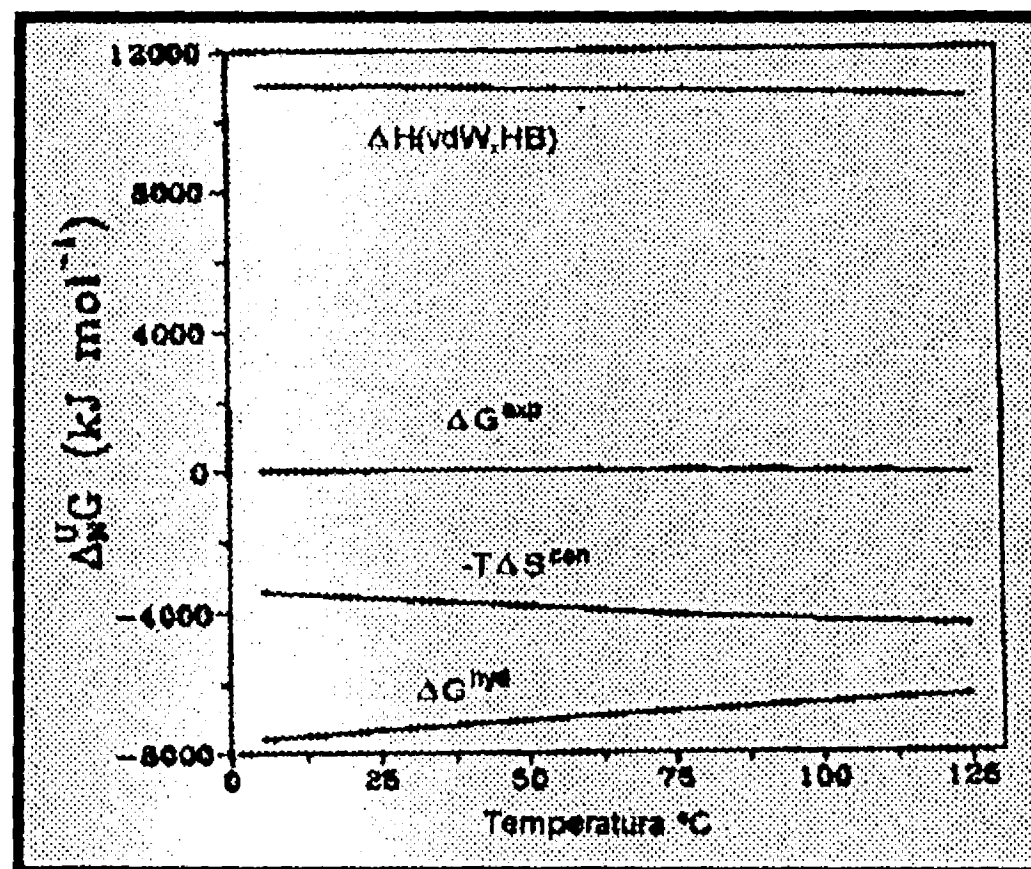


Figura 2. Contribución de varios factores en la energía libre de desnaturalización de la mioglobina.  $\Delta G^{\text{exp}}$  Valor experimental;  $\Delta G^{\text{hyd}}$  Cambio en energía libre debido a la hidratación de grupos polares y no polares.  $-T\Delta S^{\text{con}}$  Fuerzas disipativas debidas a la entropía configuracional;  $\Delta H(\text{vdW}, \text{HB})$  cambio en entalpía debido a la ruptura de interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno entre los grupos de la proteína. Tomado de Privalov y Makhatadze 1993.

La contribución relativa de los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals a la estabilidad no es clara, cada puente de hidrógeno contribuye con aproximadamente

1.3 ( $\pm 0.6$ ) kcal mol<sup>-1</sup> a la estabilidad de la estructura nativa (Shirley *et al* 1992),. No existe consenso en cuanto a la magnitud del efecto hidrofóbico; el valor más aceptado a partir de experimentos de transferencia entre fases es de 25 a 30 cal mol<sup>-1</sup>Å<sup>-2</sup> (equivalente a 1.3 kcal mol CH<sub>3</sub><sup>-1</sup>) (Pace 1992); aunque en algunos estudios con mutagénesis dirigida se reportan valores equivalentes (Matthews 1993), en otros casos se sugiere que este valor puede ser dos o tres veces mayor (Fersht y Serrano 1993).

#### **Asociación e Hidratación:**

En las proteínas oligoméricas, la desnaturalización por temperaturas elevadas presenta problemas de agregación irreversible, por lo que el equilibrio oligómero/monómero se ha estudiado principalmente perturbando el equilibrio al aumentar la presión hidrostática (Silva y Weber 1993). Al aumentar la presión, a temperatura constante, la constante de equilibrio se modifica hacia los productos de menor volumen de acuerdo a:

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

La ruptura de puentes de hidrógeno se acompaña de un cambio pequeño ( $\pm 1.0$  mL mol<sup>-1</sup>) en el volumen del sistema, positivo o negativo dependiendo del sistema modelo utilizado. En solución, disminuye la formación de pares iónicos al aumentar la presión; la disminución en el volumen se debe al efecto electrorrestrictivo de las cargas dissociadas en las moléculas de agua vecinas (Gross y Jaenicke 1994). La hidratación de grupos hidrofóbicos se favorece al aumentar la presión, ya que la exposición de estos grupos al agua forma una capa de hidratación cuya densidad predicha es mayor a la del agua libre (Kauzmann 1959)<sup>4</sup>. La estructura cuaternaria es

---

<sup>4</sup>En la sección "Interacciones agua-proteína" se detallan las características del agua en contacto con los grupos polares y no polares.

más sensible a la presión que la estructura secundaria o terciaria; es decir, las proteínas oligoméricas se disocian a presiones que generalmente no alteran ni la estructura secundaria ni la terciaria de los monómeros (Silva y Weber 1993, Gross y Jaenicke 1994 ). Sin embargo, en oligómeros de bajo peso molecular, la integridad de la estructura terciaria puede verse comprometida en la ausencia de interacciones entre cadenas . En este caso, los monómeros muestran características similares a los "glóbulos fundidos"<sup>5</sup> que se han encontrado en condiciones cercanas a la transición nativo ↔ desnaturalizado en proteínas monoméricas (Silva *et al* 1992, Ptitsyn 1992). La desnaturalización y disociación de proteínas se favorece al aumentar la presión. En los dímeros estudiados, el cambio en volumen debido a la hidratación de la interfase expuesta en los monómeros oscila entre 55 y 170 mL mol<sup>-1</sup> ( Silva y Weber 1993).

Mediante la extrapolación a presión atmosférica de la constante de disociación oligómero-monómero obtenida a diferentes presiones, es posible determinar el  $\Delta G$  de asociación. Los valores reportados oscilan entre -9.5 y -14.2 kcal mol<sup>-1</sup> para dímeros y entre -28.1 y -36.3 kcal mol<sup>-1</sup> para tetrámeros (Silva y Weber 1993). Modificando la temperatura a la cual se obtiene el  $\Delta G$ , es posible calcular mediante la ecuación de van't Hoff, los componentes entrópico y entálpico de la disociación (Weber 1992) . Al igual que en las proteínas monoméricas,<sup>6</sup> en el intervalo de temperatura estudiado (0-25 °C), la estabilidad de los oligómeros disminuye con la temperatura. En la mayoría de los casos, el término entálpico favorece la disociación ( $\Delta H > 0$ ), por lo tanto; la asociación es espontánea debido al aumento en entropía. Ya que la asociación de dos cuerpos disminuye la entropía del sistema; se ha propuesto (Weber 1993) que el aumento en S

---

<sup>5</sup>Sección "Intermediarios estables".

<sup>6</sup>Sección "Hidratación y plegamiento"

durante la asociación, se debe a la conversión de los enlaces proteína-agua en la interfase de los monómeros a enlaces proteína-proteína y agua-agua en el dímero (Weber 1993).

### **Intermediarios Estables**

El plegamiento de proteínas monoméricas es generalmente un proceso de dos estados, en el que los estados intermedios son inestables en relación a los estados nativo o desnaturalizado. Sin embargo, en pH ácido (1-3) y fuerza iónica elevada, o a concentraciones de guanidina cercanas a la transición nativo/desnaturalizado; algunas proteínas, como la  $\alpha$  lactalbumina, la anhidrasa carbónica y la  $\beta$ -lactamasa, muestran conformaciones parcialmente plegadas (Kuwajima 1989). Las estructuras que prevalecen en estas condiciones son compactas, con cierta estructura secundaria estable, sin interacciones terciarias fijas y con los grupos aromáticos expuestos al solvente. A este tipo de intermediarios se les aplica el nombre general de "glóbulos fundidos" (en inglés molten globules) (Kuwajima 1989, Christensen y Pain 1991, Dobson 1992). El interés por caracterizar la estructura presente en los glóbulos fundidos (Hughson *et al* 1990), radica en las posibles semejanzas entre este estado y los conformeros iniciales en la ruta del plegamiento.

### **Cinética y rutas de plegamiento**

El número de conformaciones que una cadena polipeptídica puede adoptar es astronómico, por lo que la adquisición de la estructura nativa por un mecanismo al azar, explorando todos los conformeros posibles, tomaría un tiempo mayor que la edad del universo. A pesar de esto, las proteínas se pliegan en segundos. Esta observación conocida como la paradoja

de Levinthal, sugiere que existen rutas preferenciales de plegamiento. Esto es, de todos los estados posibles de la cadena, sólo algunos son relevantes, aquellos cinéticamente accesibles en la escala de tiempo del plegamiento. La magnitud de las constantes de velocidad de las transiciones entre conformeros determinan entonces la secuencia de eventos que guían a la proteína hacia el estado nativo (Dill 1993). El establecimiento de un mecanismo cinético para la desnaturalización o la renaturalización es uno de los primeros pasos en la elucidación de la ruta de plegamiento de una proteína. Posteriormente, los intermediarios cinéticos y los estados de transición entre ellos se pueden definir en términos de estructura, estabilidad y posición en la ruta de plegamiento. En la práctica, el enfoque cinético sufre algunas limitaciones. 1) Solamente los intermediarios anteriores a los pasos lentos se pueden estudiar. 2) Los estudios estructurales se dificultan por la naturaleza transitoria de los intermediarios. 3) La cooperatividad del plegamiento, particularmente en las enzimas con un sólo dominio, limita el número de conformeros observables (Schmid 1992).

Los datos experimentales sobre plegamiento obtenidos por diversos métodos espectroscópicos, se resumen (Schmid 1992 y referencias incluidas) en la siguiente ruta consenso:

El plegamiento probablemente inicia con la formación de elementos aislados de estructura secundaria. Estos eventos son muy rápidos ( $<5$  ms) y tienen lugar en el tiempo muerto de los espectrofotómetros de flujo detenido. En analogía al plegamiento de péptidos modelo y de segmentos de la proteína, la estabilidad de estos conformeros debe ser baja, con alta velocidad de interconversión. En la siguiente paso (5 ms a 1 seg), los elementos de estructura secundaria colapsan para formar intermediarios con características similares al glóbulo fundido; no es claro si estos conformeros presentan interacciones terciarias. Los experimentos de pulso e intercambio

deuterio-hidrógeno seguidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) muestran un aumento considerable en la protección de los protones de las amidas. Estos primeros eventos del plegamiento tienen lugar en cadenas con prolinas en los isómeros correctos o incorrectos. El grado de desarrollo del interior hidrofóbico no es claro, pero ciertas interacciones hidrofóbicas deben existir para facilitar el empaquetamiento. Sin embargo, las señales de fluorescencia muestran que los aminoácidos aromáticos se encuentran en contacto con el solvente. De la unión de colorantes a estos intermediarios, se sugiere que existen "parches hidrofóbicos" en la superficie. Las fuerzas que originan el colapso no son claras. Posiblemente, la formación de los primeros puentes de hidrógeno coopera con la formación de regiones hidrofóbicas para dirigir a la proteína hacia la geometría correcta. En el paso limitante del plegamiento ( $\Delta G^\ddagger = 20-30 \text{ kcal mol}^{-1}$ )<sup>7</sup>, se observan cambios en la absorbancia de los residuos aromáticos, lo cual sugiere que en este paso tiene lugar el empaquetamiento del interior de la proteína y la deshidratación cooperativa de las regiones hidrofóbicas. En el caso de las cadenas con isómeros incorrectos en las prolinas, la isomerización puede tener lugar en cualquiera de los eventos mencionados, dependiendo de la localización de la prolina en la estructura y de las condiciones de renaturalización (Schmid 1992).

#### **Cinética de renaturalización de oligómeros.**

Los oligómeros funcionales más estudiados son dímeros o tetrámeros, pero también existen estudios con agregados de orden mayor (Jaenicke 1987). Siguiendo en paralelo la cinética de los cambios en estructura y función, es posible determinar: 1) La adquisición de estructura y/o actividad catalítica en las subunidades aisladas, así como la estabilidad de estos intermediarios. 2)

---

<sup>7</sup> $\Delta G^\ddagger$  = Energía de activación.

La especificidad de la asociación y por último 3) El plegamiento y las consecuencias funcionales a la asociación (Jaenicke 1987).

En términos generales, cada reacción de asociación esta flanqueada por dos pasos de plegamiento. En el primero se forman las interfases que posibilitan el reconocimiento entre las subunidades. En el paso posterior a la asociación, la conformación de la proteína se modifica como resultado de las nuevas interacciones en la interfase. La constante de velocidad y las diferencias en energía entre los diferentes conformeros determinan, por lo tanto, la evolución temporal de las poblaciones, así como la aparición de intermediarios estables (Jaenicke 1987).

