

00591  
1500  
7/7



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO

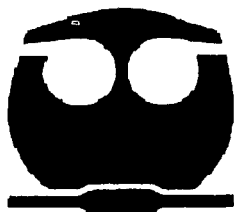
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y  
TERMODINÁMICA DEL PLEGAMIENTO  
Y LA ASOCIACIÓN DE LA  
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)  
P R E S E N T A :  
**HUGO NÁJERA PEÑA**

Asesor: DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO



MÉXICO, D. F.

2003

A



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 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.

## ÍNDICE

Resumen .....	2
Abstract.....	3
Abreviaturas .....	4
Introducción.....	5
Plegamiento de proteínas .....	5
Plegamiento <i>in vitro</i> vs <i>in vivo</i> .....	6
Plegamiento y asociación.....	7
La paradoja de Levinthal.....	8
Desnaturalización.....	9
Presión y estabilidad .....	10
Plegamiento en presencia de cosolventes .....	11
Triosafosfato isomerasa .....	12
Estructura de la triosafosfato isomerasa.....	14
Plegamiento y asociación de la TPI .....	16
Objetivos.....	19
Materiales y métodos.....	20
Materiales.....	20
Experimentos de desnaturalización y renaturalización .....	20
Mediciones espectroscópicas.....	21
Ensayos de actividad catalítica.....	21
Radio de Stokes.....	22
Ajuste de datos al equilibrio.....	23
Cinética de desnaturalización.....	24
Cinética de renaturalización .....	24
Ajuste de datos cinéticos.....	25
Renaturalización.....	25
I.- Reacción unibimolecular.....	25
II.- Reacción biunimolecular .....	26
Desnaturalización .....	27
Teoría del estado de transición.....	27
Resultados y discusión .....	29
Desnaturalización y renaturalización de la ScTPI.....	29
Estudios al equilibrio.....	29
Histéresis.....	29
Equilibrio real .....	33
Intermediario al equilibrio en la renaturalización de la ScTPI.....	34
Cálculos de estabilidad en la TPI.....	38
Estudios cinéticos .....	40
Cinética de renaturalización.....	40
Cinética de desnaturalización .....	47
Perfil de energía .....	51
Desnaturalización de la TPI de diferentes especies y otros barriles $\beta/\alpha$ .....	53
Estabilidad vs función .....	55
Estabilidad .....	55
Función .....	56
Conclusiones.....	58
Perspectivas .....	62
Referencias .....	63

## Resumen

Las razones para la naturaleza oligomérica de algunas proteínas no son claras, tal es el caso de la enzima homodimérica trifosfato isomerasa (TPI). Se ha propuesto que esta enzima es un oligómero principalmente por razones de estabilidad más que de funcionalidad. Para profundizar sobre esta discusión, caracterizamos las propiedades espectroscópicas, hidrodinámicas y funcionales de la enzima TPI de *Saccharomyces cerevisiae* para los procesos de desnaturalización y renaturalización reversible inducidos por cloruro de guanidinio y urea. El desplegamiento y replegamiento de esta enzima no fueron coincidentes después de tiempos de equilibrio “convencionales”, debido a una reacción lenta que involucra la disociación. El equilibrio fue alcanzado en la dirección de la renaturalización y puede ser descrito como un proceso de tres estados, en el cual participa un intermediario monomérico expandido e inactivo. Las cinéticas de desnaturalización y renaturalización también se describen con un modelo de tres estados, el cual involucra a un intermediario monomérico. Por otro lado, la velocidad de reactivación fue lenta y dependiente de la concentración de TPI; también mostró dependencia con la viscosidad de la solución, lo que sugiere que tanto el plegamiento como la asociación están limitados por la difusión. Se evaluaron los cambios en energía de Gibbs para las transiciones observadas en cloruro de guanidinio y urea. Del análisis de los datos obtenidos del presente trabajo y de los reportados en la literatura para la estabilidad de la trifosfato isomerasa de diferentes especies y de otros barriles  $\beta/\alpha$ , se concluye que la baja estabilidad del monómero no es ni la única, ni la principal causa de la naturaleza dimérica de la trifosfato isomerasa. Debe considerarse la posibilidad de que un dímero estable se haya formado tempranamente en la evolución y fue subsecuentemente optimizado para una catálisis perfecta. En las proteínas oligoméricas, la función y la estabilidad están íntimamente ligadas, por lo tanto, la naturaleza dimérica de la TPI debe ser examinada bajo la luz de esa interrelación.

## Abstract

The reasons underlying the oligomeric nature of some proteins such as triosephosphate isomerase are unclear. It has been proposed that this enzyme is an oligomer mainly because of stability rather than functional reasons. To address this issue, the reversible denaturation and renaturation of the homodimeric triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae* induced by guanidinium chloride and urea have been characterized by spectroscopic, functional and hydrodynamic techniques. The unfolding and refolding of this enzyme are not coincident after "conventional" equilibrium times. Unfolding experiments did not reach equilibrium due to a very slow dissociation and/or unfolding process. In contrast, equilibrium was reached in the refolding direction. The simplest equilibrium pathway compatible with the obtained data was found to be a three-state process involving an inactive and expanded monomer. Denaturation and renaturation kinetics are compatible with a three-state model, involving a monomeric intermediate. Reactivation experiments carried out at different protein concentrations were used to estimate the rates for monomer folding and association were found to be inversely proportional to the viscosity of the solution, suggesting that both reactions are diffusion-limited. The Gibbs energy changes for monomer folding and monomer association were carefully calculated from data obtained in guanidinium chloride and urea. From an analysis of the present and literature data for the stability of triosephosphate isomerase from different species and for other  $\beta/\alpha$  barrels, and model simulations on the effect of stability in the catalytic activity of the enzyme, it is concluded that the low stability of the monomers is neither the only nor the main cause for the dimeric nature of triosephosphate isomerase. There is interplay between function and stability.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

## Abreviaturas

<b>CME</b>	centro de masa espectral
<b>DC</b>	dicroísmo circular
<b>DHAP</b>	dihidroxiacetona fosfato
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>FPLC</b>	cromatografía líquida de alta presión, del inglés "fast pressure liquid chromatography"
<b>G3P</b>	D-gliceraldehído-3-fosfato
<b>GuHCl</b>	cloruro de guanidinio
<b>GPDH</b>	$\alpha$ -glicerolfosfato deshidrogenasa
$\lambda$	longitud de onda
<b>NADH</b>	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
<b>cTPI</b>	triosafosfato isomerasa de conejo
<b>hTPI</b>	triosafosfato isomerasa de humano
<b>pTPI</b>	triosafosfato isomerasa de pollo
<b>ScTPI</b>	triosafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>TbTPI</b>	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TPI</b>	triosafosfato isomerasa

# Introducción

## Plegamiento de proteínas

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

El problema del plegamiento se ha movido al escenario central de la biofísica molecular. El entender el mecanismo por el cual la secuencia de aminoácidos de una proteína dirige su rápido y eficiente plegamiento hacia la conformación nativa, involucra el esfuerzo de matemáticos, bioquímicos, biofísicos y químicos, quienes han perseguido la solución del problema desde el trabajo seminal de Anfinsen [1, 2].

Existe información detallada del plegamiento de proteínas monoméricas [3]; sin embargo, la mayoría de las proteínas son de naturaleza oligomérica. Las proteínas monoméricas sólo requieren del plegamiento intramolecular, esto es, de las interacciones de autoorganización hacia el estado nativo, mientras que en el caso de las proteínas oligoméricas también se requiere el reconocimiento y la asociación intermolecular. En el caso de los sistemas oligoméricos o multiméricos, la mayoría de las veces las reacciones de asociación están relacionadas con elementos funcionales en las vías metabólicas, aparición de la actividad o de la regulación alostérica; por lo tanto, es muy importante conocer la ruta conformacional del reconocimiento y ensamblaje de proteínas constituidas por varias cadenas polipeptídicas para formar una estructura biológicamente activa.

Se ha observado que las proteínas se pliegan con o sin intermediarios. También hay evidencia de vías de plegamiento simples o múltiples. El plegamiento presenta un nuevo reto en cuanto a la definición del problema: a) identificar y categorizar los mecanismos generales



del plegamiento b) identificar la secuencia y aspectos estructurales que determinan esos mecanismos y c) tratar de predecir que mecanismo general predomina para una proteína de secuencia y estructura particular. Hay tremendos avances a este respecto, pero el acto final está por comenzar.

### **Plegamiento *in vitro* vs *in vivo***

El plegamiento *in vivo* es facilitado por varias proteínas, que ayudan a que este proceso se lleve a cabo en lugar y tiempo adecuados, o evitan la agregación irreversible de las cadenas recién sintetizadas [4]. Sin embargo, existe un gran número de proteínas que adoptan *in vitro* la conformación nativa sin ayuda de otras proteínas, de información adicional o de aporte de energía [5]. La adquisición y estabilidad de estas estructuras está determinada por la secuencia de aminoácidos y las interacciones proteína-disolvente [2].

El plegamiento *in vivo* puede ser limitado por pasos cotraduccionales o postraduccionales, mientras que para estudiar el plegamiento *in vitro*, se hacen experimentos donde los procesos de desnaturalización y posterior replegamiento y reasociación sean reversibles. Los resultados pueden ser diferentes, pues la reconstitución *in vitro* parte de una cadena polipeptídica ya sintetizada [6-8].

Para desnaturalizar a las proteínas se pueden emplear diversos agentes, por ejemplo, el cloruro de guanidinio (GuHCl) o la urea. Estos compuestos son agentes caotrópicos cuyo mecanismo de acción todavía no es bien conocido [9-11]. Aparentemente, el GuHCl y la urea aumentan la solubilidad en agua de los residuos de aminoácidos no polares, es decir, debilitan las interacciones hidrofóbicas; los estados desnaturalizados por estos agentes son conformaciones de hebras al azar (random coil). Se considera que este estado es semejante al estado desnaturalizado *in vivo*, ya que los ángulos de rotación alrededor de cada enlace del esqueleto polipeptídico y las cadenas laterales tienen completa e igual libertad de rotación.

Una proteína desnaturizada es un conjunto de conformeros de energía similar, que se interconvierten rápidamente entre sí; casi todos los intermediarios son inestables en relación al estado nativo. Uno de los modelos más comunes en el plegamiento de proteínas es el que postula únicamente dos estados: el nativo y el desnaturizado.

## **Plegamiento y asociación**

La formación de estructura cuaternaria está ligada a las propiedades funcionales y de regulación de varias proteínas oligoméricas [7, 12]. Algunos oligómeros presentan un proceso de disociación / desplegamiento de dos estados sin intermediarios detectables [13]. En otros casos, cuando se han reportado intermediarios estables, es posible estimar su contribución relativa del plegamiento y la asociación a la estabilidad total de la proteína [14, 15]. Los dos prerequisites generales para el análisis termodinámico son la reversibilidad del proceso y que el sistema alcance el equilibrio en un tiempo razonable. Las constantes de equilibrio que describen el efecto de la concentración de desnaturizante sobre las cantidades relativas de especies nativas, intermediarias y desnaturizadas pueden ser obtenidas a partir de dos tipos de experimentos: (a) Experimentos de desnaturización ( $N \rightarrow D$ ). La proteína nativa es el estado inicial y las muestras se incuban en diferentes condiciones desnaturizantes; (b) Experimentos de renaturalización ( $D \rightarrow N$ ). Inicialmente, la proteína nativa se desenrolla completamente al incubarse a temperaturas elevadas o altas concentraciones de desnaturizante. La proteína desnaturizada es el estado inicial, que se renaturaliza a menores concentraciones de desnaturizante. En ambos tipos de experimentos, una vez alcanzado el equilibrio, las poblaciones relativas de los estados estables se calculan mediante la determinación de las propiedades espectroscópicas, funcionales o hidrodinámicas del sistema. Si la desnaturización y la renaturalización son reversibles y el tiempo de incubación es suficiente para alcanzar el equilibrio, las propiedades observadas de los experimentos  $N \rightarrow D$  y

D→N deben coincidir. Para proteínas oligoméricas, la desnaturalización se ha estudiado más que la renaturalización, ya que en esta última el rendimiento es bajo debido a la formación de interacciones no productivas e irreversibles entre los intermediarios del plegamiento [15]. Otra de las dificultades que se puede presentar, es que la cinética de desnaturalización y renaturalización sean muy lentas, ocasionando problemas en la identificación de los estados al equilibrio. De hecho, el control cinético ha sido observado en proteínas monoméricas [16] y oligoméricas [17-21].

## **La paradoja de Levinthal**

Podemos referirnos al problema del plegamiento en términos de cómo y por qué una proteína adopta su conformación nativa. Una cadena polipeptídica es capaz de adoptar millones de conformaciones. Si la cadena polipeptídica visitara todas estas conformaciones, encontrar la estructura correcta le tomaría un tiempo mayor a la edad del universo [5]. A pesar de esto, las proteínas se pliegan en segundos, lo que se conoce como la paradoja de Levinthal [22]. Para resolverla, es necesario sugerir la existencia de rutas preferenciales de plegamiento, esto es, sólo unos cuantos conformeros son visitados por la cadena y asumir la necesidad de intermediarios de plegamiento.

Tres mecanismos han emergido para explicar estas rutas: 1) El modelo del armazón (del inglés "framework") propone que los elementos locales de estructura secundaria nativa se forman independientemente de la estructura terciaria [23, 24]. Estos elementos difundirían hasta que colisionen con éxito, se adhieren y dan origen a la estructura terciaria (modelo de difusión-colisión) [25, 26]. 2) El modelo de nucleación clásico postula que algunos de los residuos vecinos en la secuencia formarían la estructura secundaria nativa que actuaría como un núcleo a partir del cual la estructura nativa podría propagarse, [27, 28]. De esta forma, la estructura terciaria resulta una consecuencia necesaria de la formación previa de estructura

secundaria. 3) El modelo del colapso hidrofóbico supone que una proteína se colapsaría rápidamente alrededor de las cadenas laterales hidrofóbicas; el intermediario así formado se reorganizaría entonces en un espacio conformacional restringido [29, 30]. En este modelo, la estructura secundaria sería dirigida por interacciones terciarias semejantes a las de la nativa.

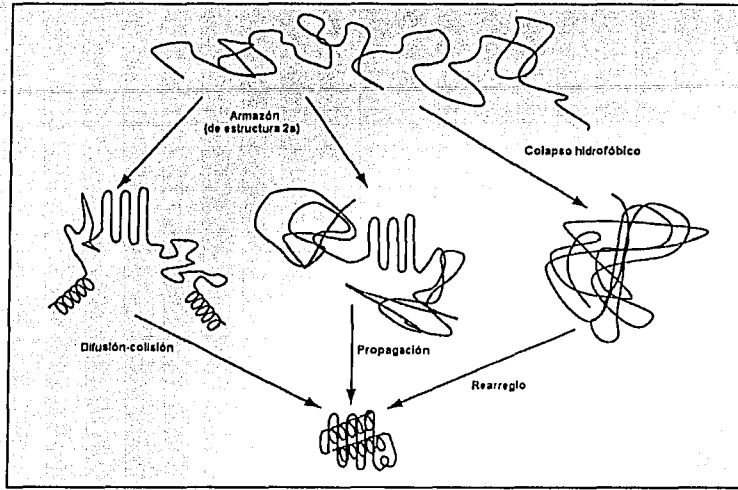


Figura 1. Los tres mecanismos clásicos de plegamiento. Figura modificada de [31].

En la actualidad, se busca afanosamente un “código de plegamiento” que intente responder cómo una estructura de una dimensión, representada por la secuencia de aminoácidos, genera la estructura tridimensional correspondiente.

## ***Desnaturalización***

La desnaturalización de las proteínas es una herramienta para el estudio de las vías o rutas de plegamiento. En las proteínas globulares pequeñas desnaturalizadas por temperatura [32] o por agentes químicos como la urea y el GuHCl, se ha encontrado que el plegamiento se lleva a cabo cooperativamente; es decir, existe únicamente una transición entre dos estados macroscópicos, el nativo y el desnaturalizado, sin la presencia de intermediarios estables. Por

lo tanto, al aumentar la condición desnaturalizante lo que cambia es la proporción de moléculas que se encuentran en el estado nativo y en el estado desnaturalizado [33].

Existe controversia sobre la semejanza entre los conformeros desnaturalizados que se obtienen por temperatura y aquellos que se obtienen por agentes químicos. Estos dos estados pueden considerarse equivalentes ya que en ambos casos se observa el deterioro cooperativo y generalizado de la estructura nativa, sin cambios significativos en la estructura covalente (con la excepción de los puentes disulfuro) [33].

El plegamiento de la cadena polipeptídica naciente y la renaturalización de las proteínas desnaturalizadas *in vitro* se inician a partir de estados poco definidos, lo que puede ser muy importante, debido a que la vía de formación de la estructura nativa puede depender del estado desnaturalizado.

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

## **Presión y estabilidad**

La estabilidad también se puede modificar al variar la presión, la cual afecta exclusivamente las interacciones internas por cambios en las distancias (volúmenes) de los componentes [34, 35]. En las proteínas monoméricas se observan cambios espectrales a presiones cercanas a 1 kbar; a presiones mayores la proteína se desnaturaliza. No se tiene información detallada sobre el estado desplegado por presión. Sin embargo, existen pruebas que indican que al exponerse los aminoácidos hidrofóbicos aumenta el volumen

hidrodinámico; por lo que se consideran termodinámicamente equivalentes a las transiciones inducidas por presión, temperatura o adición de agentes desnaturalizantes [35-37].

## **Plegamiento en presencia de cosolventes**

Se han utilizado como crioprotectores algunos polioles como el glicerol, la sacarosa o el polietilenglicol [38, 39]. Se ha establecido que en algunas proteínas globulares y péptidos, estos compuestos estabilizan la conformación nativa [40-42] a través de una hidratación preferencial de la superficie de la proteína [43, 44]. Se ha propuesto que la magnitud del efecto de estabilización es proporcional al cambio en la superficie entre los reactivos y los productos [44, 45].

El glicerol y el polietilenglicol también se han utilizado como asistentes en la renaturalización; varios autores han demostrado que estos agentes promueven la renaturalización, pues al agregar alguno de estos cosolventes en el amortiguador, se obtiene un mayor rendimiento en la renaturalización en comparación al obtenido sin la adición del asistente [45-47].

Estos cosolventes también se han utilizado como agentes viscosogénicos, para determinar la naturaleza del paso limitante en algunos procesos como el plegamiento o la catálisis. La determinación del paso limitante en el plegamiento de proteínas (excluyendo la isomerización de las prolinas o la formación de enlaces disulfuro), puede ser detallado por un análisis cinético [11]. Por ejemplo, al alterar la viscosidad del disolvente mediante la adición de agentes viscosogénicos, se ha demostrado que en la subunidad  $\alpha$  de la triptofano sintasa, el paso limitante es la asociación de las dos unidades de plegamiento  $\beta/\alpha$ . Esta reacción está limitada por la difusión [48]. Por otra parte, al analizar y comparar mutaciones sencillas o dobles en los aminoácidos de la interfase entre las unidades de plegamiento de la misma proteína, se observó que se altera tanto la velocidad de desplegamiento como la de replegamiento,

demostrando que ambas unidades  $\beta/\alpha$  de la proteína juegan un papel importante en estos procesos. El plegamiento del monómero de la subunidad  $\alpha$  se ha descrito mediante un esquema de plegamiento de 6+2, esto es, primero se pliegan 6 unidades  $\beta/\alpha$  y por último 2 unidades  $\beta/\alpha$  [11]. Esto también se ha observado para otras proteínas ( $\beta/\alpha$ ), como la fosforribosil-antranilato isomerasa [49]. Por lo tanto, este podría ser un modelo general para la formación de estructuras simétricas, como los barriles  $\beta/\alpha$ . También se ha estudiado la velocidad de plegamiento y desplegamiento en función de la viscosidad del disolvente para otras proteínas [50, 51].

Además de incrementar la viscosidad del disolvente, los aditivos viscosogénicos como el etilen glicol, el glicerol o la sacarosa, aumentan la estabilidad de la proteína [52-54]. Para resolver este problema, se ha sugerido trabajar bajo condiciones de estabilidad idéntica o isoestabilidad, que se obtiene por medio de la adición de desnaturalizante, el cual neutraliza el efecto estabilizador del agente viscosogénico. Una vez encontradas estas condiciones, se realizan mediciones del efecto de la viscosidad sobre las cinéticas de plegamiento / desplegamiento [48, 55, 56].

## **Triosafosfato isomerasa**

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

La triosafosfato isomerasa (TPI) es una proteína homodimérica, de cadenas de 27 kDa, soluble, que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato y el D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) [57]. Ya que sólo el G3P continúa en la vía glucolítica, esta enzima asegura la síntesis neta de ATP en la oxidación de la glucosa hasta piruvato. El mecanismo catalítico se conoce con gran detalle [58, 57]. La TPI se ha encontrado en todos los organismos en los que se ha buscado [59]; a la fecha, se ha reportado la secuencia de aminoácidos de TPI de más de

100 especies y se tiene la estructura tridimensional a alta resolución de 13 de ellas: *Gallus gallus* (pollo) [60], *Saccharomyces cerevisiae* [59], *Trypanosoma brucei brucei* [61], *Escherichia coli* [62], *Homo sapiens sapiens* (humano) [63], *Bacillus stearothermophilus* [64], *Plasmodium falciparum* [65], *Vibrio marinus* [66], *Trypanosoma cruzi* [67], *Leishmania mexicana* [68], *Thermotoga maritima* [69], *Pyrococcus woesei* [70] y *Entamoeba histolytica* [71]. La mayoría de las enzimas analizadas son dímeros formados por dos cadenas idénticas de 25-27 kDa, incluyendo la enzima bifuncional fosfoglicerato cinasa / triosafosfato isomerasa de *Thermotoga maritima* [72], con la excepción de dos enzimas de arqueobacterias hipertermófilas reportadas como homotetrámeros de 100 kDa [73].

La triosafosfato isomerasa es una enzima muy eficiente. La velocidad de isomerización del G3P es entre  $10^8$  y  $10^9$  veces mayor en presencia de ésta. La relación  $k_{cat}/K_m$  para el G3P como sustrato es de  $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , valor que es comparable al calculado ( $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión [58]. El perfil de energía libre de la reacción catalizada por la TPI, muestra que el estado de transición más alto está asociado con la unión del G3P a la enzima [58]. Al estudiar la variación de los parámetros catalíticos con la viscosidad del disolvente [74], se confirmó que la unión del G3P a la enzima está limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos especies; por lo tanto, los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el disolvente en la catálisis o los rearrreglos químicos entre sustrato y enzima son más rápidos que la difusión del sustrato al sitio activo. Debido a esto, la TPI es un catalizador "perfecto"; cualquier aumento en la velocidad de los pasos catalíticos no tendría efecto en la velocidad de la reacción [58].

La cinética enzimática de la TPI de diferentes especies exhibe una cinética hiperbólica del tipo Michaelis-Menten [75]. Los residuos involucrados en el pegue del sustrato y la catálisis están localizados en la misma subunidad. Cada monómero tiene un sitio activo y funciona independientemente del otro. A la fecha, no se han descrito cofactores o reguladores



alostéricos, ni se ha detectado cooperatividad entre las subunidades [76]. Parece ser que la alta eficiencia catalítica de la TPI requiere de la dimerización [77].

## Estructura de la triosafosfato isomerasa

La triosafosfato isomerasa es el prototipo del barril  $\beta/\alpha$ , uno de los patrones de plegamiento más comunes encontrados en la naturaleza [78, 79]. Los barriles  $\beta/\alpha$  presentan gran variedad de actividades catalíticas, incluyendo 5 de las 6 clases de enzimas [80]. La estructura secundaria de la TPI está formada por ocho hebras  $\beta$  que alternan con una (a veces dos) hélice(s)  $\alpha$  (Figura 2). La cadena polipeptídica se pliega de tal manera que las ocho hebras forman una hoja  $\beta$  paralela central semejando un barril.

