

03021
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

TERMODINAMICA DE LA DISOCIACION DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Entamoeba*
histolytica

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
DAVID ALEJANDRO CISNEROS ARMAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco los comentarios y valiosas discusiones de los miembros del jurado: Dr. D. Alejandro Fernández Velasco, Dr. Armando Gomez-Puyou, Dra. Georgina Garza-Ramos, Dr. Miguel Costas Basín y Dr. Enrique García Hernández

A los miembros de la comuna del Laboratorio de Físico-química e Ingeniería de Proteínas, sobre todo por su valiosa amistad.

A los integrantes del "Seminario de los Jueves" por compartir el gusto por la ciencia.

A mis abuelitos Ana María Armas, María Luisa González y Felipe Cisneros por su ejemplo.

A mis tíos y primos por su apoyo.

A Celia Sanginés por su amor y comprensión

A la familia Sanginés Franco por las desveladas y los patrocinios.

A mis compañeros de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica por su amistad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a Mireya del C. Armas González,
a Jorge Cisneros González,
a Jorge Cisneros Armas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

ABREVIACIONES	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Plegamiento de proteínas	5
Modelos de Plegamiento de proteínas	6
Asociación en oligómeros.....	7
Trisafosfato isomerasa (TIM)	8
Plegamiento de la TIM.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Purificación de EHTIM.....	14
Ensayo de Actividad	15
Solución amortiguadora	15
Ensayo de desplegamiento y replegamiento de EhtIM con temperatura.....	16
Fluorescencia intrínseca.....	16
Disociación por dilución.....	16
Ecuaciones y ajuste de datos	17
Accesibilidad al solvente	18
Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS	20
El desplegamiento de EhtIM muestra dos transiciones.....	20
Equilibrio en la primera transición del desplegamiento de EhtIM.....	24
Modelos de desplegamiento para EhtIM.....	26
Disociación por frío	28
Estabilidad a la dilución a 10 °C.....	29
Cálculo de parámetros termodinámicos.....	30
Accesibilidad al solvente del conformero <i>M</i>	32
DISCUSIÓN.....	34
La enzima EhtIM se pliega a través de un intermediario monomérico.....	34
Interpretación del ΔC_p en la disociación de EhtIM.....	35
El papel de Glu72 en la asociación/disociación de EhtIM.....	36
Colapso y plegamiento de EhtIM.....	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	40
Evolución y dimerización.....	40
Histéresis, asociación y plegamiento.....	40
EhtIM, un modelo para las interacciones proteína-proteína entre oligómeros.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

ABREVIACIONES

TIM	Trisafosfato isomerasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilen diamida tetracético
EhTIM	Trisafosfato isomerasa de <i>Entamoeba histolytica</i>
GuHCL	Hidrocloreuro de guanidina
huTIM	Trisafosfato isomerasa de humano
IPTG	isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
K_D	Constante de disociación $K_D = M^2/N$
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_U	Constante de deplegamiento $K_U = U/M$
L	Longitud de una proteina en residuos
LmTIM	Trisafosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>
M	Confórmero monomérico parcialmente plegado
MMTS	Metilmetano tiosulfonato
N	Confórmero nativo
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
R	Constante general de los gases $R=0.0019877 \text{ kcal/mol}^\circ\text{K}$
rTIM	Trisafosfato isomerasa de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo)
s	segundos
ScTIM	Trisafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
t	tiempo
T_0	Temperatura de referencia
TbTIM	Trisafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
T_m	Temperatura media de transición i.e. $X_N = X_M = 0.5$
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Confórmero desplegado
V_{max}	Velocidad máxima de catálisis una enzima
X_N	Fracción de enzima en estado nativo
X_M	Fracción de enzima en estado monomérico
ΔC_p	Cambio en la capacidad calorífica a presión constante (C_p)
ΔG^\ddagger	Energía de Gibbs de Activación
ΔG_D	Energía de Gibbs de disociación
ΔG_{T_0}	Energía de Gibbs de disociación a la temperatura de referencia
ΔG_{TOT}	Energía de Gibbs de deplegamiento de un dímero: $\Delta G_{TOT} = \Delta G_D + \Delta G_U$
ΔG_U	Energía de Gibbs de desplegamiento de un monómero
ΔH_D	Entalpía de disociación ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
ΔH_{T_0}	Entalpía de disociación a la temperatura de referencia
ΔS_D	Entropía de disociación ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot ^\circ\text{K}^{-1}$)
ΔS_{T_0}	Entropía de disociación a la temperatura de referencia
τ	Tiempo que tarda una molécula para pasar de una conformación a otra

RESUMEN

La triosafosfato isomerasa (TIM) cataliza la reacción:



Estructuralmente la TIM es un barril (β/α)₈ y en las especies mesófilas, como la amiba, se encuentra en forma de homodímero. En este trabajo se realizaron ensayos de desplegamiento y repliegamiento por temperatura de la TIM de *Entamoeba histolytica* (EhTIM), y se observó que el proceso de desplegamiento se ajusta al siguiente modelo de tres estados:



en donde N es el estado nativo, M es un intermediario monomérico y U es el estado desplegado. Se encontraron condiciones de reversibilidad y equilibrio para la disociación al observar la transición por dicroísmo circular. De estos datos se obtuvieron los parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y ΔC_p de disociación. De la interpretación del ΔC_p de disociación se obtiene que el intermediario monomérico es una especie expandida y que la disociación de EhTIM no es de tipo cuerpo rígido. Es decir que si lo vemos desde otro punto de vista, la asociación de los monómeros completa el plegamiento de los mismos. En éste proceso, el puente de hidrógeno formado entre la Gly45 y el Glu72 es importante para la estabilidad de la EhTIM en particular.

INTRODUCCIÓN

Plegamiento de proteínas

Las proteínas son polímeros lineales que adquieren una estructura tridimensional particular en un proceso llamado **plegamiento**, a esa estructura funcional se le llama la **conformación nativa (N)**. Éste proceso se puede llevar a cabo *in vitro*, sin la ayuda de ningún otro componente celular, lo que quiere decir que en la cadena polipeptídica se encuentra toda la información química y termodinámica necesaria. El estudio del plegamiento de las proteínas trata de entender los principios que dictan la formación de la estructura nativa a partir de una secuencia de aminoácidos, a lo que se le ha llamado la segunda parte del código genético. Dado que en su estado **desplegado (U)** las proteínas tienen cientos o miles de enlaces que pueden rotar, a Levinthal se le ocurrió en 1968 la siguiente pregunta: Si una proteína se plegara visitando todas las conformaciones posibles, ¿Cuánto tiempo (t) tardaría? La respuesta de Levinthal fue algo parecido a esto (Berezovsky *et al.*, 2002): Si tomamos un proteína con 150 residuos (L) y suponemos que cada residuo tiene $n=3$ posibles conformaciones y que estas se intercambian con una constante de (τ) de 10^{-12} s el cálculo es:

$$t = n^L \tau = 3^{150} \cdot 10^{-12} = 3.7 \times 10^{40} \text{ s} = 1.2 \times 10^{23} \text{ años} ,$$

el cual representa un tiempo mayor a la edad del universo, pero una proteína se pliega en la escala de segundos o milisegundo. A este planteamiento se le llama la paradoja de Levinthal e implica que las proteínas no pueden visitar todo el espacio conformacional azarosamente y por lo tanto deben tener una ruta o camino específico para llegar al estado nativo (Baldwin, 1999 y referencias ahí citadas). Sin embargo los modelos actuales del plegamiento de las proteínas eluden la paradoja al considerar que la diferencia en energía entre el estado desplegado y nativo provee un sesgo suficiente del espacio conformacional, en donde la energía y la entropía decrecen a medida que la proteína se pliega a su estado de menor energía (N) (Bogatyreva *et al.*, 2001).

Modelos de plegamiento de proteínas

Existen tres modelos básicos que describen el proceso del plegamiento de proteínas (Daggett *et al.*, 2002):

1. Nucleación-condensación (Wetlaufer, 1973). En este modelo el paso limitante es la formación de un núcleo de plegamiento a partir del cual se propaga el plegamiento del resto de la proteína. La formación de estructura secundaria y terciaria ocurre concertadamente en el estado de transición, en donde algunos residuos forman los contactos principales. (revisado en: Fersht, 1997).
2. Modelo jerárquico (También llamado de difusión-colisión), (Pitysin, 1973). En este modelo se plantea que el plegamiento comienza con la formación de estructuras locales en la secuencia que tienen estabilidad marginal. Estas estructuras locales interactúan y aumentan la complejidad de la estructura hasta llegar al estado nativo (revisado en: Baldwin *et al.*, 1999a y 1999b).
3. Colapso hidrofóbico. La principal característica de este modelo, propuesto por Kauzmann en 1959, es la tendencia de los residuos hidrofóbicos a ser excluidos del ambiente acuoso. El colapso hidrofóbico sucede tempranamente en el proceso de plegamiento, reduciendo el espacio conformacional y ayudando a estabilizar la estructura secundaria. Difiere del modelo de nucleación porque en éste, el núcleo de plegamiento es considerado un estado de transición, mientras que el colapso hidrofóbico se lleva a cabo sin barreras de activación (revisado en: Bilsel *et al.*, 2000).

Estos modelos representan los diferentes escenarios en los que una proteína puede plegarse. Cabe destacar que podrían ocurrir simultáneamente formando esquemas de plegamiento más complejos. En estos esquemas se pueden presentar intermediarios y su

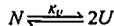
caracterización nos ayuda a trazar las interacciones importantes que deben estabilizarse para que una proteína desplegada llegue a su estado nativo.