Ya que el plegamiento de un oligómero es la sucesión de pasos unimoleculares y bimoleculares, el orden de la reacción determina el paso limitante en la formación de la estructura nativa. Si la formación del oligómero nativo está controlada por un paso bimolecular, la velocidad de renaturalización depende de la concentración de proteína; si no es así, y el paso limitante es unimolecular, es necesario seguir la evolución temporal del sistema por varios métodos para determinar si el paso limitante es anterior o posterior a la asociación. Cuando el plegamiento está limitado por la concentración de proteína, se acumulan intermediarios con segmentos de la cadena plegados, pero no apareados. La presencia de estos intermediarios origina una competencia entre la asociación y la agregación incorrecta (Jaenicke 1987, Schmid 1992). Muchos oligómeros muestran este comportamiento: varias deshidrogenasas ( Krebs *et al*, 1979, Herman *et al*, 1981, Vaucheret *et al*, 1987), la aspartato transcarbamilasa (Burns y Schachman 1982 a,b), la triptofano sintasa (Blond y Goldenberg 1986), la fosfoglicerato mutasa (Herman *et al*, 1983) y la fosfofructocinasa (Le Bras *et al*, 1989).

Existen otras proteínas oligoméricas, tipificadas por el represor de *trp* (Gittelman y Matthews 1990), la proteína trimérica "tailspike" ( Goldenberg y King 1982), y el represor de

Arc (Milla y Sauer 1994), en los que el plegamiento y la asociación son procesos concertados, sin la aparición de intermediarios monoméricos plegados. Esto se debe probablemente, a requerimientos intercadena en la estabilidad de las interacciones terciarias (Milla y Sauer 1994).



## **INTERACCIONES AGUA PROTEÍNA.**

Kyte (1995), presenta una revisión sobre diversas metodologías que permiten calcular la cantidad de agua afectada en sus propiedades físicas por su interacción con la proteína. El número de moléculas de agua que forman esta red, se denomina  $\delta_{H_2O}$  o  $h$  y expresa los gramos de agua perturbados por cada gramo de proteína. Los valores obtenidos varían alrededor de 0.2-0.4 g g<sup>-1</sup>, mostrando que  $h$  depende de la propiedad medida. El agua de hidratación equivale a 200-300 moléculas de agua para una proteína de 100-150 amino ácidos. Suponiendo que cada molécula de agua cubre 7-9 Å<sup>2</sup> en la superficie de la proteína, Kyte estima que se obtiene una monocapa de agua cuando  $h$  es cercana a 0.9-1.2 ; concluye entonces, que el agua de hidratación perturbada por la proteína en solución, es considerablemente menor a la necesaria para formar una monocapa.

La hidratación de la proteína, y en particular la hidratación de los grupos no polares, juegan un papel central en la descripción termodinámica de la desnaturalización de proteínas. La descripción estructural del agua en la vecindad de los grupos polares y no polares de las proteínas, permite determinar si existen diferencias geométricas o dinámicas en la hidratación de estos grupos, que permitan entender, desde una perspectiva microscópica, a la hidratación.

En la descripción estructural de la hidratación, los métodos experimentales más usados son la difracción de rayos X y neutrones por cristales de proteína, así como la resonancia magnética nuclear en solución. Los métodos teóricos relacionados, incluyen las simulaciones de

## **INTERACCIONES AGUA PROTEÍNA.**

Kyte (1995), presenta una revisión sobre diversas metodologías que permiten calcular la cantidad de agua afectada en sus propiedades físicas por su interacción con la proteína. El número de moléculas de agua que forman esta red, se denomina  $\delta_{H_2O}$  o  $h$  y expresa los gramos de agua perturbados por cada gramo de proteína. Los valores obtenidos varían alrededor de 0.2-0.4 g g<sup>-1</sup>, mostrando que  $h$  depende de la propiedad medida. El agua de hidratación equivale a 200-300 moléculas de agua para una proteína de 100-150 amino ácidos. Suponiendo que cada molécula de agua cubre 7-9 Å<sup>2</sup> en la superficie de la proteína, Kyte estima que se obtiene una monocapa de agua cuando  $h$  es cercana a 0.9-1.2 ; concluye entonces, que el agua de hidratación perturbada por la proteína en solución, es considerablemente menor a la necesaria para formar una monocapa.

La hidratación de la proteína, y en particular la hidratación de los grupos no polares, juegan un papel central en la descripción termodinámica de la desnaturalización de proteínas. La descripción estructural del agua en la vecindad de los grupos polares y no polares de las proteínas, permite determinar si existen diferencias geométricas o dinámicas en la hidratación de estos grupos, que permitan entender, desde una perspectiva microscópica, a la hidratación.

En la descripción estructural de la hidratación, los métodos experimentales más usados son la difracción de rayos X y neutrones por cristales de proteína, así como la resonancia magnética nuclear en solución. Los métodos teóricos relacionados, incluyen las simulaciones de

dinámica molecular y el análisis empírico de las estructuras conocidas ( Westhof 1993, Karplus y Faerman 1994).

Las simulaciones de dinámica molecular aplicadas a proteínas que incorporan al solvente en la simulación (Daggett y Levitt 1993), indican que las moléculas de agua cercanas a la superficie tienen un coeficiente de difusión entre dos y cuatro veces menor al valor experimental para el agua pura ( $0.21-0.27 \text{ \AA}^2 \text{ ps}^{-1}$ ). No existe consenso en cuanto a la magnitud relativa del efecto en los grupos polares, no polares o cargados (Karplus y Faerman 1994).

La cristalografía de rayos X y neutrones revelan las posiciones preferenciales ocupadas por las moléculas de agua en los cristales de proteína. Estas posiciones se denominan sitios de agua ordenada y se modelan de manera rutinaria en las determinaciones estructurales. Los sitios varían entre altamente localizados (Factor B bajo)<sup>8</sup> en los que la probabilidad de encontrar una molécula de agua es alta, hasta sitios en los que se muestra una baja probabilidad de ocupancia, por lo que no pueden definirse bien. ( Teeter 1991, Creighton 1993, Kyte 1995) .

En algunas proteínas, se han detectado moléculas de agua de relevancia funcional; éstas participan directamente en el mecanismo catalítico, o contribuyen a la especificidad por el sustrato (Westhof 1993, SurrIDGE 1994, Gregory 1995).

Las moléculas de agua pueden interactuar con la superficie de la proteína, o con el interior de la molécula; en promedio, se encuentra una molécula de agua escondida por cada 27 aminoácidos en la cadena (Williams *et al*, 1994). En general, las moléculas de agua escondidas se encuentran en pares o grupos mayores. Cada molécula de agua interna forma en promedio tres o cuatro puentes de hidrógeno (Hubbard *et al*, 1994). En el caso de las serin-proteasas, se ha encontrado que 16 moléculas de agua internas se encuentran conservadas en siete diferentes

---

<sup>8</sup> El Factor de temperatura B aumenta a medida que disminuye la amplitud media de vibración.

proteasas, lo cual sugiere un papel estructural para las moléculas de agua escondidas (Sreenivasan y Axelsen 1992).

El agua interactúa con toda la superficie de la proteína. La contribución de los átomos no polares y polares a la superficie expuesta al solvente es muy semejante en varias proteínas (53/47 % en la carboxipeptidasa A y 57/43 % para la mioglobina respectivamente) (Teeter 1991). Las moléculas de agua que más frecuentemente se detectan son aquellas que interactúan con los átomos polares de la superficie; el 42 % se encuentran como donadores de puente de hidrógeno a los oxígenos del esqueleto, 16 % actúan como aceptores de los hidrógenos unidos al nitrógeno de las amidas del esqueleto y el 42 % restante actúa como aceptor o donador con las cadenas laterales (Kyte 1995). La organización del agua alrededor de los átomos no polares solo se detecta cuando la resolución en la estructura es menor a 1 Å y a temperaturas menores a 0°C. El estudio más completo sobre la solvatación de una proteína en cristal, es la determinación (a una resolución de 0.83 Å) de la estructura de la crambina a 130<sup>0</sup> K. Las moléculas de agua observadas en esta estructura representan al 96 % del contenido de solvente en el cristal (Teeter *et al*, 1993). En este estudio se observaron arreglos pentagonales de moléculas de agua alrededor de los grupos hidrofóbicos. Las moléculas de agua en estos pentágonos muestran una mayor interacción con otras moléculas de agua que con átomos de la proteína. La movilidad de las moléculas de agua es mayor en la segunda capa de hidratación (Factor B 15 a 19 Å<sup>2</sup>), que en las moléculas de agua en contacto directo con la superficie (B entre 9.4 y 11 Å<sup>2</sup>) (Teeter 1991)

Las descripciones estructurales más completas de la hidratación de proteínas se obtiene de la combinación de varios métodos. La comparación de la estructura de la tripsina obtenidas por difracción de rayos X y de neutrones (Finner-Moore *et al*, 1992), muestra que algunas de

las moléculas claramente asignables en el estudio por rayos X ( 20 de un total de 184) no son visibles en la difracción de neutrones; no se conoce el motivo de esto. El 50 % de las moléculas de agua observadas interactúan en el empaquetamiento del cristal y no se encuentran conservadas en cristales no-isomorfos. Estos resultados muestran que las características del agua obtenidas en cristales con un contenido de humedad bajo, no son directamente comparables con los resultados obtenidos en solución por RMN (Finner-Moore *et al*, 1992).

Wüthrich y colaboradores, desarrollaron un método para la detección de las interacciones agua-proteína por RMN. Otting Liepinsh y Wütrich (1991) compararon la hidratación de la oxitocina (en solución este nonapeptido se encuentra altamente solvatado, en una conformación flexible no globular) y el Inhibidor Pancreático de Tripsina (BPTI) (como prototipo de una proteína globular). Para ambas moléculas, existen estructuras de alta resolución. En el experimento en solución, la intensidad de la señal de los NOE proteína-agua<sup>9</sup>, refleja principalmente el tiempo de residencia de las moléculas de agua cercanas a los protones de la proteína, mientras que el experimento de difracción en cristales, determina la fracción del tiempo (probabilidad) en la que una molécula de agua se localiza en un sitio particular vecino a la proteína. La difracción es, sin embargo, insensible al tiempo de residencia en cada visita al sitio de hidratación. En el caso de la oxitocina, todas las señales atribuibles a las moléculas de agua en la superficie de la molécula muestran tiempos de residencia entre 100 y 250 psec, no se observaron aguas estables, con tiempos de residencia mayores. Por otro lado, las estructuras cristalográficas reportadas muestran siete u ocho moléculas de agua con ocupancias claramente distinguibles del resto de la molécula (Otting *et al*, 1991). El BPTI muestra la misma arquitectura en solución y en

---

<sup>9</sup>El Efecto nuclear de Overhauser (NOE) es consecuencia del acoplamiento dipolo-dipolo entre diferentes núcleos. los NOE observados reflejan la cercanía de otro núcleo en una distancia menor a 5 Å (Creighton 1993)

el cristal, incluyendo la localización de cuatro moléculas de agua internas. Los tiempos de residencia de estas moléculas ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$  seg), son claramente diferenciables de los observados para el agua de hidratación en la superficie (100-250 psec). Una de las conclusiones de este estudio, es que no existe correlación entre el tiempo de residencia de las moléculas de agua en la superficie y la probabilidad de ocupancia. En particular, las seis moléculas de agua observadas en posiciones equivalentes en tres cristales del BPTI, no muestran tiempos de residencia mayores. De acuerdo a estos autores, el alto recambio entre el agua de hidratación y el solvente provee a la cadena polipeptídica de una matrix flexible que le permite responder eficientemente a los cambios en el ambiente (Otting *et al*, 1991)

Los resultados obtenidos por RMN con el BPTI fueron comparados posteriormente con una dinámica molecular de 1.4 ns (Brunner *et al*, 1993). A partir de la trayectoria de las moléculas de agua en la simulación, se calcularon tiempos de residencia ( $\tau$ ) entre 5 y 100 ps. Los resultados de la simulación son comparables cualitativamente, a los obtenidos por resonancia, aunque los  $\tau$  experimentales son significativamente mayores que los calculados por la simulación.

De la combinación de difracción de rayos X y neutrones, resonancia magnética nuclear y simulaciones de dinámica molecular, Karplus y Faerman (1994) derivan la siguiente imagen de la hidratación de las proteínas:

Las moléculas de agua que interactúan con la superficie expuesta de la proteína presentan un coeficiente de difusión menor al del agua pura, aunque recambian a una alta velocidad con el medio. En las porciones apolares de la proteína, las moléculas de agua interactúan en diferentes posiciones en cada choque. Por tanto, el promedio muestra un patrón de

hidratación poco definido. Por otra parte, las moléculas de agua que interactúan con los grupos polares tienden a localizarse en posiciones favorecidas, formando puentes de hidrógeno que complementan el potencial electrostático de la superficie, y por tanto, se definen mejor en las hendiduras de la proteína. Las moléculas de agua escondidas en el interior de la proteína intercambian con el solvente a la menor velocidad y experimentan la mayor pérdida de entropía (Karplus y Faerman 1994).

La imagen estructural de la hidratación muestra diferencias en el comportamiento del agua en la vecindad de los grupos polares y no polares. A continuación se presenta la respuesta de las enzimas al modificar su esfera de hidratación.

#### **Modificaciones en la hidratación.**

Tradicionalmente, la estabilidad y función de las proteínas se estudian en sistemas en los que la concentración del agua es cercana a 55 M y las proteínas y substratos se encuentran en el intervalo nM-mM. A partir de estos estudios, se ha obtenido una gran cantidad de información sobre la cinética y la termodinámica de las interacciones solvente-proteína y proteína-ligando (Creighton 1993). En estas condiciones, el agua está en exceso. Utilizando diversos métodos experimentales, se ha estudiado la contribución del agua en la actividad enzimática, cuando la relación agua-proteína es cercana a la primera capa de hidratación; para determinar el papel de la hidratación en la energética o en la función, es necesario reducir el contenido de agua en contacto con la proteína (Rupley y Careri 1991, Gómez-Puyou 1992).