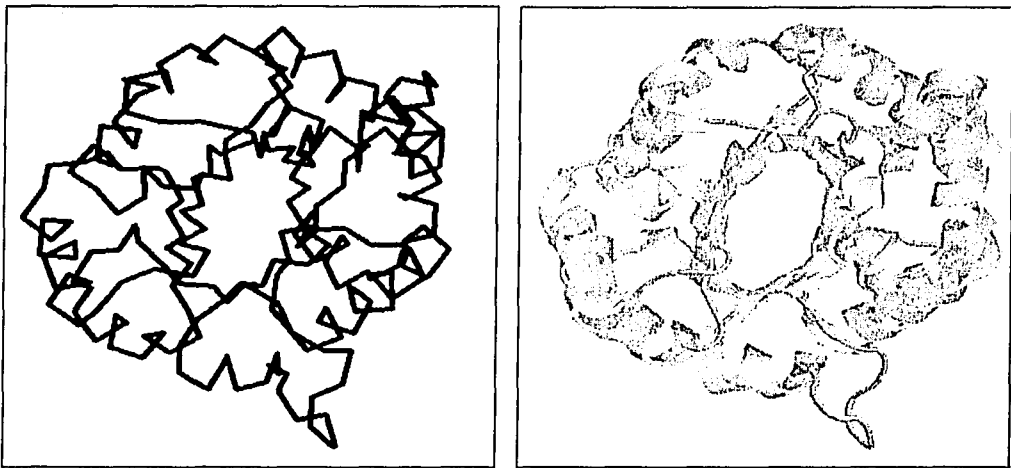


Figura 2. Estructura de la TPI (barril  $\beta/\alpha$ ). Izquierda.- esqueleto polipeptídico; derecha.- estructura secundaria en caricatura.

El sitio activo se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad formada por las asas contiguas a las hebras  $\beta$  [60] (Figura 3). Este patrón topológico se ha encontrado en aproximadamente el 10% de las proteínas cristalizadas y resueltas, depositadas en el PDB (protein data bank, URL: <http://www.rcsb.org/pdb/>).

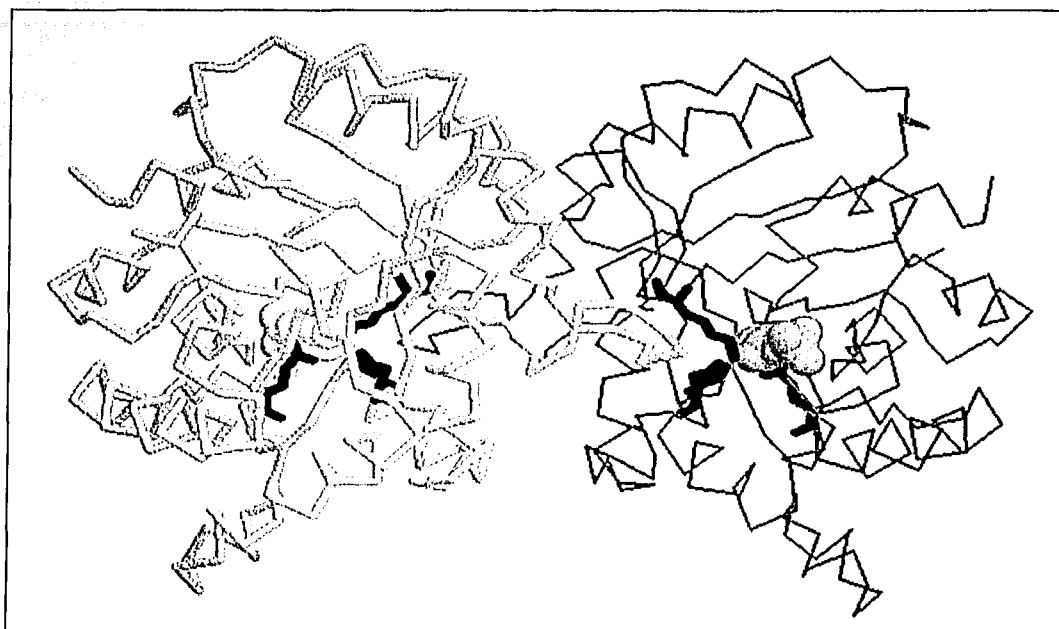


Figura 3. Esqueleto polipeptídico de la ScTPI. Se muestran los aminoácidos conservados del sitio catalítico con sus cadenas laterales (negro) y el análogo de sustrato fosfoglicohidroxamato.

En las proteínas homólogas, los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo están conservados [5]. Para el caso de la TPI sucede lo mismo [59] (Figura 3). Aunque existen diferencias en los aminoácidos de la interfase, tanto la estructura del barril (Figura 4) como la geometría de la asociación entre los monómeros, son semejantes en diferentes especies [81].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

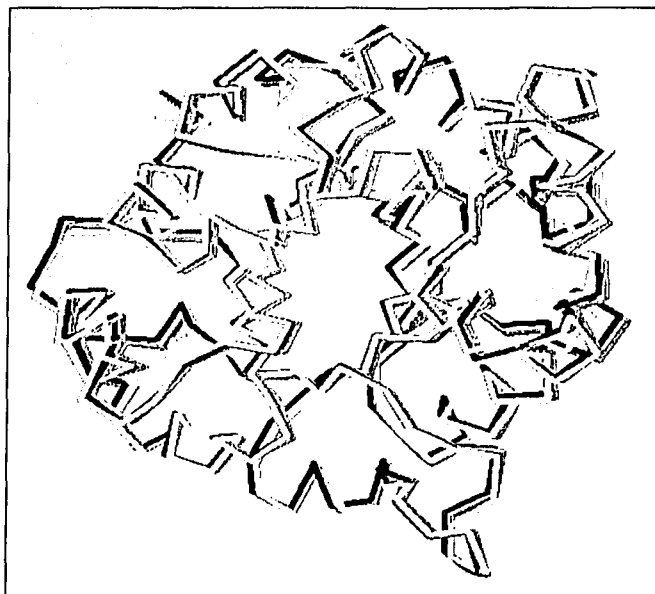


Figura 4 Sobreposición del monómero de tres estructuras de TPI. *Saccharomyces cerevisiae* (negro), *Trypanosoma brucei brucei* (gris oscuro) y pollo *Gallus gallus* (gris claro).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Plegamiento y asociación de la TPI

Ya que la TPI es un homodímero, esta enzima es uno de los modelos más sencillos para explorar el plegamiento y la asociación de las proteínas oligoméricas.

Se ha encontrado histéresis cinética entre los experimentos  $N \rightarrow D$  y  $D \rightarrow N$  en la desnaturalización de la TPI de conejo (cTPI) inducida por presión hidrostática [82] y en la desnaturalización de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTPI) inducida por temperatura [83]. A pesar de esto, los trabajos en los que se ha calculado la estabilidad de la TPI sólo han empleado experimentos  $N \rightarrow D$  [84-90, 94].

La renaturalización de la cTPI [91, 92] y de la TPI de pollo (pTPI) [93] (a partir de la enzima desnaturalizada por GuHCl), es completamente reversible. La cinética de renaturalización, determinada por la recuperación de la actividad enzimática, depende de la concentración de proteína cuando se trabaja a concentraciones bajas. A concentraciones

elevadas de proteína, la cinética se vuelve de primer orden, esto es, independiente de la concentración de enzima. Lo anterior indica que, 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. Como primera aproximación, los datos obtenidos para la renaturalización de la cTPI se ajustan a un modelo consecutivo unibimolecular ( $k_{\text{pleg}} = 1.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{\text{asoc}} = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en el que se supone que los monómeros formados durante la renaturalización son inactivos [92]. La constante de velocidad de asociación ( $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) es cercana a la esperada ( $10^5$  a  $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) para la asociación, limitada por difusión de dos moléculas de tamaño semejante. Esto implica que durante la renaturalización, todos los choques entre los monómeros son productivos.

Debido a esto, Zabori y col. [92] sugieren que la asociación de los monómeros está limitada por difusión; sin embargo, para determinar experimentalmente el papel de la difusión, es necesario determinar la variación de las constantes cinéticas con la viscosidad del disolvente [94].

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

Se ha propuesto que los monómeros de la TPI son inestables y que el ensamblaje de las subunidades induce la máxima estabilidad conformacional [95]. Por otra parte, de acuerdo con la explicación “estructura-estabilidad”, se ha considerado que la dimerización es necesaria para optimizar la geometría espacial del sitio activo [77]. Con los argumentos anteriores, no se ha establecido convincentemente la importancia relativa de la catálisis y la estabilidad para

explicar la naturaleza oligomérica de esta enzima. Aunque se ha propuesto un intermediario monomérico en el desplegamiento / replegamiento, sus características estructurales, estabilidad y el papel de la difusión en su formación no se conocen.

En este trabajo, se utilizaron diversas técnicas para caracterizar la desnaturalización y la renaturalización de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae* en GuHCl y en urea, determinando a partir de estos experimentos la estabilidad de la enzima. Con estos datos, así como con los datos disponibles en la literatura, se discute con detalle las posibles razones para la naturaleza oligomérica de la TPI.

## Objetivos

El objetivo general de este proyecto, es caracterizar la termodinámica y la cinética de la desnaturalización / renaturalización de la TPI de *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque se conoce la estructura tridimensional de esta enzima, existen varias incógnitas en cuanto a su mecanismo de plegamiento.

Utilizando como agentes desnaturalizantes la presión hidrostática, el cloruro de guanidinio y la urea, combinados con mediciones de la actividad enzimática, los espectros de fluorescencia, dicroísmo circular y la cromatografía de exclusión molecular, se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar la ruta de plegamiento de la ScTPI.
2. Obtener los  $\Delta G$  para los pasos que se determinen en el punto 1.
3. Caracterizar las propiedades de los intermediarios presentes en la ruta de plegamiento.
4. Determinar las constantes de velocidad de la desnaturalización de la ScTPI.
5. Determinar las constantes de velocidad de la renaturalización de la ScTPI.
6. Determinar el efecto del glicerol en las constantes de velocidad mencionadas en los dos objetivos anteriores
7. Conocer el papel de la difusión en el esquema de plegamiento de la ScTPI
8. Observar si el patrón de plegamiento de la TPI se modifica al variar la concentración de glicerol.

## Materiales y métodos

### Materiales

La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y el GuHCl se obtuvieron de Boehringer Mannheim, la urea de Aldrich, el glicerol y el etanol (99,9%) se obtuvieron de Merck. Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma. La producción, expresión y purificación de la ScTPI recombinante se realizó de acuerdo a Vázquez-Contreras *et al.* [90]. La concentración de ScTPI se midió espectrofotométricamente usando una absorptividad molar ( $\epsilon_{280}$ ) de 26,664  $M^{-1}cm^{-1}$  [96].

### Experimentos de desnaturalización y renaturalización

En los experimentos de desnaturalización (N→D), la ScTPI se diluyó en trietanolamina 100 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, DTT 0.1 mM (Amortiguador A) y diferentes concentraciones de GuHCl o urea. Para los experimentos de renaturalización (D→N), la enzima primero se incubó en 6 M GuHCl por 45 min u 8 M urea durante 6 h. La ausencia de actividad catalítica así como los espectros de dicroísmo circular (DC) y fluorescencia intrínseca, indicaron que en estas condiciones la ScTPI está completamente desnaturalizada. Estos tiempos de incubación fueron suficientes para alcanzar el estado desnaturalizado, ya que las propiedades observadas permanecieron sin cambio después de 24 h. Posteriormente, la renaturalización se inició por dilución de la proteína desnaturalizada en el amortiguador A, que contenía concentraciones decrecientes de GuHCl o urea. En ambos tipos de experimentos, la concentración de ScTPI estuvo en el intervalo de 7.5 nM a 7.5  $\mu M$ .

## Mediciones espectroscópicas

Las mediciones de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL). La temperatura de las celdas se mantuvo a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Para los espectros de fluorescencia se excitó a 280 nm (ancho de banda 4 nm) y se colectó la emisión de 300-400 nm (ancho de banda 8 nm). Se utilizaron celdas de cuarzo de 0.4 y 1 cm de paso de luz, dependiendo de la concentración de proteína. El centro de masa espectral (CME) se calculó de los datos de intensidad ( $I_\lambda$ ) obtenidos a diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ), usando la siguiente ecuación:  $\text{CME} = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$ .

Los experimentos con alta presión hidrostática se llevaron a cabo en el espectrofluorómetro antes mencionado; la muestra se colocó en una celda de cuarzo dentro de una celda de presión, provista de ventanas de zafiro acoplada al aparato.

El DC de las muestras con ScTPI (1.85-7.5  $\mu\text{M}$ ) se siguió a 222 nm con un espectropolarímetro JASCO J-715 usando celdas de 0.1 cm de paso de luz, termorreguladas a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Los valores reportados son el promedio de 4 minutos, con registros cada 10 segundos. Para los espectros se siguió la elipticidad en el intervalo de 250 a 210 nm en celdas de 0.1 cm de paso de luz. Las muestras de referencia sin proteína se restaron en todas las mediciones espectroscópicas.

## Ensayos de actividad catalítica

La actividad de la ScTPI se midió en celdas de 1 mL, en una mezcla de reacción con trietanolamina 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM y DTT 1 mM (amortiguador B), conteniendo 3.0 mM D,L-gliceraldehído-3-fosfato, 10  $\mu\text{g}$  GPDH, 0.2 mM NADH y 75 pM de ScTPI [97]. Las velocidades de la reacción se determinaron en un espectrofotómetro Beckman DU7500, a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , a partir del decremento en la absorbancia del NADH a 340 nm como función del



tiempo. La actividad catalítica en presencia de altas concentraciones de desnaturizante afecta la actividad de la enzima acoplante, además, las mediciones de actividad catalítica deben llevarse a cabo a concentraciones de proteína 1000 veces menores que las usadas para los experimentos espectroscópicos. Por lo tanto, la actividad se midió como sigue: las muestras (7.5  $\mu\text{M}$ -75 nM ScTPI) fueron primero diluidas a 7.5 nM sin cambio en la concentración de desnaturizante. Una alícuota tomada de la mezcla anterior se diluyó en la mezcla de reacción para medición de la actividad; este procedimiento tomó 15 segundos. Después del último paso de dilución, la concentración de ScTPI fue 75 pM y la concentración de desnaturizante fue 60 mM GuHCl u 80 mM urea. Los cursos temporales de oxidación del NADH fueron lineales, indicando que no hay reactivación o inactivación durante las mediciones. Como se ha establecido previamente, el paso de dilución no afectó los valores de actividad y los experimentos control mostraron que las mediciones de actividad catalítica no se afectan por la concentración residual de desnaturizante en el ensayo de actividad [89].

## Radio de Stokes

La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en una columna Superdex 75 HR 10/30 de filtración en gel acoplada a un sistema FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden). La elución de la proteína se siguió con un detector de fluorescencia Waters 474, usando una longitud de onda de 280 nm en la excitación (ancho de banda 18 nm) y 320 nm en la emisión (ancho de banda 18 nm). Las enzimas incubadas fueron introducidas a la columna de filtración que había sido previamente equilibrada con amortiguador B y GuHCl. Las muestras fueron eluidas a un flujo de 0.4 mL min<sup>-1</sup>. Los radios de Stokes ( $R_s$ ) se calcularon de los volúmenes de elución y una curva de calibración en la cual se utilizaron proteínas con radios de Stokes conocidos, tanto en condiciones nativas como en 6 M de GuHCl, de acuerdo a Uversky y Cháñez-Cárdenas y col. [98, 89].

## Ajuste de datos al equilibrio

La renaturalización de los monómeros desnaturalizados ( $D$ ) al dímero nativo ( $N$ ) se analizó con un modelo de tres estados que incluye un intermediario monomérico ( $M$ ).



Los cambios en energía libre para el plegamiento del monómero ( $\Delta G_{pleg}$ ) y la asociación de los monómeros ( $\Delta G_{asoc}$ ), se definen como  $\Delta G_{pleg} = -RT \ln \frac{M}{D}$  y  $\Delta G_{asoc} = -RT \ln \frac{N}{M^2}$ , suponiendo que ambos varían linealmente con la concentración de desnaturalizante  $x$  de acuerdo a:

$$\Delta G_{pleg} = \Delta G_{pleg}^0 + m_{pleg} x \quad (2)$$

$$\Delta G_{asoc} = \Delta G_{asoc}^0 + m_{asoc} x \quad (3)$$

Donde  $\Delta G_{pleg}^0$  y  $\Delta G_{asoc}^0$  son los  $\Delta G$  en ausencia de desnaturalizante y  $m$  es la energía de Gibbs en función de la concentración de desnaturalizante.

Las fracciones molares de los estados desnaturalizado, monomérico y nativo se definen por

$$f_D = \frac{D}{P_t}, f_M = \frac{M}{P_t}, \text{ y } f_N = \frac{2N}{P_t}, \text{ respectivamente, donde la concentración de proteína total}$$

( $P_t$ ) está expresada en relación a la concentración de monómeros ( $P_t = D + M + 2N$ ).  $f_M$ ,  $f_N$  y

$f_D$  pueden ser expresadas en función de las constantes de equilibrio como:

$$f_M = \frac{-\left(\frac{1}{K_{pleg}} + 1\right) + \sqrt{\left(\frac{1}{K_{pleg}} + 1\right)^2 + 8K_{asoc}P_t}}{4K_{asoc}P_t} \quad (4)$$

$$f_N = 2 (f_M)^2 K_{asoc} P_t \quad (5)$$

$$f_D = 1 - f_N - f_M \quad (6)$$

Se asumió aditividad en el observable experimental ( $y$ ) de acuerdo a:  $y = y_D f_D + y_M f_M + y_N f_N$ . Para comparar y usar los datos provenientes de diferentes técnicas, es conveniente normalizar los valores experimentales a cambio fraccional ( $\alpha$ ) con la fórmula  $\alpha = \frac{[y(x) - y(x')]}{[y(x=0) - y(x)]}$ , donde  $x'$  es la concentración de desnaturizante en la cual la enzima está completamente desplegada. Los parámetros  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$ ,  $m_{\text{pleg}}$ ,  $\Delta G_{\text{usoc}}^0$  y  $m_{\text{asoc}}$ , fueron ajustados a  $\alpha(x)$  usando las ecuaciones (4) y (5).

## Cinética de desnaturalización

Las cinéticas de desnaturalización se iniciaron por la adición de ScTPI nativa, a una solución que contenía la concentración de GuHCl deseada y glicerol cuando fue el caso, en amortiguador B a una concentración de 37.5 o 375 nM.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando una longitud de onda de excitación de 280 nm (ancho de banda 4 nm), la emisión se colectó a 320 nm (ancho de banda 8 nm). Los ensayos de actividad se hicieron por dilución de la muestra a los tiempos indicados, en amortiguador B a una concentración final de 75  $\mu\text{M}$  de ScTPI.

## Cinética de renaturalización

La ScTPI (18.75  $\mu\text{M}$ ) se desnaturalizó a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  por incubación en amortiguador B en 6 M de GuHCl por al menos 45 min. La renaturalización se inició por dilución de la proteína en una mezcla que contenía el amortiguador B y diferentes concentraciones de glicerol (0-75% v/v). La concentración de ScTPI en la renaturalización varió entre 1.875 y 187.5 nM. La concentración de GuHCl en la renaturalización se fijó en 60 mM. Experimentos control muestran que la actividad catalítica no es afectada por estas concentraciones de desnaturizante.

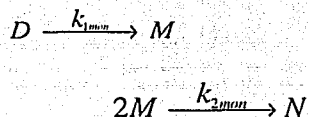
Las mediciones de actividad catalítica se llevaron a cabo como sigue: una alícuota se tomó de la mezcla arriba mencionada (2 ng ScTPI), a los tiempos indicados se diluyó en la mezcla de reacción para actividad (ver subsección ensayos de actividad). Este procedimiento tomó 15 s (40 s a altas concentraciones de glicerol). Las mediciones de fluorescencia se realizaron con 37.5-375 nM de ScTPI, usando una longitud de onda en la excitación de 280 nm (ancho de banda 8 nm), la emisión se siguió a 320 nm (ancho de banda 16 nm).

## Ajuste de datos cinéticos

### Renaturalización

#### I.- Reacción unibimolecular

Una reacción unibimolecular tiene dos pasos. En el primero se tiene una reacción de primer orden y en el segundo hay una reacción de segundo orden [99, 100]. Si se considera el caso inicial siguiente, la reacción es:



$$t = 0: \quad [D]_0 \quad 0 \quad 0$$

$$t \quad : \quad [D] \quad [M] \quad [N]$$

Las ecuaciones cinéticas son:

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_{1mon}[D] \quad (7)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = k_{1mon}[D] - 2k_{2mon}[M]^2 \quad (8)$$

$$\frac{d[N]}{dt} = k_{2mon}[M]^2 \quad (9)$$

El curso temporal de  $[D]$ ,  $[M]$  y  $[N]$  se obtiene de [99, 100]:

$$[D] = [D]_0 \tau \quad (10)$$

$$[M] = -[D]_0 \sqrt{\frac{\tau}{\kappa}} \frac{I_1(2\sqrt{\kappa\tau}) - \beta' \kappa_1(2\sqrt{\kappa\tau})}{I_0(2\sqrt{\kappa\tau}) + \beta' \kappa_0(2\sqrt{\kappa\tau})} \quad (11)$$

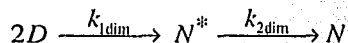
$$[N] = \frac{1}{2}([D]_0 - [D] - [M]) \quad (12)$$

donde  $\tau = e^{-k_{1mon}t}$ ,  $k'_{2mon} = 2k_{2mon}$ ,  $\kappa \equiv [D]_0 k'_{2mon} / k_{1mon}$ ,  $\beta' = \frac{iJ_1(2i\sqrt{\kappa})}{H_1^{(0)}(2i\sqrt{\kappa})}$ ,  $i = \sqrt{-1}$  y  $J_0$  y  $H_0^{(0)}$ ,

son funciones de Bessel de primer y tercer tipo de orden cero, respectivamente.

## II.- Reacción biunimolecular

La reacción consecutiva biunimolecular es [99]:



$$\begin{array}{l} t = 0: \quad [D]_0 \quad 0 \quad 0 \\ t \quad : \quad [D] \quad [N^*] \quad [N] \end{array}$$

Las ecuaciones cinéticas son:

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_{1dim}[D]^2 \quad (13)$$

$$\frac{d[N^*]}{dt} = 2k_{1dim}[D]^2 - k_{2dim}[N^*] \quad (14)$$

$$\frac{d[N]}{dt} = k_{2dim}[N^*] \quad (15)$$

El curso temporal de  $[D]$ ,  $[N^*]$  y  $[N]$  se obtiene de [99]:

$$[D] = \frac{[D]_0}{1 + [D]_0 k_{1dim} t} \quad (16)$$

$$[N^*] = \frac{2}{k_{1dim}\tau'} \left[ k_1' (\tau' \exp(-k_{2dim}t) - 1) - \tau' k_{2dim} (Ei(k_3\tau') \exp(k_3\tau')) (Ei(k_3) \exp(k_3)) \right] \quad (17)$$

$$[N] = \frac{1}{2} ([D]_0 - [D]) - [N^*] \quad (18)$$

donde  $\tau' \equiv (k_1' + 1)$ ,  $k_1' \equiv k_{1dim}[D]_0$ ,  $k_3 \equiv -k_{2dim}/k_1'$  y  $Ei$  es la exponencial integral.

## Desnaturalización

Los experimentos cinéticos de disociación y desplegamiento se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$y = y_0 + A_1 e^{-x/\tau} \quad (19)$$

donde  $y$  es la intensidad de fluorescencia o la actividad catalítica,  $y_0$  es  $y$  a tiempo infinito,  $A_1$  es la amplitud y  $\tau$  es el tiempo de relajación.

## Teoría del estado de transición

La teoría del estado de transición propuesta por Eyring y por Evans y Polanyi en 1935 [101, 102], aportó un nuevo aspecto en el cual se considera al complejo activado o "estado de transición<sup>‡</sup>" como una especie inestable en el máximo de energía libre.