Asociación en oligómeros

Muchas proteínas se encuentran formadas por más de una cadena polipeptídica, lo cual conlleva ventajas funcionales muy importantes. Por ejemplo compartir un sustrato, o el acomodo estructural del sitio activo, como es el caso de la TIM. En general es más o menos claro que la asociación de cadenas independientes en un solo ensamble cuaternario es determinada por las mismas fuerzas que son responsables del plegamiento de proteínas monoméricas, pero ésta contiene un término entrópico extra (Tamura *et al.*, 1997). Además la asociación en proteínas oligoméricas puede ser una forma adicional de ganar estabilidad. Por ejemplo, sin pérdida de generalidad, podemos plantear el siguiente modelo sencillo de plegamiento para el caso de un dímero:



Donde N representa el estado nativo, M un monómero parcialmente plegado, U es la conformación desplegada, K_D es la constante de equilibrio para la reacción de disociación y K_U es la constante de equilibrio para la reacción de desplegamiento. Si la K_U es muy grande entonces el intermediario monomérico sería muy inestable y no se encontraría poblado en el equilibrio (Neet *et al.*, 1994), reduciendo el modelo a:



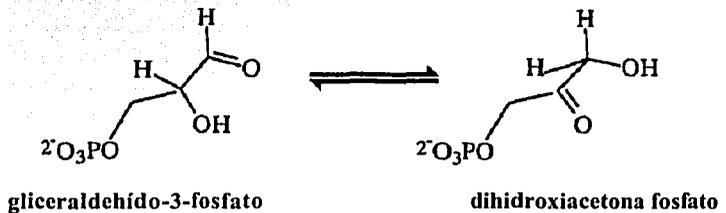
Este mecanismo se ajusta a muchas enzimas dimericas (Neet *et al.*, 1994), y da fuerza al argumento de la ganancia de estabilidad mediante la asociación, porque significa que $\Delta G_{DIS} \approx \Delta G_{TOT}$. Aunque la evolución también pudo haber jugado en sentido inverso, es decir que los monómeros estables evolucionaron hacia especies más inestables que se vieron obligados a dimerizar.

Por otra parte también se han encontrado intermediarios monoméricos en el plegamiento de homodímeros e incluso, intermediarios diméricos en el plegamiento de una proteína tetramérica (Shakhnovich *et al.*, 1999; Mateu *et al.*, 1999). Éstas podrían seguir un esquema de plegamiento jerárquico.

En todo caso, en el plegamiento de oligómeros se debe cumplir estrictamente un paso en el que haya reconocimiento entre las subunidades. Si el plegamiento de las subunidades es concomitante a la asociación, ello representa un caso extremo de proteínas que sufren un rearrreglo estructural fuertemente ligado a la oligomerización.

Triosafosfato isomerasa (TIM)

La triosafosfato isomerasa es una enzima glicolítica extensivamente estudiada que cataliza la reacción:



Esta enzima es un catalizador perfecto, es decir que el paso limitante para la reacción es la velocidad de difusión del sustrato a la enzima (revisado en Stroppolo *et al.*, 2001). En los organismos que no tienen mitocondrias, como la ameba, debe ser una enzima esencial, por lo que se le ha considerado un blanco potencial para el diseño de drogas especie específicas (Gomez-Puyou *et al.*, 1995; Rodríguez-Romero *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 1998).

La estructura de rayos X de la TIM de varias especies ha sido determinada, incluyendo la de amiba (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002; PDB: 1M6J). En las especies mesófilas, como la amiba, la TIM es dimérica, mientras que en varios organismos extremófilos es un tetrámero (Maes *et al.*, 1999). Estructuralmente es un barril (β/α)₈ y es modelo del patrón de plegamiento llamado barril TIM. Este patrón de plegamiento consiste en un barril (una hoja β circular) formado por 8 hebras β , rodeado de 8 hélices α . Las hebras β se intercalan con las hélices α en la secuencia y están unidas por asas (ver figura 1).

En la intercara de la triosafosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica* el asa tres se interna en una cavidad cercana al sitio activo e interacciona con el asa uno y el asa tres de la otra subunidad. En una de las puntas del asa tres se encuentran la treonina 82 y la glicina 83, que están conservadas en muchas especies; mutaciones de estos residuos producen enzimas monoméricas (Schliebs *et al.*, 1997). En la cavidad en la que reside el asa tres, al comienzo del asa tres de la otra subunidad, se encuentra el glutámico 72, que en la mayoría de las especies es glutamina; este residuo es importante para la asociación de EhTIM como se verá más adelante. Otra zona muy importante para la asociación de la TIM es la que rodea a la cisteína 14, este residuo se encuentra también en una cavidad sumamente hidrofóbica formada por el asa tres del otro monómero. La derivatización de este residuo por sulfhidrilos provoca la inactivación de la enzima (Garza-Ramos *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998; Pérez-Montfort *et al.*, 1999) y, en el caso de EhTIM, disociación a monómeros estables (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002); además, algunas mutantes en esa posición se comportan como monómeros (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002). En la figura 1 se puede ver el asa 3 y el asa 1, nótese como se entrelazan formando un ensamble que debe proporcionar gran parte de la estabilidad del dímero. El asa tres parece cumplir dos funciones principales; proporciona la cavidad para recibir la Cys14 y se inserta en otra cavidad formada por Glu72 y otros residuos lejanos en secuencia (figura 2).

Plegamiento de la TIM

Se han reportado trabajos sobre el plegamiento de la TIM de varias especies. En el replegamiento de la TIM de músculo de conejo (rTIM) (Zabori *et al.*, 1980) se observó una

reacción unimolecular y otra bimolecular. También se han observado intermediarios monoméricos en el desplegamiento de la TIM de levadura (ScTIM) (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Nájera *et al.*, 2003) y de *Tripanosoma brucei* (TbTIM) (Chávez-Cardenas *et al.*, 2002).

Una de las características observadas en los estudios de plegamiento de la TIM es la presencia de control cinético en su desplegamiento. Ésto fue notorio para el caso del desplegamiento de ScTIM por temperatura (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001) y por GuHCl o Urea (Nájera *et al.*, 2003). También se ha reportado heterogeneidad en el desplegamiento-replegamiento de la TIM de músculo de conejo inducido por presión (Rietveld *et al.*, 1996). Ésto puede explicarlo la alta barrera de activación (ΔG^\ddagger) que se ha calculado para el paso de disociación (21 kcal/mol) (Rietveld *et al.*, 1998) y el alto ΔG_D (18 kcal/mol) (Nájera *et al.*, 2003), por lo que condiciones que disminuyan esta barrera deberían suprimir el control cinético.

El plegamiento de la TIM de humano (huTIM) también ha sido estudiado (Mainfroid *et al.*, 1996). Sin embargo, al igual que la desnaturalización por temperatura de ScTIM (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001), se observó el desplegamiento de los monómeros acoplado a la disociación. En el primer caso, mediante la caracterización de mutantes monoméricas, se calcula un $\Delta G_{TS} = 2.5$ kcal/mol y sugieren que la naturaleza dimerica de la TIM se debe a la baja estabilidad del monómero. Otra posibilidad es la propuesta de que la TIM ha evolucionado a dímero por razones funcionales (Nájera *et al.*, 2003), ya que prácticamente el dímero es la única especie activa.

Por otra parte, se ha estudiado el plegamiento de la TIM de *Leishmania mexicana* (LmTIM) inducido por GuHCl a diferentes valores de pH, y se postulan razones estructurales por las que la mutante LmTIM/E65Q gana 26 °C en su T_m y 4 kcal/mol en estabilidad (Lambeir *et al.*, 2000). Este ejemplo es muy interesante porque la mutación de un solo residuo induce la termoestabilidad, además la única diferencia inducida por la mutación es la ganancia de un puente de hidrógeno intracadena. Acerca de este trabajo se

Figura 1

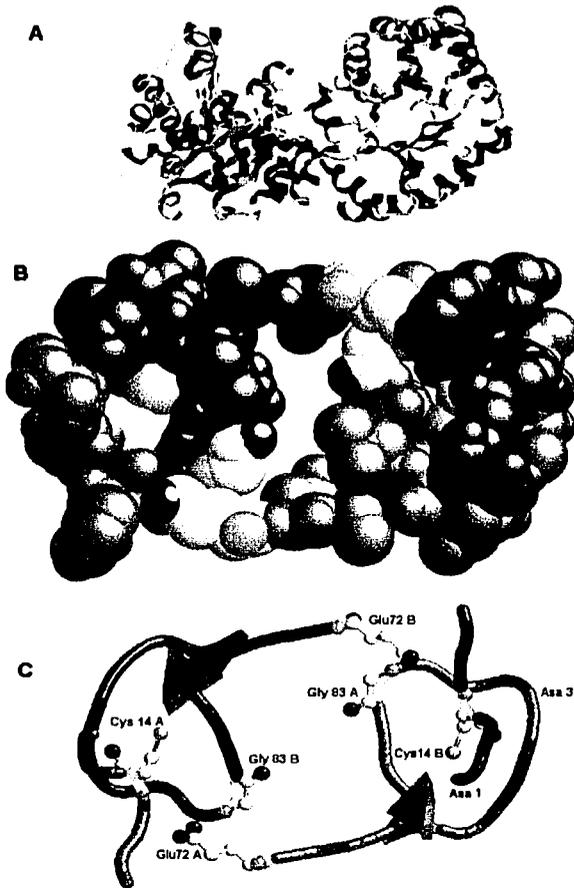


Figura 1. Estructura del barril TIM (A); en rojo hélices α , en azul hojas β y las asas en gris (ver texto). El asa 1 y el asa 3 de EhTIM en esferas de Van der Waals (B) y listones (C). En color azul esta la subunidad B y en color verde la subunidad A, además se muestran algunos residuos considerados importantes para la estabilidad de la asociación de la TIM en color CPK. Graficado por Rasmol, código PDB: 1M6J.