La cantidad de agua en contacto con la proteína puede disminuirse de tres maneras:

- 1) Por liofilización y posterior rehidratación parcial en atmósferas controladas.
- 2) Mediante la adición de solutos y solventes solubles en agua

o 3) Mediante la transferencia de la enzima a un sistema en el que el principal componente es un solvente no polar.

Con la hidratación progresiva de enzimas liofilizadas, es posible determinar la secuencia de eventos a medida que se restaura el agua en contacto con la proteína. A partir de los resultados obtenidos para la lisozima por espectroscopía de infrarojo, resonancia paramagnética del electrón, RMN y capacidad calorífica, se han propuesto esquemas generales sobre los cambios que acompañan la hidratación de enzimas (Rupley *et al*, 1983, Finney y Poole 1984,). Estos datos, en conjunción con determinaciones de termoestabilidad en solventes orgánicos con diferentes contenidos de agua (Zaks y Klibanov 1988), se han agrupado por Rupley y Careri (1991) en tres regiones de hidratación, previas a la formación de una monocapa completa sobre la proteína<sup>10</sup>.

1)  $h < 0.07$  (60). Se hidratan los grupos cargados. La movilidad del agua es baja y la Cp del agua presente es intermedia entre las determinadas para el agua líquida y el hielo. La actividad enzimática es despreciable.

2)  $0.07 < h < 0.25$  (60-220). Se hidratan los grupos polares. El intercambio de H<sup>+</sup> muestra valores equivalentes a los encontrados en solución. Disminuye la termoestabilidad. Se empieza a desarrollar conectividad en la red de hidratación. Algunas proteínas comienzan a mostrar actividad catalítica.

3)  $0.25 < h < 0.38$  (220-305). Las propiedades termodinámicas del agua toman valores cercanos a los encontrados en solución. Se hidratan los grupos no polares y aumenta en paralelo la actividad enzimática y el movimiento de ligandos unidos no covalentemente. La termoestabilidad es cercana a la obtenida en soluciones acuosas.

---

<sup>10</sup>El número entre paréntesis indica moles de agua por mol de lisozima.



Cuando la hidratación es mayor a una monocapa de agua, la actividad catalítica y las características del agua de hidratación regresan a los valores encontrados en solución.

Existen datos contradictorios sobre la cantidad de agua necesaria para formar una monocapa alrededor de la proteína. Tomando  $7-9 \text{ \AA}^2$  por molécula de agua, Kyte (1995) estima  $h$  cercana a 0.9

### **Micelas Invertidas.**

La cantidad de agua en contacto con la proteína se puede limitar transfiriendo a la proteína a medios en los que el agua no sea el componente mayoritario. La actividad catalítica y la termoestabilidad, también se han estudiado como función de la cantidad de agua en contacto con la proteína en un sistema de micelas invertidas (revisiones generales en: Martinek *et al*, 1986, Luisi *et al*, 1988, Pileni 1993). Este término se refiere a una región específica en el diagrama de fases triangular para mezclas ternarias formadas por un solvente orgánico apolar, un surfactante y agua. En el equilibrio, esta región está formada por pequeñas esferas de agua (20-100 Å de radio) rodeadas por una capa de surfactante orientada por su parte polar hacia el interior acuoso. La parte hidrofóbica del surfactante está en contacto directo con el solvente apolar. Este último componente es el de mayor concentración en la solución y forma el continuo en el que se encuentran suspendidas las micelas invertidas.

Diversos factores determinan la formación de micelas. En general, la formación de micelas invertidas está limitada a concentraciones de agua menores al 10 %, la cantidad de surfactante oscila entre el 1 y el 40%, mientras que el solvente orgánico es el componente de mayor concentración. No existe, sin embargo, un modelo que permita predecir para un sistema (solvente y surfactante dados), la relación de concentraciones a las que se forman micelas

invertidas. Por lo tanto, es necesario determinar experimentalmente la región del sistema en la que existen micelas. En términos generales, es posible caracterizar las dimensiones de la micela determinando el parámetro  $W_o$ , definido como la relación molar entre las moléculas de agua y la moléculas de surfactante en la pared de la micela.

Experimentos de dispersión de luz dinámica (Zulauf y Eicke 1979), resonancia magnética nuclear (Maitra 1984) y dispersión de neutrones (Rahaman y Hatton 1991) o rayos X de bajo ángulo (Darszon *et al*, 1978), muestran que, en general, al aumentar el número de moléculas de agua por molécula de surfactante ( $W_o$ ) aumenta el tamaño micelar. De esta manera, cuando se incrementa el contenido de agua manteniendo constante la concentración de surfactante, las micelas aumentan de tamaño (Martinek *et al*, 1986, Luisi *et al*, 1988 ).

La constante dieléctrica y las propiedades espectrales del agua en el interior de las micelas invertidas se modifican hacia los valores encontrados en solución, a medida que la concentración de agua y/o el  $W_o$  aumentan (Maitra 1984, Gallay *et al*, 1987). Existe controversia sobre el aumento o disminución en el tamaño de las micelas invertidas al incorporar proteínas (Rahaman y Hatton 1991).

### **Comportamiento enzimático en micelas invertidas**

Un gran número de laboratorios ha mostrado que la actividad catalítica de las enzimas en el interior de una micela invertida, depende de la cantidad de agua en el sistema. A concentraciones de agua baja, la velocidad de catálisis es baja. Al aumentar el contenido de agua, la velocidad con la que la enzima cataliza aumenta (Martinek *et al*, 1986, Luisi *et al*, 1988).

Además del contenido de agua, la disminución en la actividad catalítica depende de la enzima estudiada y del sistema empleado. Por ejemplo, la actividad de la deshidrogenasa láctica es 20 veces menor que en medios acuosos mientras que la actividad de la citocromo oxidasa apenas es detectable (Garza-Ramos G. *et al*, 1992, Escamilla *et al*, 1989).

En todas las enzimas, la catálisis se acompaña de cambios conformacionales. La evidencia obtenida con diferentes técnicas, indica que durante el ciclo catalítico las enzimas muestran rearrreglos estructurales múltiples (Creighton 1993). Esto implica que también existen rearrreglos entre la enzima y su capa de hidratación. El número de recambio para la catálisis puede ser tan pequeño como  $10^{-6}$ s, aunque generalmente es mayor (Creighton 1993). El intercambio de la capa de hidratación y el solvente "bulto" tiene lugar en el orden de 100-250 ps (Otting *et al*, 1991). Ya que en sistemas convencionales el agua está en exceso, el reajuste entre la enzima y su capa de hidratación no limitan la catálisis.

En micelas invertidas, la cantidad de agua modula la velocidad de reacción. Por tanto, es posible que la disminución en la velocidad enzimática sea lenta debido a que las interacciones agua-proteína son limitantes (Garza-Ramos *et al*, 1992b). A favor de esta posibilidad surgieron las siguientes observaciones: 1) La termoestabilidad de las enzimas dispersas en solventes orgánicos o en el interior de una micela invertida, depende del contenido de agua (Zaks y Klibanov 1984, Garza-Ramos *et al*, 1990). Al aumentar la cantidad de agua la termoestabilidad disminuye y de manera concomitante se observa un aumento en la velocidad catalítica (Garza-Ramos *et al*, 1990). Ya que la desnaturalización térmica y la actividad catalítica requieren de rearrreglos conformacionales de la proteína, que necesariamente modifican la solvatación de la molécula, la relación inversa entre termoestabilidad y catálisis es la esperada para un sistema en

el que la variable ajustada está relacionada con la movilidad de la proteína. Pruebas adicionales sobre la relación entre la baja actividad y restricciones en las interacciones solvente-proteína se presentaron cuando la actividad catalítica en micelas se determinó en presencia de varios agentes desnaturizantes. Aunque el mecanismo de acción de estos agentes no se conoce, se sabe que promueven la solvatación de la proteína (Pace 1975). En micelas invertidas, la actividad enzimática aumenta dramáticamente en presencia de desnaturizantes. La actividad de la deshidrogenasa láctica de corazón aumenta 20 veces cuando las micelas contienen 1.5 M GdnHCl. Los desnaturizantes y temperaturas elevadas aumentan la movilidad y la solvatación de la proteína y en consecuencia producen desnaturización. En el espacio limitado del interior de la micela, ambos agentes compensan las restricciones impuestas por la baja cantidad de agua (Garza-Ramos *et al*, 1992a, Fernández-Velasco *et al*, 1992).

En algunos casos, se detectan alteraciones estructurales en las proteínas introducidas en micelas invertidas (Grandi *et al*, 1981, , Ramírez-Silva *et al*, 1993). En términos generales, se detectan cambios en la movilidad y el microambiente de algunos grupos (Strambini y Gonelli 1988, Marzola y Gratton 1991), mientras que los cambios en la estructura secundaria y terciaria son menos evidentes (Vos *et al*, 1987, Walde *et al*, 1988, Garza-Ramos *et al*, 1994); existen, sin embargo, excepciones a este comportamiento (Walde *et al*, 1993).

Ya que en micelas invertidas la velocidad catalítica es un orden de magnitud menor que en medio acuoso, en estos sistemas ha sido posible atrapar diferentes conformeros (Russell y Klibanov 1988), intermediarios en ciclos catalíticos (Escamilla *et al*, 1989, Barrabin *et al*, 1993) y conformaciones susceptibles a la desamidación durante la catálisis (Garza-Ramos *et al*, 1994).

En el presente trabajo, se estudia a la triosafosfato isomerasa (TPI) en un sistema de micelas invertidas formadas por 200 mM de bromuro de cetiltrimetilamonio en n-octano/hexanol (8.7/1 v/v) (Hilhorst *et al*, 1984). El contenido de agua del sistema varía entre 2.0 y 6.0 % (  $W_0$  5.5-16.6). Los diagramas de solubilidad de agua en este tipo de micelas se han determinado (Hilhorst *et al*, 1984, Garza-Ramos *et al*, 1992a); la concentración de micelas es entre 1 y 4 mM (Laane *et al*, 1987). La actividad catalítica de la TPI en micelas con 6.0 % de agua, (Garza-Ramos *et al*, 1992c), es un orden de magnitud menor a la observada en soluciones acuosas, y depende del contenido de agua en el sistema.

## TRIOSAFOSFATO ISOMERSA

La triosafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1) cataliza la isomerización entre los dos productos de la aldolasa: la dihidroxiacetona fosfato y el R-gliceraldehido 3 fosfato. El mecanismo de la reacción involucra la formación de un intermediario cis-enediol(ato) (Figura 3)(Knowles 1991).

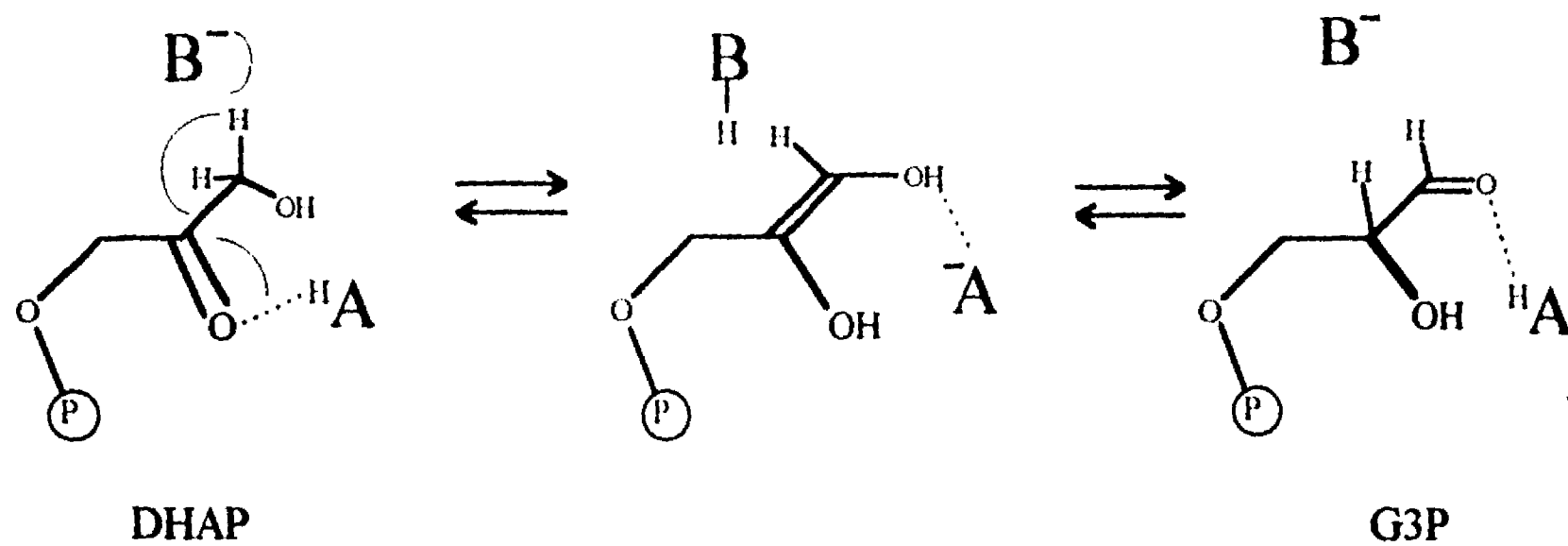


Figura 3. Mecanismo catalítico de la Triosafosfato Isomerasa.  $B^-$  representa a la base catalítica (Glu 165), y HA al ácido catalítico (His 95). DHAP Dihidroxiacetona fosfato. G3P Gliceraldehido 3 fosfato.