En la teoría del estado de transición, la reacción elemental  $A + B \xrightarrow{k} P$  se puede reescribir como:  $A + B \xrightleftharpoons{K^\ddagger} AB^\ddagger \xrightarrow{k^\ddagger} P$

Se supone que los reactantes están en equilibrio rápido con el estado de transición  $AB^\ddagger$ .  $K^\ddagger$  es la constante de equilibrio entre el estado de transición y los reactantes y  $k^\ddagger$  es una constante universal de velocidad.

$$K^\ddagger = \frac{[AB^\ddagger]}{[A][B]} \quad (20)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k^\ddagger [AB^\ddagger] \quad (21)$$

Tanto  $K^\ddagger$  como  $k^\ddagger$  no son parámetros medibles; se usan solamente para derivar los resultados.

Combinando las ecuaciones 20 y 21 se obtiene

$$\frac{d[P]}{dt} = k^\ddagger K^\ddagger [A][B] \quad (22)$$

La expresión de constante experimental es

$$\frac{d[P]}{dt} = k [A][B]$$

Entonces se tiene la relación de una constante de velocidad experimental  $k$  con propiedades del estado de transición.

$$k = k^\ddagger K^\ddagger \quad (23)$$

Pero cualquier constante de equilibrio está relacionada con la energía libre de la reacción,  $\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger$  y la teoría del estado de transición muestra que la constante de velocidad universal  $k^\ddagger$  es igual a

$$k^\ddagger = \frac{k_B T}{h} \quad (24)$$

donde  $k_B$  y  $h$  son la constante de Boltzmann y Planck respectivamente ( $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ,  $h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ). Combinando las ecuaciones 22-24 se obtiene

$$k = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (25)$$

Esta ecuación permite el cálculo de la energía libre de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ), a partir de una constante de velocidad determinada experimentalmente.

Los  $\Delta G^\ddagger$  en ausencia de GuHCl se obtuvieron por extrapolación lineal de las constantes de velocidad obtenidas en presencia de desnaturizante.

## Resultados y discusión

### Desnaturalización y renaturalización de la ScTPI

#### Estudios al equilibrio

##### Histéresis

Se determinaron las propiedades espectroscópicas y catalíticas de los diferentes estados de la ScTPI, con las muestras provenientes de experimentos convencionales  $N \rightarrow D$  (Figura 5, símbolos vacíos) y de experimentos  $D \rightarrow N$  (Figura 5, símbolos llenos). En ambos tipos de experimentos ( $N \rightarrow D$  y  $D \rightarrow N$ ), a concentraciones menores a 0.3 M de GuHCl o 1.0 M de urea, la actividad catalítica y la fluorescencia fueron muy parecidas entre sí y a la nativa. Esto indica que la renaturalización de la enzima es completamente reversible. Las muestras  $N \rightarrow D$  y  $D \rightarrow N$  también coinciden a altas concentraciones de desnaturante (1.5-2.5 M GuHCl o 7.0-8.0 M urea). En ambos casos la enzima es inactiva y muestra un CME característico de proteínas desnaturadas. En contraste, a concentraciones intermedias de desnaturante la señal de las muestras  $N \rightarrow D$  y  $D \rightarrow N$  no es coincidente (Figura 5). Las propiedades funcionales y espectroscópicas de la ScTPI que van en el sentido  $D \rightarrow N$  alcanzan un valor constante después de 48 horas (Figura 5, símbolos llenos), no así en la dirección  $N \rightarrow D$ , donde se observa un cambio muy lento en el CME y en la actividad catalítica hacia los valores observados en la dirección contraria ( $D \rightarrow N$ ). Los datos de la Figura 5 indican que los experimentos en el sentido  $D \rightarrow N$  alcanzaron el equilibrio, mientras que los experimentos en la dirección  $N \rightarrow D$  no lo alcanzan. La histéresis mostrada en la Figura 5 probablemente se deba a que el paso de disociación, el de desplegamiento o ambos, sean lentos. Esta reacción no implica un cambio en el radio de Stokes de la enzima entre 1.0 y 0 M de GuHCl (Figura 6B); siempre se obtuvo



un sólo pico de elución en columnas de exclusión molecular, a todas las concentraciones de GuHCl utilizadas (Figura 6A). Las propiedades hidrodinámicas de la ScTPI fueron similares en ambas direcciones y permanecieron sin cambio entre las 24 y 96 horas (Figura 6B). El radio de Stokes de la proteína nativa fue de 30 Å y el de la proteína desplegada fue de 45 Å.

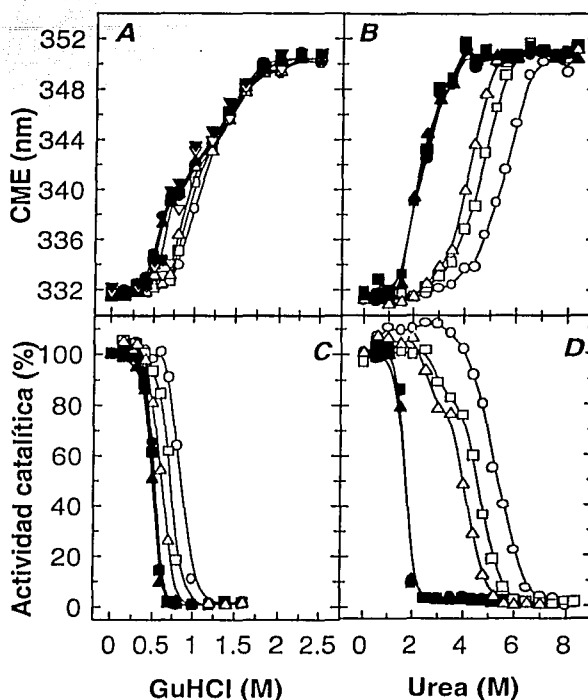


Figura 5. Histéresis entre la desnaturalización (N→D) y la renaturalización (D→N) de la ScTPI. Muestras de la ScTPI (0.75  $\mu$ M) de los experimentos N→D (símbolos vacíos) y D→N (símbolos llenos) seguidos por el CME del espectro de fluorescencia (A y B) o la actividad catalítica (C y D). Las mediciones se realizaron después de incubar por 96 (O, ●) 168 (□, ■) y 240 (△, ▲) horas en GuHCl (A y C) ó 48 (○, ●) 192 (□, ■) y 360 (△, ▲) horas en urea (B y D). Las líneas están dibujadas para ayudar en la visualización.

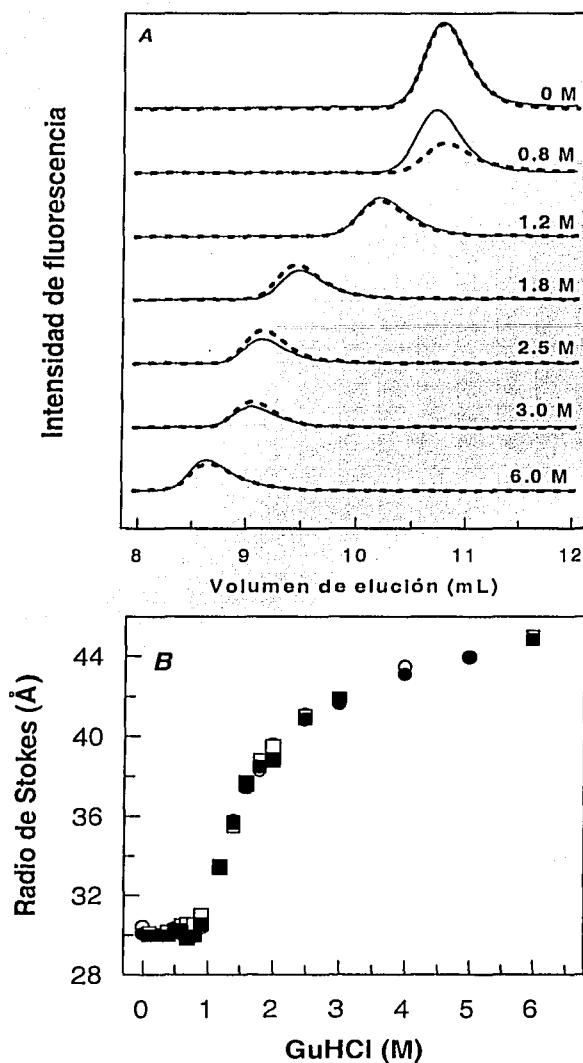


Figura 6. Experimentos de cromatografía de exclusión molecular. A) Perfiles de elución de las muestras de la ScTPI (0.75  $\mu$ M) determinados por la intensidad de fluorescencia ( $\lambda_{ex}$ =280 nm  $\lambda_{em}$ =320 nm). Las muestras de las direcciones N→D (líneas continuas) y D→N (líneas discontinuas) fueron incubadas por 24 horas en 0, 0.8, 1.2, 1.8, 2.5, 3.0 y 6.0 M de GuHCl. B) Radios de Stokes calculados de los volúmenes de elución obtenidos de las muestras en el sentido N→D (símbolos vacíos) y D→N (símbolos llenos) después de incubación por 24 (○, ●) y 96 (□, ■) horas.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Otro agente desnaturante ampliamente utilizado para estudios de plegamiento es la presión hidrostática [34, 35]. Al aumentar la presión se favorecen los estados de menor

volumen, lo que conduce a que las proteínas oligoméricas como la TPI se disocien en monómeros. Para conocer si la proteína se desnatura de manera similar que con GuHCl y urea, la enzima se sometió a un ciclo de presurización-despresurización, incubándola por 5 min a cada presión. Al realizar el ciclo se observó una histéresis muy marcada entre la compresión (Figura 7, símbolos vacíos) y la descompresión (Figura 7, símbolos llenos). Además, existe el problema de la irreversibilidad, que se observa entre los estados iniciales y finales. De manera contraria a lo que se describe en la Figura 5, con la presión hidrostática no se logró desnaturar por completo a la ScTPI (comparar Figura 5 y Figura 7). Aunque se exploraron diversos tiempos de incubación (5 min - 1 h) en cada paso del ciclo, en ninguna condición se obtuvieron curvas que se superpusieran (resultados no mostrados), por lo que se decidió no continuar explorando este agente desnaturante, ya que si el proceso no es reversible y no se alcanza el equilibrio, no es posible obtener parámetros termodinámicos. Estudios previos han reportado que la histéresis también se presenta al desnaturar-renaturalizar a la ScTPI por temperatura [83].

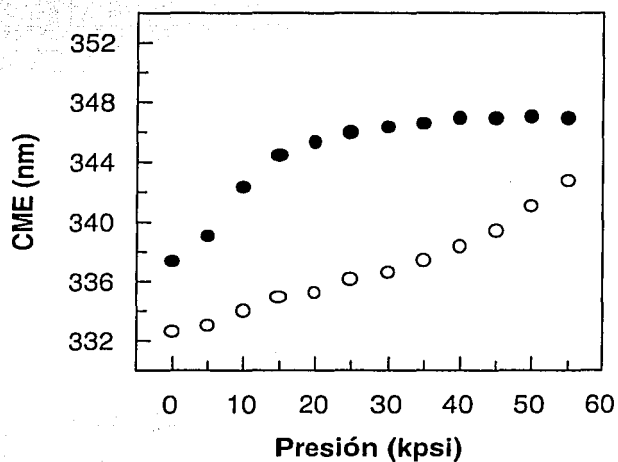


Figura 7. Histéresis entre la presurización-despresurización de la ScTPI. Muestras de la ScTPI ( $0.75 \mu\text{M}$ ) al aumentar (○) y al bajar (●) la presión hidrostática, seguidos por el CME del espectro de fluorescencia

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Equilibrio real

Debido a que a 25°C no hubo coincidencia entre los experimentos N→D y D→N, se estudió el efecto de la GuHCl a 30°C, donde se espera que la cinética sea más rápida. Las propiedades de las muestras incubadas en el sentido D→N permanecen prácticamente sin cambio después de 48 horas. Como se observó a 25°C, a 30°C las muestras N→D alcanzaron progresivamente los valores de las D→N y a los 10 días se logró la coincidencia en ambos sentidos (tiempo menor que a 25°C) (Figura 8). Sin embargo, a 30°C y largos tiempos de incubación (> 10 días), tanto en la enzima nativa como en los experimentos D→N se observó un decremento en la actividad catalítica y un corrimiento hacia el rojo en los valores de CME. Dado que existen evidencias de que largos tiempos de incubación y temperaturas relativamente altas promueven reacciones químicas colaterales entre la proteína y el desnaturizante, así como degradación de la proteína [103-105], no se llevaron a cabo más experimentos a 30°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

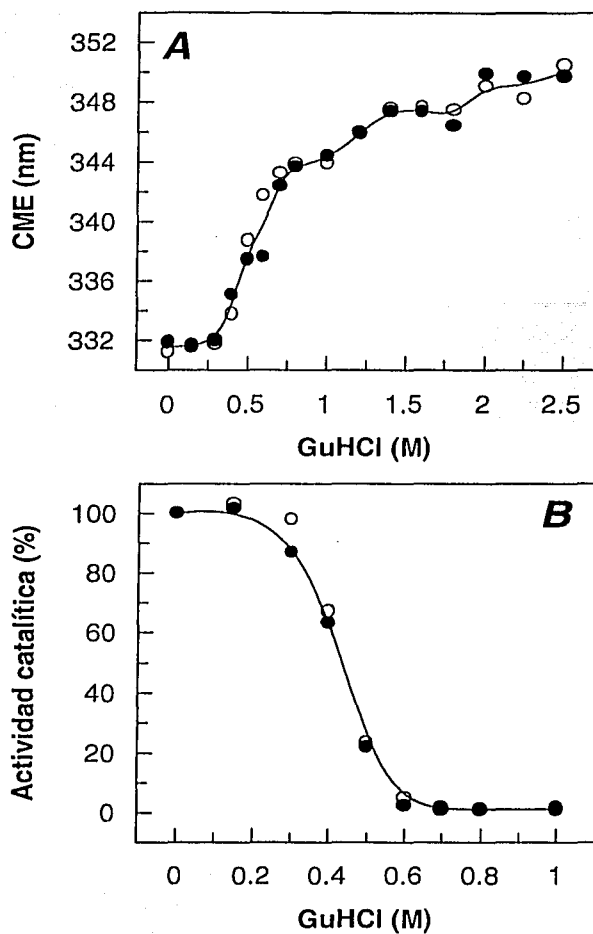


Figura 8. Comparación del CME y la actividad catalítica al alcanzar el equilibrio. Muestras en el sentido N→D (O) y D→N (●) de la ScTPI (0.75 μM) a 30°C, seguidos por el CME del espectro de fluorescencia (A) o la actividad catalítica (B). Las mediciones se realizaron después de incubar por 10 días. Las líneas están dibujadas para ayudar en la visualización.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## Intermediario al equilibrio en la renaturalización de la ScTPI

Tomando en cuenta la discusión de los experimentos anteriores, únicamente se analizaron los experimentos en el sentido D→N a 25°C. Para facilitar el análisis y la comparación de los resultados usando diferentes técnicas, de aquí en adelante los datos están

normalizados como  $\alpha(x)$  (ver ajuste de datos al equilibrio). En presencia de GuHCl, la fluorescencia y el DC mostraron dos transiciones (Figura 9), lo que indica la presencia de un intermediario. A altas concentraciones de desnaturizante (2.5-1.0 M GuHCl), la primera transición se caracteriza por el ocultamiento parcial de los aminoácidos aromáticos y la formación de estructura secundaria; entre 1.0 y 0.6 M se detectó una meseta. En la segunda transición, la proteína adquirió las propiedades de la enzima nativa a concentraciones menores a 0.6 M. La ScTPI fue inactiva en la región que corresponde a la primera transición detectada por técnicas espectroscópicas; la actividad catalítica se detectó únicamente en la segunda transición, indicando que el intermediario es inactivo (Figura 9). Dado que la ScTPI es un dímero, la renaturalización debe incluir un paso bimolecular y por lo tanto, el estado de asociación del intermediario en la transición puede ser determinado por el efecto de la concentración de proteína. La dependencia de  $\alpha(x)$  con la concentración de proteína ha sido considerada como el mejor criterio para asignar un paso bimolecular en los mecanismos de plegamiento [14]. Las diferentes concentraciones que se utilizaron en los experimentos, no mostraron un efecto claro sobre las transiciones detectadas por mediciones hidrodinámicas o espectroscópicas. Sin embargo, cuando la concentración de TPI fue disminuida, las curvas de reactivación se desplazaron a concentraciones de desnaturizante menores (Figura 9). Por lo tanto, la segunda transición es una reacción bimolecular, en donde los monómeros ( $M$ ) inactivos se asocian para formar al dímero activo. Las propiedades espectroscópicas de los tres estados ( $N$ ,  $M$  y  $D$ ) se presentan en la Figura 10. Se observa que el intermediario posee una cantidad considerable de estructura secundaria, mientras que el espectro de fluorescencia intrínseca muestra que los residuos aromáticos están parcialmente ocultos. Se han reportado espectros similares para experimentos  $N \rightarrow D$  [88].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

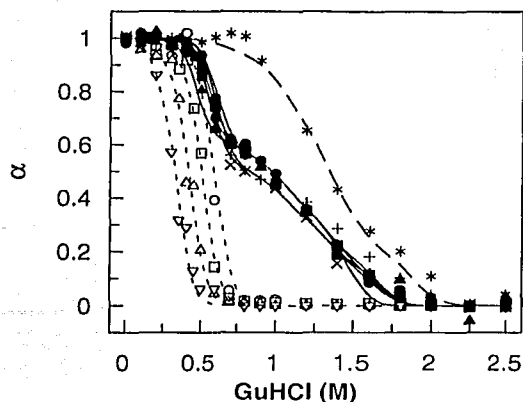


Figura 9. Análisis de tres estados para la renaturalización (D→N) de la ScTPI en presencia de GuHCl. Cambios normalizados para los experimentos D→N seguidos por CME a 7.5 (●), 1.85 (◐), 0.75 (◑) y  $7.5 \times 10^{-2}$  (▲)  $\mu\text{M}$ , DC a 7.5 (+) y 1.85 (×)  $\mu\text{M}$ , actividad catalítica a 7.5 (○), 0.75 (◻),  $7.5 \times 10^{-2}$  (△) y  $7.5 \times 10^{-3}$  (▽)  $\mu\text{M}$  radio de Stokes a 0.75  $\mu\text{M}$  (\*). Las líneas son ajustes a las ecuaciones (4) y (5). Los parámetros obtenidos usando la alternativa (i) se encuentran en la tabla 1.

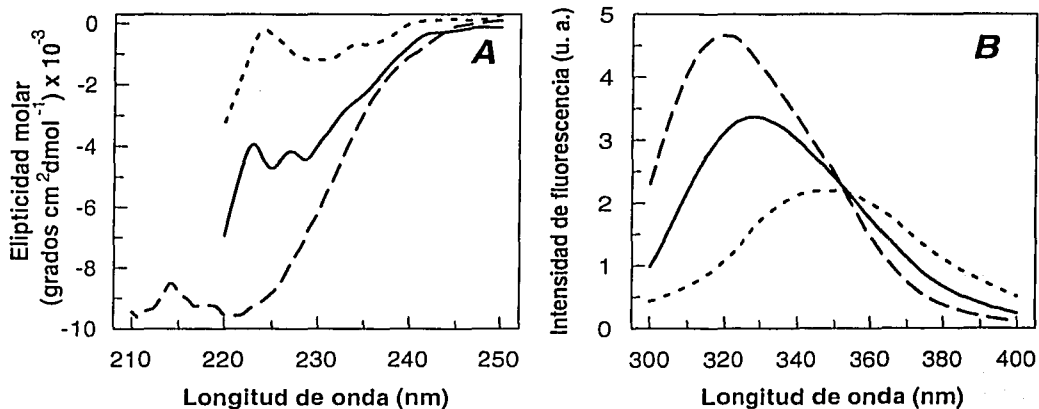


Figura 10. Propiedades de los tres estados de la ScTPI observados en experimentos D→N. Los espectros de DC en el UV lejano (A) y fluorescencia intrínseca (B) de la ScTPI se obtuvieron a 0 (—), 0.7 (—) y 2.5 (- -) M de GuHCl. De acuerdo al análisis de tres estados (ver texto), la máxima concentración de intermediario ( $f_M = 0.92$ ) se estimó a 0.7 M de GuHCl. La concentración de enzima fue 7.5  $\mu\text{M}$ .

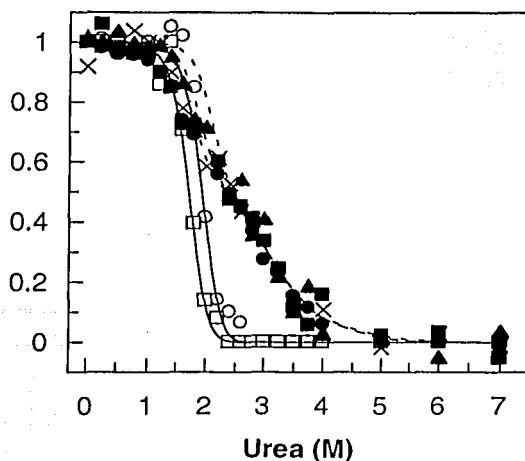
Aunque los dímeros y los monómeros están en equilibrio en la segunda transición, en esta región el radio de Stokes de la TPI permanece constante y similar al  $R_s$  de la nativa (Figura 6B) y se observa un sólo pico (Figura 6A). Este comportamiento puede reflejar el

promedio de dos estados con diferente radio hidrodinámico en equilibrio rápido o indicar que las propiedades hidrodinámicas del intermediario monomérico y del dímero nativo son similares. Ya que en la segunda transición, el equilibrio se alcanza muy lentamente (Figura 5A y 5C), la primera opción se descartó. Por lo tanto el dímero nativo y el intermediario monomérico tienen valores semejantes en el radio de Stokes, indicando que el intermediario es más expandido que el "monómero nativo" en el dímero. Recientemente, se reportó el radio hidrodinámico de un intermediario (23.5 Å) de la ScTPI para la desnaturalización inducida por GuHCl [88], el intermediario descrito en este trabajo es menos compacto ( $R_s = 30 \text{ \AA}$ ), pero menos expandido que el intermediario observado en la desnaturalización de la TPI de *Trypanosoma brucei* (TbTPI) ( $R_s = 36 \text{ \AA}$ ) [89] y los dos intermediarios en la desnaturalización de la subunidad  $\alpha$  de la triptofano sintasa ( $R_s = 37.9$  y  $52.9 \text{ \AA}$ ), proteína que también es un barril  $\beta/\alpha$  con un peso molecular similar (27 kDa) [106].

El comportamiento bifásico en el CME y el DC de la TPI para la desnaturalización inducida por GuHCl fue menos marcado en urea (Figura 11). En este último desnaturalizante, los datos espectroscópicos mostraron dos transiciones por la presencia de un pequeño hombro alrededor de 2.5 M, además de la no coincidencia entre las técnicas. La TPI fue inactiva en la primera transición (7-2.5 M urea) y se reactivó en concentraciones de urea que corresponden a la segunda transición (menor a 2.5 M urea). Al igual que en GuHCl, la reactivación de la enzima depende de la concentración de proteína (Figura 11). Estos datos sugieren fuertemente, que el mecanismo de tres estados observado en GuHCl es el mismo en urea.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Figura 11.** Análisis de tres estados para la renaturalización (D→N) de la ScTPI en presencia de urea. Cambios normalizados para los experimentos D→N seguidos por CME a 7.5 (●), 0.75 (■) y 0.225 (▲)  $\mu\text{M}$ , DC a 7.5 (×)  $\mu\text{M}$  y actividad catalítica a 2.25 (○) y 0.225  $\mu\text{M}$  (□). Las líneas continuas (actividad catalítica) y las líneas discontinuas (CME y DC) son ajustes a las ecuaciones (4) y (5). Los parámetros están reportados en la tabla 1 (alternativa *ii*).