Figura 2

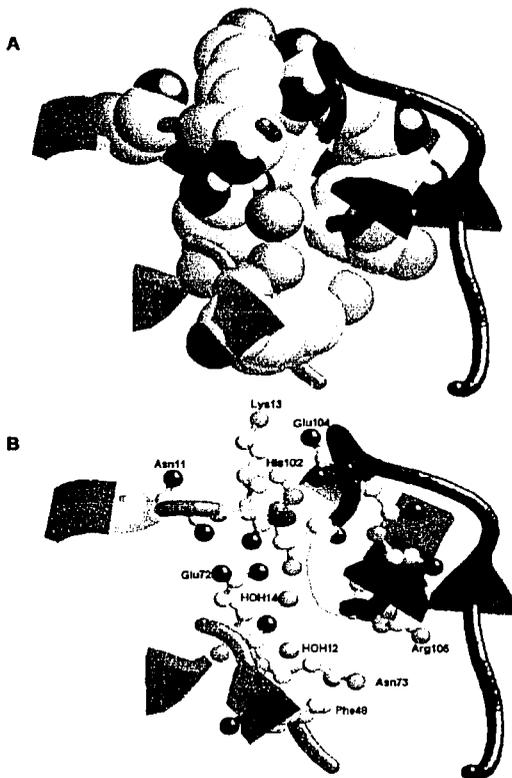


Figura 2. El asa tres se introduce en una cavidad formada por residuos de diferentes posiciones en la secuencia. El asa 3 (azul) en esferas de Van der Waals (A) y listones (B). En color blanco Thr82 y Gly83 del monómero A; en color epk los residuos de la subunidad B (verde) que se encuentran en contacto ($< 4 \text{ \AA}$) con el asa 3; en color cyan HOH12 y HOH14. Graficado en Rasmol, código PDB: 1M6J.

hablará ampliamente en la sección de discusión, cuando se establezcan las analogías entre LmTIM y EhTIM.

En el presente trabajo se hizo un intento por caracterizar el desplegamiento de la TIM de amiba, nuestro análisis sólo llegó hasta la disociación de la enzima. Sin embargo los resultados son interesantes, calculamos los parámetros termodinámicos de disociación y de su interpretación podemos inferir algunas características del plegamiento de EhTIM y de los determinantes estructurales que ayudan a su dimerización.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de EhTIM.

La purificación se llevó a cabo en los siguientes pasos (descrito por Landa *et al.*, 1997):

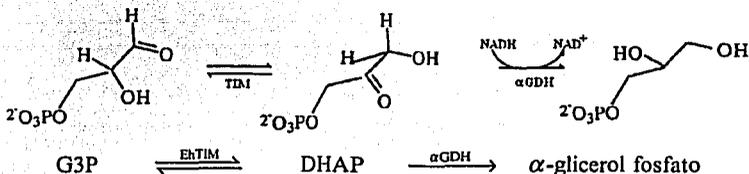
- 1) Sobre expresión de EhTIM recombinante. El gen EhTIM se encuentra clonado en el plásmido pRSET de Invitrogen (Landa *et al.*, 1997). El sistema de expresión se encuentra en *E. coli* cepa BL21/pLysS. Para sobre expresar EhTIM, un cultivo bacteriano creció hasta 1.2 de densidad óptica (600 nm) a 37 °C. Posteriormente al cultivo se le agregó IPTG 0.4 mM y se dejó crecer por 8 horas más.
- 2) El cultivo se centrifugó a 12,000 RPM durante 5 minutos para concentrar las células;
- 3) La pastilla fue resuspendida en Tris 40 mM pH 8.0 y las células se rompieron por sonicación
- 4) Las células rotas se ultracentrifugaron a 45,000 RPM en un rotor 60TI de Beckman durante 1 hora, y se conservó el sobrenadante.
- 5) Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta llegar al 60% y se dejó equilibrar durante 3 horas. Posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM por 5 min y se conservó el sobrenadante, el cual se llevó a 90% de sulfato de amonio y se dejó equilibrar durante la noche. Nuevamente se centrifugó y se conservó la pastilla.
- 6) la pastilla se resuspendió en 6 ml de Trietanolamina/EDTA/DTT 10/1/1 mM (TED 10/1/1) a pH 7.4 y se dializó por 8 horas.
- 7) La solución dializada se inyectó a una columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, de donde se conservaron las fracciones con mayor actividad de EhTIM.
- 8) Las fracciones con EhTIM se juntaron y dicha solución se inyectó a una columna de intercambio aniónico Mono-Q pH en TED 10/1/1 pH 7.4, en este pH la EhTIM se une a la columna y fue despegado por un gradiente de NaCl de 0 a 100 mM en 100 ml y EhTIM se despegó a 20 mM de NaCl. Las fracciones con más actividad específica se juntaron y se dializaron en TED 10/1/1 pH 8.

8) La solución de proteína dializada se inyectó nuevamente a la columna monoQ pero a pH 8 siguiendo exactamente el mismo protocolo que en el paso anterior, sólo que se despegó en un gradiente de 110 ml. Las fracciones con EhtIM pura fueron recolectadas y mezcladas, posteriormente se les midió sus parámetros cinéticos.

En este trabajo se hicieron tres purificaciones siguiendo el protocolo antes descrito, en cada purificación se obtuvieron entre 15 y 20 mg de EhtIM pura por cada litro de cultivo. Los parámetros cinéticos promedio de la enzima de las diferentes purificaciones son: $V_{max}=11, 727\pm 240$ y $K_m=0.5\pm 0.03$.

Ensayo de Actividad

La actividad de EhtIM se midió a través de un ensayo acoplado con la enzima α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α -GDH). En la celda de reacción se colocaron 0.2 mM de NADH, 20 μ g/ml de α -GDH, 2.5 mM de gliceraldehído-3-fosfato y 2 ng/ml de EhtIM en un volumen final de 1 ml, en amortiguador Trietanolamina/EDTA/DTT/ 100/10/1 mM pH 7.4. El esquema de reacción es el siguiente:



Solución amortiguadora

La solución amortiguadora para el ensayo de desplegamiento se preparó con tetraborato de potasio 20 mM. Se escogió ésta amortiguadora por su bajo $\Delta pK/T$ (-0.008). Esto es importante porque seguramente la disociación de EhtIM depende de pH como se explicará más adelante. Se pudo comprobar que los boratos no interfirieran con el ensayo

de desplegamiento repitiendo los datos del desplegamiento de ScTIM reportados por Benitez-Cardozo *et al.*, 2001.

Ensayo de desplegamiento y replegamiento de EhtIM con temperatura

Los ensayos se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-750 midiendo el cambio en la señal de elipticidad a 220 nm con un tiempo de respuesta de 16 s en celdas de 1 y 0.5 cm. El calentamiento de las celdas se hizo con un Peltier, el termopar que registra la temperatura del bloque se mantuvo adentro de la celda durante todo el ensayo. Se usaron tres concentraciones de proteína 15, 50 y 300 µg/ml diluidas en boratos 20 mM, además se le agregó 1 mM de DTT (0.1 mM de DTT en donde se especifique). La velocidad de calentamiento y enfriamiento fue 1 °C/min.

Fluorescencia Intrínseca

Las muestras de EHTIM (50 µg/ml) se incubaron 2.5 h en boratos 20 mM a 0° C, el amortiguador no se congeló a esta temperatura. Para medir la fluorescencia intrínseca de la proteína a bajas temperaturas se tomaron espectros de emisión de los triptofanos excitando a 295 nm.

Disociación por dilución

Se incubó EhtIM a diferentes concentraciones de proteína en el intervalo [3.57×10^{-10} M, 3.57143×10^{-7} M] a 10 °C en amortiguador trietanolamina/EDTA/DTT 100/10/1 mM a pH 8.5. Se midió la actividad de todas las muestras a las 0 horas y dos días después. Algunas muestras se midieron una semana después y mantuvieron la misma actividad, lo que quiere decir que las muestras medidas a los dos días están al equilibrio.

Ecuaciones y ajuste de datos

Los datos correspondientes a la primera transición observada en los experimentos de desnaturalización térmica se ajustaron al modelo $N \rightleftharpoons 2M$ de disociación, en donde N es la concentración de enzima nativa (dimérica) y M es la concentración de monómeros. Las concentraciones de las especies dimérica y monomérica fueron normalizadas a través de las siguientes relaciones: $X_N = \frac{2N}{P_T}$ y $X_M = \frac{M}{P_T}$, en donde X_N y X_M son la fracción de moles de monómero en estado nativo dimérico y monomérico respectivamente; P_T es la concentración de proteína total en moles de monómero por litro ($P_T = 2N + M$). La fracción de enzima dimérica se puede expresar en función de la concentración de proteína (P_T) a una temperatura por medio de la siguiente función:

$$X_N(T) = \frac{1}{4} \frac{K_D(T) + 4P_T - \sqrt{K_D(T)^2 + 8K_D(T)P_T}}{P_T} \quad (1)$$

en donde K_D es la constante de disociación. Cuando se observó la disociación por dilución a temperatura constante (10 °C), la P_T fue la variable independiente y se dejó la K_D como parámetro de ajuste. Esto permitió calcular la energía de disociación a esa temperatura por medio de la ecuación $\Delta G(T_0) = -RT_0 \ln K_D(T_0)$.

Las curvas de disociación por temperatura se normalizaron por medio de la ecuación

$$X_M(T) = \frac{y(T) - y_N}{y_M - y_N}, \text{ donde } y \text{ es la señal de dicroísmo circular a una temperatura dada, } y_N$$

es la señal de la enzima nativa, y y_M es la señal de la enzima disociada. Una vez normalizadas se ajustaron a la ecuación:

$$X_M(T) = 1 - X_N(T) \quad (2)$$

La K_D esta relacionada con la energía de Gibbs de disociación ΔG_D por la ecuación:

$$K_D = e^{-\frac{\Delta G_D(T)}{RT}} \quad (3)$$

A su vez la variación de la energía de disociación con la temperatura está descrita por una ecuación derivada de la ecuación de Gibbs-Hemholtz:

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_{T_0} - T \left[\frac{\Delta H_{T_0} - \Delta G_{T_0}}{T_0} \right] + \Delta C_p \left[T - T_0 - T \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \right] \quad (4)$$

en donde ΔC_p es el cambio en la capacidad calorífica entre el estado asociado y el estado monomérico, ΔH_{T_0} es la entalpía a la temperatura de referencia y ΔG_{T_0} es la energía de disociación a la temperatura de referencia, que para el caso de este trabajo fue $T_0 = 10^\circ \text{C}$.