Ya que sólo el G3P continúa en la vía glicolítica, la TPI asegura la producción neta de ATP en la oxidación de la glucosa a piruvato (Knowles y Albery 1977). La TPI se ha encontrado en todos los organismos que se han estudiado (Lolis *et al*, 1990). A la fecha se conoce la secuencia de aminoácidos de la TPI de 28 especies y la estructura tridimensional de 5 de ellas; pollo (Banner *et al*, 1975, Zhang *et al*, 1994), levadura (Lolis *et al*, 1990), *Trypanosoma brucei* (Wierenga *et al*, 1991), *E. coli* (Noble *et al*, 1993) y humano (Mande *et al*, 1994). Se conocen también los rearrreglos estructurales que tienen lugar en presencia de diversos análogos del

substrato (revisado por Wierenga *et al*, 1992). Las enzimas analizadas a la fecha son dímeros formados por dos cadenas idénticas de aprox 27 KDa. Los parámetros cinéticos de diferentes especies son semejantes (Lambeir *et al*, 1987). No se conocen cofactores o reguladores alostéricos, ni se ha detectado cooperatividad entre las subunidades y la actividad de los sitios es independiente (Schnackerz y Gracy 1991). Recientemente se construyó por ingeniería genética una variante monómerica a partir de la TPI de tripanosoma. La monoTIM es capaz de unir al substrato; sin embargo, muestra una disminución de 20 veces en la  $K_m$  y de 1000 veces en la  $k_{cat}$ , con respecto a la enzima nativa (Borchert *et al*, 1994).

La TPI es una enzima eficiente, la velocidad de isomerización del G3P en presencia de la TPI es  $10^8$ - $10^9$  veces mayor que en ausencia de catalizador. La relación  $k_{cat}/K_m$  con el G3P como substrato<sup>11</sup> es de  $10^8$   $M^{-1}s^{-1}$ ; éste valor es comparable al calculado ( $10^8$ - $10^{10}$   $M^{-1}s^{-1}$ ) para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión (Knowles y Albery 1977). La reacción catalizada por la TPI se lleva a cabo con la formación de un intermediario cis-enediol(ato) (Figura 3). En términos mecanísticos, la función biológica de la TPI consiste en disminuir las barreras energéticas que limitan la velocidad de protonación y desprotonación y/o estabilizar el intermediario. El perfil de energía libre de la reacción muestra que el estado de transición más alto es la unión del G3P a la enzima (Knowles y Albery 1977); mediante el estudio de los parámetros catalíticos de la TPI al variar la viscosidad del solvente (Blacklow *et al*, 1988), se confirmó que la unión del G3P a la enzima está limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos especies, y no por los ajustes conformacionales en la proteína necesarios para la catálisis (en el solvente que les acompaña) o los rearrreglos químicos entre substrato y enzima. Por lo

---

<sup>11</sup>La relación  $k_{cat}/K_m$  representa la constante de velocidad aparente de segundo orden ( $v$ ) de la reacción entre enzima libre ( $[E]$ ) y substrato libre ( $[S]$ ).  $v = (k_{cat}/K_m) [E][S]$  (Fersht 1985)

tanto, la TPI es un catalizador "perfecto"; cualquier aumento en la velocidad de los pasos catalíticos no tendría efecto en la velocidad de la reacción (Knowles y Alberly 1977). En varias enzimas<sup>12</sup> se ha encontrado que la difusión del sustrato, es el paso limitante en la catálisis. De esta manera, el alto recambio entre el agua de hidratación y el solvente<sup>13</sup>, permite que la velocidad con la que la capa de hidratación de la proteína se reajusta durante la catálisis, no sea limitante en los rearrreglos químicos entre la proteína y el sustrato. Esto ha permitido la evolución de mecanismos biológicos altamente eficientes, que no se encuentran bajo presión evolutiva.

El mecanismo propuesto para la actividad catalítica de la TPI a partir de la combinación de estudios cinéticos, genéticos y estructurales, involucra un mecanismo ácido-base, en el que el carboxilato del Glu 165<sup>14</sup> y el imidazol de la His 95 realizan las protonaciones y desprotonaciones necesarias para la formación del enediol(ato) (Figura 3) (Knowles 1991). Otros elementos que participan en la unión del sustrato, son la Lis 12 (Lodi *et al*, 1994) y el macrodipolo de dos  $\alpha$ -hélices, una de ellas modifica el pK de la His 95, mientras que el macrodipolo positivo de la otra hélice permite la unión del fosfato del sustrato (Lodi y Knowles 1993). Este se descompone a metilglioxal cuando la reacción se lleva a cabo en solución, por lo que la TPI cuenta con una asa móvil que oculta al sustrato del solvente y por lo tanto evita la formación del subproducto tóxico (Pompliano *et al*, 1990) (Figura 4).

---

<sup>12</sup> A partir de estudios cinéticos al variar la viscosidad del solvente, se ha demostrado que la velocidad catalítica de las siguientes enzimas: fosforilasa b, peroxidasa de rábano, quimotripsina,  $\beta$ -lactamasa, anhidrasa carbónica, invertasa, acetilcolinesterasa, y adenosina deaminasa; está limitada por la difusión del sustrato hacia la enzima (referencias en Blacklow *et al*, 1988).

<sup>13</sup> Sección "Interacciones agua-proteína."

<sup>14</sup> La numeración se refiere a la secuencia de la TPI de levadura.



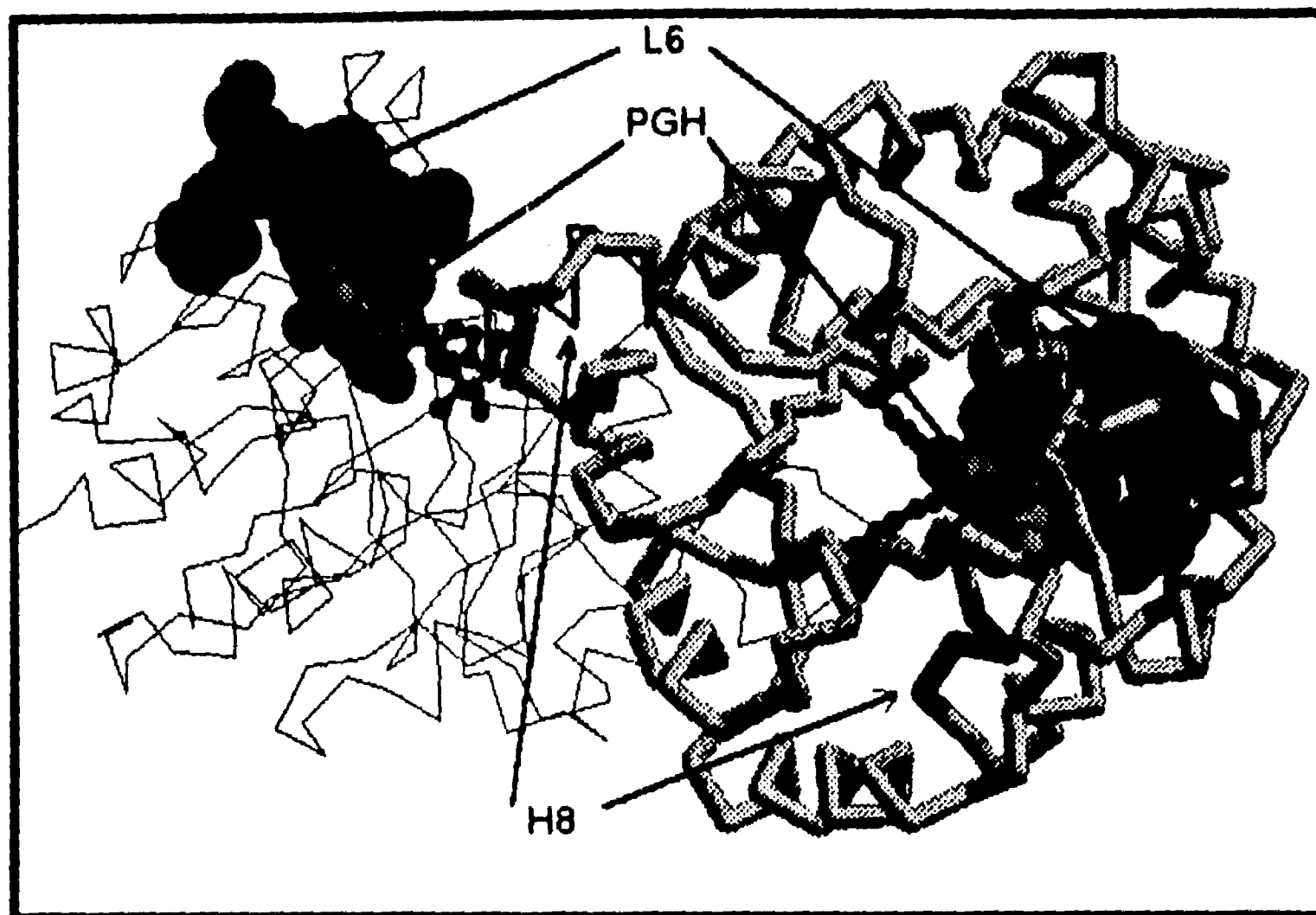


Figura 4. Estructura del esqueleto polipeptídico de la TPI de pollo en presencia de fosfoglicolohidroxamato (PGH). A partir de las coordenadas obtenidas por cristalografía (Zhang *et al.*, 1994). Se resaltan la  $\alpha$ -hélice que interactúa con el fosfato del sustrato (H8), las cadenas laterales de los aminoácidos catalíticos y el asa móvil que cubre al sitio activo (L6).

La estructura secundaria de la TPI está formada por ocho hebras  $\beta$  que alternan con una (a veces dos)  $\alpha$  hélice(s). La cadena se pliega de manera que las ocho hebras forman una hoja  $\beta$  paralela central semejante a un barril (el ángulo entre las hebras y el eje del barril es de  $35^\circ$ ). Las hélices que unen a las hebras  $\beta$  se empaquetan en forma paralela a la dirección de las hebras. El sitio activo se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad formada por las asas contiguas a las hebras  $\beta$  (Banner *et al.*, 1975) (Figura 5). Este patrón topológico se ha encontrado en más de 20 enzimas con actividades catalíticas diversas (aproximadamente el 10 % de las enzimas cristalizadas). No es claro si este patrón de plegamiento refleja las características

de un ancestro común, o si el barril presenta una topología estable a la cual han convergido diferentes enzimas (Farber y Petsko 1990, Bränden 1991, Farber 1993.)

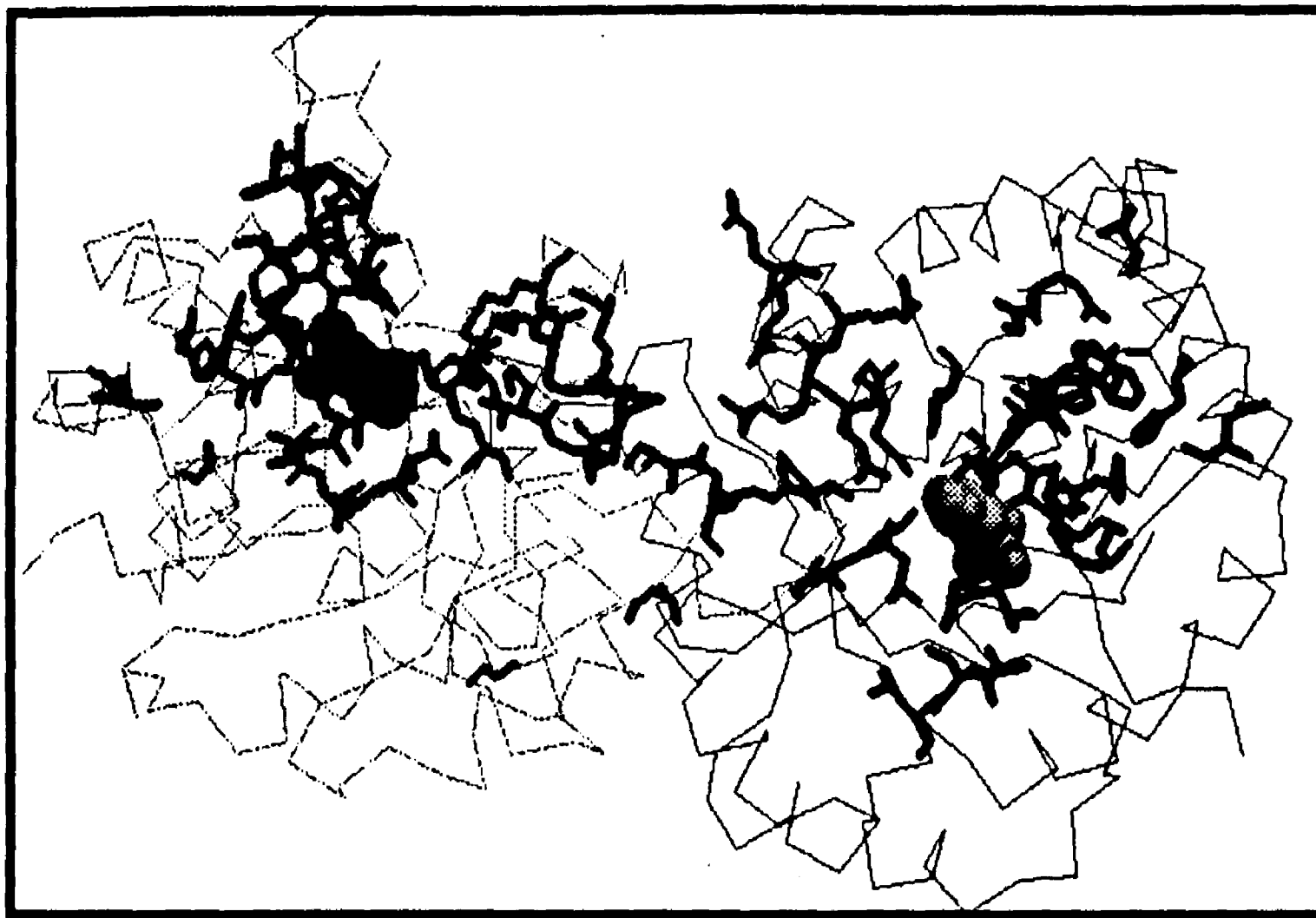


Figura 5. Esqueleto polipeptídico de la TPI de pollo (Zhang *et al*, 1994), se resaltan las cadenas laterales de los aminoácidos estrictamente conservados.