## Cálculos de estabilidad en la TPI

El modelo más simple que está de acuerdo con los datos es un modelo de tres estados  $2D \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons N$ , donde los monómeros desnaturalizados se pliegan parcialmente a un monómero inactivo y expandido hasta ensamblarse en un dímero activo nativo. Ya que sólo los experimentos en el sentido D→N alcanzan el equilibrio, estos se usaron para calcular los cambios en energía de Gibbs asociados con las transiciones, esto es, el plegamiento del monómero ( $\Delta G_{\text{pleg}}$ ) y la asociación de los mismos ( $\Delta G_{\text{asoc}}$ ). Dado que hay datos con dos desnaturalizantes y varias técnicas, es posible hacer uso de diferentes juegos de datos para obtener los parámetros termodinámicos, cuyos valores, en principio, deberían ser independientes de los datos escogidos. Sobre esta base,  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$  y  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$  se evaluaron de tres maneras; en todos estos ajustes, las señales normalizadas del monómero desnaturalizado  $y_D = 0$  y del dímero nativo  $y_N = 1$ . De acuerdo con la discusión de la sección anterior, los datos de la

señal normalizada para el intermediario monomérico en la actividad,  $y_M = 0$  y para los datos hidrodinámicos  $y_M = 1$ . En la primera alternativa (i) los parámetros termodinámicos se ajustaron con todos los datos disponibles con GuHCl, usando la  $y_M$  de los datos espectroscópicos como un parámetro ajustable, los  $\Delta G^0$  resultantes se reportan en la Tabla 1. En la segunda alternativa (ii) se utilizaron todos los datos disponibles con urea, debido a que la conducta bifásica no es tan marcada y ya que no hay datos disponibles del radio de Stokes, la señal espectroscópica del intermediario es difícil de obtener como parámetro de ajuste, por lo tanto, se utilizó la  $y_M$  de la alternativa i como un parámetro fijo (Tabla 1). Finalmente, la alternativa (iii) fue un ajuste global, empleando todos los datos disponibles en ambos desnaturizantes y dos valores para las espectroscopias  $y_M$  (DC) y  $y_M$  (CME) como parámetros ajustables. En la Tabla 1, los valores de  $y_M$  oscilan entre 0.52 para DC y 0.63 para fluorescencia, indicando que el intermediario monomérico contiene estructura secundaria substancial y sus aminoácidos aromáticos están parcialmente escondidos. Los valores de  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$  y  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$  obtenidos de las tres alternativas son cercanos entre sí, y en todos  $|\Delta G_{\text{asoc}}^0| \gg |\Delta G_{\text{pleg}}^0|$ . La gran magnitud del  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$  está de acuerdo con los experimentos de dilución, ya que después de incubar a la enzima por tres meses, la actividad catalítica de la ScTPI permanece constante e independiente de la concentración de enzima en el intervalo de 75 pM – 7.5  $\mu$ M (ver abajo). La comparación de las tres alternativas sugiere que tanto el plegamiento como la asociación de la ScTPI son termodinámicamente equivalentes en ambos desnaturizantes. Como se ha observado previamente para otras proteínas, los valores de  $m$  para GuHCl son considerablemente más grandes que los de urea (Tabla 1). Dado que todos los experimentos empleados en las alternativas (i) a (iii) están en el equilibrio, las pequeñas diferencias observadas en la Tabla 1 pueden ser atribuidas a factores estocásticos; desde este

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

punto de vista, los resultados del ajuste global (alternativa *iii*) deben ser los más satisfactorios, ya que en este ajuste algunas de las imprecisiones se compensaron.

Ajuste	$\Delta G_{\text{pleg}}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m_{\text{pleg}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> · M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{isoc}}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m_{\text{asoc}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> · M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{tot}}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
(i) <sup>†</sup>	-15.91 ± 0.05	12.23 ± 0.13	-68.01 ± 0.31	64.60 ± 0.43	-96.42
(ii) <sup>§</sup>	-12.41 ± 1.38	4.26 ± 0.48	-83.26 ± 1.92	26.12 ± 0.85	-108.08
(iii) <sup>‡</sup>	-16.59 ± 0.71	12.39 ± 0.58 (GuHCl) 5.42 ± 0.24 (Urea)	-70.26 ± 1.08	69.90 ± 2.42 (GuHCl) 19.09 ± 0.61 (Urea)	-103.44

Tabla 1. Estabilidad de la ScTPI a 25°C y pH 7.4. <sup>†</sup> $y_M$  (DC) = 0.55 ± 0.02 y  $y_M$  (CME) = 0.63 ± 0.01 usados como parámetros de ajuste <sup>§</sup> $y_M$  (DC y SCM) = 0.59 fue tomado como constante, es el promedio de los obtenidos en la alternativa (i) <sup>‡</sup> $y_M$  (DC) = 0.52 ± 0.03 y (CME) = 0.59 ± 0.02 usados como parámetros de ajuste.

## Estudios cinéticos

### Cinética de renaturalización

La actividad catalítica requiere de la formación del dímero activo. El esquema completo para la formación del dímero ( $2D \rightarrow N$ ) demanda de un paso bimolecular. Por lo tanto, la ScTPI se desnaturalizó previamente en 6 M de GuHCl por 45 min y se renaturalizó por dilución a diferentes concentraciones de proteína. La proteína desnaturalizada no muestra actividad catalítica; sin embargo, se recupera la actividad con el tiempo hasta que se reactiva totalmente (Figura 12).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

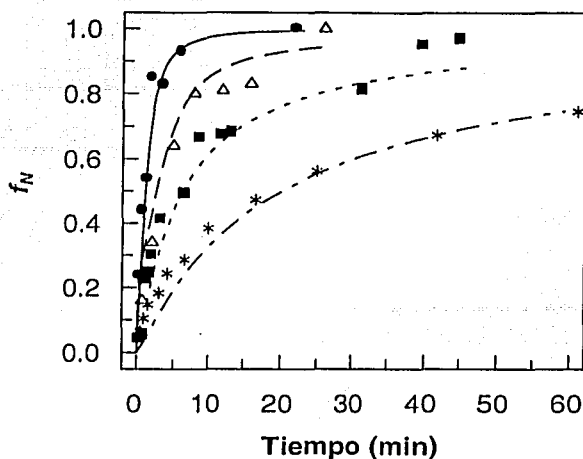


Figura 12. Cinética de reactivación como función de la concentración de ScTPI. La ScTPI se renaturalizó por dilución a las siguientes concentraciones, 187.5 (●), 37.5 (△) 7.5 (■) y 1.875 (\*) nM, las líneas continuas son ajustes a las ecuaciones 10, 11 y 12; las constantes de velocidad están reportadas en la Tabla 2.

En el intervalo de 1.875 - 7.5 nM, la velocidad de reactivación se incrementa con la concentración de ScTPI, como se predice para una reacción bimolecular. Sin embargo, en las mayores concentraciones ensayadas (37.5 y 187.5 nM), la recuperación de la actividad ocurre aproximadamente a la misma velocidad; por lo tanto, un paso unimolecular (antes o después de la asociación) comienza a ser el paso limitante. Para explicar la conducta cinética observada, debe postularse la presencia de un intermediario (I) en la vía de plegamiento y asociación ( $2D \rightarrow I \rightarrow N$ ). Los modelos más simples de tres estados son:

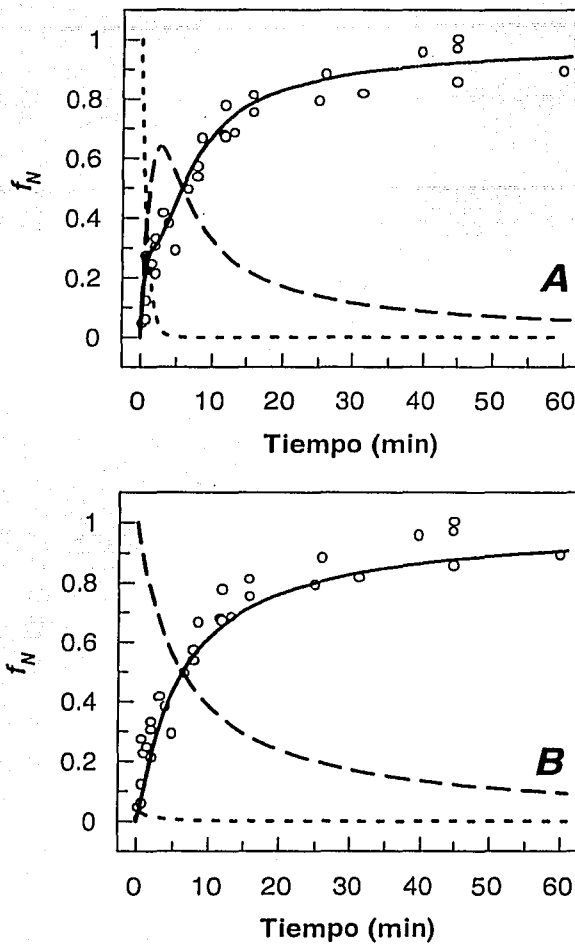
$$2D \xrightarrow{k_{ple}} 2M \xrightarrow{k_{asoc}} N \text{ y } 2D \xrightarrow{k_{asoc}} N^* \xrightarrow{k_{reple}} N.$$

El primero es un modelo consecutivo unibimolecular con un intermediario monomérico y el segundo es biunimolecular con un intermediario dimérico. Los datos de actividad ( $f_N$ ) se ajustaron adecuadamente a ambos modelos (Figura 13). Sin embargo, la predicción del curso temporal de  $D$  e  $I$  ( $M$  o  $N^*$ ) es muy diferente para los dos modelos. El esquema unibimolecular predice la acumulación de intermediario, mientras que en el modelo biunimolecular se predice que  $D$ , decrece lentamente

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

con el tiempo (Figura 13B). Debido a que con una sola técnica no es posible distinguir entre ambos modelos, se realizaron experimentos determinando la cinética de renaturalización de la ScTPI por fluorescencia intrínseca. En la Figura 14 se hace una comparación de la renaturalización de la ScTPI seguida por actividad catalítica y fluorescencia intrínseca (320 nm). En todas las condiciones utilizadas y a las diferentes concentraciones de proteína (18.75 – 375 nM de ScTPI) no se observó un cambio en la fluorescencia intrínseca entre los 30 segundos y las 24 horas (resultados no presentados). Dado que la señal de fluorescencia intrínseca de *D* difiere de la señal de *N* (Figura 10B), la Figura 14 muestra que la fluorescencia intrínseca de los confórmers presentes es similar a la señal de la nativa dentro del primer minuto. El modelo del intermediario dimérico se descartó, ya que predice un decaimiento lento de *D*. Si este último modelo fuera el correcto, se lograría observar el cambio en la señal de fluorescencia al pasar desde *D* hasta *N*. Por lo tanto, el modelo que se ajusta a los datos observados es el unibimolecular, el cual predice la acumulación de un intermediario monomérico. Estudios preliminares de cromatografía de exclusión molecular, en los cuales se inyectó la enzima marcada con un fluoróforo extrínseco a diferentes tiempos durante la renaturalización, sugieren que el intermediario es de naturaleza monomérica, apoyando aún más al modelo unibimolecular (resultados no presentados).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 13. Análisis de la cinética de reactivación de la ScTPI.** La enzima se renaturalizó a 7.5 (O) nM. (A) Modelo consecutivo unimolecular, las líneas son la predicción a [D], (- -); predicción a [M], (— —) y el ajuste a [N], (— · —). Ajustes a las ecuaciones 10, 11 y 12. (B) Modelo consecutivo biunimolecular, las líneas son la predicción a [D], (- -); predicción a [N\*], (— —) y el ajuste a [N], (— · —). Ajustes a las ecuaciones 16, 17 y 18.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

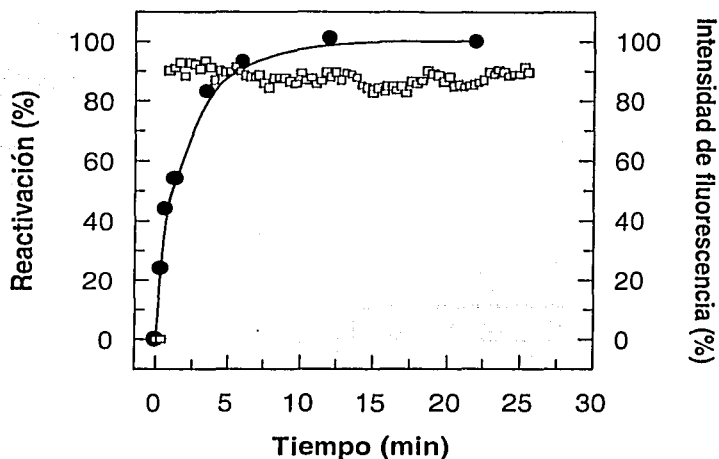


Figura 14. Cinética de renaturalización seguida por fluorescencia intrínseca y actividad catalítica. Fluorescencia intrínseca (□) de la ScTPI al renaturalizarla, también se le midió la actividad catalítica (●) a la misma concentración de enzima (187.5 nM). Las líneas son para ayudar a la visualización.

A partir de experimentos de reactivación para la cTPI, previamente disociada y desnaturalizada por GuHCl se ha propuesto que el esquema de renaturalización que sigue es el siguiente [91, 92]:  $2D \xrightarrow{k_{pleg}} 2M \xrightarrow{k_{asoc}} N$  donde  $D$  es un monómero desplegado, que se pliega ( $k_{pleg} = 1.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para formar  $M$ , un monómero competente para la dimerización. Zabori *et al.* [92] propusieron que la constante de velocidad de asociación de los monómeros para formar dímeros ( $N$ ) ( $k_{asoc} = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), es cercana al valor estimado para asociación de monómeros de tamaño comparable que están limitados por difusión ( $k_{asoc} = 10^5 - 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [92]. Algunos efectos pueden operar para incrementar o reducir la velocidad de reacciones controladas por la difusión; la magnitud de la constante de velocidad, así sugerida, no es por lo tanto un indicador confiable del control por difusión [107]. Modelos teóricos han mostrado que las constantes de velocidad de cada reacción son inversamente proporcionales a la viscosidad del disolvente si dependen de la difusión [108]. Por tanto, la vía experimental más

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sencilla para determinar si una reacción está controlada por difusión, es examinar la dependencia de la reacción con la viscosidad [94].

Para determinar si la asociación de los monómeros está limitada por difusión, se realizaron experimentos de renaturalización en presencia de glicerol. La renaturalización de la ScTPI es reversible entre 0 y 75 % (v/v) de glicerol (Figura 15). El perfil cinético de la renaturalización de la ScTPI en presencia de este cosolvente se muestra en la Figura 15.

La velocidad de reactivación se reduce cuando se incrementa la concentración de glicerol, indicando que el cosolvente afecta el paso bimolecular. Por otro lado, a altas concentraciones de glicerol se observó un retardo considerable en la aparición de la actividad, sugiriendo que el agente viscosogénico también afecta la velocidad de plegamiento del monómero (Figura 15, recuadro).

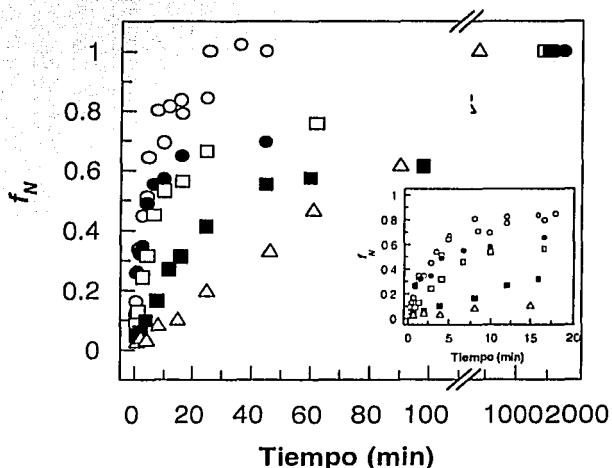


Figura 15. Reactivación de la ScTPI en presencia de glicerol. Muestras de la ScTPI previamente desnaturalizadas, se reactivaron por dilución en presencia de 0 (○), 20 (●), 40 (□), 60 (■) y 75 (△) % (v/v) de glicerol a los tiempos indicados. La concentración final de ScTPI fue de 37.5 nM en todas las concentraciones de glicerol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Experimentos similares a los de la Figura 15, llevados a cabo a diferentes concentraciones de proteína (1.875 - 187.5 nM), se utilizaron para determinar las constantes de



velocidad de plegamiento de los monómeros, así como la asociación de los mismos en presencia de 20, 40, 60 y 75 % (v/v) de glicerol (Tabla 2).

Glicerol % (v/v)	$k_{\text{pleg}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{asoc}}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
0	$1.43 \times 10^{-2} \pm 7.80 \times 10^{-3}$	$6.70 \times 10^5 \pm 2.81 \times 10^5$
20	$9.83 \times 10^{-3} \pm 3.83 \times 10^{-3}$	$3.72 \times 10^5 \pm 2.05 \times 10^5$
40	$2.88 \times 10^{-3} \pm 2.02 \times 10^{-3}$	$1.83 \times 10^5 \pm 8.63 \times 10^4$
60	$1.08 \times 10^{-3} \pm 9.89 \times 10^{-4}$	$5.67 \times 10^4 \pm 3.31 \times 10^4$
75	$2.24 \times 10^{-4} \pm 1.66 \times 10^{-4}$	$3.15 \times 10^4 \pm 9.22 \times 10^3$

Tabla 2. Constantes de velocidad del plegamiento y la asociación de la ScTPI a 25°C y pII 7.4. Las constantes obtenidas son el promedio de al menos 3 experimentos en ausencia de glicerol y 2 o más experimentos para 20, 40, 60 y 75 % (v/v) de glicerol. Los parámetros de ajuste son la  $k_{\text{pleg}}$  y la  $k_{\text{asoc}}$  ajustados a las ecuaciones 10, 11 y 12.

A continuación, las constantes de velocidad relativas se regraficaron en función de las viscosidades ( $\eta$ ) relativas (Figura 16).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

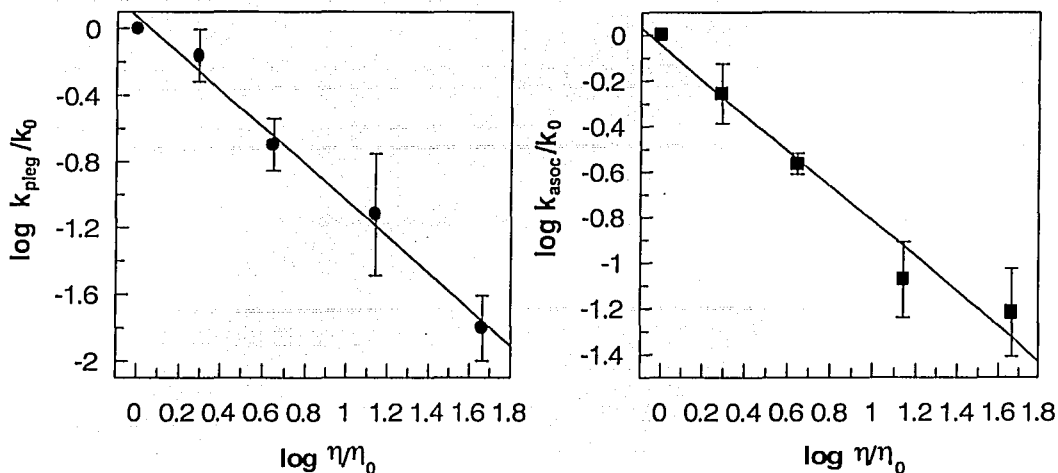


Figura 16. Dependencia con la viscosidad relativa de la velocidad de plegamiento y asociación de la ScTPI. Las dependencias de las viscosidades relativas, con las constantes de velocidades de plegamiento del monómero (●) y de la asociación de estos, para formar al dímero (■) se ajustaron a la ecuación de la recta. El coeficiente de correlación fue de 0.99 y 0.98 para el plegamiento y la asociación, respectivamente.

En ambos casos la pendiente es cercana a -1, sugiriendo que tanto el plegamiento de los monómeros como la asociación de estos, están limitados por difusión. Si no se modifica la estabilidad de la enzima por el glicerol, entonces las reacciones contrarias, esto es, el desplegamiento del monómero y la disociación del dímero, deberán ser también dependientes de la viscosidad del disolvente.

### Cinética de desnaturalización

La ScTPI nativa muestra un máximo en la señal de fluorescencia a 320 nm (Figura 10). Para estudiar la pérdida de estructura terciaria y cuaternaria, se determinó el cambio en la fluorescencia intrínseca y en la actividad catalítica con respecto al tiempo al desnaturalizar la enzima con diferentes concentraciones de GuHCl.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

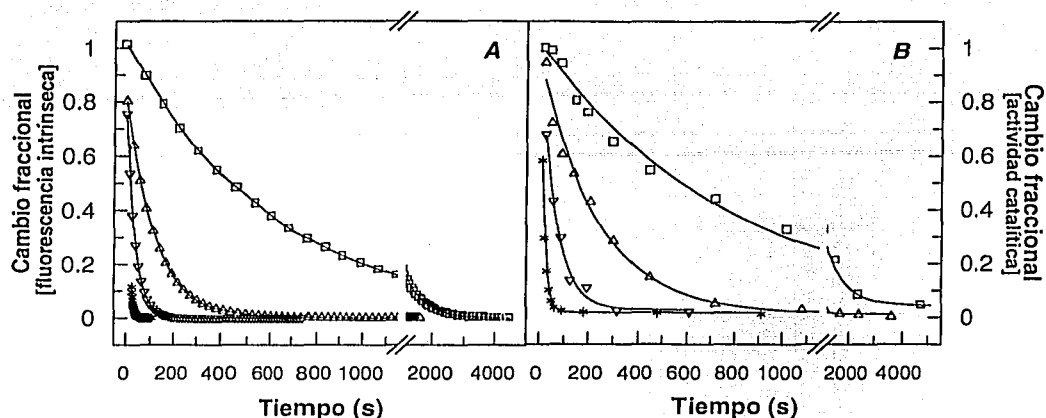


Figura 17. Cinética de desnaturalización de la ScTPI. La enzima se desnaturalizó a 37.5 nM y se determinó la señal de fluorescencia intrínseca (A) o la actividad catalítica (B) que perdió con el tiempo en 2.0 (□), 2.5 (△), 3.0 (▽) y 3.5 (\*) M de GuHCl. La enzima se incubó en las diferentes concentraciones y en los tiempos indicados se tomó una alícuota para cuantificar la actividad catalítica. Las líneas son ajustes a una exponencial sencilla (ecuación 19), de donde se obtiene la constante de velocidad de desplegamiento.

La Figura 17A muestra que la variación de la señal de fluorescencia con el tiempo puede describirse adecuadamente mediante un ajuste a un decaimiento exponencial sencillo (líneas) (ver Tabla 3), indicando que una de las dos etapas en la desnaturalización es la limitante. Al variar la concentración de proteína de 37.5 a 375 nM, no se observaron cambios en las constantes de velocidad obtenidas (Tabla 3). Con el objeto de caracterizar el paso limitante se realizaron experimentos en los cuales se determinó la desaparición de la actividad catalítica con el tiempo. La Figura 17B muestra que la desaparición de la actividad catalítica también presenta un decaimiento exponencial.