La ecuación (4) surge del supuesto que:

$$\Delta H = \Delta H_{T_0} + \Delta C_p(T - T_0) \quad (5)$$

$$\text{y} \quad \Delta S = \Delta S_{T_0} + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \quad (6)$$

Sustituyendo (4) en (3), (3) en (1) y (1) en (2) se obtiene la función $X_M(T)$, la cual tiene como parámetros: ΔC_p , ΔH_{T_0} , ΔG_{T_0} , R , P_T y T_0 . En el ajuste de curvas de desplegamiento por temperatura se mantuvieron fijos los últimos cuatro y se dejaron como parámetros de ajuste ΔC_p y ΔH_{T_0} .

Todos los ajustes se hicieron con el programa Microcal™ Origin® versión 6.0 por medio de ajustes no lineal con el método de mínimos cuadrados.

Accesibilidad al solvente

La accesibilidad al solvente se determinó a partir de la estructura cristalográfica de EhTIM (PDB: 1M6J) con el programa NACCESS (Hubbard, S.J. & Thornton, J.M., 1993, 'NACCESS', Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London) utilizando el protocolo de Lee y Richards (Lee, B., *et al.*, 1971) con una sonda de 1.4 Å y 0.05 Å en el ancho de rebanada.

La accesibilidad del confórmero desplegado fue calculado como el promedio de la cota superior e inferior que provee el método de Cramer-Rose (Creamer *et al*, 1995 y 1997) en la página <http://rosclab.ihu.edu/utis/unfolded.html>.

Análisis estadístico

Se hicieron 6 experimentos de desplegamiento de EhtIM a 300 $\mu\text{g/ml}$, 5 a 50 $\mu\text{g/ml}$ y 5 más a 15 $\mu\text{g/ml}$. Cada una de las curvas de difracción circular a las diferentes concentraciones se ajustaron a la ecuación $X_M(T)$ (ecuación 2) sin restricciones a los parámetros de la ecuación, esto con la finalidad de obtener un valor exacto de la T_m por medio de ajustar la curva que mejor describiera los datos. La T_m se obtuvo al resolver para T_m en la ecuación $X_M(T_m) = 0.5$ usando los parámetros ajustados para cada una de las curvas. Las T_m de cada concentración se promediaron y se obtuvo su varianza. Con esto se llevo a cabo una análisis de varianza (ANOVA) con la hipótesis de que las tres T_m son iguales. Después se compararon los promedios por separado por medio de una prueba de T de student con la hipótesis de que la T_m de una concentración de EhtIM es igual a la de otra concentración.

RESULTADOS

El desplegamiento de EhtIM muestra dos transiciones

Se ha reportado el desplegamiento de la EhtIM por temperatura a pH 7.4 y se observó una transición no reversible con una temperatura media de transición (T_m) de ~ 55 °C (Landa *et al.*, 1996), mientras que a pH 8.5 se había observado una transición reversible calentando a 3 °C/min hasta 55 °C y con T_m de ~ 45 °C (Fernández-Velasco, *et al.*, datos no publicados) es por esto que se decidió caracterizar el desplegamiento de la EhtIM a pH 8.5. El desplegamiento de EhtIM por temperatura a pH 8.5 mostró dos transiciones con $T_{m1}=40$ °C y $T_{m2}=57$ °C (figura 3).

Figura 3

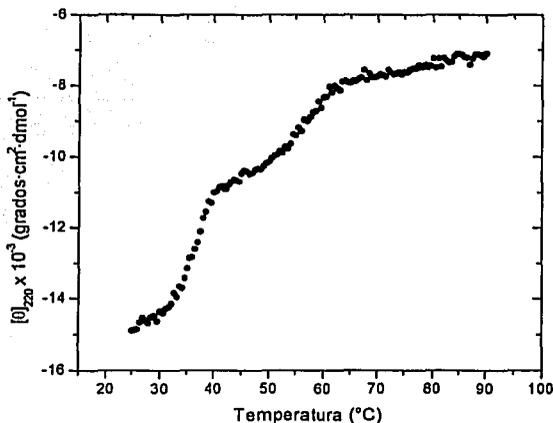


Figura 3. Desplegamiento de EhtIM seguido por dicroísmo circular a 220 nm en las condiciones estándar pero con 0.1 mM de DTT.

Un requisito importante en los estudios de plegamiento de proteínas es que las transiciones observadas sean completamente reversibles. Para observar la reversibilidad en el desplegamiento de EHTIM, se calentó una solución de EhTIM (50 $\mu\text{g/ml}$) a una velocidad de barrido de 1°C/min en amortiguador de boratos 20 mM con 0.1 mM de DTT; al llegar a 70°C se dejó enfriar la solución de enzima a una velocidad de 12°C/min hasta llegar a 20°C ; después se tomaron espectros de elipticidad para observar si la señal de la enzima renaturalizada era igual a la señal correspondiente a la enzima nativa. Los resultados revelan que la segunda transición no es reversible (figura 4), aún después de dejarla a 20°C por dos horas no recupera su estructura nativa y tampoco es reversible si el enfriamiento es más lento (datos no mostrados).

Figura 4

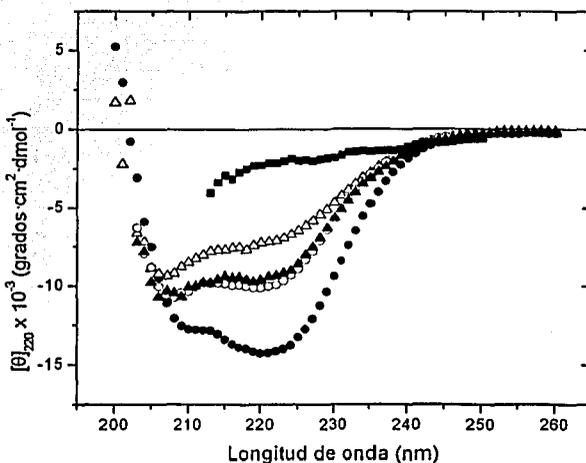


Figura 4. Espectro de dicroísmo circular de EhTIM en el UV lejano; enzima nativa a 20°C (●), enzima renaturalizada desde 70°C (○), intermedio a 50°C (▲), enzima a 70°C (△) y EhTIM en GuHCL 6M (■). El dato de 6 M de GuHCL es cortesía de Fernández Velasco, D.A. y Pozo-Yauner, L.

Se repitió el experimento aumentando la concentración de DTT (de 0.1 mM a 1 mM, ver materiales y métodos) para obtener mayor reversibilidad. Esto provocó que la enzima sufriera otra transición a partir de $\sim 60^\circ\text{C}$ (figura 5), durante la cual la elipticidad se hace más negativa. Ésta transición no es reversible y no se pudo asociar a ningún evento en el plegamiento de EhtIM. Sin embargo conservamos la alta concentración de DTT para el análisis de la primera transición como se verá más adelante.

Figura 5

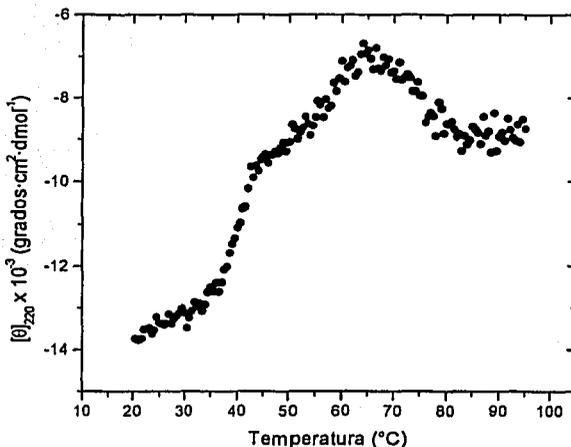


Figura 5. Desplegamiento de EhtIM con 1 mM de DTT hasta 90 °C seguido por diroísmo circular a 220 nm.

Como no se encontraron condiciones de reversibilidad para la segunda transición exploramos la posibilidad de que la primera transición, observada entre 20°C y 50°C, fuera reversible. Se hicieron ensayos de despliegamiento de EhtIM siguiendo la transición por diroísmo circular calentando a 1 °C/min hasta 50 °C, es decir donde acaba la primera transición. Después, la muestra se dejó enfriar rápidamente, a $\sim 12^\circ\text{C}/\text{min}$, hasta 20 °C. Se

volvió a calentar nuevamente a 1 °C/min hasta 50 °C; éste ciclo se repitió una vez más. De este experimento se obtuvieron tres curvas de desplegamiento (figura 6). Entre el primer y el segundo trazo, no hay diferencias significativas, aunque en el tercer trazo (círculos abiertos) se observa una irreversibilidad marginal. Estos resultados nos muestran que la primera transición, observada por dicroísmo circular, es reversible.

Figura 6

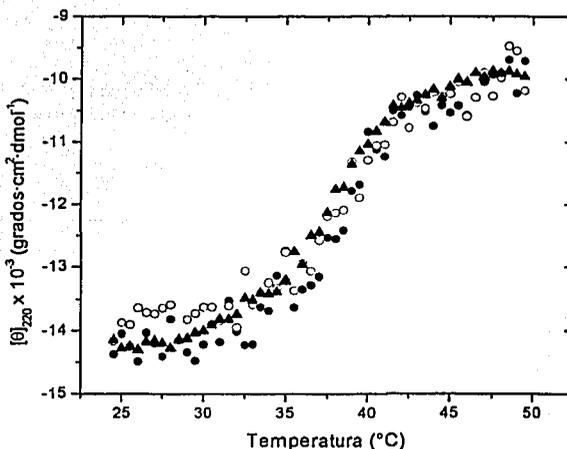


Figura 6. Reversibilidad de EhtIM. Una muestra de EhtIM se calentó a 1°C/min y enfrió a 5°C/min dos veces y se calentó una vez más. Primer desplegamiento (▲), segundo desplegamiento (●) y tercer desplegamiento (○).

Para cuantificar el porcentaje de reversibilidad en el desplegamiento de EhtIM, se repitió el experimento descrito anteriormente pero sólo se desnaturizó y renaturalizó una vez. Después se determinaron los parámetros cinéticos V_{max} y K_m a la enzima renaturalizada, como una prueba del estado conformacional y de asociación de la enzima.