Existe una presión evolutiva continua para modificar la cadena polipeptídica; las regiones conservadas son aquellas que resisten esta presión. En proteínas homólogas, las regiones que se encuentran en el sitio activo están conservadas, así como los residuos directamente involucrados en la química de la reacción (Creighton 1993, Schreiber *et al*, 1994). Este es el caso de la TPI, en donde los aminoácidos conservados son aquellos que participan directamente en la química de la reacción, o se localizan en la vecindad del sitio activo (Lolis *et al*, 1990) (Figura 5).

A pesar de las diferencias en los aminoácidos de la interfase, la topología del barril y la geometría de la asociación de los monómeros es semejante en diferentes especies (Wierenga *et al*, 1992) (Figura 6).

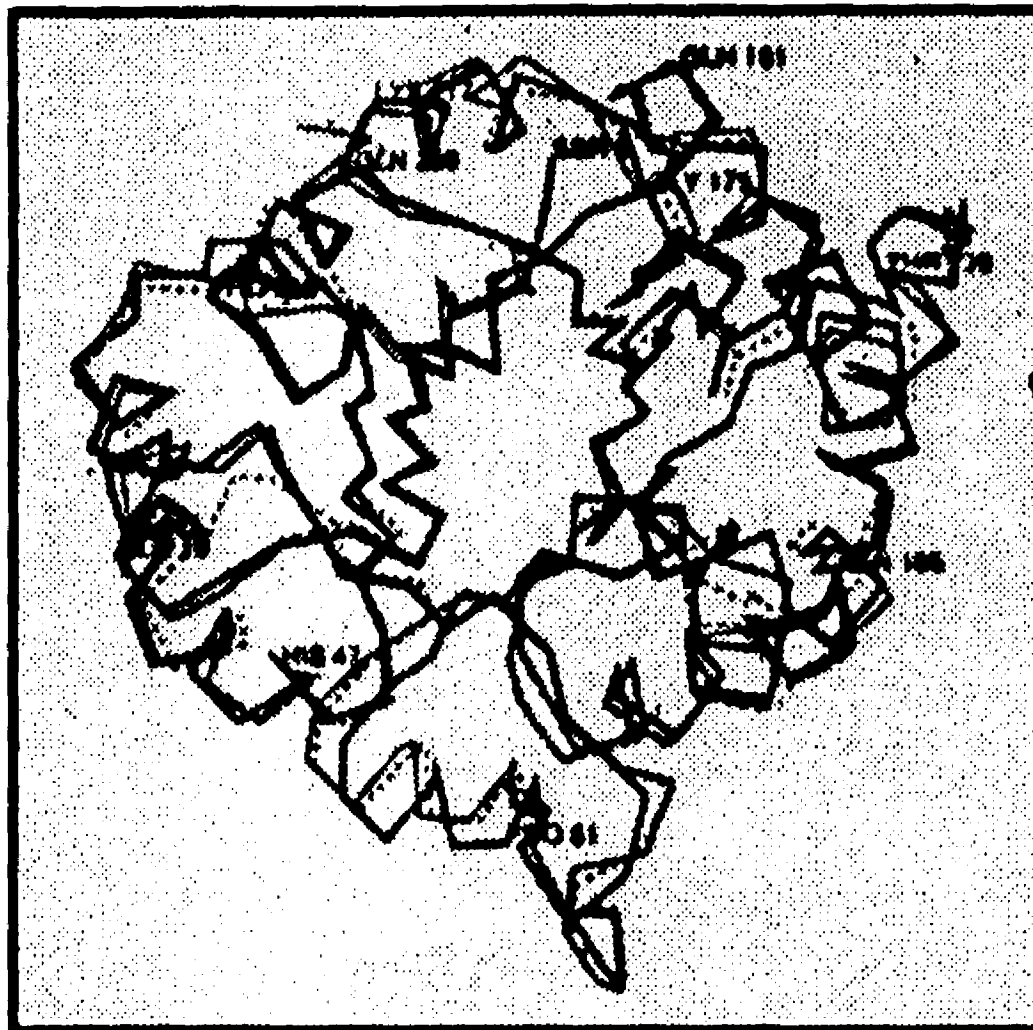


Figura 6. Sobreposición del esqueleto polipeptídico de la TPI de *Tripanosoma* (líneas continuas oscuras), *Levadura* (líneas continuas delgadas) y *Pollo* (líneas discontinuas). Tomado de Wierenga *et al*, 1992.

No se ha reportado el  $\Delta G$  de asociación o el  $\Delta G_{Tot}^{15}$ . Sin embargo, la enzima de conejo es estable como dímero en diluciones extremas ( $2 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (Zabori *et al*, 1980). A partir de la superficie del monómero que se esconde del solvente durante la dimerización, Lolis *et al*, (1990), calcularon  $K_a$  entre  $10^{14}$ - $10^{16} \text{ M}^{-1}$ .

No es claro por qué la TPI sólo es activa como dímero, ya que los aminoácidos involucrados en la catálisis se encuentran contenidos en el monómero. Es probable que las

<sup>15</sup> $\Delta G_{Tot} = \Delta G_{Asoc} + \Delta G_{Mon}$ . Donde  $\Delta G_{Mon}$  es la diferencia en energía entre el monómero nativo y el desnaturalizado.

interacciones en la interfase sean necesarias para mantener a los aminoácidos catalíticos en posición, o para mantener la estabilidad del barril; de hecho, algunos aminoácidos de la interfase se encuentran conservados (Figura 6). Sin embargo, algunos miembros de la familia  $\alpha/\beta$  son barriles activos como monómeros (Seygusch *et al*, 1987, Wilmanns *et al*, 1991 ) y recientemente se construyó una variante monomérica de la TPI con actividad catalítica (Borchert *et al*, 1994). De cualquier forma, no es claro cual es el papel de las interacciones cuaternarias en la catálisis.

### **Plegamiento y asociación de la TPI en sistemas acuosos**

La renaturalización de La TPI de conejo y pollo, a partir de la enzima desnaturalizada por GdnHCl es completamente reversible (Waley 1973, Mc Vittie *et al*, 1977, Zabori *et al*, 1980). La velocidad de renaturalización (determinada por la recuperación de actividad enzimática) depende de la concentración de proteína a concentraciones bajas. A concentraciones de proteína elevadas, la cinética se vuelve de primer orden (independiente de la concentración). Debido a esto, cuando la concentración de proteína es baja, el paso limitante es la asociación de los monómeros; al aumentar la concentración de proteína, la asociación deja de ser limitante y el paso más lento es unimolecular (ya sea anterior o posterior a la formación del dímero) (Waley 1973). Como primera aproximación, los datos de la reactivación, se ajustan bien a un modelo consecutivo uni-bimolecular ( $k_{uni} = 1.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{bi} = 3.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Zabori *et al*, 1980), en el que se supone que los monómeros formados durante la renaturalización son inactivos. La velocidad de asociación de los monómeros de TPI es cercana a la esperada para la asociación por difusión de dos moléculas de tamaño semejante ( $10^6$  a  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Esto implica que durante la renaturalización todos los choques entre los monómeros son productivos. Existen dos

explicaciones para este fenómeno: 1) las subunidades aisladas tienen la conformación complementaria a la interfase del otro monómero antes del choque, y 2) las interacciones que tienen lugar durante la dimerización son débiles, con restricciones geométricas no específicas; este complejo se rearreglaría posteriormente para dar lugar al dímero activo.

El paso limitante en la renaturalización de la TPI es la asociación, por lo que durante el curso temporal del plegamiento se presentan intermediarios plegados pero no apareados, a diferencia de otros oligómeros (Jaenicke 1987),<sup>16</sup> el intermediario monomérico de la TPI no se agrega irreversiblemente. No se han reportado estudios estructurales sobre la naturaleza del intermediario monomérico.

#### **Plegamiento y asociación de la TPI en micelas invertidas**

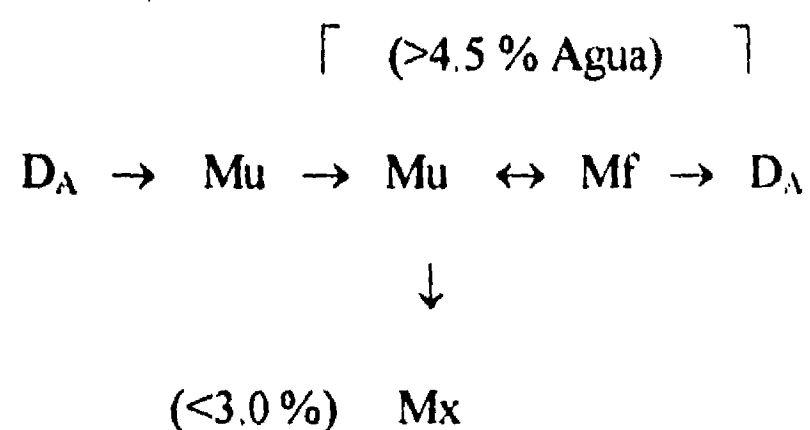
Como se mencionó en la sección anterior, en el sistema de micelas invertidas, formadas por 200 mM de bromuro de cetiltrimetilamonio en octano/hexanol (8.7 a 1 v/v); los espectros de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular de la TPI en el interior de la micela son semejantes a los determinadas en solución (Garza-Ramos *et al*, 1994). La actividad catalítica en el interior de las micelas es un orden de magnitud menor que en soluciones acuosas. La actividad específica se mantiene aún después de una semana de incubación en las micelas (Garza-Ramos *et al*, 1992c). Estos resultados indican que la TPI nativa es estable en el interior de las micelas y que la cantidad de agua limita los movimientos necesarios para la catálisis.

---

<sup>16</sup>Ver sección "Cinética de renaturalización de oligómeros".

La TPI desnaturalizada en agua, mediante incubación en concentraciones elevadas de GdnHCl (3.0-6.0 M) puede renaturalizarse en el sistema de micelas invertidas. El porcentaje de reactivación en micelas aumenta con la concentración de proteína (0.014-36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), hasta llegar a valores cercanos al 100%. La velocidad de reactivación aumenta con la concentración de proteína, por lo que, al igual que en soluciones acuosas, el paso limitante en la reactivación es la formación del dímero activo. Aunque en micelas invertidas la formación del dímero nativo es un orden de magnitud más lenta que en soluciones acuosas, en las concentraciones de proteína mas altas utilizadas en las micelas la recuperación de la actividad es total. Esto es, no se observa agregación irreversible a pesar de la disminución en la velocidad de dimerización.

Los resultados anteriores se observan cuando el contenido de agua en el sistema es mayor a 4.5 %. Sin embargo, cuando la enzima desnaturalizada se transfiere a concentraciones de agua menores, el porcentaje de reactivación disminuye considerablemente ( en 2.5-2.8 % de agua, la reactivación es cercana al 5%) . La pérdida de la reversibilidad a concentraciones bajas de agua, se debe a la formación irreversible (en menos de 12 s) de estructuras incapaces de adoptar la estructura activa. Los datos anteriores se resumen en el siguiente esquema (Garza-Ramos *et al*, 1992 c)



Donde  $D_A$  representa al dímero activo,  $Mu$  al monómero desnaturalizado,  $Mf$  al monómero competente para la dimerización y  $Mx$  se refiere a aquellas estructuras incapaces de dimerizar.

## **OBJETIVOS**

El presente trabajo, continua estudios de nuestro laboratorio sobre la reactivación de la enzima homodimérica triosafosfato isomerasa en micelas invertidas. La estabilidad de la conformación nativa en monómeros y oligómeros está dominada por las interacciones agua-proteína. Sin embargo, no se conoce el papel del solvente en la cinética del plegamiento.

La pregunta central de este trabajo es:

¿Es posible utilizar al agua como variable para modificar el plegamiento y la asociación de la triosafosfato isomerasa? Si es así, ¿cuál es la función del agua en el plegamiento y en la asociación de proteínas oligoméricas?

Al variar el contenido de agua de las micelas invertidas durante la reactivación, se proponen los siguientes objetivos:

- Determinar la cantidad de agua en el sistema necesaria para el plegamiento y la asociación.
- Estabilizar un intermediario monómero y analizar sus características estructurales por fluorescencia intrínseca.