Experimentos similares a los mostrados en la Figura 17, pero desnaturalizando en presencia de glicerol, no muestran cambio en la constante de velocidad obtenida, lo cual sugiere que esta constante de velocidad no está limitada por la difusión (Tabla 3).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

[TPI]	375 nM.	37.5 nM	37.5 nM	375 nM.	375 nM.
GuHCl (M)	$\tau$ (s) fluo.	$\tau$ (s) fluo.	$\tau$ (s) act.	$\tau$ (s) fluo. Glic. 20% (v/v)	$\tau$ (s) fluo. Glic. 40% (v/v)
1.5	$3933.67 \pm 13.9$				
2	$866.95 \pm 2.5$	$620.03 \pm 8.9$	$757.61 \pm 59.1$	$1319.22 \pm 44.5$	$1635.33 \pm 41.8$
2.5	$166.63 \pm 0.83$	$120.77 \pm 5.5$	$231.46 \pm 19.6$	$321.97 \pm 2.9$	$234.32 \pm 4.3$
3	$48.26 \pm 0.46$	$36.83 \pm 2.7$	$64.65 \pm 6.3$	$54.57 \pm 1.3$	$34.38 \pm 1.8$
3.5	$13.11 \pm 0.34$	$11.65 \pm 0.83$	$15.05 \pm 0.41$	$12.20 \pm 2.36$	
4		$8.48 \pm 2.9$	$7.02 \pm 0.38$		

Tabla 3. Comparación de los tiempos de relajación de las cinéticas de desnaturalización. Los tiempos de relajación se obtuvieron por fluorescencia intrínseca (fluo.) y actividad catalítica (act.), en ausencia y en presencia de 20 y 40% (v/v) de glicerol (Glic.). Los tiempos de relajación ( $\tau$ ) se obtuvieron del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 19.

La similitud de los tiempos de relajación obtenidos al determinar la pérdida de fluorescencia y actividad, indican que en la segunda transición (2.0 - 4.0 M GuHCl), la desaparición de la estructura terciaria y cuaternaria de la ScTPI es concertada.

En la primera transición (0.5 - 1.0 M GuHCl) los experimentos N→D mostraron cambios muy lentos tanto en el CME del espectro de fluorescencia como en la actividad catalítica, (Figura 5A y C símbolos vacíos), los datos obtenidos por ambas técnicas se ajustaron adecuadamente a decaimientos exponenciales sencillos, los  $\tau$  calculados se muestran en la tabla 4. Estas cinéticas no se estudiaron en presencia de glicerol debido a la extrema lentitud del cambio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

GuHCl (M)	$\tau$ (h) Act.	$\tau$ (h) fluo.
0.6	$391.6 \pm 123.5$	$424.8 \pm 80.9$
0.7	$310.7 \pm 60.2$	$359.7 \pm 42.7$
0.8	$165.0 \pm 13.3$	$219.2 \pm 19.3$
1	$43.6 \pm 1.14$	$88.6 \pm 4.6$

Tabla 4. Comparación de los tiempos de relajación de las cinéticas de desnaturalización obtenidas de los experimentos de histéresis. Los tiempos de relajación se obtuvieron por actividad catalítica (act.) y fluorescencia intrínseca (fluo.). La concentración de la ScTPI fue de 0.75  $\mu$ M.

A partir de los  $\tau$  ( $\tau=1/k$ ) mostrados en las tablas 3 y 4 y de la ecuación 25, es posible calcular la energía de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ). Al graficar  $\Delta G^\ddagger$  vs GuHCl (Figura 18), se observa que los datos derivados de la tabla 3 (2.0-4.0 M GuHCl) muestran una pendiente diferente a los provenientes de la tabla 4 (0.5-1.0 M GuHCl), lo cual sugiere un cambio en el paso limitante al variar la concentración de desnaturalizante.

En la primera transición (0.5 - 1.0 M GuHCl) el estado más poblado en el equilibrio es el intermediario monomérico. Por lo tanto, es posible que los  $\tau$  obtenidos en la Tabla 4, correspondan a la disociación del dímero en monómeros, la variación de  $\Delta G^\ddagger$  con GuHCl para esta transición es de  $-12.1 \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . Por otra parte, en la segunda transición (2.0-4.0 M GuHCl), que probablemente corresponde a la desnaturalización del monómero, la variación de  $\Delta G^\ddagger$  con GuHCl para esta transición es de  $-6.5 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

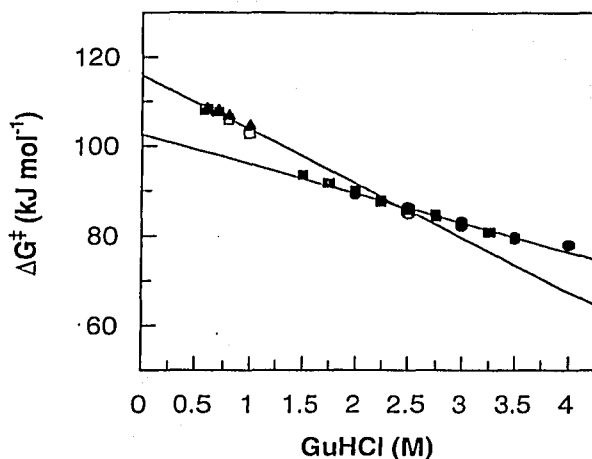


Figura 18. Extrapolación de los  $\Delta G^\ddagger$  obtenidos con GuHCl. La datos se obtuvieron de las cinéticas de disociación y desplegamiento de la ScTPI seguido por actividad (●), fluorescencia (○) a 37.5 nM y por fluorescencia a 375 nM (■). Datos de las cinéticas de disociación (histéresis) de la ScTPI a 0.75  $\mu$ M seguidos por actividad (□) y por fluorescencia (▲). Las líneas son el ajuste a la ecuación de la recta por mínimos cuadrados. El origen de la ordenada para los datos de la disociación es de  $115.8 \pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  y para el desplegamiento es de  $102.5 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . La pendiente para la disociación es  $-12.1 \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  y para el desplegamiento es  $-6.5 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

## Perfil de energía

A partir de la figura 18 es posible obtener  $\Delta G_{\text{despleg}}^\ddagger$  y  $\Delta G_{\text{disoc}}^\ddagger$  de la extrapolación a 0 M de GuHCl. Los valores de  $\Delta G_{\text{pleg}}^\ddagger$  y  $\Delta G_{\text{asoc}}^\ddagger$  pueden calcularse directamente de las cinéticas de renaturalización; en este caso, los experimentos se llevaron a cabo prácticamente en ausencia de desnaturalizante, por lo que no es necesario realizar ninguna extrapolación. A partir de estos valores de  $\Delta G^\ddagger$  y los valores de  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$  y  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$  obtenidos de los experimentos al equilibrio, se construyó el perfil de energía que describe el patrón de plegamiento de la ScTPI (Figura 19).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

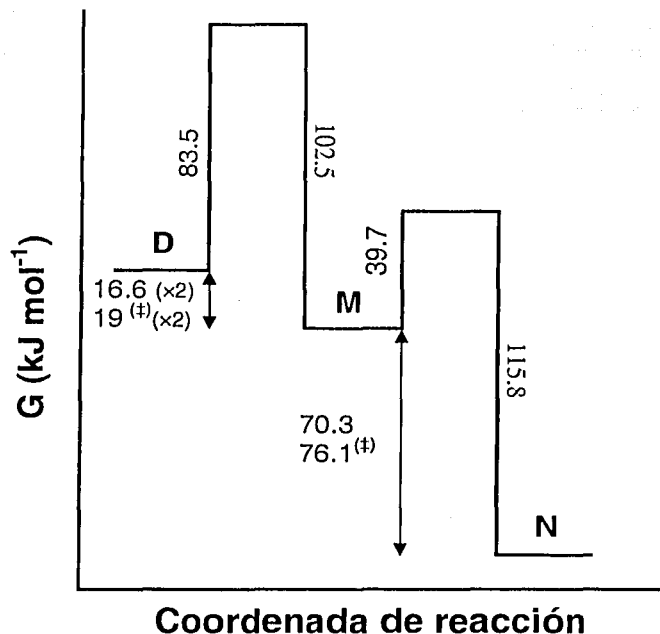


Figura 19. Diagrama de energía libre para el plegamiento / desplegado y asociación / disociación de la ScTPI. Las energías de activación están indicadas directamente con números, los cambios en energía libre están indicados por flechas verticales. Los números que tienen a la derecha (‡), se obtuvieron por diferencia de las energías de activación del paso que le corresponde. De izquierda a derecha, los diagramas representan las transiciones entre los monómeros desplegados a monómeros parcialmente plegados a dímeros nativos.

Es importante remarcar que el  $\Delta G_{\text{pleg}}$  y el  $\Delta G_{\text{asoc}}$  obtenidos por experimentos al equilibrio o por la diferencia en las energías de activación de cada paso ( $\Delta G_{\text{pleg}} = \Delta G_{\text{pleg}}^{\ddagger} - \Delta G_{\text{despleg}}^{\ddagger}$  y  $\Delta G_{\text{asoc}} = \Delta G_{\text{asoc}}^{\ddagger} - \Delta G_{\text{disoc}}^{\ddagger}$ ) son muy similares (Figura 19). La diferencia en las constantes de equilibrio calculadas tiene como límite superior, un orden de magnitud para la disociación. La coherencia entre los parámetros cinéticos y los termodinámicos sugiere que el esquema de plegamiento propuesto para la desnaturalización/renaturalización de la ScTPI es plausible.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Desnaturalización de la TPI de diferentes especies y otros barriles

$\beta/\alpha$

La desnaturalización de la TPI ha sido extensamente estudiada pero, algunas veces, se ha encontrado irreversibilidad [66, 86, 89, 109]. La Figura 20 muestra todos los datos disponibles acerca de la estabilidad termodinámica de la TPI de diferentes especies [93, 59, 83-85, 87, 88, 95]. En contraste con los datos de este trabajo donde se detectó un comportamiento bifásico y se usó para obtener los cambios en energía libre, en los demás casos se emplearon transiciones monofásicas utilizando el modelo de dos estados ( $2D \rightleftharpoons N$ ). Por consiguiente, solamente se han reportado los cambios en energía libre involucrando un intermediario a partir de datos cinéticos para la cTPI [85] y para la ScTPI [83] o de mutantes monoméricas de la TPI de humano (hTPI) [95, 84] y de TbTPI [87]. Todas las demás caracterizaciones termodinámicas de la estabilidad de la TPI en la Figura 20 han usado experimentos en la dirección  $N \rightarrow D$ . A este respecto, los resultados de la Figura 5 claramente muestran que debe prestarse especial atención cuando se realizan únicamente experimentos en la dirección  $N \rightarrow D$ , ya que a menos de que se cumplan largos tiempos de incubación, el equilibrio puede no haberse alcanzado. Una posible consecuencia de no alcanzar el equilibrio es que el clásico indicio de la existencia de un intermediario, esto es, transiciones bifásicas y la no coincidencia, pueden no haber sido vistas en estudios previos (comparar símbolos llenos y vacíos en la Figura 5). Además, cuando las transiciones complejas implican el empleo de una sola técnica y/o un solo desnaturalizante, puede disminuir la confianza de los parámetros de estabilidad calculados. Hay entonces una duda razonable sobre la precisión de algunos de los valores de la literatura en la Figura 20. A pesar de esto, hay una clara relación entre los cambios en energía libre para las transiciones de asociación y plegamiento, puesto que para todas las TPI estudiadas el  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$  es mucho más negativo que el  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$ . La fracción de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



contribución del plegamiento a la estabilidad de la enzima nativa (estimada como  $2\Delta G_{\text{pleg}}^0 / \Delta G_{\text{tot}}^0$ ) varía entre 0.14 para cTPI a 0.30 para la ScTPI, esto es, el ensamble de las subunidades incrementa la estabilidad conformacional de la TPI. En todos los casos el plegamiento del monómero es un proceso favorable, los valores del  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$  obtenidos para las TPI silvestres varían entre -5.02 a -16.59 kJ mol<sup>-1</sup>. Esto indica que los monómeros de la TPI son marginalmente estables. Ya que estos valores son menores que los observados para el plegamiento de proteínas monoméricas [110], algunos autores han sugerido que la TPI es dimérica principalmente por consideraciones de estabilidad [95]. En contraste, otros enfoques (ver abajo) sugieren que la gran eficiencia catalítica de la TPI está unida a la naturaleza dimérica de la enzima. De aquí en adelante, a través de la comparación de resultados en la TPI y los obtenidos para otros barriles  $\beta/\alpha$ , se analizará la contribución relativa de la estabilidad y la función como razones para la naturaleza dimérica de la TPI.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

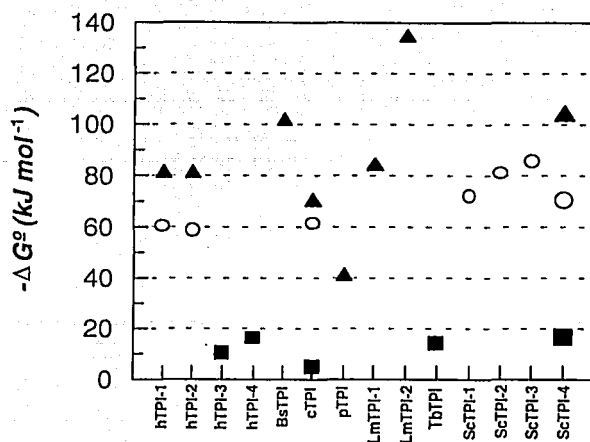


Figura 20. Estabilidad de la TPI de diferentes especies. Los datos que se presentan a continuación son para enzimas silvestres a 25°C y pH 7.4, salvo en los casos que se indique.  $\Delta G_{\text{pleg}}^{\circ}$  (■),  $\Delta G_{\text{isoc}}^{\circ}$  (○) y  $\Delta G_{\text{tot}}^{\circ}$  (▲). El código para el eje de las x es el siguiente. hTPI-1: TPI de humano a pH 8.0 [95], hTPI-2:  $\Delta G_{\text{isoc}}^{\circ}$  de ref. [95] y  $\Delta G_{\text{tot}}^{\circ}$  de ref. [84], hTPI-3: M14Q/R98Q mutante monomérica [95, 84], hTPI-4: M14Q / R98Q / Q179D / K193A / A215P mutante monomérica [84], BsTPI: TPI de *Bacillus stearothermophilus* [84], cTPI: TPI de conejo [85], pTPI: TPI de pollo a 30.4 °C [93], LmTPI-1: TPI de *Leishmania mexicana* a pH 7.5 [87], LmTPI-2: mutante E65Q a pH 7.7 [87], TbTPI: mutante monomérica de la TPI de *Trypanosoma brucei* a pH 6.8 [87], ScTPI-1: TPI de *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta G_{\text{isoc}}^{\circ}$  promedio a pH 7.2 [88], ScTPI-2:  $\Delta G_{\text{isoc}}^{\circ}$  extrapolación a 25°C de la desnaturalización / renaturalización por temperatura [83], ScTPI-3:  $\Delta G_{\text{isoc}}^{\circ}$  promedio calculado de datos estructurales y parámetros de solvatación [59], y ScTPI-4: datos de este trabajo (tabla 1, alternativa iii).

## Estabilidad vs función

### Estabilidad

Se ha propuesto que la TPI es una enzima dimerica por razones de estabilidad, Esta hipótesis está basada en dos suposiciones. La primera, es que no pueden existir los barriles  $\beta/\alpha$  monoméricos activos con baja estabilidad. Segunda, la alta estabilidad requiere de las interacciones cuaternarias, esto es, no es posible encontrar barriles  $\beta/\alpha$  monoméricos estables. La primera suposición no está de acuerdo con la baja estabilidad ( $-9.0 \pm 2.0$  kJ mol<sup>-1</sup>) reportada para la aldolasa monomérica y activa de *Staphylococcus aureus* [111]. En cuanto a la segunda suposición, se ha reportado un barril  $\beta/\alpha$  muy estable, específicamente para la

subunidad  $\alpha$  de la triptofano sintasa, el  $\Delta G_{tot}^0 = -34.3$  y  $-64.42$  kJ mol<sup>-1</sup> para la desnaturalización inducida por GuHCl y urea, respectivamente [112, 106]. Por lo tanto, el intervalo de estabilidad para barriles  $\beta/\alpha$  monoméricos y activos es bastante amplio (-9 a -64 kJ mol<sup>-1</sup>). La estabilidad de los monómeros de la ScTPI obtenidos en este trabajo (-15.29 kJ mol<sup>-1</sup>, Tabla 1) está claramente dentro de este intervalo pero cercano al límite inferior. Cabe mencionar que la estabilidad de los barriles  $\beta/\alpha$  monoméricos puede ser incrementada como se mostró en estudios de las mutantes monoméricas de la hTPI, en donde se incrementó la estabilidad de -10.46 a -16.32 kJ mol<sup>-1</sup> [84]. Es claro que hay ejemplos que restan validez a las dos suposiciones arriba mencionadas.

## Función

La hipótesis funcional se apoya en el hecho de que a pesar del gran esfuerzo en investigación que se ha realizado, las mutantes monoméricas de la TPI presentan una actividad catalítica al menos 100 veces menor que las TPIs silvestres [113]. Cabe mencionar que los residuos del sitio activo se encuentran contenidos en cada monómero. Se ha propuesto que el enorme incremento en la actividad catalítica que acompaña a la asociación, es debido a los contactos intersubunidades que disminuyen la flexibilidad de las asas catalíticas [77]. Otros estudios, tales como la renaturalización en medios convencionales como en bajo contenido de agua, así como la estabilidad a la dilución [91, 92, 114-116] indican que la catálisis de la TPI requiere de la dimerización.

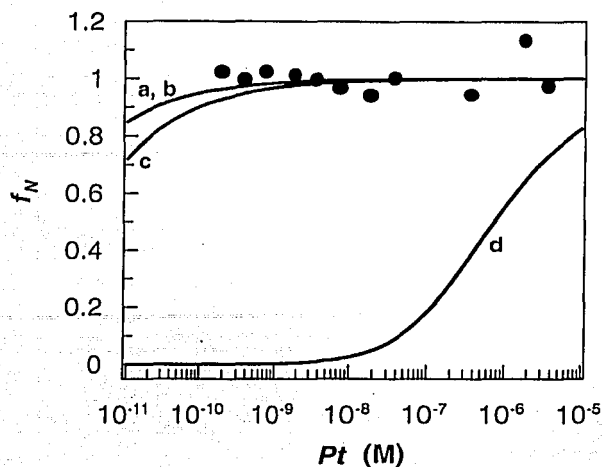


Figura 21. Concentración de ScTPI *versus* actividad catalítica. Datos experimentales (●), y simulaciones para los siguientes valores de [ $\Delta G_{\text{pleg}}^0$  y  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$ ] (en  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), respectivamente: (a) [-15.29, -69.99] de la tabla 1, alternativa *iii*, (b) [-70, -70], (c) [0, -70] y (d) [-75, -35]. Líneas (a) y (b) son indistinguibles. Pt = Proteína total

Esto también se puede abordar por el análisis de la actividad específica como función de la concentración de proteína. Estos datos experimentales se muestran en la Figura 21 junto con la predicción obtenida usando los datos de este trabajo (Tabla 1, alternativa *iii*). La figura también muestra tres simulaciones para diferentes valores de  $\Delta G^0$ . Las primeras dos simulaciones indican que la actividad es prácticamente constante cuando el  $\Delta G_{\text{asoc}}^0 = -70 \text{ kJ mol}^{-1}$  y el  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$  es cambiado de 0 a  $-70 \text{ kJ mol}^{-1}$  i.e. de un monómero no estable a un monómero muy estable. En otras palabras, el perfil de actividad es casi independiente del valor de  $\Delta G_{\text{pleg}}^0$ . En la tercera simulación, el  $\Delta G_{\text{asoc}}^0$  se redujo a la mitad ( $-35 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) mientras que se mantuvo un monómero muy estable ( $\Delta G_{\text{pleg}}^0 = -75 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), el resultado muestra que la actividad catalítica se reduce drásticamente a concentraciones bajas de proteína. Ya que *in vivo* la concentración de TPI para diferentes especies se encuentra entre

$1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M [117] y los monómeros son escasamente activos, es claro de la Figura 21 que el alto  $\Delta G_{isoc}^0$  es necesario para la catálisis. Es probable que no hay presión de selección que favorezca la aparición de monómeros estables. La posibilidad de que un dímero estable se haya formado tempranamente en la evolución y posteriormente se fue optimizando para una catálisis perfecta debe entonces ser considerada. De la discusión anterior, los datos de la TPI parecen indicar que no hay una sola razón para la naturaleza dimerica de la TPI; en las proteínas oligoméricas, la función y la estabilidad están íntimamente ligadas. Por lo tanto, la naturaleza dimerica de la TPI debe ser examinada bajo la luz de esa interrelación. Definitivamente, la baja estabilidad de los monómeros de la TPI no es ni la única ni la principal causa.

## Conclusiones

Conocer más acerca del plegamiento y de la asociación de proteínas oligoméricas nos permitirá conocer si efectivamente existe un código de plegamiento que pueda llegar a predecir, para una cadena lineal de aminoácidos, el tipo de plegamiento que tendrá en su forma biológicamente activa.

En el presente trabajo describimos la formación de una estructura oligomérica a partir de estudios de desnaturalización / renaturalización, utilizando uno de los modelos más sencillos, la enzima homodimérica trifosfato isomerasa.

Aunque la desnaturalización y la renaturalización de la TPI ha sido ampliamente estudiada, los datos termodinámicos para la desnaturalización sólo han sido reportados para la hTPI y cTPI, en los que se ha propuesto un modelo de tres estados ( $2D \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons N$ ) usando mutantes monoméricas o datos cinéticos. La desnaturalización de las TPI silvestres fue modelada inicialmente como una transición de dos estados; la información sobre las propiedades del monómero se obtuvo de la desnaturalización de dos estados en mutantes

monoméricas o fue calculada a partir de energías de activación para la enzima silvestre. Sin embargo, en ningún caso se observaron intermediarios en equilibrio. En el presente trabajo se detectó un intermediario monomérico al desnaturalizar a la ScTPI con GuHCl y urea. Con los experimentos realizados se ajustaron los datos de diversas formas: se recurrió a diversas técnicas, desnaturalizantes por separado y en conjunto, así como técnicas separadas y predicciones. Hay evidencias sobre otros mecanismos de desplegamiento para las TPI de *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum*, donde se ha encontrado más de un intermediario.

Nuestros datos indican que tanto en urea como en GuHCl hay un intermediario de plegamiento al equilibrio detectado por a) presencia de una meseta para el caso de la desnaturalización inducida por GuHCl y b) no coincidencia entre las técnicas utilizadas para la desnaturalización por urea y GuHCl. De los ajustes se obtuvieron los  $\Delta G^0$  para el paso del monómero desnaturalizado que se pliega con un  $\Delta G_{\text{pleg}}^0 = -16.59 \pm 0.71 \text{ kJ mol}^{-1}$  y posteriormente, se asocia con un  $\Delta G_{\text{isoc}}^0 = -70.26 \pm 1.08 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Por otro lado, los experimentos de cromatografía de exclusión molecular indican que en GuHCl el intermediario observado es un monómero expandido, que tiene un corrimiento hacia el rojo en la señal de fluorescencia intrínseca, así como una señal de DC con estructura secundaria significativa.

Cabe mencionar que el  $\Delta G_{\text{isoc}}^0 = -70.26 \pm 1.08 \text{ kJ mol}^{-1}$  es el que participa mayoritariamente en el  $\Delta G_{\text{tot}}$ , compatible con los experimentos de inactivación por dilución; con este valor no es importante para la TPI generar un monómero más estable, ya que en condiciones *in vivo* la enzima siempre está asociada, forma en la cual presenta una alta eficiencia catalítica. Con respecto a la catálisis, análisis estructurales de las mutantes monoméricas de TPI muestran que la estructura del barril está bien conservada, sin embargo

presentan al menos 100 veces menos actividad catalítica que la enzima silvestre. Por consiguiente, se sugiere que la dimerización produce la tensión de las asas catalíticas que se requiere para la creación del espacio y la rigidez del sitio activo.

La presencia del glicerol en la TPI no tiene efectos irreversibles. La TPI renaturalizada no muestra diferencias significativas en cuanto al porcentaje de renaturalización determinado por actividad catalítica y/o fluorescencia intrínseca.