Este experimento demostró que después de un ciclo de calentamiento-enfriamiento se recupera el 89% de la actividad en la V_{max} (ver figura 7).

Figura 7

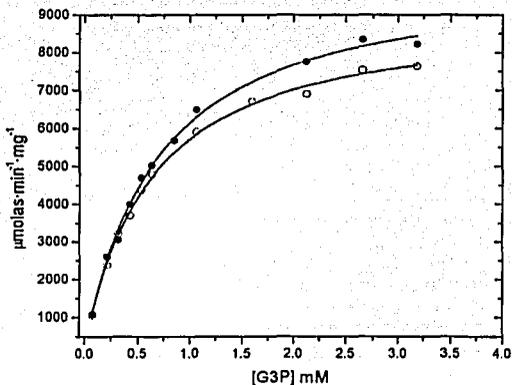


Figura 7. Cinética enzimática de Ehtim nativa (●) y Ehtim renaturalizada (○). La V_{max} para la enzima nativa y renaturalizada es de $10,172 \pm 163$ y $9,079 \pm 148$ respectivamente. La K_m no se modifica significativamente ($0,65 \pm 0,03$ para Ehtim nativa y $0,58 \pm 0,03$ para Ehtim renaturalizada).

Equilibrio en la primera transición del desplegamiento de Ehtim

Ya que la primera transición es aceptablemente reversible, entonces es necesario saber si ésta se encuentra al equilibrio. Cuando un transición está en equilibrio no depende del tiempo, sino que exclusivamente depende de la temperatura. Esto se puede saber al observar si la transición ocurre a diferentes temperaturas al variar la velocidad de calentamiento y enfriamiento (velocidad de barrido). Por lo tanto se hicieron ensayos de desplegamiento y repliegamiento para Ehtim a diferentes velocidades de barrido (1, 0,5 y 0,25 °C/min) en las condiciones estándar. Los resultados se muestran en la figura 8;

Figura 8

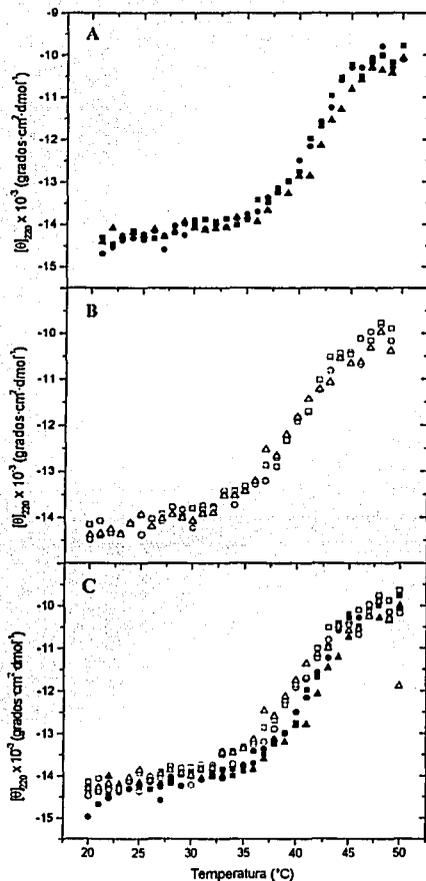


Figura 8. Despliegamiento de EhTIM a diferentes velocidades de barrido, equilibrio en el plegamiento/despliegamiento de EhTIM. Las gráficas se sobrepone ya sea para el despliegamiento (panel A, símbolos cerrados) o plegamiento (panel B, símbolos abiertos) a las diferentes velocidades de barrido; 0.25 °C/min (●,○), 0.5 °C/min. (■,□) y 1 °C/min (▲,△).

por una parte la transición parece estar al equilibrio en el desplegamiento, ya que las curvas obtenidas, a las tres velocidades de barrido se sobreponen. Lo mismo ocurre para el replegamiento, la velocidad de barrido no afecta el intervalo de temperatura en que ocurre la transición. Sin embargo cuando comparamos las curvas de desplegamiento con las de replegamiento, se alcanza a observar un poco de histéresis, la cual no es comparable con la gran histéresis que presenta el desplegamiento térmico (Benitez-Cardozo, *et al.*, 2000) y por hidrocloreuro de guanidina (Nájera, *et al.*, 2003) de ScTIM. Aún así consideramos que las curvas están al equilibrio con el fin de calcular parámetros termodinámicos, nuevos experimentos podrían ayudarnos a confirmar esta suposición.

Modelos de desplegamiento para EhTIM

Como el desplegamiento por temperatura de EhTIM presenta dos transiciones, es decir tres estados, hay dos modelos sencillos que puede seguir este proceso; tomando en cuenta que la TIM es una enzima homodimérica, los modelos son:

- a) $N \xrightleftharpoons{k_n} 2M \xrightleftharpoons{k_u} 2U$. Donde N es el estado nativo, M es un intermediario monomérico y U es el estado desplegado. Si la primera transición que observamos (20-50°C) es el paso de disociación, entonces, por tratarse de una reacción bimolecular, la T_m aumentaría al incrementar la concentración de proteína (P_t).
- b) $N \xrightleftharpoons{k_u} I \xrightleftharpoons{k_n} 2U$. Donde I es un intermediario dimérico. En este caso la T_m de la primera transición no depende de la concentración de proteína porque la primera transición es una reacción unimolecular.

Para distinguir a qué modelo pertenece la primera transición se realizaron experimentos de desplegamiento a tres concentraciones de proteína (300, 50, y 15 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados muestran que la T_m aumentó a medida que la concentración de proteína fue incrementada (figura 9), y a pesar de que este aumento es perceptible a simple vista, apenas es de aproximadamente 2.7 °C al variar en 20 veces la concentración de proteína. Para confirmar si las diferencias encontradas en la T_m son significativas se hizo un análisis estadístico por medio de la prueba ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE). Este análisis se hizo

con los resultados de al menos 5 experimentos para cada concentración de EhtIM. Los resultados muestran que la probabilidad de que la T_m de las tres concentraciones de proteína sea la misma es de 9.43×10^{-8} . La diferencia entre cada concentración también fue significativa como lo demostró un prueba de t de student. Por lo tanto este análisis nos hace inferir que la T_m en el desplegamiento de EhtIM depende de la concentración de la enzima y por lo tanto la primera transición corresponde a la disociación de EhtIM.

Tabla 1

Grupo	Número de experimentos	T_m Promedio (°K)	Varianza	Desviación estándar
300 µg/ml	6	314.69	0.14119	0.1188
50 µg/ml	5	312.99	0.14103	0.37554
15 µg/ml	5	312.22	0.08404	0.2899

Tabla 1. T_m 's promedio de la disociación de EhtIM por temperatura observada por dicroísmo circular.

Figura 9

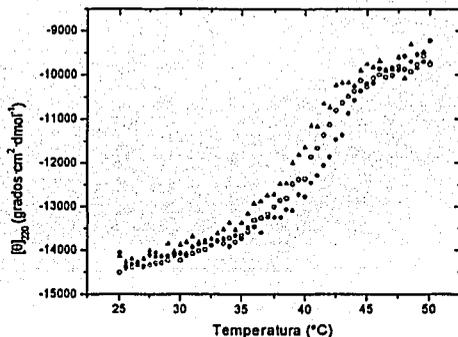


Figura 9. Desplegamiento de EhtIM a tres concentraciones de proteína: 300 µg/ml (●), 50 µg/ml (○) y 15 µg/ml (▲) seguido por dicroísmo circular.

Disociación por frío

Ya que en el desplegamiento de proteínas hay un cambio en la capacidad calorífica entre el estado nativo y desnaturalizado (ΔC_p), se predice que las proteínas se desnaturalizan tanto a altas como a bajas temperaturas. Para saber si EhTIM se disociaba a bajas temperaturas se midió la fluorescencia de la enzima después de dos horas y media de incubación a 0° C. Los espectros fueron tomados siguiendo la emisión de los triptofanos a 295nm (figura 10). Hay una disminución en la longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}), es decir un corrimiento hacia el azul de aproximadamente 4 nm. Éste fenómeno se ha visto en EhTIM cuando se estabiliza un monómero con MMTS (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002) en donde se observa un desplazamiento en la λ_{max} de 3.25 nm excitando a 280 nm. Esto podría significar que uno o más triptofanos se están reacomodando hacia el interior hidrofóbico, de la misma manera que lo hace el monómero estabilizado por MMTS, como ha sido discutido por Rodríguez-Romero *et al.*, 2002. En particular se discutió la participación del triptofano 75 que se encuentra en la interfase y que podría estar reacomodándose en la disociación de EhTIM. Por lo tanto, es probable que hayamos observado la disociación por frío por medio de la fluorescencia.

Figura 10

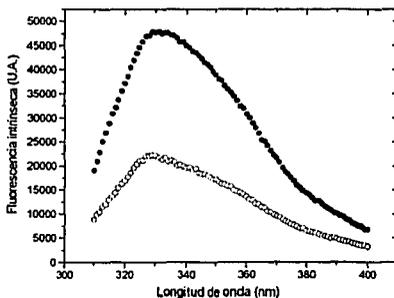


Figura 10. Espectro de emisión de fluorescencia de EhTIM a 0°C excitando a 295 nm después de incubarse 0 h (●) y 2.5 (○) h.

Estabilidad a la dilución a 10 °C

Otra forma de conocer la dependencia de la disociación con la concentración de proteína ($K_D(T)$) es medir estabilidad a la dilución a una temperatura dada; ya que sólo el dímero es activo, se puede observar la fracción de enzima nativa, simplemente al medir la actividad de muestras incubadas a diferentes concentraciones de proteína. Se sabía que la enzima era estable a la dilución a 25 °C y pH 7.4 (Landa *et al.*, 1997), así que hicimos una curva de dilución a 10°C (la cual llamaremos temperatura de referencia, T_0) y pH 8.5 (figura 11). La curva se ajustó a un modelo de disociación (ver materiales y métodos) para obtener la fracción de EhtIM nativa, esto es $X_N(P)$; como parámetro de ajuste se obtuvo el K_D , que por la relación $\Delta G = -RT \ln K$, nos permite calcular la energía libre de disociación a 10° C. La K_D para esta curva fue $9.2335E-10 \pm 2.5934E-10$, a la cual le corresponde un ΔG de 11.7 ± 0.13 kcal·mol⁻¹.