A continuación se presenta el trabajo realizado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

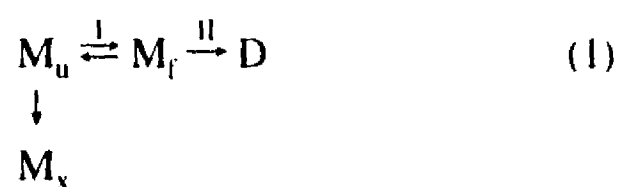
<sup>||</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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



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

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



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

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

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

## MATERIAL AND METHODS

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

glycerophosphate dehydrogenase, NADH, and glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal were obtained from Sigma. Glyceraldehyde 3-phosphate was prepared from glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal as described by the supplier. Soybean trypsin inhibitor was from Worthington. The activity of TPI in all aqueous mixtures, measured as described elsewhere (Rozacky et al., 1971), was around 4 000  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  with glyceraldehyde 3-phosphate as substrate. TPI concentration was determined by its absorbance at 280 nm,  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 12.9$  (Rozacky et al., 1971).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESULTS

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

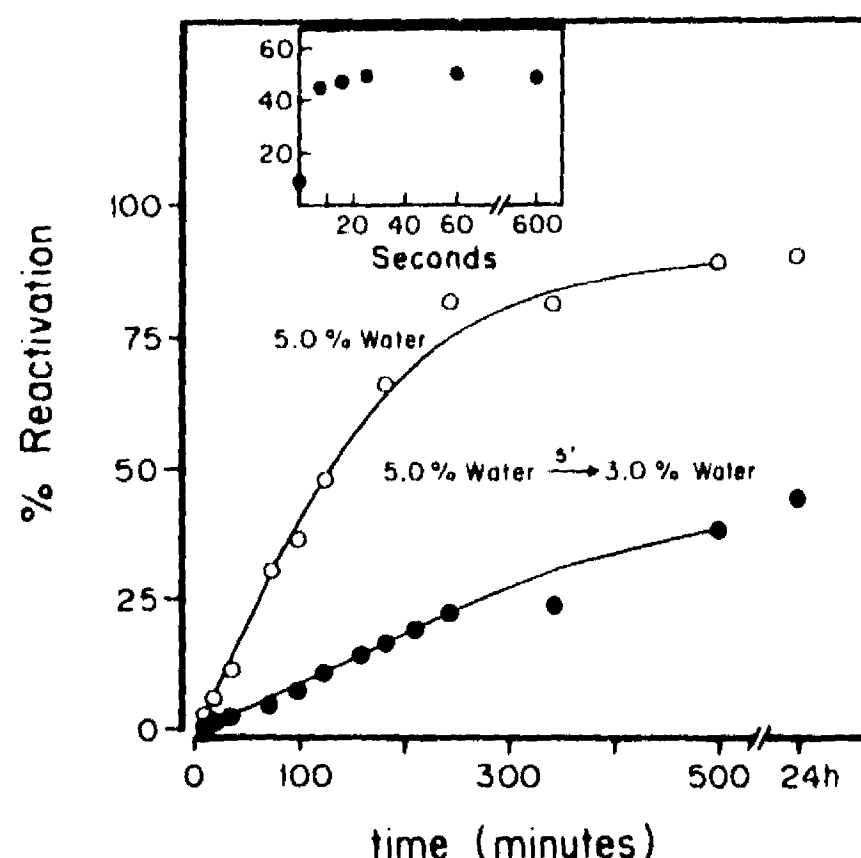


FIGURE 1: Kinetics of TPI reactivation in reverse micelles after a 5% to 3% water transition. TPI denatured in 6.0 M GdnHCl was transferred to reverse micelles that contained 5.0% water, yielding a concentration of 3.7  $\mu$ g of protein/mL of reverse micelles. After 5 min, the water content was decreased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

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

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

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

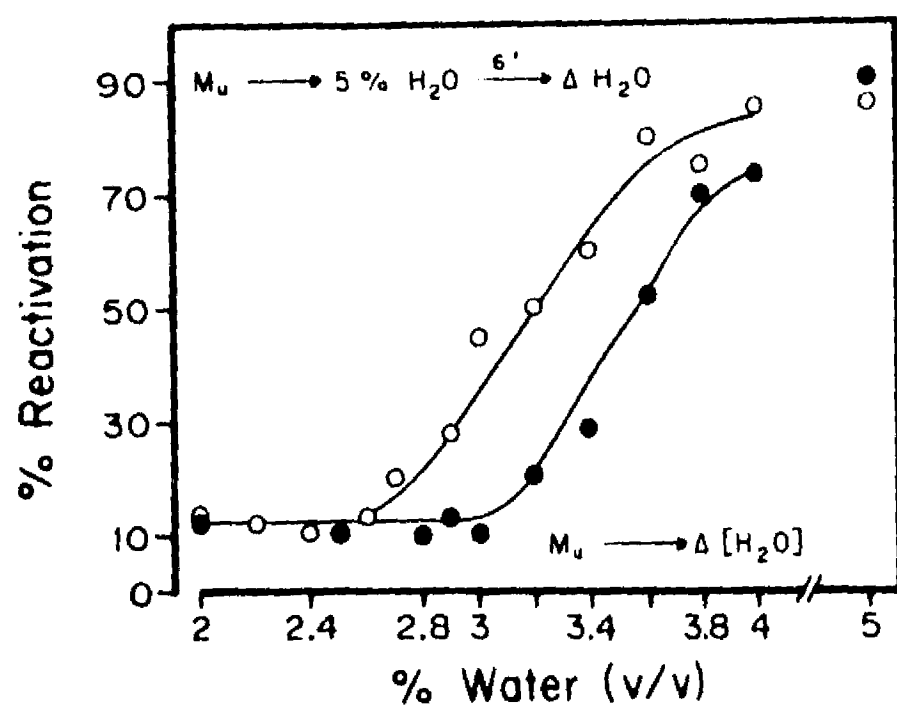


FIGURE 2: Amount of water required for monomer folding and dimerization in reverse micelles. The protocol was as in Figure 1. In the traces depicted with (●), TPI denatured with 6.0 M GdnHCl was transferred to reverse micelles that had the indicated water concentrations and incubated for 24 h. In the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

( $M_f$ ) that are able to undergo dimerization and/or a reduction in the number of productive collisions due to a lower concentration of competent monomers.

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

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

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

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

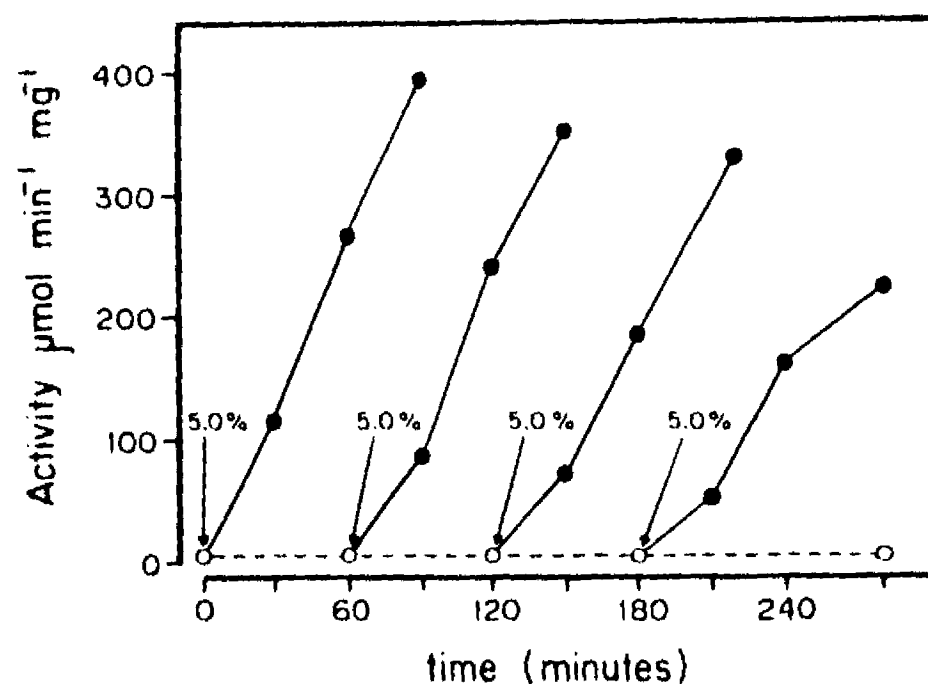


FIGURE 3: Reactivation of denatured TPI after 5.0% to 2.0% to 5.0% water transitions. The protocol was as in Figure 1, except that 5 min after transfer of TPI denatured in 6.0 M GdnHCl to reverse micelles with 5.0% water, the water content of the system was decreased to 2.0%; this is time zero in the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

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

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

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

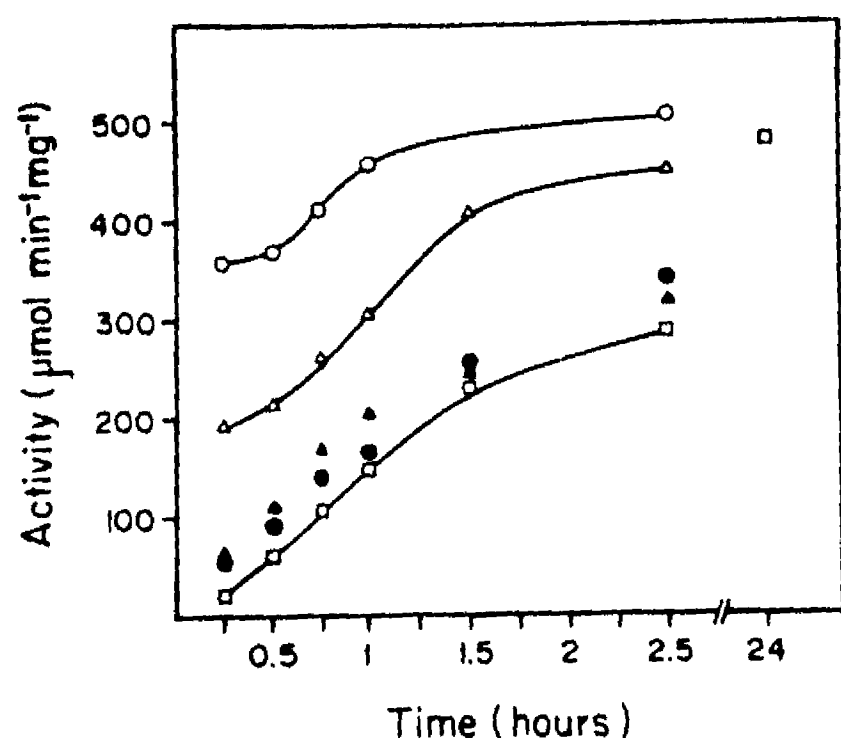


FIGURE 4: Arrest and reinitiation of TPI reactivation. Denatured TPI was allowed to reactivate in reverse micelles with 5.0% water. The time course is illustrated by  $\square$ . At different times of reactivation, the following protocol was followed, where  $H$  indicates a water transition: ( $\bullet$ ) 5.0%  $H$  2.0% (24 h)  $\rightarrow$  activity; ( $\blacktriangle$ ) 5.0%  $H$  2.0% (48 h)  $\rightarrow$  activity; ( $\circ$ ) 5.0%  $H$  2.0% (1 h)  $H$  5.0% (24 h)  $\rightarrow$  activity; ( $\triangle$ ) 5.0%  $H$  2.0% (24 h)  $H$  5.0% (24 h)  $\rightarrow$  activity.

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

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

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

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

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

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

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

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

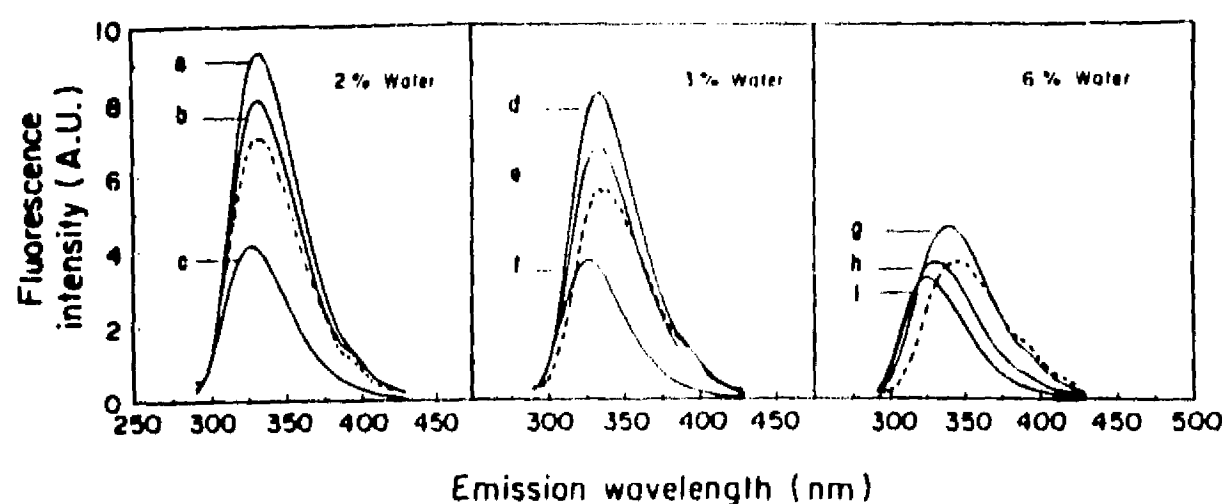


FIGURE 5: Intrinsic fluorescence emission spectra of native, denatured, and reactivated TPI in reverse micelles. Native TPI and TPI denatured in 4.0 M GdnHCl were transferred to reverse micelles formed with aqueous buffer or a solution of 4.0 M GdnHCl, respectively; the concentration of these solutions in the reverse micelles was 2.0%, 3.0%, or 6.0% (as shown). Traces c, f, and i show the spectra of native TPI in micelles formed with 2.0%, 3.0%, and 6.0% buffer; the dashed lines depict the spectra of the denatured enzyme in reverse micelles formed with 4.0 M GdnHCl. Denatured TPI was also transferred to reverse micelles formed with aqueous buffer at a concentration of 2.0%, 3.0% and 6.0% water. Traces a, d, and g show spectra taken 5 min after transfer. Traces b, e, and h show the spectra of the latter samples after 24 h. The concentration of GdnHCl in the aqueous phase of all samples (except those shown by the dashed lines) was adjusted to 66 mM.

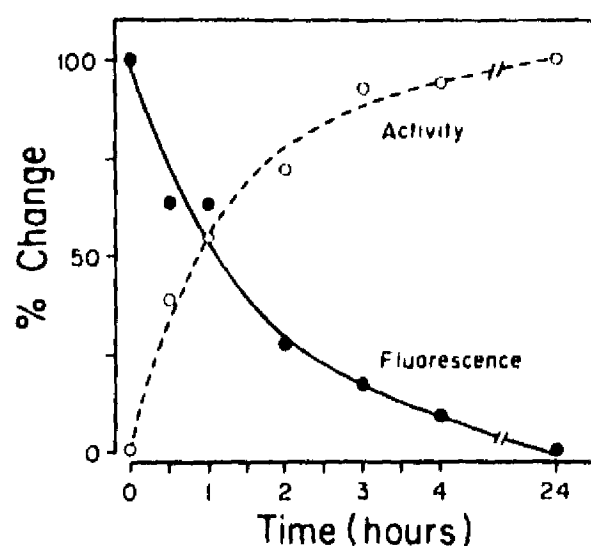


FIGURE 6: Fluorescence and activity of TPI during reactivation. TPI was denatured in 4.0 M GdnHCl and transferred to reverse micelles with 6.0% water. At the indicated times, emission fluorescence spectrum and activity were determined. The results are plotted as percent of the maximal changes in activity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

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

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

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

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

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

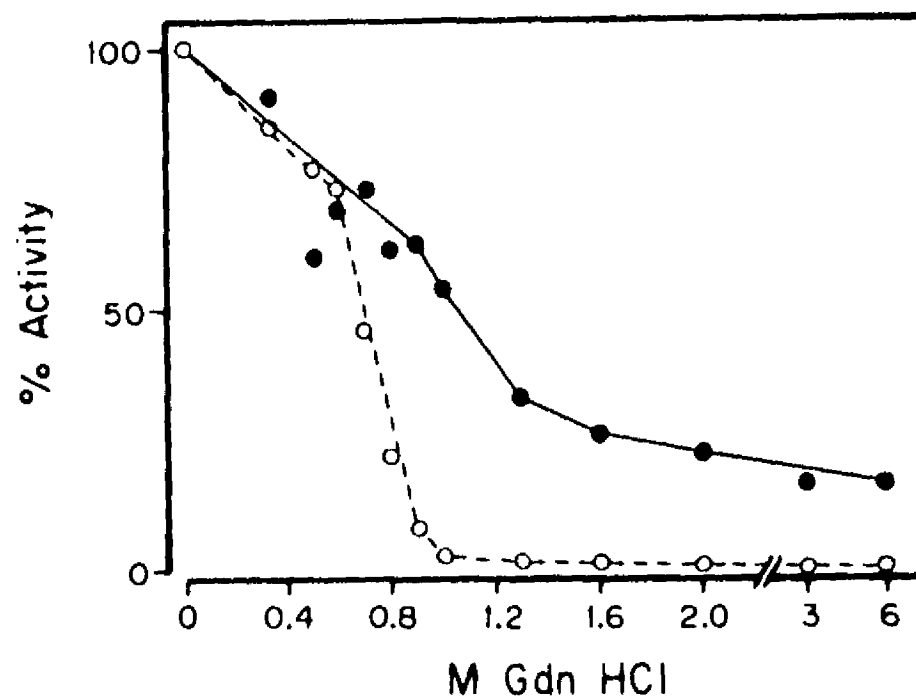


FIGURE 7: Reactivation in reverse micelles of TPI that had been exposed to various GdnHCl concentrations. TPI was incubated for 2 h in the indicated concentrations of GdnHCl. At that time it was transferred to reverse micelles with 2.0% water, and its activity was measured (○). After 15 min, the water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

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

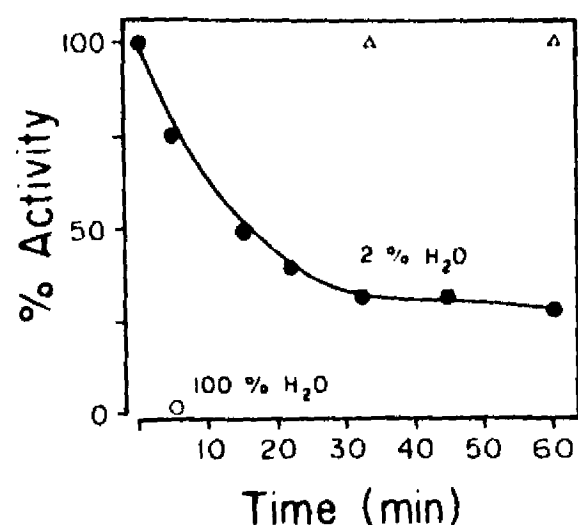


FIGURE 8: Inhibition of trypsin activity by the soybean trypsin inhibitor in reverse micelles with 2.0% water. Reverse micelles were formed at a concentration of 2.0% water that contained 100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and either 0.06  $\mu$ M trypsin or 0.06  $\mu$ M soybean trypsin inhibitor at pH 8.0. At time zero, equal volumes of the two types of micelles were mixed. At the indicated times aliquots were withdrawn and their activity was assayed in reverse micelles that contained 0.25 mM BAEE (overall concentration). (●) shows activity at the indicated preincubation times. (△) indicates activity of trypsin preincubated without inhibitor. (○) shows the activity of trypsin preincubated in aqueous media with inhibitor for 5 min.

## DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## REFERENCES

Affleck, R., Xu, Z. F., Suzawa, V., Focht, K., Clark, D. S., & Dordick, J. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1100–1104.

- Ahern, T. J., Casal J. I., Petsko, G. A., & Klibanov, A. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 675–679.
- Alber, T., Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Rivers, P. S., & Wilson, I. A. (1981) *Philos. Trans. R. Soc. (London) B* 293, 159–171.
- Albery, W. J., & Knowles, J. R. (1976) *Biochemistry* 15, 5631–5640.
- Albery, W. J., & Knowles, J. R. (1977) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 16, 285–293.
- Baker, D., Sohl, J., & Agard, D. A. (1992) *Nature* 356, 263–265.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., & Waley, S. G. (1975) *Nature* 255, 609–614.
- Barrabin, H., Scofano, H. M., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 757–763.
- Bismuto, E., Jameson, D. M., & Gratton, E. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2354–2357.
- Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. Ph., Callens, M., Noble, M. E. M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M., & Wierenga, R. K. (1993) *Eur. J. Biochem.* 211, 703–710.
- Bru, R., & García-Carmona, F. (1991) *FEBS Lett.* 282, 170–174.
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., & Klibanov, A. M. (1987) *Biochemistry* 26, 1258–1264.
- Desfosses, B., Cittanova, N., Urbach, W., & Waks, M. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 79–87.
- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Millan, L., & Darszon, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 332–343.
- Fernández-Velasco, D. A., Garza-Ramos, G., Ramírez, S., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205, 501–508.
- Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992a) in *Biomolecules in Organic Solvents* (Gómez-Puyou, A., Ed.) pp 113–131, CRC Press, Boca Raton.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., & Gracy, R. W. (1992b) *Eur. J. Biochem.* 208, 389–395.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., Yüksel, Ü., & Gracy, R. W. (1994) *Biochemistry*, 33, 6960–6965.
- Girg, R., Jaenicke, R., & Rudolph, R. (1983) *Biochem. Int.* 7, 433–441.
- Hagen, A. J., Hatton, T. A., & Wang, D. I. C. (1990a) *Biotech. Bioeng.* 35, 955–965.
- Hagen, A. J., Hatton, T. A., & Wang, D. I. C. (1990b) *Biotech. Bioeng.* 35, 966–975.
- Hilhorst, R., Spruijt, T., Laane, C., & Veeger, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 459–466.
- Hughson, F. M., Wright, P. E., & Baldwin, R. L. (1990) *Science* 249, 1544–1548.
- Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117–237.
- Jaenicke, R., & Buchner, J. (1993) *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.* 4, 1–30.
- Kabanov, A. V., Klyachko, N. L., Nametkin, S. N., Merker, S., Zaroza, A. V., Bunik, V. I., Ivanov, M. V., & Levashov, A. V. (1991) *Protein Eng.* 4, 1009–1017.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14, 1–63.
- Kernen, P., Degli Agosti, R., Greppin, H., Darszon, A., & Strasser, R. J. (1993) *Experientia* 49, A51.
- Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350, 121–124.
- Laane, C., Hilhorst, R., & Veeger, C. (1987) *Methods Enzymol.* 136, 216–229.

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

B1941054M



## CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

Las interacciones agua-proteína determinan la estabilidad de la estructura nativa de las proteínas; sin embargo, el papel del agua en las barreras energéticas que separan a los intermediarios formados durante el plegamiento no se conoce. En soluciones acuosas, el alto recambio entre el agua de hidratación y el solvente, provee a la cadena polipeptídica de una matrix flexible que le permite responder eficientemente a los cambios en el ambiente (Otting *et al*, 1991); cuando el agua está en exceso, no existen restricciones cinéticas agua-proteína que impidan el tránsito de la proteína entre diferentes conformeros. Mientras que en el interior de las micelas invertidas, al modificar el contenido de agua, es posible atrapar intermediarios en ciclos catalíticos (Escamilla *et al*, 1989, Barrabin *et al*, 1993) y como se muestra en este trabajo, iniciar o interrumpir la formación del dímero activo de la TPI.

Los datos que se obtuvieron en micelas invertidas muestran claramente que el sistema presenta ventajas sobre los sistemas convencionales. Sin embargo, también presenta problemas adicionales, uno de ellos, reside en la caracterización del sistema; en particular, la determinación del tamaño y la cantidad de agua de las micelas que contienen proteína. Por lo tanto, es difícil estimar cuantas moléculas de agua entran en contacto con la proteína para permitir el plegamiento del monómero o la asociación. Incluso, es posible que los requerimientos de agua para ambos fenómenos estén relacionados con otras variables del sistema, como el aumento en el

radio micelar al incrementar el contenido de agua de las micelas.<sup>17</sup> A pesar de esto, es posible cuantificar diferencias entre el plegamiento y la asociación, así como iniciar o interrumpir la dimerización. Por lo tanto, las micelas invertidas abren la posibilidad de manipular los rearrreglos estructurales con el contenido de agua, así como la determinación de las diferencias cinéticas entre la ruta de plegamiento en agua y en micelas invertidas.

¿Para qué se requiere agua en el plegamiento y la asociación? Al igual que en la catálisis y en la desnaturalización por temperatura o agentes químicos (Garza-Ramos et al, 1992b), en este trabajo se muestra como las restricciones conformacionales debidas al tipo y/o cantidad de agua presente en el sistema disminuyen la velocidad con la que la proteína transita entre diferentes conformeros. Los datos obtenidos con enzimas liofilizadas y en solventes orgánicos muestran que la cantidad de agua que se requiere para observar catálisis es inferior a una monocapa de agua (Rupley y Careri 1991). A partir de los resultados presentados en este trabajo, se requiere más de una monocapa de agua para que se lleve a cabo el plegamiento. Al transferir a la TPI nativa a las micelas invertidas, se observa actividad catalítica (Garza-Ramos *et al*, 1992c) a concentraciones de agua (2.0 %) en las que la enzima desnaturalizada no se renaturaliza. Esto se debe probablemente a que los rearrreglos proteína-agua necesarios para la catálisis son menos extensos que los involucrados en la ruta hacia la proteína nativa; de acuerdo a los datos presentados en este trabajo, al aumentar el contenido de agua disminuyen las barreras energéticas entre los estados, ya que los cambios estructurales que se llevan a cabo durante el plegamiento y la asociación son semejantes<sup>18</sup>, es probable que las barreras energéticas de ambas transiciones se modifiquen con el mismo signo al aumentar el contenido de agua; por lo tanto, la energía de

---

<sup>17</sup>La relación entre el  $W_0$  y el radio promedio no se ha determinado en el sistema micelar utilizado en este trabajo.

<sup>18</sup>En ambos casos se ocultan grupos hidrofóbicos del solvente y se retiran moléculas de agua de la capa de hidratación de la proteína.

activación involucrada en el plegamiento debe ser de mayor magnitud que la energía de activación necesaria para la dimerización, y es por esto, que se observa dimerización a concentraciones de agua en las que no se detecta el plegamiento de los monómeros. Para que los dos pasos del plegamiento se lleven a cabo, es necesario aumentar el contenido de agua y de esta manera disminuir la energía de activación mas alta de todo el proceso, esta es, la involucrada en el plegamiento del monómero.

Si el razonamiento anterior es correcto, resulta interesante determinar experimentalmente la dependencia con temperatura de la velocidad de plegamiento del monómero y de la dimerización; así como los requerimientos de agua para ambos procesos como función de la temperatura. En este caso, sin embargo, sería necesario determinar la contribución del cambio en las propiedades de las micelas invertidas con la temperatura al efecto observado.

Durante los últimos  $3 \times 10^9$  años de evolución, las estructuras de las macromoléculas biológicas se han refinando para optimizar el funcionamiento de los organismos (Knowles y Albery 1977). Los dos eventos comunes y relevantes en la vida de todas las enzimas son el plegamiento a la estructura nativa y el desempeño de una actividad biológica específica. La determinación de las constantes de velocidad y de equilibrio de la isomerización catalizada por la TPI (Knowles y Albery 1977) en conjunto con la construcción de mutantes, han permitido la descripción del mecanismo catalítico a gran detalle (Knowles 1991). Por lo que una opción atractiva, es la determinación de las diferencias en energía y las barreras cinéticas que conducen a la formación de este catalizador perfecto. Los resultados expuestos en este trabajo, muestran que en el interior de las micelas invertidas, es posible estabilizar un intermediario monomérico debido al aumento en la energía de activación para la dimerización. Una de las perspectivas más

interesantes de los resultados presentados en este trabajo, está en asignar cambios estructurales a estas restricciones cinéticas. aunque ..... citando a Creighton:

" Unfortunately, at present it is clear that a description of these observations would be premature; we can only follow this intriguing story as it unfolds"

## BIBLIOGRAFIA

- Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**, 223-230.
- Baldwin R L (1986) *Proc Nat Acad Sci USA* **83**, 8069-8073.
- Banner D W, Bloomer A C, Petsko G A, Phillips D C, Pogson C I, Wilson I A, Corran P H, Furth E J, Milman J D, Offord R E , Priddle J D y Waley S G. (1975) *Nature* **255**, 609-614.
- Barrabin H, Scofano H M, Tuena de Gómez-Puyou M y Gómez-Puyou A. (1993) *Eur J Biochem* **213**, 757-763.
- Blacklow S C, Raines R T, Lim W A, Zamore P D, y Knowles J R. (1988) *Biochemistry* **27**, 1158-1167
- Borchert T V, Abagyan R, Jaenicke R, y Wierenga R K. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1515-1518.
- Bränden C I (1991) *Curr Op Struct Biol* **1**, 978-983.
- Brunne R M, Liepinsh E, Otting G, Wütrich K, y Van Gasteren W F (1993) *J Mol Biol* **231**, 1040-1048.
- Burns D L y Schachman H K (1982a) *J Biol Chem* **257**, 8638-8647.
- Burns D L y Schachman H K (1982b) *J Biol Chem* **257**, 8648-8654.
- Christensen H y Pain R H. (1991) *Eur Biophys J* **19**, 221-229.
- Costas M, Kronberg B y Silveston R. (1994) *J Chem Soc Faraday Trans.* **90**, 1513-1522.
- Creighton T. E. (1990) *Biochem. J.* **270**, 1-16.
- Creighton T.E. (1993) "Proteins: Structures and Molecular Properties." (2 Ed) W.H. Freeman and Co. N.Y.

- Darszon A, Philipp M, Zarco L, y Montal M. (1978) *J Membrane Biol.* **43**, 71-103.
- Dill K A (1993) *Curr Op Struct Biol* **3**, 99-103.
- Dill, K.A. y Shortle D. (1992) *Annu Rev Biochem* **60**, 795-825.
- Dobson C M (1992) *Curr. Op Struct Biol* **2**, 6-12.
- Escamilla E, Ayala G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Millan L, y Darszon A. (1989) *Arch Biochem Biophys.* **272**, 332-343.
- Fernández-Velasco D A, Garza-Ramos G, Ramírez L, Shoshani L, Darszon A, Tuena de Gómez-Puyou M y Gómez-Puyou A. (1992) *Eur J Biochem* **205**, 501-508.
- Grandi C, Smith R E y Luisi P L. (1981) *J Biol Chem* **256**, 837-843.
- Farber G K y Petsko G A (1990) *Trends Biochem Sci* **15**, 228-234
- Farber G K (1993) *Curr Op Struct Biol* **3**, 409-412.
- Fersht A (1985) "Enzyme Structure and Mechanism" (2 Ed.) W. H. Freeman and Co. N. Y.
- Fersht A y Serrano L (1993) *Curr. Op Struct. Biol.* **3**, 75-83.
- Finer-Moore J S, Kossiakoff A A, Hurley J H, Earnest T, Stroud R M, (1992) *Proteins* **12**, 203-222.
- Finney J L y Poole P L (1984) *Comments Mol Cell Biophys* **2**, 129-151.
- Freedman R.B. (1992) in "Protein Folding" Creighton T.E. Ed W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Gallay J, Vincent M, Nicot C y Waks M (1987) *Biochemistry* **26**, 5738-5747.
- Garza-Ramos G, Darszon A, Tuena de Gómez-Puyou M y Gómez-Puyou A. (1990) *Biochemistry* **29**, 751-757.
- Garza-Ramos G, Fernández-Velasco D A, Ramírez L, Shoshani L, Darszon A, Tuena de Gómez-Puyou M y Gómez-Puyou A. (1992a) *Eur J Biochem* **205**, 509-517.

- Garza-Ramos G, Fernández-Velasco D A, Tuena de Gómez-Puyou M y Gómez-Puyou A. (1992b) en "Biomolecules in Organic Solvents" Gómez-Puyou A Ed. CRC Press.
- Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Yüskel U y Gracy R W (1992c) *Eur J Biochem* **208**, 389-395.
- Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Yüskel U y Gracy R W (1994) *Biochemistry* **33**, 6960-6965.
- Goldenberg D y King J (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 3403-3407.
- Gómez-Puyou A Ed. (1991) "Biomolecules in Organic Solvents" CRC Press.
- Gregory R B Ed. (1995) "Protein-Solvent Interactions" M Dekker Inc.
- Griko Y.V. Privalov P.L. Venyaminov S. Y. (1988) *J Mol Biol* **202**, 127-
- Gross M y Jaenicke R (1994) *Eur J Biochem* **221**, 617-630.
- Herman R, Jaenicke R, y Rudolph R (1981) *Biochemistry* **20**, 5195-5201.
- Herman R, Rudolph R, Jaenicke R, Price N C, y Scobbie A (1983) *J Biol Chem* **258**, 11014-11019.
- Hilhorst R, Spruijt T, Laane C y Veeger C (1984) *Eur. J. Biochem* **144**, 459-466.
- Hu, C-Q, Sturtevant J.M., Thomson J.A., Erickson R.E. y Pace C.N. (1992) *Biochemistry* **31**, 4876-4882.
- Hubbard S J, Gross K H y Argos P (1994) *Protein Engin.* **7**, 613-626.
- Hughson F M Wright P E y Baldwin R L (1990) *Science* **249**, 1544-1548.
- Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. mol. Biol.* **49**, 117-237.
- Karplus P A y Faerman C (1994) *Curr Op Struct Biol* **4**, 770-776.
- Kauzmann, W (1959) *Adv Protein Chem* **14**, 1-63.

- Knowles J R (1991) *Nature* **350**, 121-124.
- Knowles J R y Albery W J (1977) *Acc Chem Res* **10**, 105-111.
- Krebs H, Rudolph R, Jaenicke R (1979) *Eur J Biochem* **100**, 359-364.
- Kuwajima K (1989) *Proteins* **6**, 87-103.
- Kyte J (1995) "Structure in Protein Chemistry" Garland N.Y.
- Laane C, Hilhorst R y Veeger C. (1987) *Methods in Enzymol* **136**, 216-229.
- Lambeir A M, Opperdoes F R y Wierenga R K (1987) *Eur J Biochem* **168**, 69-74.
- Le Bras G, Teschner W, Deville-Bonne D, y Garel J R (1989) *Biochemistry* **28**, 6836-6841.
- Lodi P J y Knowles J R (1993) *Biochemistry* **32**, 4338-4343.
- Lodi P J, Chang L C, Knowles J R y Komives E A. (1994) *Biochemistry* **33**, 2809-2814.
- Lolis E, Alber T, Davenport R C, Rose D, Hartman F C y Petsko G A. (1990) *Biochemistry* **29**, 6609-6618.
- Luisi P L, Giomini M, Pileni M P y Robinson B H. (1988) *Biochim Biophys Acta* **947**, 209-246.
- Maitra A (1984) *J Phys Chem* **88**, 5122-5125.
- Mande S C, Mainfroid V, Kalk K H, Goraj K, Matrial J A y Hol W G J (1994) *Protein Sci* **3**, 810-821.
- Martinek K, Levashov A V, Klyachko N, Khmelnski Y L y Berezin I V. (1986) *Eur J Biochem* **155**, 453-468.
- Marzola P y Gratton E. (1991) *J Phys Chem* **95**, 9488-9495.
- Matthews B W (1993) *Annu Rev Biochem* **62**, 139-160.
- Milla M E y Sauer R T (1994) *Biochemistry* **33**, 1125-1133.
- Muller N (1990) *Acc Chem Res.* **23**, 23-28.



- Murphy, K P, Privalov P L, Gill S J. (1990) *Science* **247**, 559-561.
- Murphy, K P, y Gill S J (1991) *J Mol Biol* **222**, 699-709.
- Noble M E M, Zeelen J P, Wierenga R K, Mainfroid V, Goraj K, Gohimont A C y Martial J A  
(1993) *Acta Crystallogr. D* **49**, 403-417.
- Otting G, Liepinsh E y Wütrich K (1991) *Science* **254**, 974-980.
- Pace, C.N. (1975) *Crit Rev Biochem* **3**, 1-43.
- Pace C N. (1992) *J Mol Biol* **226**, 29-35.
- Pfeil W y Privalov P L (1976) *Biophys Chem* **4**, 41-50.
- Pileni M P (1993) *J Phys Chem* **97**, 6961-6973.
- Pompliano D L, Peyman A, y Knowles J R. (1990) *Biochemistry* **29**, 3186-3194.
- Ptitsyn , O B. (1992) en "Protein Folding" Creighton T.E. Ed W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Privalov, P.L. (1992) en "Protein Folding" Creighton T.E. Ed W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Protein Chem* **33**, 167-241.
- Privalov, P.L. (1989) *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* **18**, 47-69.
- Privalov P L y Gill (1988) *Adv Protein Chem* **39**, 191-234.
- Privalov, P.L. y Makhatadze G.I. (1990) *J Mol Biol* **213**, 385-391.
- Privalov, P.L. y Makhatadze G.I. (1993) *J Mol Biol* **232**, 660-679.
- Rahaman R S y Hatton T A (1991) *J. Phys Chem.* **95**, 1799-1811.
- Ramírez-Silva L, Tuena de Gómez-Puyou M y Gómez-Puyou A (1993) *Biochemistry* **32**, 5332-5338.
- Rupley J A y Careri G (1991) *Adv Protein Chem* **41**, 38-173.
- Rupley J A, Gratton E y Careri G (1983) *Trens Bioch Sci.* **8**, 18-22.

- Russell A J y Klibanov A M (1988) *J Biol Chem* **263**, 11624-11626.
- Schmid F X . (1992) en "Protein Folding" Creighton T.E. Ed W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Schnackerz K D y Gracy R W (1991) *Eur J Biochem* **199**, 231-238.
- Schreiber G, Buckle A M y Fersht A R. (1994) *Structure* **2**, 945-951.
- Seygusch J, Beaudry D, y Allaire M (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7846-7850.
- Shirley B A, Stanssens P, Hahn U y Pace C N (1992) *Biochemistry* **31**, 725-732.
- Silva J L, Silveira C F, Correia A, Pontes L. (1992) *J Mol Biol* **223**, 545-555.
- Silva J. L. y Weber G. (1993) *Annu. Rev. Phys Chem* **44**, 89-113.
- Sreenivasan U y Axelsen P H (1992) *Biochemistry* **31**, 12785-12791.
- Strambini G B y Gonelli M (1988) *J Phys Chem* **92**, 2850-2853.
- Surridge C (1994) *Nature* **369**, 426.
- Tanford C (1968) *Adv Protein Chem* **23**, 121-282.
- Teeter M M (1991) *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**, 577-600.
- Teeter M M, Roe S M y Heo N H (1993) *J Mol Biol* **230**, 292-311.
- Vaucheret H, Signon L, Le Bras G y Garel J R (1987) *Biochemistry* **26**, 2785-2790.
- Vos K, Laane C, Van Hoek A, Veeger C y Visser A J W G. (1987) *Eur J Biochem* **169**, 275-282.
- Walde P Peng Q, Fadnaviss N W, Battistel E y Luisi P L. (1988) *Eur J Biochem* **173**, 401-409.
- Walde P, Han D y Luisi P L (1993) *Biochemistry* **32**, 4029-4034.
- Waley S G (1973) *Biochem J* **135**, 165-172.
- Weber G (1992) "Protein Interactions" Chapman & Hall. N.Y.
- Weber G (1993) *J Phys Chem* **97**, 7108-7115.

- Westhof E. Ed. (1993) "Water and Biological Macromolecules" CRC Press.
- Williams M A, Goodfellow J M y Thornton J M (1994) *ProteinSci* **3**, 1224-1235.
- Wierenga R K, Noble M E M, Vriend G, Nauche S y Hol W G J (1991) *J Mol Biol* **220**, 995-1015.
- Wierenga R K Borchert T V y Noble M E M (1992) *FEBS Lett* **307**, 34-39.
- Wierenga R K, Noble M E M y Davenport R C. (1992) *J Mol Biol* **224**, 1115-1126.
- Wilmanns M, Craig Hyde C, Davies D.R. Kirschner K y Jansonius J N (1991) *Biochemistry* **30**, 9161-9169.
- Zabori S, Rudolph R y Jaenicke R (1980) *Z. Naturforsch.* **35**, 999-1004.
- Zaks A (1992) en "Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation" Ahern T J y Manning M Eds. Plenum Press.
- Zaks A y Klibanov A M (1984) *Science* **224**, 1249-1251.
- Zaks A y Klibanov A M (1988) *J Biol Chem* **263**, 8017-8021.
- Zhang Z, Sugio S, Komives E A, Liu K D, Knowles J R, Petsko G A y Ringe D. (1994) *Biochemistry* **33**, 2830-2837.
- Zulauf M y Eicke H F (1979) *J Phys Chem* **83**, 480-486.