Para describir el mecanismo de plegamiento de la ScTPI es necesario postular la presencia de un intermediario ( $2D \rightarrow I \rightarrow N$ ) durante la renaturalización de la enzima, donde el paso limitante en la reacción es unimolecular o bimolecular, dependiendo de la concentración de proteína en el experimento. El modelo que describe mejor los resultados es el unibimolecular ( $2D \rightarrow 2M \rightarrow N$ ). El paso que determina la velocidad de la reacción a bajas concentraciones de proteína es de segundo orden ( $2M \rightarrow N$ ), mientras que a concentraciones de proteína mayores, el paso limitante es el unimolecular  $D \rightarrow M$ .

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

En presencia de glicerol la velocidad del paso bimolecular disminuye  $2M \rightarrow N$ , la asociación de los monómeros es más lenta en este intervalo de concentraciones (1.875 – 187.5 nM), pues estamos disminuyendo la frecuencia de choques entre las especies.

Este efecto es más evidente al aumentar el porcentaje de glicerol a 60 y 75% (v/v). En estos casos se observa, además de la disminución del paso bimolecular, un retraso considerable en la aparición de la actividad catalítica. Esto sugiere que el paso unimolecular ( $D \rightarrow M$ ) también se afecta por el glicerol, posiblemente por un arreglo intramolecular de los confórmers. Ya que a altas concentraciones de glicerol  $k_{\text{pleg}} \ll k_{\text{asoc}}$ , el paso que limita la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

renaturalización de la TPI es el unimolecular, por lo tanto, el proceso se vuelve independiente de la concentración.

Los experimentos presentados indican que en la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* al igual que en la enzima de conejo, el paso limitante en la renaturalización depende de la concentración de proteína, cuando es baja. Es importante señalar que en todas las condiciones estudiadas, el porcentaje de recuperación de la actividad biológica y de la estructura terciaria es cercano al 100% e independiente de la concentración de glicerol.

Ya que la fluorescencia observada después del primer minuto es semejante a la obtenida a las 24 horas, los monómeros competentes tienen una estructura terciaria semejante a la encontrada en el dímero activo.

Los regímenes de viscosidad relativa sugieren que tanto el plegamiento del monómero así como la asociación de estos están limitados por la difusión.

Sería valioso poder ampliar la presente discusión para incluir oligómeros con diferentes tipos de plegamiento. Los datos en la referencias [14, 118-121] indican que en muchos casos, la estabilidad del dímero contribuye significativamente a la energía libre conformacional de la proteína, como se discute arriba para la TPI. Sin embargo, dado que hay relativamente pocos estudios termodinámicos para la asociación / disociación de proteínas oligoméricas, es muy difícil hacer conclusiones generales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## Perspectivas

Algunas interrogantes interesantes que surgen de este trabajo son:

- Estudiar a profundidad las características estructurales y el estado de asociación del intermediario cinético para compararlo con el intermediario al equilibrio.
- Estudiar las características estructurales de los conformeros en los primeros eventos en la ruta de plegamiento (orden de milisegundos).
- Estudiar la contribución del glicerol en la estabilidad de la ScTPI.
- Realizar experimentos de disociación en presencia de glicerol, para conocer si este paso también está limitado por la difusión.
- Obtener las constantes de velocidad de renaturalización en presencia GuHCl bajas y construir un gráfico con las constantes de velocidad de desnaturalización y de renaturalización (gráfico de *Chevron*) en ausencia y presencia de glicerol.
- Realizar experimentos en los que se logren tener condiciones de equilibrio al desnaturalizar / renaturalizar por presión hidrostática.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Referencias

1. Haber, E. y Anfinsen, C. B. (1962) Side chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **237**, 1839-1844
2. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230
3. Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 155-241
4. Freedman R. B. (1992) Protein folding in the cell. En: Protein folding. (Creighton, T. E. ed) W. H. Freeman and Co. New York. pp. 455-539
5. Creighton, T. E. (1993) Proteins: structures and molecular properties (2<sup>a</sup> Ed) W.-H. Freeman and Co. New York. pp. 261-328
6. Jaenicke, R. y Rudolph, R. (1986) Refolding and association of proteins. *Methods Enzymol.* **131**, 218-250
7. Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237
8. Jaenicke, R. (1991) Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* **30**: 3147-3161
9. Tanford, C. (1970). Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95
10. Dill, K. A. y Shortle, D. (1991) Denatured states of proteins. *Annual Reviews in Biochemistry* **60**, 795-825
11. Matthews, C. R. (1993) Pathways of Protein Folding. *Annual Reviews in Biochemistry.* **62**, 653-683
12. Traut T. W. (1994) Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 125-63
13. Bowie, J. U. y Sauer, R. T. (1989) Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer. *Biochemistry* **28**, 7139-7143
14. Neet, K. E. y Timm, D. E. (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* **3**, 2167-2174
15. Jaenicke, R. y Lilie, H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein Chem.* **53**, 329-401
16. Baker, D., Sohl, J. L. y Agard, D. A. (1992) A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature* **356**, 263-265
17. Sinclair, J. F., Ziegler, M. M., y Baldwin, T. O. (1994) Kinetic partitioning during protein folding yields multiple native states. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 320-326
18. Lai, Z., McCulloch, J., Lashuel, H. A. y Nelly, J. W. (1997) Guanidine hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochemistry* **36**, 10230-10239
19. Røsegarth, A., Røsgen, J. y Linz, H. J. (1999) Slow unfolding and refolding kinetics of the mesophilic Rop wild-type protein in the transition range. *Eur. J. Biochem.* **264**, 989-995
20. Engel, J. y Blichinger, H. P. (2000) Cooperative equilibrium transitions coupled with a slow annealing step explain the sharpness and hysteresis of collagen folding. *Matrix Biology* **19**, 235-244
21. Zhu, L., Fan, Y. X y Zhou, J. M. (2001) Identification of equilibrium and kinetic intermediates involved in folding of urea-denatured creatine kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**, 320-332
22. Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique.* **65**, 44-45

23. Ptitsyn, O. B. (1973) Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules *Dokl. Acad. Nauk. SSSR.* **210**, 1213-1215
24. Kim, P. S. y Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 631-660
25. Bashford, D., Cohen, F. E., Karplus, M., Kuntz, I. D. y Weaver D. L. (1988) Diffusion-collision model for the folding kinetics of myoglobin *Proteins: Struct. Func. Genet.* **4**, 211-227
26. Karplus, M. y Weaver D. L. (1994) Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci.* **3**, 650-668
27. Wetlaufer, D. B (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 697-701
28. Wetlaufer, D. B (1990) Nucleation in protein folding-confusion of structure and process. *Protein Sci.* **15**, 414-415
29. Ptitsyn, O. B. (1995) How the molten globule became. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 376-379
30. Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Struct. Func. Genet.* **6**, 87-103
31. Fersht, A. (1999) Folding pathways and energy landscapes. En: Structure and mechanism in protein science. W. H. Freeman and Company, New York. p. 576.
32. Privalov, P. L. (1979) Stability of proteins. *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241
33. Creighton, T. E. (1990) Protein folding. *Biochemical J.* **270**, 1-16
34. Silva, J. L. y Weber, G. (1993) Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89-113
35. Gross, M. y Jaenicke, R. (1994) Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.* **221**, 617-630
36. Privalov, P. L. (1992) Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. En: Protein folding. (Creighton, T. E. ed) W. H. Freeman and Co. New York. pp. 83-126
37. Royer, C. A. (2002) Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 201-209
38. Jarabak, J., Seeds, E. y Talalay, P. (1966) Reversible cold inactivation of a 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: protective effect of glycerol. *Biochemistry.* **5**, 1269-1279
39. Huang, P., Dong, A. y Caughey, W. S. (1995) Effects of dimethyl sulfoxide, glycerol and ethylene glycol on secondary structures of cytochrome c and Lysozyme as observed by infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **84**, 387-392
40. Gekko, K. y Timasheff, S. N. (1981) Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* **20**, 4677-4686
41. Gekko, K. y Ito, H. (1990) Competing solvents effects of polyols and guanidine hydrochloride on protein stability. *J. Biochem.* **107**: 572-577
42. Oliveira, A. C., L. P. Gaspar., A. T. Da Poian y Silva, J. L. (1994) Arc repressor will not denature under pressure in the absence of water. *J. Mol. Biol.* **240**, 184-187
43. Timasheff, S. N., Lee, J. C., Pitz, E. P. y Tweedy, N. (1976) The interaction of tubulin and other proteins with structure-stabilizing solvents. *Journal of Colloid and Interface Science.* **55**, 658-663

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

44. Timasheff, S. N. y Arakawa, T. (1989) Stabilization of protein structure by solvents. En: Protein structure: a practical approach. (Creighton, T. E. ed) IRL Press, Oxford. pp. 331-345
45. Shortle, S., Meeker, A. K. y Gerring, S. L. (1989) Effects of denaturants at low concentrations on the reversible denaturation of staphylococcal nuclease. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 103-113
46. Zhi, W., Landry, S. J. Gierasch, L. M. y Srere, P. A. (1992) Renaturation of citrate synthase: Influence of denaturant and folding assistants. *Protein Sci.* **1**, 522-529
47. Cleland, J. L., Hedgepeth, C. y Wang, D. I. C. (1992) Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B. *J. Biol. Chem.* **267**, 13327-13334
48. Chrnyk, B. y Matthews C. R. (1990) Role of diffusion in the folding of the  $\alpha$  subunit of Tryptophan Synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**: 2149-2154
49. Eder, J. y Kirschner, K. (1992) Stable substructures of eightfold  $\beta\alpha$ -barrel proteins: fragment complementation of Phosphoribosylanthranilate Isomerase. *Biochemistry* **31**, 3617-3625
50. Vaucheret, H., Signon, L., Le Bras, G. y Garel, J. R. (1987) Mechanism of renaturation of a large protein, aspartokinase-homoserine dehydrogenase. *Biochemistry* **26**, 2785-2790
51. Garel, J. R. (1992) Folding of large proteins: multidomain and multisubunit proteins. En: Protein folding. (Creighton, T. E. ed) W. H. Freeman and Co. New York. pp. 405-454
52. Back, J. F., Oakenfull D. y Smith M. B. (1979) Increased stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* **18**, 5191-5196
53. Hurle, M. R., Michelotti, G. A., Crisanti, M. M. y Matthews, C. R. Characterization of a slow folding reaction for the  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase. *Proteins: Struct. Func. Gen.* **2**, 54-63
54. Timasheff S. N. (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 67-97
55. Jacob, M., Schindler, T., Balbach, J. y Schmid, F. X. (1997) Diffusion control in an elementary protein folding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5622-5627
56. Plaxco, K. W. y Baker, D. (1998) Limited internal friction in the rate-limiting step of a two-state protein folding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 13591-13596
57. Knowles, J. R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* (London): **350**,121-124
58. Knowles, J. R. y Albery, J. W. (1977) Perfection in enzyme catalysis: The energetics of Triosephosphate Isomerase. *Accounts of Chemical Research.* **10**:105-111
59. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, FC. y Petsko, G. A. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**, 6609-6618
60. Banner, D. W., A. C. Bloomer., G. A. Petsko., D. C. Phillips., C. I. Pogson., I. A. Wilson. P. H. Corran., A. J. Furth., J. D. Milman., R. E. Offord., J. D. Priddle y Waley, S. G. (1975) Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature.* **255**, 609-614
61. Wierenga, R. K., M. E. M. Noble., G.Vriend., S. Nauche y Hol, W. G. J. (1991) Refined 1.83 Å structures of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* **220**, 995-1015

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

62. Noble, M. E. M., J. P. Zeellen, J. P., R. K. Wierenga., V. Mainfroid., K. Goraj., A. C. Gohimont y Martial, J. A. (1993) Structure of triosephosphate isomerase from *E. Coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog.* sect. D. **49**, 403-417
63. Mande, S. C., V. P. Mainfroid., K. H. Kalk., K. Goraj., J. A. Martial y Hol. W. G. J. (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 810-821
64. Delboni, L. F., S. C. Mande., F. Rentier-Delrue., V. Mainfroid., S. Turley., F. M. D. Vellieux., J. A. Martial y Hol, W. G. J. (1995) Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**, 2594-2604
65. Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. y Murthy, M. R. (1997) Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **5**, 751-761
66. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. y Maes, D. (1998) Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**, 2199-2206
67. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou. M., Gomez-Puyou, A. y Pérez-Montfort, R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **283**, 193-203
68. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. y Wierenga, R. K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**, 243-250
69. Maes, D., Zeelen J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H. D., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritime*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Struct. Func. Gen.* **37**, 441-453
70. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. y Taylor, G. L. (2001) Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **306**, 745-757
71. Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. y Fernández-Velasco, D. A. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**, 669-675
72. Schurig, H., Beaucamp, N., Osterndorp, R., Jaenicke, R., Adler, E. y Knowles, J. R. (1995) Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime* form a covalent bifunctional enzyme complex. *EMBO J.* **14**, 442-451
73. Kohlhoff, M., A. Dahm y Hensel, R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters.* **383**, 245-250
74. Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. y Knowles, J. R. (1988) Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry* **27**, 1158-1167

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

75. Lambeir, A., Opperdoes, F. R. y Wierenga, R. K. 1987. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* **168**, 69-74
76. Schnackerz, K. D. y Gracy R. W. (1991). Probing the catalytic sites of triosephosphate isomerase by <sup>31</sup>P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *Eur. J. Biochem.* **199**, 231-238
77. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. y Wierenga, R. K. (1997) A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**, 9655-9662
78. Farber, G K., y Petsko, G. A. (1990) The evolution of  $\alpha/\beta$  barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 228-34
79. Copley, R. R. y Bork, P. (2000) Homology among  $(\beta\alpha)_8$  barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J. Mol. Biol.* **303**, 627-641
80. Nagano, N., Hutchinson, E. G. y Thornton, J. M. (1999) Barrel structures in proteins-automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels. *Protein Sci.* **8**, 2072-2084
81. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M y Davenport, R. C. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **224**, 1115-1126
82. Rietveld, A. W. y Ferreira, S. T. (1996) Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**, 7743-51
83. Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (2001) Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**, 9049-9058
84. Mainfroid, V., Mande, S., Hol, W., Martial, J. y Goraj, K. (1996) Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual  $\alpha$ -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110-4117
85. Rietveld, A. W. y 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. *Biochemistry* **37**, 933-937
86. Gokhale, R. S., Ray, S. S. Balaram, H. y Balaram, P. ( 1999) Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* **38**, 423-431
87. Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V. y Wierenga, R. K. (2000) The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2516-2524
88. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y. y Dobson, C. M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **300**, 11-16
89. Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G. y 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

90. Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernández, G., Costas, M. y Fernández-Velasco, D. A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behaviour in urea. *Protein and Peptide Letters*, **7**, 57-64
91. Waley, S. G. (1973) Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochemical J*, **135**, 165-172
92. Zabori, S. Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1980) Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch* **35**, 999-1004
93. McVittie, J. D., Esnouf, M. P. y Peacocke, A. R. (1977) The denaturation-renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* **81**, 307-315
94. Berg O. G. y Von Hippel P. H. (1985) Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 131-160
95. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. y Goraj, K. (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* **257**, 441-456
96. Norton, I. L. y Hartman, F. C. (1972) Triosephosphate isomerase from Bakers' yeast. Preliminary crystallographic data. *Biochemistry* **11**, 4435-4441
97. Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A. y Gracy, R. W. (1971) Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 312-320
98. Uversky V. N. (1993) Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* **32**, 13288-13298
99. Chien, J. Y. (1948) Kinetic analysis of irreversible consecutive reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2256-2261
100. Steinfeld, J. I., Francisco, J. S. y Hase W. L. (1989) Complex reactions. En: Chemical Kinetics and dynamics. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. pp. 21-108
101. Eyring, H. (1935) The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* **3**, 107-115
102. Evans, M. G y Polanyi, M. (1935) *Trans. Faraday Soc.* **31**, 875
103. Stark G. R. (1965) Reactions of cyanate with functional groups of proteins. IV. Inertness of aliphatic hydroxyl groups. Formation of carbamyl- and acylhydantoins. *Biochemistry* **4**, 2363-2367
104. Hagel, P., Gerding, J. J., Fieggen, W. y Bloemendal, H. (1971) Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 366-373
105. Gerding, J. J., Koppers, A., Hagel, P. y Bloemendal, H. (1971) Cyanate formation in solutions of urea. II. Effect of urea on the eye lens protein  $\gamma$ -crystallin. *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 375-379
106. Gualfetti, P. J., Iwakura, M., Lee, J. C., Kihara, H., Bilsel, O., Zitzewitz, J. A. y Matthews, C. R. (1999) Apparent radii of the native, stable intermediates and unfolded conformers of the  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase from *E. coli*, a TIM barrel protein. *Biochemistry* **38**, 13367-13378
107. Davis, M. E., Madura, J. D., Sines, J., Luty, B. A., Allison, S. A. y McCammon, J. A. (1991) Diffusion-controlled enzymatic reactions. *Methods Enzymol.* **202**, 473-497
108. Kramers, H. A. (1940) Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* **7**, 284-304

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

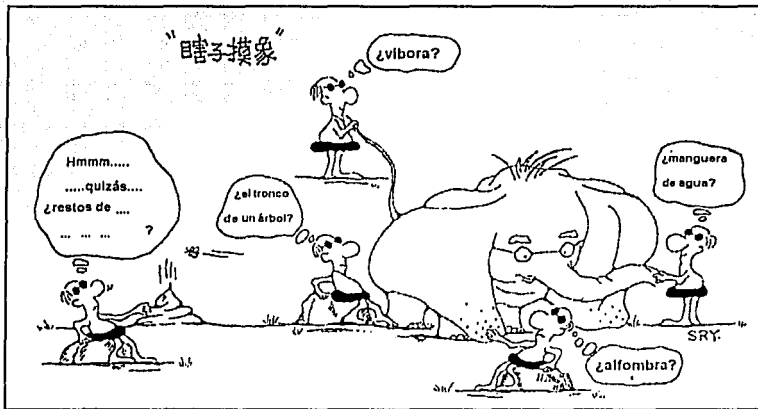
109. Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B. y Jaenicke, R. (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Sci.* **6**, 2159-2165
110. Pace, C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 14-17
111. Rudolph, R., Siebendritt, R. y Kiefhaber, T. (1992) Reversible unfolding and refolding behavior of a monomeric aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Protein Sci.* **1**, 654-666
112. Ogasahara, K. y Yutani, K. (1997) Equilibrium and kinetic analyses of unfolding and refolding for the conserved proline mutants of tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit. *Biochemistry* **36**, 932-940
113. Saab-Rincón, G., Juárez, V. R., Osuna, J., Sánchez, F. y Soberón, X. (2001) Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Eng.* **14**, 149-155
114. Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Gracy, R. W. (1992) Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* **208**, 389-395
115. Borchert, T. V. Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M. E., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. y Wierenga, R. K. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* **211**, 703-710
116. Fernández-Velasco, D. A., Sepúlveda-Becerra, M., Galina, A., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1995) Water requirements in monomer folding and dimerization of triosephosphate isomerase in reverse micelles. Intrinsic fluorescence of conformers related to reactivation. *Biochemistry* **34**, 361-369
117. Albe, K. R., Butler, M. H. y Wright, B. E. (1990) Cellular concentrations of enzymes and their substrates. *J. Theor. Biol.* **143**, 163-195
118. Hornby, J. A. T., Luo, J-K., Stevens, J. M., Wallace, L. A., Kaplan, W., Armstrong, R. N. y Dirr, H. W. (2000) Equilibrium folding of dimeric class  $\mu$  glutathione transferases involves a stable monomeric intermediate. *Biochemistry* **39**, 12336-12344
119. Apiyo, D., Jones, K., Guidry, J. y Wittung-Stafshede, P. (2001) Equilibrium unfolding of dimeric desulferodoxin involves a monomeric intermediate: Iron cofactors dissociate after polypeptide unfolding. *Biochemistry* **40**, 4940-4948
120. Bose, K. y Clarck, A. C. (2001) Dimeric procaspase-3 unfolds via a four-state equilibrium process. *Biochemistry* **40**, 14236-14242
121. Mateu, M. G. (2002) Conformational stability of dimeric and monomeric forms of the C-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 capsid protein. *J. Mol. Biol.* **318**, 519-531

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
 DE LA BIBLIOTECA



## Anexo



**Figura extra.** La caricatura ilustra como un ciego puede tener una impresión incorrecta de un elefante, dependiendo de la parte que este tocando; demostrando la importancia de examinar una reacción de plegamiento con tantas pruebas como sea posible, antes de elaborar conclusiones. (Adaptado de una vieja fábula China)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme

Hugo NÁJERA, Miguel COSTAS<sup>1</sup> and D. Alejandro FERNÁNDEZ-VELASCO<sup>2</sup>

Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México

The reasons underlying the oligomeric nature of some proteins such as triosephosphate isomerase (TIM) are unclear. It has been proposed that this enzyme is an oligomer, mainly because of its stability rather than for functional reasons. To address this issue, the reversible denaturation and renaturation of the homodimeric TIM from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) induced by guanidinium chloride and urea have been characterized by spectroscopic, functional and hydrodynamic techniques. The unfolding and refolding of this enzyme are not coincident after 'conventional' equilibrium times. Unfolding experiments did not reach equilibrium, owing to a very slow dissociation and/or unfolding process. By contrast, equilibrium was reached in the refolding direction. The simplest equilibrium pathway compatible with the obtained data was

found to be a three-state process involving an inactive and expanded monomer. The Gibbs energy changes for monomer folding ( $\Delta G_{\text{fold}}^0 = -16.6 \pm 0.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) and monomer association ( $\Delta G_{\text{assoc}}^0 = -70.3 \pm 1.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) were calculated from data obtained in the two denaturants. From an analysis of the present data and data from the literature on the stability of TIM from different species and for other  $\beta/\alpha$  barrels, and model simulations on the effect of stability in the catalytic activity of the enzyme, it is concluded that the low stability of the monomers is neither the only, nor the main, cause for the dimeric nature of TIM. There is interplay between function and stability.

**Key words:** dimer evolution, equilibrium, hysteresis, monomeric intermediate, TIM-barrel, unfolding/refolding.

## INTRODUCTION

The functional and regulatory properties of oligomeric proteins are mostly provided by quaternary structure formation [1,2]. Triosephosphate isomerase (TIM) is the prototype of the  $\beta/\alpha$  barrel, one of the most common folds found in Nature [3,4]. All wild-type TIMs so far studied are oligomers. TIM activity exhibits classical Michaelis-Menten kinetics, is not allosterically regulated and the residues involved in substrate binding and catalysis are all located in the same subunit. However, dimerization is required for catalytic activity. In an effort to rationalize the oligomeric nature of TIM, it has been proposed that TIM monomers are thermodynamically unstable and that subunit assembly induces maximal conformational stability [5]. Besides this structural-stability explanation, it has been also argued that dimerization is necessary to optimize the geometry of the active-site pocket [6]. It appears that the relative importance of stability and function as reasons for the oligomeric nature of this enzyme is not convincingly established.

Some oligomers show a two-state dissociation/unfolding process without detectable intermediates [7]. However, in many cases, stable intermediates have been reported [8,9]. Where three or more states are observed, it is possible to estimate the relative contribution of monomer folding and association to the overall stability of the protein through the calculation of the thermodynamic parameters describing the processes involved. The two prerequisites for these calculations are the reversibility of the process and that the system reaches equilibrium. The equilibrium constants that describe the effect of denaturant concentration on

the relative amounts of native, folding intermediates and unfolded states can be obtained from two types of experiment, namely (a) native dimer  $\rightarrow$  unfolded monomer ( $N \rightarrow U$ ) unfolding experiments, where the native protein is the initial state and samples are incubated at several concentrations of denaturant, and (b)  $U \rightarrow N$  refolding experiments in which the native protein is first completely unfolded using high denaturant concentrations. The unfolded state is therefore the initial state that is then allowed to refold at lower denaturant concentrations. In both types of experiments, the relative populations of the stable states are then measured after equilibrium is reached, monitoring the spectroscopic, functional or hydrodynamic properties of the system. If denaturation and renaturation are reversible and the incubation time is long enough for equilibrium to be reached, both types of experiment should give the same results. For oligomeric proteins, unfolding rather than refolding has been commonly studied, since low refolding yields are commonly observed owing to the formation of irreversible non-productive interactions between folding intermediates [9]. Another difficulty is that unfolding and refolding kinetics might be very slow, making the identification of the equilibrium states problematic. In fact, kinetic control has been observed in monomeric [10] and oligomeric proteins [11–15]. In the case of TIM, kinetic hysteresis between  $N \rightarrow U$  and  $U \rightarrow N$  experiments has been detected in the pressure-induced denaturation of rabbit TIM (rTIM) [16] and in the temperature-induced unfolding of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) TIM (yTIM) [17]. However, up until the present time, TIM stability has only been studied at equilibrium employing  $N \rightarrow U$  experiments [5,18–24]. In the present study

Abbreviations used: DTT, dithiothreitol; GdmCl, guanidinium chloride; GDPH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase;  $N \rightarrow U$ , native dimer  $\rightarrow$  unfolded monomer;  $R_s$ , Stokes radius; SCM, spectral centre of mass; TIM, triosephosphate isomerase; hTIM, human TIM; rTIM, rabbit TIM; TbTIM, *Trypanosoma brucei* TIM; yTIM, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) TIM.

<sup>1</sup> On sabbatical leave from the Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria México, D.F. 04510, México

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed (e-mail fdaniel@servidor.unam.mx).



we monitored the denaturation and renaturation of yTIM in guanidinium chloride (GdmCl) and in urea, and determined the stability of the enzyme. With these data, together with the information available in the literature, we discuss in detail the possible reasons for the oligomeric nature of TIM.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GDPII) and GdmCl were from Boehringer-Mannheim, urea from Aldrich. All other reagents were purchased from Sigma. Production, expression and purification of recombinant yTIM were performed as described by Vázquez-Contreras et al. [24]. The concentration of purified yTIM was measured using a molar absorption coefficient ( $\epsilon_{222\text{nm}}$ ) of  $26664 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [25].

### Denaturation (N → U) and renaturation (U → N) experiments

In denaturation experiments (N → U), an aliquot of a concentrated yTIM stock solution was diluted in 100 mM triethanolamine, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol (DTT) (Buffer A) and different concentrations of GdmCl or urea. For the renaturation experiments (U → N), the enzyme was first exposed to 6 M GdmCl for 45 min or 8 M urea for 6 h, conditions under which yTIM is completely unfolded, as indicated by the absence of catalytic activity as well as by CD and intrinsic-fluorescence spectra. These incubation times were enough for the enzyme to reach the unfolded state, since all the monitored properties remained unchanged after 24 h. After this step, renaturation was started by dilution of the unfolded protein in buffer A that contained decreasing concentrations of GdmCl or urea. In both types of experiment, yTIM concentration was in the range 7.5 nM–7.5  $\mu\text{M}$ .

### Spectroscopic measurements

Fluorescence measurements were made on an ISS (Champaign, IL, U.S.A.) PC1 spectrofluorimeter. The temperature of the cells was maintained at  $25 \pm 0.1$  °C. Fluorescence measurements were carried out at an excitation wavelength of 280 nm (4 nm bandwidth) and emission was monitored from 300 to 400 nm (8 nm bandwidth). The fluorescence spectral centre of mass (SCM) was calculated from intensity data ( $I_\lambda$ ) obtained at different wavelengths using:

$$\text{SCM} = \frac{\sum \lambda \cdot I_\lambda}{\sum I_\lambda}$$

CD of yTIM samples (1.85–7.5  $\mu\text{M}$ ) was monitored at 222 nm with a JASCO J-715 spectropolarimeter using 0.1-cm-pathlength cells thermostatically maintained at  $25 \pm 0.1$  °C. The values reported were the average of 4 min scans, recorded every 10 s. Reference samples without protein were subtracted in all spectroscopic measurements.

### Catalytic-activity measurements

yTIM activity was measured in 1 ml of a mixture that contained 100 mM triethanolamine, pH 7.4, 10 mM EDTA and 1 mM DTT (Buffer B), containing 3.0 mM D,L-glyceraldehyde-3-phosphate, 10  $\mu\text{g}$  of GDPII, 0.2 mM NADH and 75 pM yTIM [26]. Reaction rates were determined from the decrease in absorbance at 340 nm as a function of time in a Beckman DU7500 spectrophotometer with a multicell device thermostatically maintained at  $25 \pm 0.1$  °C. Catalytic-activity measurements are complicated by the presence of high concentrations of denaturants because of their effect on the activity of the coupling enzyme. In addition,

TIM catalytic-activity measurements must be carried out at much lower protein concentrations ( $\approx 1000$  times) than those used for spectroscopic measurements. Therefore, activity was measured as follows. Samples (7.5  $\mu\text{M}$ –75 nM yTIM) were first diluted to 7.5 nM without changing the concentration of denaturant. Aliquots were withdrawn from the aforementioned mixture and further diluted in the activity reaction mixture; this procedure took 15 s. After this final dilution step, the yTIM concentration was 75 pM and the residual denaturant concentration was either 60 mM GdmCl or 80 mM urea; The time courses of NADH oxidation were linear, indicating that no re- or de-activation took place during reaction-rate measurements. As previously found, the dilution step did not affect activity values, and control experiments showed that catalytic-activity measurements were not affected by residual concentrations of denaturant in the assay media [23].

### Hydrodynamic measurements

Size-exclusion-chromatography experiments were performed on a Superdex 75 HR 10/30 gel-filtration column coupled to a Pharmacia (Uppsala, Sweden) FPLC system. Protein elution was monitored with a Waters 474 scanning fluorescence detector, using an excitation wavelength of 280 nm (18 nm bandwidth), emission being monitored at 320 nm (18 nm bandwidth). The incubated enzymes were loaded on to the filtration column, which had been equilibrated with Buffer B and GdmCl. The samples were eluted at a flow rate of  $0.4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Stokes-radii ( $R_s$ ) values were calculated from elution volumes and a calibration curve [23,27].

### Data fitting

The refolding of the unfolded monomers (U) into the native dimer (N) was analysed according to a three-state model involving a monomeric intermediate (M):



The changes in Gibbs energy for monomer folding ( $\Delta G_{\text{fold}}$ ) and monomer association ( $\Delta G_{\text{assoc}}$ ), defined as  $\Delta G_{\text{fold}} = -RT \ln (M/U)$  and  $\Delta G_{\text{assoc}} = -RT \ln (N/M^2)$  (where  $R$  is the gas constant,  $T$  is the temperature and  $\ln$  is logarithm to the base  $e$ ), were assumed to vary linearly with denaturant concentration  $x$  according to:

$$\Delta G_{\text{fold}} = \Delta G_{\text{fold}}^0 + m_{\text{fold}} x \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{assoc}} = \Delta G_{\text{assoc}}^0 + m_{\text{assoc}} x \quad (3)$$

where  $m$  is the dependence of free energy on denaturant concentration. The molar fractions of subunits in the unfolded, monomeric and native states are defined by  $f_U = U/P_1$ ,  $f_M = M/P_1$  and  $f_N = 2N/P_1$  respectively, where the total protein concentration ( $P_1$ ) is expressed on a monomer basis ( $P_1 = U + M + 2N$ ).  $f_M$  and  $f_N$  can be expressed as a function of the equilibrium constants as:

$$f_M = \frac{-\left(\frac{1}{K_{\text{fold}}} + 1\right) + \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{fold}}} + 1\right)^2 + 8K_{\text{assoc}} P_1}}{4K_{\text{assoc}} P_1} \quad (4)$$

$$f_N = 2(f_M)^2 \cdot K_{\text{assoc}} \cdot P_1 \quad (5)$$

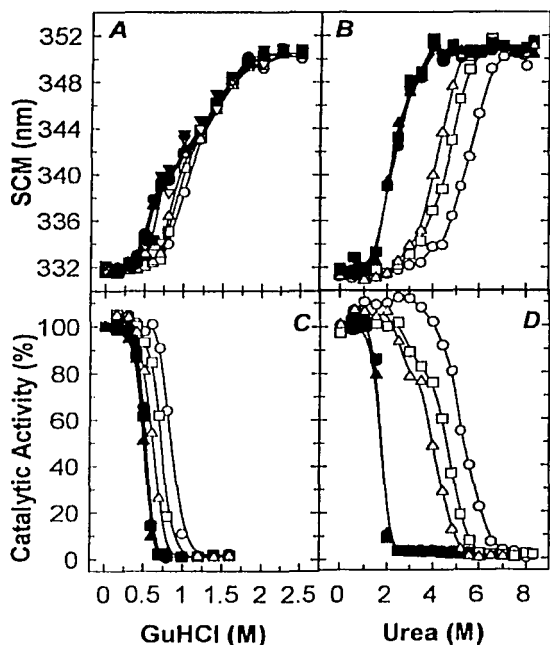
with  $f_U = 1 - f_N - f_M$ . In obtaining eqns (4) and (5), the experimental observable ( $y$ ) was assumed to be additive  $y = y_U \cdot f_U + y_M \cdot f_M + y_N \cdot f_N$ . In order to compare and use data from different techniques, it is convenient to normalize the experimental values as  $\alpha = [y(x) - y(x')]/[y(x=0) - y(x')]$ , where  $x'$  is

the denaturant concentration for complete unfolding. The parameters  $\Delta G_{\text{fold}}^{\text{H}}$ ,  $m_{\text{fold}}^{\text{H}}$ ,  $\Delta G_{\text{unfold}}^{\text{H}}$  and  $m_{\text{unfold}}^{\text{H}}$  were fitted to  $\alpha(x)$  using eqns (4) and (5).

## RESULTS AND DISCUSSION

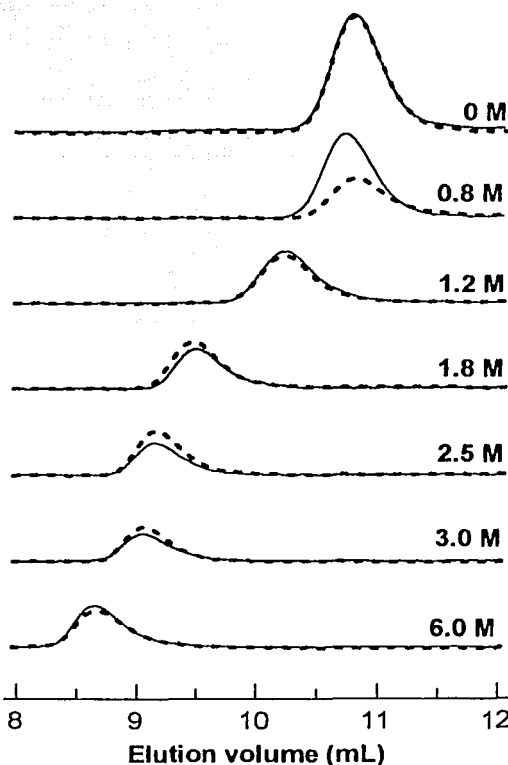
### Unfolding and refolding of $\gamma$ TIM

$\gamma$ TIM was incubated in 6 M GdmCl or in 8 M urea. Incubation times longer than 10 min in GdmCl or 5 h in urea leads to complete unfolding of  $\gamma$ TIM, as indicated by the complete inactivation of the enzyme, a far-UV CD spectrum characteristic of unfolded proteins, a decrease in the quantum yield of the fluorescence spectrum and a red shift in the SCM to 351 nm (results not shown). In what follows,  $\gamma$ TIM incubated for 45 min in 6 M GdmCl or for 6 h in 8 M urea was used as the unfolded (U) starting material for the U  $\rightarrow$  N experiments. The spectroscopic and catalytic properties of  $\gamma$ TIM were determined after different incubation times in the U  $\rightarrow$  N experiments (Figure 1, closed symbols) and in the conventional N  $\rightarrow$  U experiments (Figure 1, open symbols). The fluorescence and catalytic activity of  $\gamma$ TIM at concentrations below 0.5 M GdmCl or 1.0 M urea were native-like in both the N  $\rightarrow$  U and U  $\rightarrow$  N samples. The latter indicates that  $\gamma$ TIM renaturation is fully reversible. N  $\rightarrow$  U



**Figure 1** Hysteresis between the unfolding (N  $\rightarrow$  U) and refolding (U  $\rightarrow$  N) of  $\gamma$ TIM

$\gamma$ TIM samples (0.75  $\mu$ M) from N  $\rightarrow$  U (open symbols) and U  $\rightarrow$  N (closed symbols) experiments were monitored by the SCM of the fluorescence spectra (A and B) or catalytic activity (C and D). Measurements were taken after incubation for 96 (○, ●), 168 (□, ■) and 240 (△, ▲) h in GdmCl (A and C) or 48 (○, ●), 192 (□, ■) and 360 (△, ▲) h in urea (B and D). Lines are drawn to aid visualization.



**Figure 2** Elution profiles of  $\gamma$ TIM from N  $\rightarrow$  U and U  $\rightarrow$  N experiments in the presence of GdmCl

$\gamma$ TIM samples (0.75  $\mu$ M) from N  $\rightarrow$  U (continuous lines) and U  $\rightarrow$  N (broken lines) experiments were incubated for 24 h in the presence of GdmCl; thereafter samples (100  $\mu$ l) were injected into a Superdex 75 column equilibrated in the same concentration of denaturant. Elution profiles were monitored by fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{excitation}} = 280$  nm;  $\lambda_{\text{emission}} = 320$  nm).

and U  $\rightarrow$  N samples were inactive and showed a similar SCM at high concentrations of denaturants (1.5–2.5 M GdmCl or 7.0–8.0 M urea). At these low and high denaturant concentrations, both types of experiments gave the same results. In contrast, there were differences in the N  $\rightarrow$  U and U  $\rightarrow$  N courses at intermediate concentrations of denaturant (Figure 1). While the spectroscopic and functional properties of  $\gamma$ TIM in the U  $\rightarrow$  N samples reached a constant value after 48 h in both GdmCl and urea (closed symbols in Figure 1), in the N  $\rightarrow$  U experiments (open symbols in Figure 1) there was a very slow change in the SCM and catalytic activity towards the values observed in the U  $\rightarrow$  N direction. The data in Figure 1 indicate that, in the U  $\rightarrow$  N experiments, equilibrium was truly reached, while in the N  $\rightarrow$  U experiments this was not the case. The hysteresis observed in Figure 1 after incubation for conventional (1 or 2 days) and much higher 'equilibrium times' was probably due to slow kinetics of the dissociation and/or the unfolding transition(s).

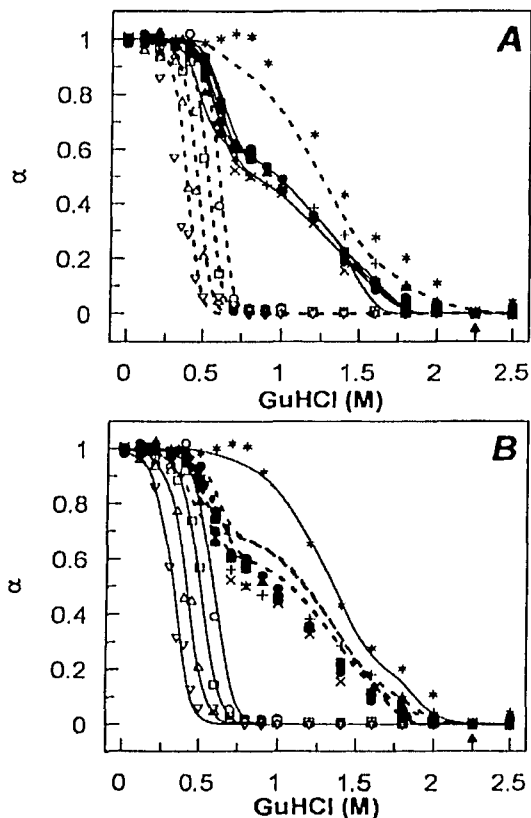


Figure 3 Three-state analysis of yTIM renaturation (U → N) in the presence of GdmCl ('GuHCl')

Normalized changes for yTIM renaturation experiments (U → N) in GdmCl followed by SCM at 7.5 (●), 1.85 (●), 0.75 (■) and 0.075 (▲)  $\mu\text{M}$ , CD at 7.5 (+) and 1.85 (×)  $\mu\text{M}$ , catalytic activity at 7.5 (○), 0.75 (□), 7.5<sup>-2</sup> (△) and 7.5<sup>-3</sup> (▽)  $\mu\text{M}$  and  $R_e$  at 0.75  $\mu\text{M}$  (\*). In each panel, continuous lines are fits to eqns (4) and (5); broken lines are predictions. Parameters obtained using alternative (i) (A) and alternative (ii) (B) are given in Table 1.

The hydrodynamic properties of yTIM in the presence of GdmCl were explored using size-exclusion chromatography [23,27]. A single elution peak was observed at all the GdmCl concentrations tested (Figure 2). The  $R_e$  of yTIM shows an increase in going from 0 to 6 M GdmCl from 30.0 to 44.9 Å (1 Å = 0.1 nm) (Figure 2). The  $R_e$  of unfolded yTIM varied between 40.9 and 44.9 Å in going from 2.5 to 6.0 M GdmCl (Figure 2). The elution profiles of yTIM samples in the N → U and U → N courses were similar at low (0–0.4 M GdmCl) and high concentrations (1.2–6.0 M GdmCl) of denaturant (Figure 2). However, in 0.8 M GdmCl the elution profiles of yTIM clearly differed in quantum yield (Figure 2). In spite of this difference in fluorescence properties, the  $R_e$  of yTIM in N → U and U → N experiments are coincident at all the times (24, 96 and 168 h) and GdmCl concentrations studied.

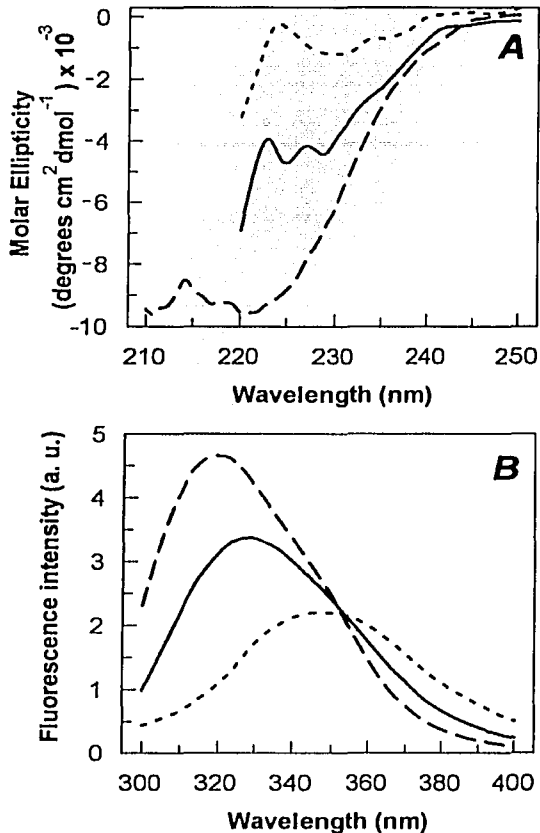


Figure 4 Spectroscopic properties of the three states of yTIM observed in U → N experiments

Far-UV CD (A) and fluorescence (B) spectra of yTIM were obtained at 0 (long-dash broken lines), 0.7 (continuous lines) and 2.5 (short-dash broken lines) M GdmCl. According to the three-state analysis (see the text), the maximum concentration of intermediate ( $U_e = 0.92$ ) was estimated to occur at 0.7 M GdmCl.

In an effort to find conditions for coincidence between the N → U and U → N experiments, both courses were also studied at 30 °C, where faster kinetics would be expected. The properties of U → N samples remained almost unchanged after 48 h (results not shown). As observed at 25 °C, the N → U samples at 30 °C progressively reached the U → N values. It was after 10 days that coincidence was achieved (results not shown), i.e. within a shorter time than at 25 °C. However, at 30 °C and this long incubation time, a decrease in the catalytic activity and a red shift in the SCM values were also observed in the native enzyme and in the U → N experiments. Since it is known that long incubation times or relatively high temperatures promote collateral chemical reactions between the protein and denaturants, as well as protein degradation [28–30], no further experiments were carried out at 30 °C.

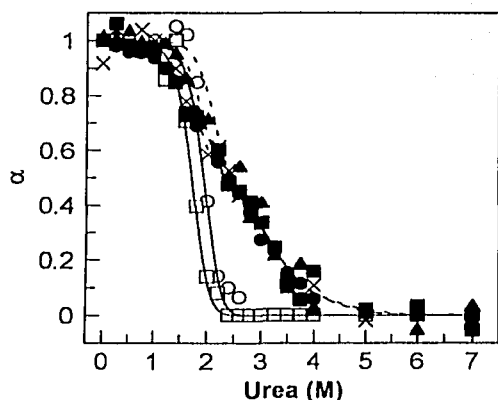


Figure 5 Three-state analysis of yTIM renaturation (U → N) in the presence of urea

Normalized changes for yTIM renaturation experiments (U → N) in urea followed by SCM at 7.5 (●), 0.75 (■) and 0.225 (▲)  $\mu\text{M}$ , CD at 7.5 (×)  $\mu\text{M}$  and catalytic activity at 2.25 (○) and 0.225 (□)  $\mu\text{M}$ . Continuous lines (catalytic activity) and broken lines (CD and SCM) are fits to eqns (4) and (5). Parameters are reported in Table 1 (alternative iv).

#### An equilibrium intermediate in the refolding of yTIM

On the basis of the above findings, hereafter only the results of U → N experiments at 25 °C are analysed. To facilitate the analysis and comparison of results using different techniques, results are henceforth expressed in their normalized form  $\alpha(x)$  (see above). The intrinsic fluorescence and CD of yTIM in the presence of GdmCl exhibited two transitions (Figure 3), indicating the presence of an intermediate. The first transition, observed at high concentrations of denaturant (between 2.5 and 1.0 M GdmCl), is characterized by partial burial of aromatic residues and secondary-structure formation. A shoulder was detected from 1.0 to 0.6 M. In the second transition, observed at GdmCl concentrations lower than 0.6 M, yTIM acquired the spectral properties and secondary structure of the native enzyme. yTIM was inactive in the region that corresponds to the first transition detected by the spectroscopic techniques. Catalytic activity appeared in the second transition, indicating that the intermediate is inactive (Figure 3). The  $R_h$  of yTIM was native-like in the second transition, so the intermediate might be a native-like dimer or an expanded monomer. Since yTIM is a dimer, its refolding must include a bimolecular step, and hence the association state of the intermediate can be determined from the effect of protein concentration on the transitions. The dependence of  $\alpha(x)$  on protein concentration has been considered to be the best criterion for assigning the bimolecular step in a folding mechanism ([8] and references therein). Variations in yTIM concentration had no clear effect on the transitions detected by spectroscopic or hydrodynamic measurements (results not shown). However, as the yTIM concentration was decreased, the re-activation curves were displaced to lower denaturant concentration (Figure 3). Therefore, the second transition is a bimolecular reaction, where inactive monomers associate to form the active dimer. The spectroscopic properties of the three states are shown in Figure 4. It is seen that the intermediate possesses a considerable amount of secondary structure, whereas its fluorescence spectra shows that aromatic residues are partially

buried, final rearrangements in their environment being accomplished upon association. Similar spectra were reported for N → U experiments [22].

Although dimers and monomers are in equilibrium in the second transition, the  $R_h$  of yTIM remained constant (Figure 3) and a single elution peak was observed (Figure 2). This may reflect the average of two states with different hydrodynamic properties in fast equilibrium, or that the hydrodynamic properties of the monomeric intermediate and the native dimer are similar. Because the approach to equilibrium is extremely slow (Figures 1A and 1C), the first possibility was ruled out. Therefore, the native dimer and the monomeric intermediate have similar  $R_h$  values (30 Å) and the latter is therefore more expanded than the 'native monomer' in the dimer. From NMR experiments, the hydrodynamic radii ( $R_h$ ) for native yTIM and for the monomeric intermediate observed in unfolding experiments are 24 and 29.6 Å respectively [22]. The intermediate described here is less expanded than the monomeric intermediate observed in the unfolding of the TIM from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) ( $R_h = 36$  Å) [23] and the two unfolding intermediates of the  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase ( $R_h = 37.9$  and 52.9 Å), which is a monomeric  $\beta/\alpha$  barrel protein of a similar molecular mass (27 kDa) [31].

In urea, the presence of an intermediate is clearly indicated by the non-coincidence of activity and spectroscopic data. Despite this, only a rather weak shoulder around 2.5 M urea was detected by CD and SCM (Figure 5). yTIM was inactive in the first transition, between 7.0 and 2.5 M urea, and re-activates at denaturant concentrations that correspond to the second transition (less than 2.5 M urea). As with GdmCl, enzyme re-activation depended on protein concentration (Figure 5). These data strongly suggest that the same three-state mechanism observed for the enzyme in GdmCl is also present for the enzyme in urea. In order to explore the effect of ionic strength on the equilibrium reassociation of yTIM, we measured the effect of moderate NaCl concentrations (0.3 and 0.6 M) on the activity profile in urea. Within experimental error, no changes were detected in the presence of NaCl (results not shown).

#### Calculation of yTIM stability

The simplest model accounting for the present data is a three-state model  $2U \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons N$ , where the unfolded monomers partially fold into expanded and inactive monomers which further assemble into the native active dimer. Since U → N experiments reached equilibrium, these were used to calculate the Gibbs energy changes associated with the observed transitions, i.e. monomer folding ( $\Delta G_{\text{fold}}^0$ ) and monomer association ( $\Delta G_{\text{assoc}}^0$ ). Given that for yTIM there are data for two denaturants and several techniques, it is possible to use different sets of data to obtain the thermodynamic parameters whose values, in principle, should be independent of the chosen data set. Furthermore, it is possible to use a subset of values and predict, with the  $\Delta G_{\text{fold}}^0$  and  $\Delta G_{\text{assoc}}^0$  obtained, the behaviour of another set. This allows us to test the internal consistency of the data and the soundness of the proposed model, and to evaluate the physical reliability of the obtained values for the parameters. In this framework,  $\Delta G_{\text{fold}}^0$  and  $\Delta G_{\text{assoc}}^0$  were evaluated for five alternatives. In all these fittings, the normalized signal for the unfolded monomer  $y_U = 0$  and for the native dimer  $y_N = 1$ , while in accordance with the discussion in the previous subsection, for activity data the normalized signal for the monomeric intermediate  $y_M = 0$  and for hydrodynamic data  $y_M = 1$ . In the first alternative (I), the thermodynamic parameters were fitted to fluorescence and CD data in GdmCl, predicting catalytic activity and hydrodynamic

Table 1 Stability of yTIM at 25 °C and pH 7.4

Fit	Gibbs energy change (kJ · mol <sup>-1</sup> )		
	$\Delta G_{fold}^0$	$\Delta G_{assoc}^0$	$\Delta G_{cd}^0$
(i)*	-10.49 ± 0.79	-77.48 ± 0.89	-98.46
(ii)†	-16.38 ± 1.46	-67.59 ± 0.82	-100.35
(iii)‡	-15.91 ± 0.05	-69.01 ± 0.31	-95.42
(iv)§	-12.41 ± 1.31	-83.26 ± 1.92	-108.08
(v)*	-16.59 ± 0.71	-70.26 ± 1.08	-103.44

\*  $y_M$  (CD) = 0.64 ± 0.02 and  $y_M$  (SCM) = 0.71 ± 0.02 used as fitting parameters.

†  $y_M$  (CD) and  $y_M$  (SCM) were taken as constants equal to those obtained in alternative (i).

‡  $y_M$  (CD) = 0.55 ± 0.02 and  $y_M$  (SCM) = 0.63 ± 0.01 used as fitting parameters.

§  $y_M$  (CD and SCM) = 0.68 was taken as constant equal to the average of those obtained in alternative (i).

\*  $y_M$  (CD) = 0.52 ± 0.03 and  $y_M$  (SCM) = 0.59 ± 0.02 used as fitting parameters.

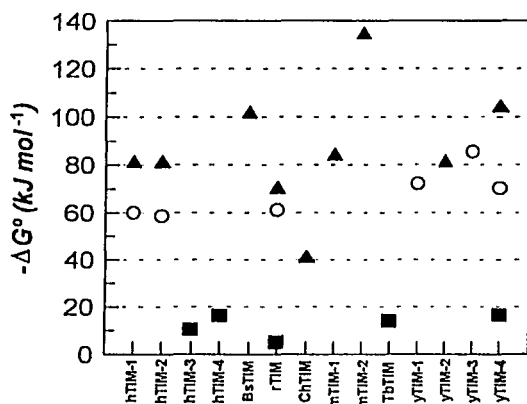


Figure 6 Stability of TIM from different species

Unless otherwise stated, data are for wild-type enzymes at 25 °C and pH 7.4.  $\Delta G_{fold}^0$  (■),  $\Delta G_{assoc}^0$  (○) and  $\Delta G_{cd}^0$  (▲). The code for the labels on the abscissa is as follows: hTIM-1, human TIM at pH 8.0 [5]; hTIM-2,  $\Delta G_{assoc}^0$  from [5] and  $\Delta G_{cd}^0$  from [18]; hTIM-3, M140/R980 monomeric mutant [5,18]; hTIM-4, M140/R980/D179D/K193A/A215P monomeric mutant [18]; BsTIM, *Bacillus stearothermophilus* TIM [18]; rTIM, rabbit TIM [19]; ChTIM, chicken TIM at 30.4 °C [34]; LmTIM-1, *Leishmania mexicana* TIM at pH 7.5 [21]; LmTIM-2, E650 mutant at pH 7.7 [21]; TbTIM, *Trypanosoma brucei* TIM monomeric mutant at pH 6.8 [21]; yTIM-1, *Saccharomyces cerevisiae* TIM average  $\Delta G_{assoc}^0$  at pH 7.2 [22]; yTIM-2,  $\Delta G_{cd}^0$  from thermal denaturation extrapolated to 25 °C [17]; yTIM-3, average  $\Delta G_{assoc}^0$  calculated from structural data and solvation parameters [35]; and yTIM-4, the present work (Table 1, alternative i).

data. In the second alternative (ii) the converse was done, i.e. parameters were fitted to catalytic-activity and hydrodynamic data and the spectroscopic behaviour was predicted. The  $\Delta G^0$  obtained for alternatives (i) and (ii) are given in Table 1, their predictive power being displayed in Figure 3. In alternative (i) (Figure 3A), the spectroscopic signal of the monomer ( $y_M$ ) was also used as a fitting parameter. In alternative (ii) (Figure 3B), these two values were used as constants to predict the spectroscopic behaviour. In both cases, the change of  $\alpha(x)$  with protein concentration is well reproduced. The third alternative (iii) using in using all the available data in GdmCl, again using  $y_M$  for spectroscopic data as an adjustable parameter, the resulting  $\Delta G^0$  being reported in Table 1. For urea, alternatives (i)

and (ii) were not considered, since, as mentioned above, in this denaturant the biphasic behaviour of the spectroscopic data is less marked and, moreover, hydrodynamic data are not available. Therefore, alternative (i) used all the available data in urea. Here, the spectroscopic signal of the intermediate is difficult to obtain as a fitted parameter and hence the  $y_M$  value obtained in the analysis of GdmCl data (alternative i) was used as a fixed parameter (Table 1). Finally, alternative (v) was a global fit employing all the available data in both denaturants and using the values of  $y_M$  (SCM) and  $y_M$  (CD) as adjustable parameters. In Table 1, the fitted spectroscopic  $y_M$  values are between 0.52 and 0.71, indicating that in comparison with the native dimer, the monomeric intermediate contains substantial secondary structure and the aromatic residues are partially buried, as observed in the spectroscopic data shown in Figure 4. The  $\Delta G_{fold}^0$  and  $\Delta G_{assoc}^0$  values obtained from the five alternatives are close, and, for all of them,  $\Delta G_{assoc}^0 \gg \Delta G_{fold}^0$ . The large magnitude of  $\Delta G_{assoc}^0$  is in agreement with dilution experiments, since, after a 3-month incubation time, the catalytic activity of yTIM remained constant and independent of enzyme concentration over the range from 75 pM to 7.5  $\mu$ M (see below). The comparison among alternatives (iii)–(v) suggests that the folding and association of yTIM is thermodynamically equivalent in both denaturants. As observed previously for other proteins, the  $m$  values for GdmCl are considerably larger than those for urea. Since the data employed in alternatives (i)–(v) are all at equilibrium, the small differences seen in Table 1 can be attributed to experimental error. From this point of view, the results of the global fit (alternative v) must be the most satisfactory, since in this fitting some of these experimental inaccuracies are compensated for.

#### Unfolding of TIM from different species and other $\beta/\alpha$ barrels

The unfolding of TIM has been extensively studied, but, often, irreversibility has been observed [20,23,32,33]. Figure 6 displays all the available data regarding the thermodynamic stability of TIM from different species [5,17–19,21,22,34]. In contrast with the present data for yTIM, where biphasic behaviour was detected and used to obtain the Gibbs energy changes, in all other cases, monophasic transitions were employed using a two-state model ( $2U \rightleftharpoons N$ ). Therefore, the only reported Gibbs energy changes involving an intermediate had to be obtained from kinetic data for rTIM [19] or from the unfolding of monomeric mutants of human TIM (hTIM) [5,18] and of TbTIM [21]. All thermodynamic characterizations of TIM stability in Figure 6 have used experiments in the  $N \rightarrow U$  direction or calculations from structural data [35]. In this respect, the results in Figure 1 clearly show that caution must be exercised when using only data from  $N \rightarrow U$  experiments to obtain thermodynamic parameters, since, unless long incubation times are employed, equilibrium might not have been reached. Despite the different conditions used to obtain the data in Figure 6, for all TIM species there is a clear relation between the Gibbs energy changes for the association and folding transitions, namely  $\Delta G_{assoc}^0$  is much bigger than  $\Delta G_{fold}^0$ . The fractional contribution of monomer folding to the stability of the native enzyme (estimated as  $2\Delta G_{fold}^0/\Delta G_{assoc}^0$ ) varies between 0.14 for rTIM to 0.32 for yTIM; that is, subunit assembly notably increases the conformational stability of TIM, as previously stated [5]. In all cases monomer folding is a favourable process, the  $\Delta G_{fold}^0$  values obtained for wild-type TIMs varying from -5.0 to -16.6 kJ · mol<sup>-1</sup>. This indicates that TIM monomers are marginally stable. Since these values are smaller than those observed for the folding of monomeric proteins [36], it can be concluded that TIM is dimeric, mainly because of stability considerations [5]. In contrast, other approaches (see below)

suggest that the high catalytic skills of TIM are linked to the oligomeric nature of the enzyme. In what follows, through the comparison between TIM results and those obtained for other  $\beta/\alpha$  barrels, we analyse the relative contributions of stability and function as reasons for the dimeric nature of TIM.

The stability hypothesis is based on two underlying assumptions. First, that monomeric and active  $\beta/\alpha$  barrels with low stability are not likely to occur. Secondly, that, in the absence of quaternary interactions, high stability cannot be achieved for  $\beta/\alpha$  barrels. The first assumption is not in agreement with the low stability reported for the monomeric and active aldolase from *Staphylococcus aureus* ( $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ} = -9.0 \pm 2.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) [37]. Regarding the second assumption, a highly stable  $\beta/\alpha$  barrel, namely the  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase, has been reported; in this case,  $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ} = -34.3$  and  $-64.42 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  from the GdmCl- and urea-induced unfolding respectively [38,39]. Therefore the stability range for monomeric and active  $\beta/\alpha$  barrels is very broad ( $-9$  to  $-64 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ); moreover, it varies significantly with pH, as observed in the indol-3-ylglycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*, where  $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ}$  changes from  $-14.7 \pm 1.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  at pH 7.0 to  $-25.5 \pm 1.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  at pH 9.0 [40]. The stability of  $\gamma$ TIM monomers obtained in this work ( $-16.6 \pm 0.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; Table 1) is clearly within this range, but closer to the lower limit. Noticeably, the stability of monomeric  $\beta/\alpha$  barrels can be increased, as shown by the results for hTIM monomeric mutants, where the stability increased from  $-10.46$  to  $-16.32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  [18]. It is clear, then, that there are examples that undermine the validity of the two above-mentioned assumptions. On the other hand, the functional hypothesis finds strong support from the fact that, despite the significant research efforts made so far, the catalytic activity of monomeric TIM mutants is at best 100 times lower than that of wild-type TIMs [41,42]. This is remarkable, considering that active-site residues are self-contained in the monomer. It has been proposed that the huge increase in catalytic activity observed upon association is due to intersubunit contacts that decrease the flexibility of the catalytic loops [6]. In the case of  $\gamma$ TIM, the intersubunit contacts occurring during reassociation involve adjustments in the secondary and tertiary structure (Figure 4), as well as monomer shrinking. Other approaches, such as refolding kinetics in conventional and low-water media, as well as stability towards dilution [43-47], indicate that TIM catalysis requires dimerization.

Some insight might be gained by the analysis of the fraction of active TIM as a function of protein concentration. These experimental data are shown in Figure 7, together with the prediction using the  $\Delta G^{\circ}$  values obtained in the present study using the three-state model described above (Table 1, alternative *r*). Figure 7 also shows three simulations for different  $\Delta G^{\circ}$  values. The first two simulations indicate that activity is practically constant when  $\Delta G_{\text{active}}^{\circ} = -70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , and  $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ}$  is changed from 0 to  $-70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; that is, from a non-stable to very stable monomer. In other words, the activity profile is almost independent of  $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ}$ . In the third simulation,  $\Delta G_{\text{active}}^{\circ}$  was reduced by half ( $-35 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) while maintaining a very stable monomer ( $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ} = -75 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), the result being that catalytic activity is drastically reduced. Since *in vivo* TIM concentrations for different species are between  $1 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  [48] and monomers are barely active, it is clear from Figure 7 that a high  $\Delta G_{\text{active}}^{\circ}$  is needed for catalysis. It is likely that there is no evolutionary pressure that favours the appearance of stable monomers. The possibility that a stable dimer formed early in evolution and was subsequently optimized for perfect catalysis should be considered. From the above discussion it appears that the available data for TIM indicates that there is not a unique

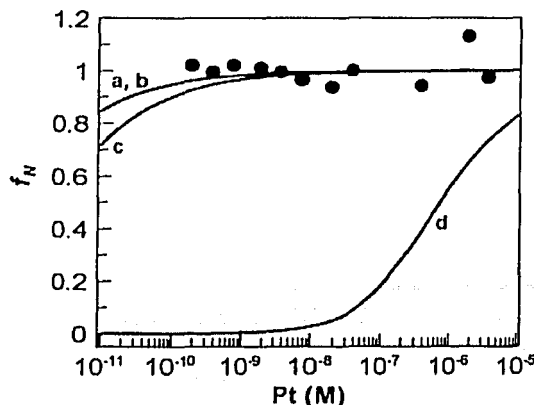


Figure 7 Fraction of active  $\gamma$ TIM molecules as a function of protein concentration [ $P_1$  (' $P_1'$ )]

Experimental data for the fraction of native molecules as a function of  $\gamma$ TIM concentration ( $\bullet$ ) are compared with simulations based on the following values of  $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ}$  and  $\Delta G_{\text{active}}^{\circ}$  (in  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) respectively: trace a,  $-16.6$  and  $-70.3$  (from Table 1, alternative *r*); b,  $-70$  and  $-70$ ; trace c, 0 and  $-70$ ; and trace d,  $-75$  and  $-35$ . Traces a and b are indistinguishable.

reason for the dimeric nature of TIM. For oligomeric proteins, function and stability are intimately linked. Hence, the dimeric nature of TIM should be examined in the light of this interplay. Definitely the low stability of TIM monomers is neither the only, nor the main, cause.

It would be valuable to widen the present discussion to include oligomers of different fold types. The data in [8,49-52] indicate that, in many cases, the stability of the dimer contributes significantly to the conformational free energy of the protein, as discussed above for TIM. However, since there are relatively few thermodynamic studies for the dissociation/association of oligomeric proteins, general conclusions are difficult to make.

We thank Professor M. Calcagno, Professor A. Gómez-Puyou, Professor A. Hernández-Arana and Professor R. A. Muñoz-Clares for helpful discussions, Professor V. Donhal for his advice on the fitting procedures and Dr M. E. Chánéz-Cardenas for her help with the FPLC experiments. This work was partially supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (34815-N, 27986-E). H.N. was a recipient of Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Postgrado-Universidad Nacional Autónoma de México (PADEP-UNAM) and CONACyT scholarships.

## REFERENCES

- Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
- Traut, T. W. (1994) Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 125-163.
- Farber, G. K. and Petsko, G. A. (1990) The evolution of  $\alpha/\beta$  barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 228-234.
- Copley, R. R. and Bork, P. (2000) Homology among ( $\beta/\alpha$ ) barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J. Mol. Biol.* **303**, 627-641.
- Maintrid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J. M., Mande, S. C., Hof, W. G., Martial, J. A. and Goraj, K. (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* **257**, 441-456.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. and 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.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- 7 Bowie, J. U. and Sauer, R. T. (1989) Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer. *Biochemistry* **28**, 7139–7143
- 8 Neet, K. E. and Timm, D. E. (1994) Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* **3**, 2167–2174
- 9 Jaenicke, R. and Lile, H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein Chem.* **53**, 329–401
- 10 Baker, D., Sohl, J. L. and Agard, D. A. (1992) A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature (London)* **356**, 263–265
- 11 Sinclair, J. F., Ziegler, M. M. and Baldwin, T. O. (1994) Kinetic partitioning during protein folding yields multiple native states. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 320–326
- 12 Lai, Z., McCulloch, J., Lachuet, H. A. and Kelly, J. W. (1997) Guanidine hydrochloride induced denaturation and refolding of transyltrein exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochemistry* **36**, 10230–10239
- 13 Rosenfarb, A., Rosen, J. and Hinz, H. J. (1999) Slow unfolding and refolding kinetics of the mesophilic Rop wild-type protein in the transition range. *Eur. J. Biochem.* **264**, 989–995
- 14 Engel, J. and Bachinger, H. P. (2000) Cooperative equilibrium transitions coupled with a slow annealing step explain the sharpness and hysteresis of collagen folding. *Matrix Biol.* **19**, 235–244
- 15 Zhu, L., Fan, Y. X. and Zhou, J. M. (2001) Identification of equilibrium and kinetic intermediates involved in folding of urea denatured creatine kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**, 320–332
- 16 Rietveld, A. W. and Ferreira, S. T. (1998) Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **37**, 933–937
- 17 Benítez-Carcedo, C. G., Rojo-Domínguez, A. and Hernández-Arana, A. (2001) Temperature induced denaturation and refolding of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of denaturation coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**, 9049–9058
- 18 Mainfroid, V., Mande, S., Hof, W., Martial, J. and Goraj, K. (1996) Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual  $\alpha$ -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110–4117
- 19 Rietveld, A. W. and Ferreira, S. T. (1996) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM, the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* **35**, 7743–7751
- 20 Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H. and Balaram, P. (1999) Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* **38**, 423–431
- 21 Larbier, A. M., Bachmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V. and Wierenga, R. K. (2000) The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2516–2524
- 22 Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y. and Dobson, C. M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **300**, 11–16
- 23 Cháñez-Gárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G. and 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
- 24 Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernández, G., Costas, M. and Fernández-Velasco, D. A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behaviour in urea. *Protein Peptide Lett.* **7**, 57–64
- 25 Norbø, T. L. and Hartman, F. C. (1972) Triosephosphate isomerase from bakers' yeast. Preliminary crystallographic data. *Biochemistry* **11**, 4435–4441
- 26 Rožický, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A. and Gracy, R. W. (1971) Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 312–320
- 27 Uversky, V. N. (1993) Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* **32**, 13288–13298
- 28 Stark, G. R. (1965) Reactions of cyanate with functional groups of proteins. IV. Inertness of aliphatic hydroxyl groups. Formation of carbamyl- and acylhydantoin. *Biochemistry* **4**, 2363–2367
- 29 Hagel, P., Gerding, J. J., Freygen, W. and Bloemendal, H. (1971) Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 366–373
- 30 Gerding, J. J., Koppers, A., Hagel, P. and Bloemendal, H. (1971) Cyanate formation in solutions of urea. II. Effect of urea on the eye lens protein  $\gamma$ -crystallin. *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 375–379
- 31 Gualletti, P. J., Iwakura, M., Lee, J. C., Khara, H., Bisel, D., Zitzewitz, J. A. and Matthews, C. R. (1999) Apparent radii of the native, stable intermediates and unfolded conformers of the  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase from *E. coli*, a TIM barrel protein. *Biochemistry* **38**, 13367–13378
- 32 Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Renier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. and Maes, D. (1998) Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*: Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**, 2199–2206
- 33 Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B. and Jaenicke, R. (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Sci.* **6**, 2159–2165
- 34 McVitie, J. D., Esnoul, M. P. and Peacocke, A. R. (1977) The denaturation–renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* **81**, 307–315
- 35 Lolis, E., Alter, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. and Pelsko, G. A. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **29**, 6609–6618
- 36 Pace, C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 14–17
- 37 Rudolph, R., Siebendritt, R. and Kiefhaber, T. (1992) Reversible unfolding and refolding behavior of a monomeric aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Protein Sci.* **1**, 654–666
- 38 Ogasahara, K. and Yutani, K. (1997) Equilibrium and kinetic analyses of unfolding and refolding for the conserved proline mutants of tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit. *Biochemistry* **36**, 932–940
- 39 Gualletti, P. J., Bisel, O. and Matthews, C. R. (1999) The progressive development of structure and stability during the equilibrium folding of the  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **8**, 1623–1635
- 40 Andreotti, G., Cutellis, M. V., Di Palo, M., Fessas, D., Sanna, G. and Marino, G. (1997) Stability of a thermophilic TIM-barrel enzyme: indole-3-glycerol phosphate synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* **323**, 259–264
- 41 Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R. and Wierenga, R. K. (1994) Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1515–1518
- 42 Saab-Rincón, G., Juárez, V. R., Osuna, J., Sánchez, F. and Soberón, X. (2001) Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Eng.* **14**, 149–155
- 43 Waley, S. G. (1973) Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* **135**, 165–172
- 44 Zabori, S., Rudolph, R. and Jaenicke, R. (1980) Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch.* **35**, 999–1004
- 45 Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. and Gracy, R. W. (1992) Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* **208**, 389–395
- 46 Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M. E., Oppendoerf, F. R., Michels, P. A. and Wierenga, R. K. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* **211**, 703–710
- 47 Fernández-Velasco, D. A., Sepúlveda-Becerra, M., Galina, A., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1995) Water requirements in monomer folding and dimerization of triosephosphate isomerase in reverse micelles. Intrinsic fluorescence of conformers related to reactivation. *Biochemistry* **34**, 361–369
- 48 Abe, K. R., Butler, M. H. and Wright, B. E. (1990) Cellular concentrations of enzymes and their substrates. *J. Theor. Biol.* **143**, 163–195
- 49 Hornby, J. A. T., Luo, J.-K., Stevens, J. M., Wallace, L. A., Kaplan, W., Armstrong, R. N. and Dirr, H. W. (2000) Equilibrium folding of dimeric class  $\mu$  glutathione transferases involves a stable monomeric intermediate. *Biochemistry* **39**, 12336–12344
- 50 Apiyo, D., Jones, K., Gundry, J. and Wittung-Stafshede, P. (2001) Equilibrium unfolding of dimeric desulfotoleroxin involves a monomeric intermediate: iron cofactors dissociate after polypeptide unfolding. *Biochemistry* **40**, 4940–4948
- 51 Bose, K. and Clark, A. C. (2001) Dimeric procaspase-3 unfolds via a four-state equilibrium process. *Biochemistry* **40**, 14236–14242
- 52 Mateu, M. G. (2002) Conformational stability of dimeric and monomeric forms of the C-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 capsid protein. *J. Mol. Biol.* **318**, 519–531