Figura 11

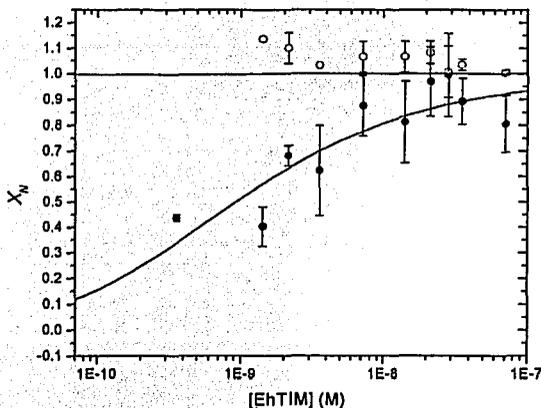


Figura 11. Estabilidad a la dilución para EhtIM a 10 °C. la fracción de dímeros activos en función de la concentración de proteína. Se midió la actividad a las 0 h de incubación (O) y 48 h después (●).

Cálculo de parámetros termodinámicos

La función $X_M(T)$ relaciona la fracción de enzima disociada (X_M) con la temperatura y sus parámetros son: ΔC_p , ΔH_{T_0} , ΔG_{T_0} , R , P_1 , y T_0 . Esta función fue utilizada para ajustar las curvas de desplegamiento medidas por dicroísmo circular y de ahí obtener los parámetros termodinámicos ΔC_p , ΔH_{T_0} (figura 12). Se utilizaron los datos de 50 y 300 $\mu\text{g/ml}$ porque son las concentraciones donde los trazos de dicroísmo circular tuvieron menos ruido. A estas curvas se les hizo un ajuste global con la restricción de ajustar un solo ΔH_{T_0} y un solo ΔC_p que describiera las dos curvas, se mantuvieron constantes R , ΔG_{T_0} , T_0 y P_T en el ajuste, los cuales se dieron por conocidos. El ΔC_p se ajustó en $4.9 \pm 0.213 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, el cual es un valor muy alto para el rango comúnmente hallado en las interacciones proteína-proteína, el ΔH_{T_0} fue ajustado en $-25.77 \pm 3.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Con el ΔC_p y el ΔH_{T_0} ajustados se calcularon el ΔG , ΔH y ΔS de disociación de otras temperaturas al resolver las ecuaciones (1), (5) y (6), estos valores fueron graficados en la figura 13, además en la tabla 2 se muestran los valores calculados para algunas temperaturas que consideramos importantes.

Tabla 2

T (° C)	T (° K)	ΔG_D kcal·mol ⁻¹	ΔH_D kcal·mol ⁻¹	ΔS_D kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	$-T\Delta S_D$ kcal·mol ⁻¹
10 ^a	283.15	11.7	-25.77±3.2	-0.13	37.47
17.62 ^b	290.77	12.2	12.18	0	0
25	298.15	11.74	48.93	0.12	-37.9
39.07 ^c	312.22	8.36	119.00	0.35	-110.64
39.84 ^d	312.99	8.08	122.83	0.37	-114.75
41.54 ^e	314.69	7.43	131.30	0.39	-123.87

Tabla 2. Valores calculados o experimentales para algunas temperaturas.

^a T_0 , temperatura de referencia; ^b temperatura de máxima estabilidad; ^c T_m 15 $\mu\text{g/ml}$; ^d T_m 50 $\mu\text{g/ml}$; ^e T_m 300 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 12

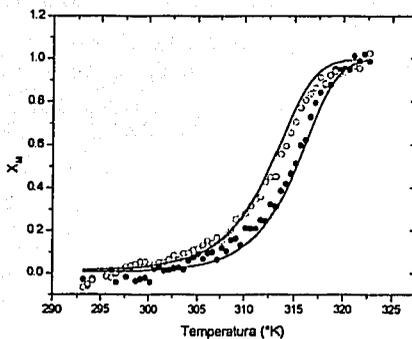


Figura 12. La ecuación $X_M(T)$, se ajustó a las curvas de despegamiento por temperatura (líneas continua) a las diferentes concentraciones; 300 µg/ml (●) y 50 µg/ml (○) .

Figura 13

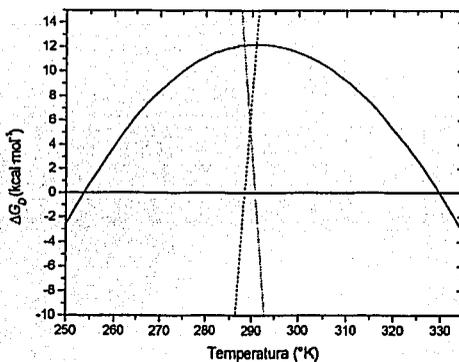


Figura 13. Curvas teóricas la entalpía $\Delta H_D(T)$ (—), entropía de disociación $\Delta S_D(T)$ (.....) y $\Delta G_D(T)$ (-·-) con los valores ajustados a las curvas de despegamiento.

Accesibilidad al solvente del conformero M

El proceso de desplegamiento de una proteína se ha comparado con la disolución de compuestos hidrofóbicos en agua (Kauzmann, 1959; Loladze *et al.*, 2001 y 2002 y referencias ahí citadas). Particularmente se ha relacionado el ΔC_p con el área expuesta al solvente (ASA) por medio de la ecuación empírica (Myers *et al.*, 1995):

$$\Delta C_p = -119 + 0.20 \Delta ASA \quad (6)$$

en donde ΔASA representa el cambio de área accesible al solvente en el desplegamiento (en este caso disociación). La ecuación (6) contiene un error conceptual porque sugiere que existe un cambio en la capacidad calorífica aun cuando no exista cambio en la accesibilidad al solvente, sin embargo puede aportar una relación relativamente confiable entre éstos dos parámetros por lo menos en el intervalo del ΔC_p ajustado. Más adelante el ΔC_p debe ser aproximado con otros modelos.

Por otra parte se pueden escribir las siguientes ecuaciones para el ΔASA para el modelo $N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$:

$$\Delta ASA_D = 2ASA_M - ASA_N \quad (7)$$

$$\Delta ASA_U = ASA_U - ASA_M \quad (8)$$

$$\Delta ASA_{TOR} = \Delta ASA_D + 2\Delta ASA_U \quad (9)$$

donde ΔASA_{TOR} es el cambio de accesibilidad entre el estado nativo y desplegado y ΔASA_U es el cambio de área accesible entre el intermediario monomérico (M) y el estado desplegado (U). Sustituyendo (8) en (7) la expresión queda:

$$\Delta ASA_{TOR} = \Delta ASA_D + 2(ASA_U - ASA_M) \quad (10)$$

por lo que podemos resolver para ASA_M de la siguiente forma:

$$ASA_M = ASA_U + \frac{1}{2}(\Delta ASA_D - \Delta ASA_{TOR}) \quad (11)$$

$$ASA_M = \frac{1}{2}(\Delta ASA_D + ASA_N) \quad (12)$$

De la ecuación (6) se calculó el cambio de accesibilidad al solvente en la disociación (ΔASA_D) a partir del ΔC_p ajustado de las curvas de disociación de EhTIM (a este lo llamaremos ΔASA_D^{EXP}). Para poder calcular la accesibilidad al solvente del

conformero M (ASA_M) necesitamos la accesibilidad del conformero N como lo dice la ecuación (12), éste último fue calculado de la estructura cristalográfica (PDB: 1M6J) como se menciona en materiales y métodos. La accesibilidad de U (ASA_U) se calculó con el método de Creamer-Rose (Creamer *et al.*, 1995 y 1997).

Por otra parte se calculó otro ΔASA_D de disociación (al que llamaremos ΔASA_D^{CRIS}) a partir de las accesibilidades de N y M provenientes de la estructura cristalográfica (PDB: 1M6J), al resolver la ecuación (7) con estos valores.

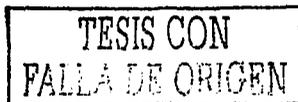
La accesibilidad de M se calculó al resolver la ecuación (12) con los dos valores del cambio en la accesibilidad al solvente de disociación (ΔASA_D^{CRIS} y ΔASA_D^{EXP}). Por lo que se obtuvieron dos valores de area accesible al solvente del intermediario monomérico (llamados ASA_M^{EXP} y ASA_M^{CRIS}), los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Conformero	$ASA^{CRIS} (\text{Å}^2)$	$ASA^{EXP} (\text{Å}^2)$	ΔASA	$\Delta ASA^{CRIS} (\text{Å}^2)$	$\Delta ASA^{EXP} (\text{Å}^2)$
N	19,811	-	ΔASA_D	3,167	25,461
M	11,489	22,636	ΔASA_U	20,121.4	8,975
U	31,611	-	ΔASA_{TOT}	43411	43411

Tabla 3. Área accesible al solvente (ASA) de los conformero presentes en el plegamiento de EhTIM.

Los datos mostrados para la accesibilidad del conformero M muestran que el ΔASA_D^{EXP} representa el ~60% ($\Delta ASA_D^{EXP} / \Delta ASA_{TOT} \times 100$) del cambio total representado por ΔASA_{TOT} . En el mismo sentido la disociación de EhTIM no es de cuerpo rígido porque el area accesible al solvente del monómero, calculado con los datos derivados de este trabajo, (ASA_M^{EXP}) es el doble de la que se puede calcular de la estructura cristalográfica (ASA_M^{CRIS}).



DISCUSIÓN

La enzima EhTIM se pliega a través de un intermediario monomérico

De los experimentos de diroísmo circular a diferentes concentraciones de proteína se puede observar que EhTIM sigue un modelo de tres estados ($N \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$) en el que el intermediario es monomérico. Esto se ha observado para la desnaturalización por agentes químicos de TIM de otras especies (Nájera *et al.*, 2003, Vázquez-Contreras *et al.*, 2000). Sin embargo, éste es el primer trabajo en el que se reporta un intermediario monomérico para desnaturalización de TIM por temperatura. El desplegamiento térmico de la TIM de levadura (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001), TIM de humano y las mutantes con baja energía de disociación huTIM/M14Q y huTIM/R98Q (Mainfroid *et al.*, 1996), se describieron como un proceso de dos estados ($N \rightleftharpoons 2U$). Esto se puede deber a que el desplegamiento de ScTIM se ve afectada por un proceso de histéresis, es decir que las mediciones están fuera del equilibrio (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001), además se ha descrito que el desplegamiento de ScTIM por urea se ajusta a un modelo de dos estados si el desplegamiento no ha llegado al equilibrio (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000). Algunas evidencias nos hacen pensar que posiblemente el desplegamiento térmico de huTIM descrito por Mainfroid y colaboradores (Mainfroid *et al.*, 1996) también está fuera del equilibrio; por ejemplo en una de las figuras de ese trabajo se demuestra, por cromatografía de exclusión molecular, que a 500 $\mu\text{g/ml}$ las mutantes M14Q y R98Q se encuentran esencialmente como monómeros, mientras que a la concentración a la que hacen su ensayo de desplegamiento térmico (10 μg), y con la K_D que reportan para M14Q a 25 °C, se predice que la fracción de monómeros en estado nativo es 0.46. Esto indica que si sus experimentos de desplegamiento térmico, estuviesen al equilibrio, deberían comenzar con la mitad de la enzima disociada. Esto es incongruente con la fuerte dependencia a la concentración de proteína en las transiciones que presentan estas mutantes, y además sus datos se ajustan a un modelo de dos estados que, como se ha mencionado, al parecer, sucede en condiciones fuera del equilibrio.

Otros resultados apoyan nuestra hipótesis de que la primera transición corresponde a la disociación de EhTIM y la segunda, muy probablemente, al desplegamiento de los monómeros. En la TIM de *Leishmania mexicana*, también se observaron dos transiciones a pH alcalinos en la desnaturalización por GuHCL. Para este caso se demostró que el intermediario es monomérico (Lambeir *et al.*, 2000), al comparar el desplegamiento del intermediario con una mutante monomérica de TbTIM, llamada monoTIM-SS; en otro trabajo se reportó que esta mutante tiene una T_m de 55 °C (Schliebs *et al.*, 1997), que es cercana a la T_m de la segunda transición reportada en este trabajo.

Interpretación del ΔC_p en la disociación de EhTIM

El ΔC_p ajustado en este trabajo ($4.9 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{°K}^{-1}$) es alto en comparación con los que se han reportado para el desplegamiento de TIM (Mainfroid, *et al.*, 1996; $\Delta C_{pTOT} = 1.5 \text{ Kcal/mol} \cdot \text{°K}$). También es más grande al ΔC_p predicho por la ecuación (6) utilizando los valores de área accesible (*i.e.* una disociación de cuerpo rígido). Si resolvemos (6) con ΔASA_D^{CRIS} entonces $\Delta C_p^{CRIS} = 0.395 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{°K}^{-1}$. Existen tres posibles explicaciones para interpretar el alto valor del ΔC_p ajustado a las curvas de disociación de EhTIM:

1. Puede ser que el supuesto de que la disociación sigue un modelo de dos estado no sea del todo correcta. Además en este trabajo se trata independientemente la disociación de EhTIM, del plegamiento del monómero, aunque probablemente haya una dependencia de ésta con la segunda transición observada (ver figura 3).
2. Por otra parte se ha propuesto que interacciones iónicas, o incluso el agua, ocultas en las intercaras proteína-proteína, pueden provocar un aumento en el ΔC_p (Stites, 1997 y referencias ahí citadas). Glu72 es un aminoácido ionizado a pH 8.5, en la intercara de EhTIM que podría contribuir a este efecto. Además existe una gran cantidad de agua atrapada en la intercara de la TIM que también podría estar aumentando el ΔC_p .
3. Si bien es posible que el ΔC_p haya sido sobreestimado, también hay evidencias a favor de que el alto valor de ΔC_p se deba a la exposición de la intercara de EhTIM

al solvente. Tomando como cierto el valor de ΔC_p y comparando los valores de la tabla 3, se puede ver que la disociación de EhTIM no es de cuerpo rígido, lo cual no es sorprendente ya que hay un cambio considerable en la estructura secundaria producido por la disociación de EhTIM (figura 4). Además, en el desplegamiento de ScTIM, se ha reportado un intermediario monomérico con el mismo radio de Stocks que la enzima nativa, *i.e.* expandido (Nájera, *et al.*, 2003). En otro reporte se encontró un intermediario compacto para el desplegamiento de ScTIM (Morgan, *et al.*, 2000), pero a diferencia del de Nájera *et al.* 2003, no está al equilibrio.

El papel de Glu72 en la asociación/disociación de EhTIM

Se han descrito las razones por las que un glutámico en la posición 65 de TIM de *Leishmania mexicana* (LmTIM) podría desestabilizar la disociación a pH alcalinos (Lambeir *et al.*, 2000). Este residuo forma parte importante de la concavidad hidrofóbica que alberga al asa 3 de la otra subunidad en la intercara de la enzima. La mayoría de las especies tienen en esa posición un residuo de glutamina. En EhTIM hay un residuo de glutámico (Glu72, figura 1), lo que podría explicar la baja energía de disociación encontrada en EhTIM a pH 8.5 (ver tabla 4). Experimentos reportados en LmTIM (Lambeir *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1999) y la observación de la estructura de EhTIM (PDB 1M6J), muestran los siguientes hechos:

1. En TbTIM y LmTIM/E65Q existe un puente de hidrógeno entre el O de la Ala42 y el NE2 de la Gln65, cuya distancia en TbTIM es 2.7 Å y en LmTIM/E65Q es 2.9 Å; en LmTIM y EhTIM esta interacción se ve afectada, en LmTIM la distancia es 3.13 Å, y en EhTIM la distancia entre los átomos equivalente, Gly45 y Glu72, es 3.4 Å (figura 14). Esta interacción es responsable del aumento de 4 kcal/mol en el ΔG_{TOR} de plegamiento de LmTIM/E65Q y se ha propuesto que dicha interacción, a pesar de ser intracatenaria, no está en el intermediario monomérico (Lambeir *et al.*, 2000).

2. También se ha propuesto que la vecindad de Glu65 en LmTIM es propicia para interacciones de puente de hidrógeno, pero para un residuo de glutamina (Williams *et al.*, 1999).
3. La estabilidad de LmTIM muestra una fuerte dependencia con el pH. Éste fenómeno se atribuye a la ionización de Glu65 (Lambeir *et al.*, 2000). La presencia de un intermediario monomérico en EhTIM resalta la desestabilización a pH alcalino, reforzado por el hecho de que la T_m de disociación, a pH 8.5, es ~ 40 °C y a pH 7.4 es de ~ 55 °C (Landa *et al.*, 1997).

Tabla 4.

Especie	ΔG_D kcal/mol
huTIM	14.3 ^a
EhTIM	11.74
ScTIM	16.8 a 18.43 ^b 19.11 a 21.83 ^c
rTIM	14.61 ^d

Tabla 4. ΔG_D a 25 ° para diferentes especies de TIM

^a(Mainfroid *et al.*, 1996)

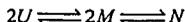
^b(Nájera *et al.*, 2003)

^c(Lolis *et al.*, *et al.*, 1990)

^d(Rietveld *et al.*, 1998)

Colapso y plegamiento de EhTIM

Dado que nuestra intención es hacer inferencias sobre el proceso de plegamiento de EhTIM, en esta sección hablaremos en sentido del plegamiento, es decir:



Tanto glutámico como glutamina son considerados aminoácidos polares y el sentido común nos hace pensar que su ocultamiento en una cavidad hidrofóbica debería considerarse desfavorable, pero se ha demostrado que el ocultamiento de residuos polares es equivalente al ocultamiento de aminoácidos hidrofóbicos del mismo tamaño si éste aminoácido polar logra una interacción de puente de hidrógeno en el interior (*i.e* deja de ser tan desfavorable) (Loladze *et al.*, 2002). Este es el caso de Gln65 de TbTIM y

LmTIM/E65Q y no es así para Glu65 de LmTIM y Glu72 de EhTIM ya que esta interacción está afectada en el estado nativo de las dos últimas enzimas.

Figura 14

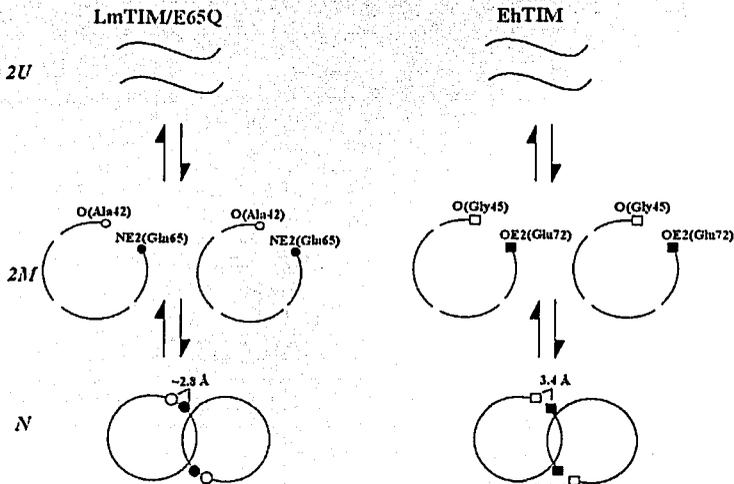


Figura 14. Modelo de plegamiento de EhTIM. La interacción O(Gly45)-OE2(Glu72) se ve afectada en el estado N en comparación a otras TIM, lo que sugiere que esta interacción es desfavorable y disminuye la energía de asociación.

De acuerdo a los datos expuestos y referidos podemos proponer el siguiente esquema de asociación para la TIM:

El conformero *U* se pliega hasta que se forma un intermediario monomérico *M*. El intermediario monomérico es una especie con un 60-70% de área expuesta como lo indica el ΔC_p aunque con considerable estructura secundaria como lo muestran los espectros de diroísmo circular (figura 4). En este intermediario expandido, en EhTIM, no existe la interacción O(Ala42)-NE2(gln65) o su equivalente en otras TIM. Al asociarse este intermediario se ocultaría esta glutamina de la interfase y este ocultamiento no sería tan desfavorable porque logra hacer un puente de hidrógeno, esto es imposible en EhTIM

porque Glu72 no puede interactuar con el O de la Gly45, convirtiéndose así en una interacción más desfavorable. Al pH en el que están hechos los experimentos de este trabajo el efecto desfavorable de Glu72 es coadyuvado por su ionización. El hecho de que el monómero sea una especie expandida sugiere que la asociación de los monómeros es esencial para que ambas cadenas polipeptídicas completen su plegamiento hasta el estado *N*. Lo que sugieren los datos hasta ahora reportados es la importancia del asa 3 en el plegamiento de la TIM, ya que el asa 3 podría estar proporcionando a la otra subunidad los contactos necesarios para que se lleve a cabo una especie de *acomodamiento inducido* (Shakhnovich, 1999) que la lleve al estado nativo y complete el plegamiento de los monómeros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Evolución y dimerización

La dimerización para la TIM es un evento clave que permite 1) el plegamiento completo de los monómeros hasta el estado nativo y 2) el correcto acomodamiento del sitio activo (Schliebs *et al*, 1997). Las razones por las cuales la TIM ha evolucionado hacia dímero, apuntan hacia razones funcionales (Nájera *et al*, 2003) y no de estabilidad como se había mencionado (Mainfroid *et al*, 1996). En un intento por revivir la teoría de la recapitulación de Haeckel, se ha propuesto que la ruta de plegamiento de oligómeros recapitula su historia de dimerización (D'alesio, 1999). Esto significa, que para el caso de dímeros que se pliegan en dos pasos, la dimerización sucedió tempranamente en la evolución debido quizá a una baja estabilidad inicial, así mismo, en los dímeros que se pliegan en tres estados la dimerización fue un evento ulterior a la evolución y a la estabilización de los monómeros. El dilema que surge al analizar estos datos es si el plegamiento de los monómeros fue un evento evolutivamente concomitante a la dimerización o posterior. Lo más razonable sería pensar que en un principio de la evolución la TIM era una enzima monomérica con muy poca actividad, tal vez como la RE-TIM (Schliebs *et al*, 1997) y que el evento de dimerización (y/o tetramerización) dio una ventaja funcional muy notable, después la evolución se enfocó al mejoramiento de energía de asociación a expensas del mecanismo de plegamiento del monómero.

Histéresis, asociación y plegamiento

Se ha observado histéresis en la disociación y plegamiento de varias especies de TIM (Nájera *et al*, 2003; Benítez-Cardoza *et al*, 2001, Rietveld *et al*, 1996). Éste fenómeno puede ser provocado por la alta energía de activación para la disociación de TIM (Rietveld *et al*, 1996; Nájera *et al*, 2003). En la disociación de EhTIM prácticamente no se observa histéresis. Tal vez la inestabilidad provocada por el Glu72 nos este indicando que las interacciones hidrofóbicas cercanas a ese residuo provoquen histéresis en las enzimas en

donde hay glutamina. En este sentido sería interesante comprobar esto a través de mutación dirigida en las especies cuyo desplegamiento esta cinéticamente controlado como ScTIM.

EhTIM, un modelo para las interacciones proteína-proteína entre oligómeros

EhTIM es una enzima que puede dar luz sobre las interacciones intercatenarias en los oligómeros ya que, a diferencia de otras especies de TIM, es reversible y su disociación se puede estudiar al equilibrio. Otra ventaja que presenta es la estabilización de especies monoméricas, ya sea por modificación química (Rodríguez-Romero *et al*, 2002) o por temperatura como las que se muestran en el presente trabajo. Bajo esta perspectiva la sustitución natural Q72E en EhTIM si bien podría representar una desventaja para la enzima, conviene para el estudio de la asociación de proteínas, en específico de la TIM.

Por otra parte, la evaluación de parámetros termodinámicos precisos es necesaria para lograr la descripción de la disociación de EhTIM. Bajo esta perspectiva el ΔC_p debe evaluarse por otros métodos, como calorimetría diferencial de barrido o calorimetría isotérmica de titulación. También se debe comprobar con otras técnicas espectroscópicas, como fluorescencia intrínseca, el supuesto de que la disociación de EhTIM se da en un único paso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Baldwin, R.L. (1999) Protein folding from 1961 to 1982. *Nat. Struc. Biol.* 6, 814-817
- Baldwin, R.L. Rose, G.D. (1999a) Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *TIBS* 1, 26-33
- Baldwin, R.L. Rose, G.D. (1999b) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *TIBS* 24, 77-83
- Benítez-Cardoza, C.G., Rojo-Domínguez, A., Hernández-Arana, A. (2001) Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of dimerization coupled to refolding. *Biochem.* 40, 9049-9058.
- Berezovsky, I.N., Trifonov, E.N. (2002) Loop Fold Structure of Proteins: Resolution of Levinthal's Paradox. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 20, 5-6
- Bilsel, O., Matthews, C.R. (2000) Barriers in protein folding. *Ad. Protein Chem.* 53, 154-207
- Bogatyрева, N.S., Finkelstein, A.V. (2001) Cuning simplicity of protein folding landscapes. *Protein Eng.* 14, 521-523
- Chávez-Cárdenas, M.E., Fernández-Velasco, D.A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., Pérez-Montfort, R. (2002) Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 117-129
- Creamer, T.P., Srinivasan, R. and Rose, G.D. (1995) Modeling unfolded states of peptides and proteins. *Biochemistry* 34, 16245-16250
- Creamer, T.P., Srinivasan, R. and Rose, G.D. (1997) Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility. *Biochemistry* 36, 2832-2835
- D'Alessio, G. (1999) The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins: tools, the environment, hypotheses. *Prog. Mol. Biol.* 72, 271-298
- Daggett, V., Fersht, A.R. (2002) Protein folding at atomic resolution. *Cell* 108, 573-582
- Fersht, A.R. (1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Op. Struc. Biol.* 7, 3-9
- Garza-Ramos G., Cabrera N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M.T., Ostoa-Saloma, P., Pérez-montfort, R., Gómez-Puyou. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* 253, 684-691

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Dominguez, A., Perez-Montfort, R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol* 2, 847-55

Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Mendoza-Hernández, G., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 41, 4230-4238

Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 14, 1-63.

Lambeir, A.M., Backmann, J., Ruiz-Sanz J., Filimonov, V., Nielsen, J.E., Kursula, I., Norledge, B.V., Wierenga, R.K. (2000) The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* 267, 2513-2524

Landa, A., Rojo-Dominguez, A., Jimenez L, Fernandez-Velasco DA. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* 247, 348-55

Lee B, Richards FM. (1971) The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J Mol. Biol.* 55, 379-400.

Loladze, V. V., Ermolenko, D.N., Makhatadze, G.I. (2001) Heat capacity changes upon burial of polar and nonpolar groups in proteins. *Protein Science* 10, 1343-1352

Loladze, V. V., Ermolenko, D.N., Makhatadze, G.I. (2002). Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior *J. Mol. Biol.* 320, 343-357

Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C., Petsko, G. (1990) Structure of Yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9-Å Resolution. *Biochemistry* 28, 6609-18

Mainfroid, V. Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J.M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A., Goraj, K. (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441-456

Maes, D., Celen, J.P., Thanki, N., Beauchamp, N., Alvarez, M., Thi, M.H., Backmann, J., Martial, J.A., Wyns, L., Jaenicke, R., Wierenga, R.K. (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different tim structures. *Proteins* 37, 441-53

Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., Perez-Montfort, R. (1998) Differences in the intersubunit

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* 283, 193-203

Mateu, M.G., Sánchez del Pino, M.M., Fersht, A.R. (1999) Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nature Struct. Biol.* 6, 191-198

Morgan, C.J., Wilkins, D.K., Smith, L.J., Kawata, Y., Dobson, C.M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 300, 11-16

Myers, J.K., Pace, N., Scholtz, J.M. (1995) Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of proteins. *Protein science* 4, 2138-2148

Nájera H., Cosats M., Fernández-Velasco, D.A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding. Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J* (En prensa).

Neet, K. E., Timm, D.E. (1994) Conformational stability of dimeric proteins: Quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein. Science.* 3, 2167-2174

Perez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H. Gao, X. G., Maldonado, E. Tuena de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A. (1999) Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *trypanosoma brucei* and *trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* 38, 4114-4120

Ptitsyn, O.B. (1973) Stage mechanism of the self-organization of protein molecules. *Dokl Acad Nauk* 210, 1213-1215.

Rietveld, A. W. M. Ferreira, S.T. (1996) Deterministic Pressure Dissociation and Unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* 35, 7743-7751

Rietveld, A.W., Ferreira, S.T. (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins.

Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Pozo-Yauner, L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, D.A. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 322, 669-675

Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., Wierenga, R.K. (1997) A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36, 9655-9662

Shakhnovich, E.I. (1999) Folding by association. *Nature Struct. Biol.* 6, 99-102

Stites, W. 1997 Protein-Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. *Chem. Rev.* 97, 1233-1250

Stroppolo, M. E., Falconi, M., Caccuri, A. M., Desideri, A. (2001) Superefficient enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1451-1460

Tamura, A., Privalov, P.L. (1997) The entropy cost of association. *J. Mol. Biol.* 273,1048-1060

Vazquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., Fernández-Velasco, D.A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl an two state behavior in urea. *Prot. Peptide Letters* 7, 57-64

Wetlaufer, D.B. (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*70, 697-701.

Williams, J.C., Zeelen J.P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann J., Michels, P.A.M., Lambeir A.M., Wierenga, R.K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: appoint mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without loosing catalytic power. *Prot. Eng.* 12, 243-250

Zabori, S., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1980) Folding and association of triose phosphate isomerase from rabbit muscle *Z. Naturforsch.*35c, 999-1004.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN