



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

AREA DE BIOFISICOQUIMICA

**“MECANISMOS DE DESPLEGAMIENTO Y REPLEGAMIENTO
TERMICOS DE LA ENZIMA DIMERICA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE LEVADURA”**

T E S I S

QUE PRESENTA

CLAUDIAGUADALUPE BENITEZ CARDOZA

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

México D.F. Julio de 2001

Esta tesis se realizo en el Area de Biofisicoquimica del Departamento de Quimica, Division de Ciencias Basicas e Ingenieria, Universidad Autonoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la direccion del Dr. Arturo Rojo Dominguez y el Dr. Andres Hernandez Arana.

Jurado

Dr. Armando Gomez Puyou	Presidente
Dr. Andres Hernandez Arana	Secretario
Dr. Daniel Alejandro Fernandez Velasco	Vocal
Dra. Silvia Solis Mendiola	Vocal
Dr. Abel Moreno Carcamo	Vocal

Dedicatorias

Con todo mi amor dedico esta tesis a:

DIOS.

El Señor es mi roca y mi fortaleza; es la roca que me da seguridad.

Salmo 18: 2-3

Maria del Socorro Cardoza Olivas

Muy querida mama; Te debo todo lo que soy en la vida. Gracias por darme siempre tanto amor y cuidado: Gracias por apoyarme en todo. Gracias por tu ejemplo de fortaleza, honestidad y responsabilidad. Gracias por traerme a este mundo, pero sobre todo te agradezco haberme inculcado profundo amor y respeto por la vida. Te quiero mucho mamita.

Eduwiges Olivas Vda de Cardoza

Querida Abuelita, también le debo todo lo que soy y no soy, le agradezco haberme dedicado tantos cuidados, amor, cariño, tiempo, apoyo. Gracias por sus oraciones y por sus enseñanzas en la vida. La quiero y la extraño mucho.

A la memoria de

Regino Cardoza Dominguez

A mis tíos, primos y sobrinos. A toda mi familia.

A mis amigas y amigos.

Agradecimientos

Agardezco el apoyo economico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia a traves de la Beca de Doctirado con numero de registro 94713

Con profundo respeto yadmiracion agradezco al Dr. Andrés Hernández Arana su tiempo e infinito apoyo que me ha brindado para realizar este trabajo. Gracias por transmitirme parte de su conocimiento; pero sobre todo le agradezco haberme guiado por el inicio de mi vida científica.

Dr. Arturo Rojo Dominguez

Gracias por su apoyo y ayuda. Gracias por su amistad y confianza.

Gracias a los miembros del jurado: Dr. Armando Gomez Puyou, Dr. Andres Hernandez Arana, Dr. Daniel Alejandro Feranandez Velasco, Dra. Silvia Solis Mendiola, y Dr. Abel Moreno Carcamo que con sus valiosos comentarios y sugerencias enriquecieron sta tesis doctoral.

A todos los maestros que he tenido a lo largo dela mi vida, porque todos han contribuido en mi formacion academica y como persona

Tengo tantas coas que agradecer y a tantas personas que podria invertir mas paginas que el texto mismo de la tesis. Gracias a los que no menciono pero que contribuyeron directa o indirectamente a la realizacion de este trabajo.

Resumen

En el presente trabajo se estudió el desplegamiento térmico de la triosafosfato isomerasa (TIM) de levadura empleando para ello calorimetría diferencial de barrido y métodos espectroscópicos tales como dicroísmo circular (DC) y fluorescencia. Primeramente se buscaron condiciones de reversibilidad en las transiciones de desplegamiento térmico seguidas por DC, siendo éstas: pH 8.5, concentraciones de proteína menores a 0.150 mg mL^{-1} y velocidades de barrido mayores a $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A pesar de que los barridos de desplegamiento térmico fueron reversibles, los ciclos de desplegamiento-replegamiento presentaron una marcada histéresis.

Por otro lado, se realizaron estudios cinéticos utilizando las técnicas de DC y fluorescencia. Con ellos se probó que el desplegamiento consiste, inicialmente, de una reacción de primer orden, que conlleva a la formación de un estado térmicamente desplegado, *U*. A juzgar por la señal de DC, *U* contiene estructura secundaria residual pero carece de la mayoría de las interacciones terciarias presentes en la proteína nativa. *U* puede formar un estado irreversiblemente desplegado (probablemente por agregación) si permanece expuesto durante períodos prolongados a temperaturas altas. En contraste, si se enfría rápidamente el estado *U* es capaz de replegarse hasta la forma nativa a través de una cinética de segundo orden. A partir de los resultados obtenidos en las cinéticas de replegamiento seguidas por DC se observó que la unión de los monómeros del estado *U* para formar la TIM nativa está asociada a la recuperación de estructura secundaria

Asimismo, se determinaron los parámetros de activación de los procesos de desplegamiento y replegamiento. El ΔH_u de activación determinado fue alto (480 kJ mol^{-1}) comparado con lo reportado para varias proteínas monoméricas. El valor de $\Delta C_{p,u}^\ddagger$ es prácticamente insignificante ($2.1 \pm 5.9 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Por el contrario, el replegamiento muestra un valor muy grande y negativo de $\Delta C_{p,r}^\ddagger$ ($-31 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), lo que concuerda satisfactoriamente con lo publicado para varias proteínas monoméricas. La dependencia de las constantes cinéticas de desplegamiento y replegamiento con la temperatura podría ser una probable explicación de la histéresis observada en los barridos térmicos.

INDICE

CAPÍTULO 1: Introduccion	9
1.1 Desnaturalizacion de proteinas	12
1.2 Triosafosfato Isomerasa de levadura	15
1.3 Estudios previos de desplegamiento y replegamiento de la triosafosfato isomerasa	19
1.4 Objetivos	21
CAPÍTULO 2: Materiales y metodos	22
2.1 Triosafosfato isomerasa de levadura	23
2.2 Ensayo de actividad	25
2.3 Tecnicas experimentales	27
2.3.1 Transiciones termicas obtenidas por espectroscopia de dicroismo circular	27
2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido	29
2.3.3 Cinética de desnaturalizacion	30
2.3.4 Cinética de replegamiento	31
2.3.5 Espectrocopia de florescencia	31
CAPÍTULO 3: Resultados	33
3.1 Transiciones termicas de desplegamiento y replegamiento de la TIM	34
3.2 Calorimetria de la desnaturalizacion termica de la TIM	42
3.3 Cinética de desnaturalizacion	47
3.4 Dependencia de la constante de desplegamiento con la temperatura	55
3.5 Cinética de replegamiento	57

3.6 Dependencia de la constante de replegamiento con la temperatura	59
CAPÍTULO 4: Discusion	61
4.1 Evaluacion de la estabilidad termodinamica de un supuesto modelo de dos estados	68
4.2 Histeresis en las transiciones termicas de desplegamiento y replegamiento termico	70
CAPÍTULO 5: Conclusiones y perspectivas	73
5.1 Mutantes en las que se genera un puente salino	75
5.2 Puentes salinos que podrian romperse	76
5.3 Puente salino conservado	77
5.4 Q65	77
CAPÍTULO 6: Apendice: Tratamiento de los datos	80
6.1 Estudios de desplegamiento en el equilibrio	81
6.1.1 Modelo reversible de dos estados para proteinas dimericas	81
6.2 Estudio de desplegamiento fuera del equilibrio	84
6.2.1 Modelo cinetico de dos estados	85
6.2.2 Modelo cinetico de tres estados	87
6.2.3 Reaccion de segundo orden	90
6.2.4 Teoria del estado de transicion	91
CAPÍTULO 7: Referencias bibliograficas	95

Surgimos de una singularidad fortuita, la Gran Explosión; a medida que se expandió el universo, se condensaron los planetas, la materia se fue enfriando y con ello se fueron formando partículas, átomos moléculas, hasta que de pronto la complejidad fue suficiente como para que ocurriera la vida, empezara a evolucionar y aquí estamos meditando sobre estas cosas....

La muerte y sus ventajas.

Fanny Blank Cerejido y Marcelino Cerejido

Capítulo 1: Introducción

1 Introducción

Las proteínas son responsables de realizar reacciones fundamentales en las células, una de ellas es catalizar y regular las reacciones químicas; también pueden formar parte de unidades estructurales en los organismos vivos. La funcionalidad de las proteínas requiere una estructura tridimensional específica, la forma “nativa”, que es la única con actividad biológica. El proceso mediante el cual una cadena polipeptídica adquiere la forma nativa, se denomina plegamiento. Se ha observado que para muchas proteínas la secuencia de aminoácidos por si sola puede dirigir el plegamiento sin información o energía adicional. Esto se demostró con los experimentos realizados por Anfinsen y colaboradores con la enzima ribonucleasa (Anfinsen, 1973): La ribonucleasa en su forma completamente reducida, con 8 grupos SH, se reoxidó en condiciones desnaturizantes, en 8 M de urea, de este modo se obtuvo una mezcla (sin actividad enzimática) de configuraciones con varios de los 105 posibles puentes disulfuros formados. Cuando se removió el agente desnaturizante la mezcla se transformó en una solución homogénea de proteína indistinguible de la forma nativa de ribonucleasa. En algunos casos las chaperonas u otras proteínas accesorias están involucradas en la adquisición del estado nativo. Éstas proteínas, más que determinar la organización espacial del producto final, asisten a la ordenación y dirección propias de la proteína. Esto significa que no contienen información adicional sobre la estructura que ayudan a plegar (Jaenicke y Lilie, 2000).

Hasta el momento, se desconoce el modo en que la secuencia primaria dirige el plegamiento proteico. El día que este problema se resuelva será posible predecir la conformación nativa partiendo únicamente de la estructura primaria. Entender en detalle el

plegamiento de las proteínas va mucho más allá de una curiosidad intelectual, dado que esto nos permitiría identificar los factores que codifican y estabilizan características particulares de las proteínas, con el propósito de modificarlas o diseñarlas racionalmente (Dobson *et al.*, 1994).

La conformación nativa de una proteína se mantiene gracias a innumerables interacciones no covalentes entre los átomos de la proteína y entre estos y el solvente que los rodea. Las cadenas hidrofóbicas tienden a empacarse una con otra, y muchos de sus aceptores y donadores de puentes de hidrógeno se disponen en el espacio favoreciendo la formación de este tipo de enlaces. Esto es especialmente notable en la cadena principal de la proteína, en la que se forman redes de puentes de hidrógeno en hélices- α y hojas- β . La energía de cada interacción es relativamente pequeña, pero dado su gran número, el total puede sumar cientos de kilocalorías por mol de proteína. A pesar de esto, la estructura nativa es marginalmente estable. El cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) para el desplegamiento de las proteínas es del orden de varias decenas de kJ mol^{-1} (Cantor y Schimmel, 1980). Esta pequeña cantidad de energía es la diferencia entre la energía libre de los estados nativo (G_N) y desnaturalizado (G_U).

$$\Delta G = G_N - G_U \quad (1.1)$$

El valor de ΔG es el resultado de un delicado balance entre los cambios relativamente grandes de la entalpía y entropía del proceso (típicamente del orden de cientos de kJ; (Jaenicke y Lilie, 2000)).

1.1 Desnaturalización de proteínas.

El proceso mediante el cual las proteínas pierden su conformación nativa se denomina desnaturalización. En este proceso se pierde la función biológica ya sea por alteraciones locales (sin que necesariamente se pierdan características estructurales globales) o bien por la extensión de la cadena polipeptídica (desplegamiento) en la que se pierde una parte importante de sus contactos terciarios y de su estructura secundaria. Las proteínas se pueden desnaturalizar cambiando su ambiente físico o químico. Los métodos más comunes de desnaturalización son el calentamiento, la adición de algún agente químico como la urea o el cloruro de guanidinio, o solventes orgánicos, el cambio de pH o de fuerza iónica o la aplicación de presiones elevadas (Fersht, 1998).

Muchas proteínas, especialmente las pequeñas, se desnaturalizan reversiblemente; esto significa que recobran su estructura nativa espontáneamente cuando se regresa a condiciones que favorecen el plegamiento. Cuando sólo se observan dos estados macroscópicos, el desplegado (U) y el nativo (N), y no se aprecian intermediarios estables se dice que el plegamiento puede describirse a través de un modelo reversible de dos estados:



donde k_u y k_r representan las constantes de velocidad de la reacción de desplegamiento y replegamiento respectivamente. La constante de equilibrio (K_u) del proceso se puede obtener de la relación de las constantes de velocidad, así como del cociente de las concentraciones molares de las especies químicas involucradas:

$$K_u = \frac{k_u}{k_r} = \frac{[U]}{[N]} \quad (1.3)$$

Frecuentemente se ha observado que el tiempo necesario para el plegamiento va de microsegundos a segundos. Por lo tanto, se deduce que los intermediarios no son prerrequisito para el plegamiento rápido y eficiente de las proteínas; más aún estas especies pueden constituir trampas cinéticas que retardan el proceso de plegamiento (Jackson, 1998). Para saber si el modelo reversible de dos estados es adecuado para describir el equilibrio, generalmente se comparan los datos de entalpía calorimétrica con la entalpía de van't Hoff, calculada a partir de la dependencia con la temperatura de la constante de equilibrio. Las desviaciones mayores al 5% se consideran como evidencia de intermediarios estables (Jackson, 1998).

El modelo más simple para describir la desnaturalización de proteínas diméricas es el modelo reversible de dos estados con disociación. En este caso la separación de los monómeros ocurre simultáneamente al desplegamiento de las cadenas polipeptídicas (Mainfroid *et al*, 1996).



Por otro lado, muchas proteínas (tanto monómeros como oligómeros) se desnaturalizan irreversiblemente; en algunas ocasiones se agregan y precipitan (Arroyo-Reyna y Hernández-Arana, 1995; Solís-Mendiola *et al*, 1998, Galisteo *et al.*, 1991). Se ha observado que el desplegamiento se puede describir mediante un modelo irreversible de dos estados:



donde k_u es la constante de velocidad del proceso. Sin embargo este esquema de desplegamiento puede complicarse, con la aparición de estructuras intermediarias estables. Uno de los casos más simples para la descripción del plegamiento de proteínas es el propuesto por Lumry-Eyring (Sánchez-Ruíz, 1992; Tello-Solís y Hernández-Arana, 1995):



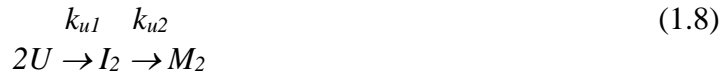
en el que se produce un intermediario (I) capaz de replegarse.

En varios casos, por ejemplo en el represor de triptofano (Shao et al., 1997; Shao y Matthews, 1998) se ha visto que la cinética de plegamiento y asociación de proteínas díméricas puede ajustarse a un modelo simple secuencial unibimolecular de plegamiento y asociación, de acuerdo al siguiente modelo (Jaenicke y Lilie, 2000):



donde U representa al estado desplegado, M al monómero estructurado, o parcialmente plegado y M_2 al dímero, k_{u1} es la constante de primer orden y k_{u2} representa la constante de segundo orden para la reacción de asociación de monómeros plegados.

En otras proteínas se ha determinado que un mecanismo biunimolecular, con un intermediario dímérico (I_2) en la ruta de plegamiento



tal es el caso en el replegamiento y asociación del represor del triptófano de *E. coli* cuyo intermediario presenta aproximadamente el 70% de la estructura nativa de la proteína (Gloss y Mathews, 1998).

Con la información presente en la literatura se deduce que el proceso de plegamiento y asociación de una proteína puede ser muy complejo y diverso. Para conocer en detalle las reglas que dirigen la formación de la estructura nativa es necesario reunir más información, con mayor detalle a nivel atómico, de los procesos de plegamiento y desplegamiento de diferentes proteínas con diversas topologías y con ello algún día poder resolver el problema del plegamiento proteico.

1.2 Triosafosfato isomerasa de levadura.

El objeto de estudio de este trabajo es la triosafosfato isomerasa (TIM) de levadura. Esta enzima participa en la glucólisis, gluconeogénesis y en la síntesis de triglicéridos. La enzima es necesaria para todas las especies y está presente en todos los tejidos (Gracy *et al.*, 1994). La TIM cataliza la isomerización reversible entre el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), a través de un intermediario cis-enediol (Figura 1.1). La velocidad de la isomerización es esencialmente controlada por la difusión, esto significa que la evolución de la TIM como enzima la ha llevado a una función prácticamente perfecta (Knowles, 1991).

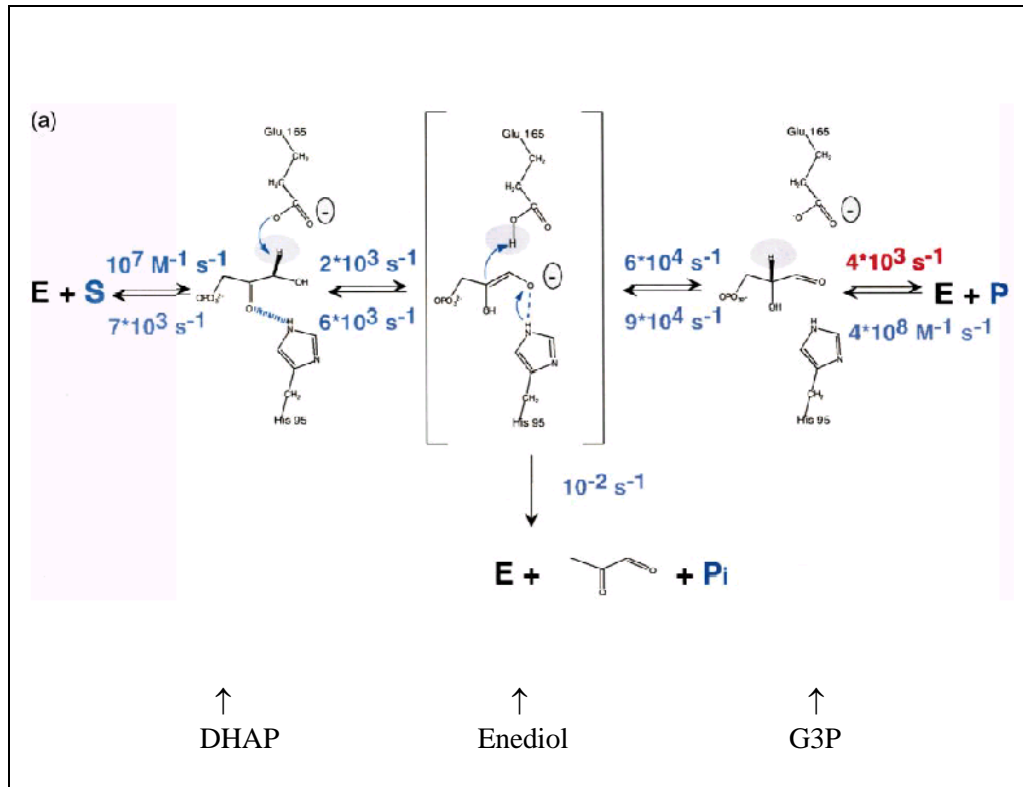


Figura 1.1. Mecanismo de reacción de la TIM. (Albery y Knowles, 1976). DHAP: dihidroxiacetona fosfato, G3P: gliceraldehído-3 fosfato.

Se ha demostrado que la deficiencia de esta enzima en el ser humano incrementa los niveles de dihidroxiacetona fosfato de, asimismo, causa anemia crónica y debilitamiento neuromuscular. Además, debido a su importancia en la ruta glucolítica, se considera como un blanco atractivo en el diseño de fármacos contra parásitos que tienen la habilidad de vivir en la sangre de los mamíferos alimentándose de la glucosa contenida en ella. Algunos de los ejemplos más serios son los parásitos causantes de la tripanosomiasis (enfermedad del sueño) y la malaria (Mande *et al.*, 1994, Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998), entre otras enfermedades. Estos padecimientos son muy comunes en las zonas tropicales; especialmente la tripanosomiasis que se presenta con frecuencia en el sureste de nuestro país, hasta el momento esta enfermedad es incurable y mortal.

La TIM ha sido ampliamente estudiada. Sus propiedades catalíticas se conocen en detalle y está bien caracterizada estructuralmente; se conoce la estructura cristalográfica de la TIM de 11 especies, así como la secuencia de la proteína proveniente de más de 60 especies diferentes.

Estructuralmente, la TIM es un homodímero de aproximadamente 53.3 kDa con alrededor de 250 residuos en cada una de las subunidades (Lolis y Petsko, 1990; Davenport *et al*, 1991); no requiere ningún ión metálico o cofactor para realizar su función biológica. Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Ambos monómeros tienen un sitio activo completo, localizado cerca de la interfase entre las subunidades, pero sólo la especie dimérica presenta actividad biológica, lo que podría indicar que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad o la estabilidad del sitio activo de la otra subunidad. Los monómeros adoptan un plegamiento de barril (α/β)₈, donde las hebras β forman una hoja β paralela circular que constituye la parte interna del barril, rodeado a su vez por 8 hélices α (Lolis y Petsko, 1990; Davenport *et al*, 1991; Figura 1.2).

Tres aminoácidos son particularmente importantes en el sitio catalítico: la lisina 13, la histidina 95 y el ácido glutámico 165. El ácido glutámico 165 actúa como un nucleófilo catalítico que atrae el protón del sustrato iniciando la isomerización (Figura 1.1). Otros elementos estructurales importantes son los lazos 3 y 6. El lazo 6 está constituido por los residuos 166 al 176 y forman una especie de tapa que se abre y cierra sobre el sitio activo (Figura 1.2) con el objeto de mantener un entorno hidrofóbico para el sustrato. Otra característica estructural importante es el lazo 3, formado por los residuos 71 al 78, que

contribuye a la mayoría de las interacciones no covalentes que mantienen unidos a los monómeros (Lolis y Petsko, 1990; Figura 1.3).

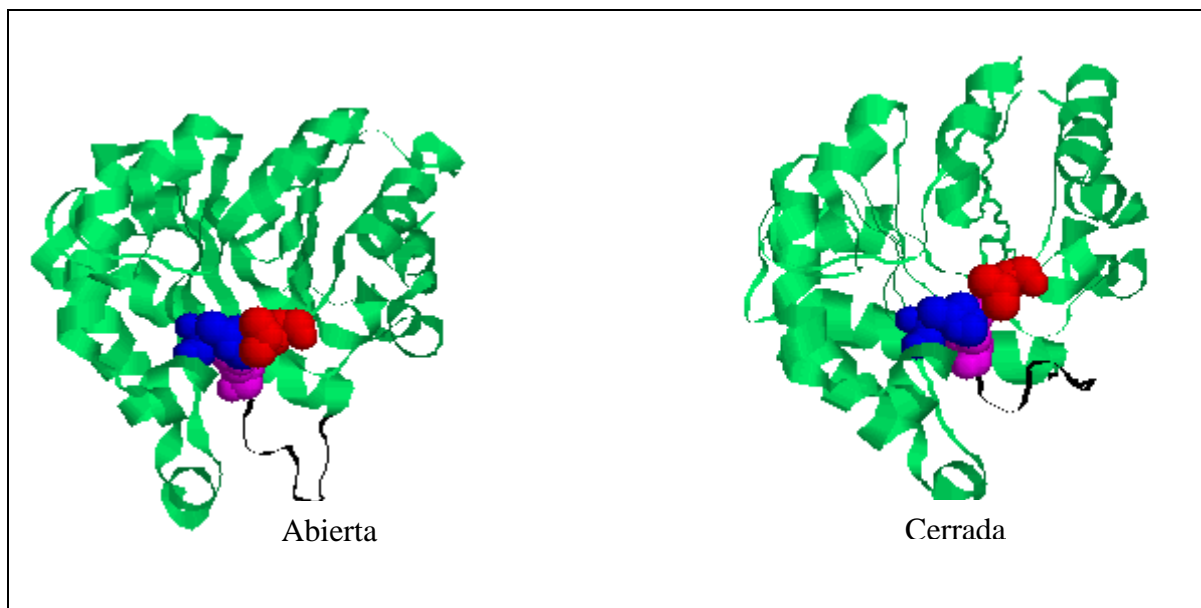


Figura 1.2. Estructuras cristalográficas del monómero de TIM de levadura, indicando el movimiento del lazo 6 durante la catálisis. La TIM se muestra en el estado libre (forma abierta; archivo del Protein Data Bank (PDB) 1YPI (Lolis y Petsko, 1990)) y el complejo con fosfoglicolhidroxamato (forma cerrada; archivo PDB 7TIM (Davenport et al, 1991)). Se muestran también los residuos del sitio activo: lisina 13 (rojo), histidina 95 (azul), ácido glutámico 165 (magenta).

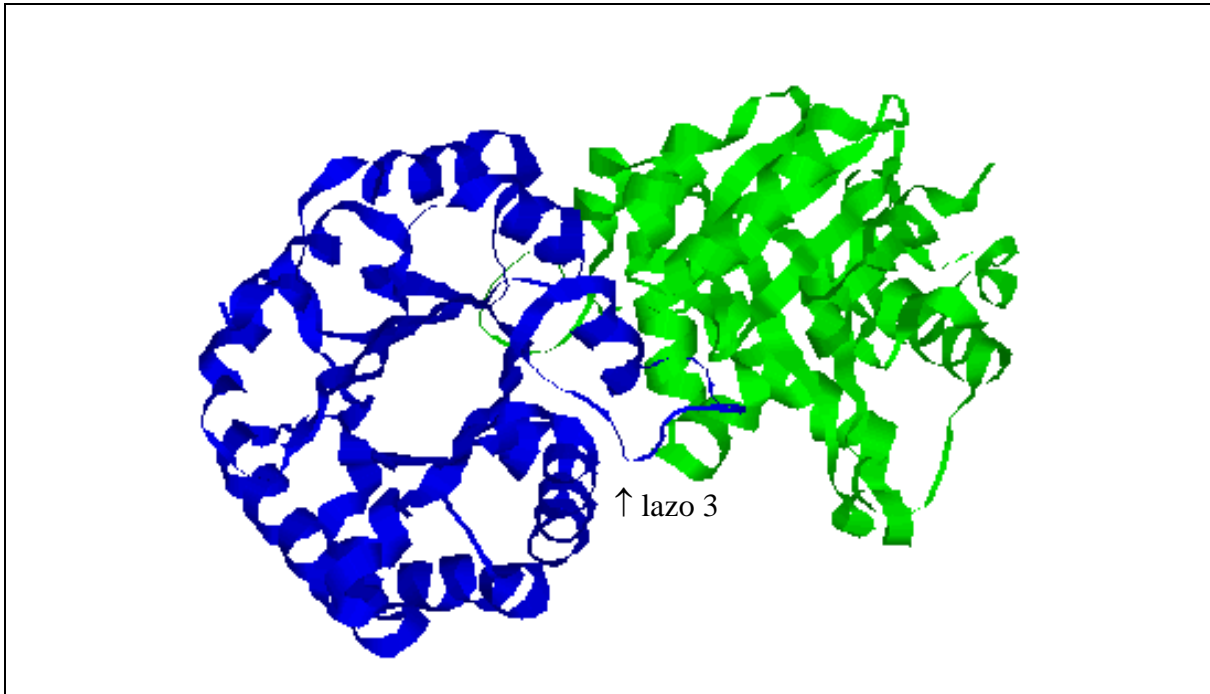


Figura 1.3. Estructra cristalográfica del dímero de triosafofosato isomerasa de levadura. Archivo del Protein Data Bank (PDB): 1YPI (Lolis y Petsko, 1990). Cada una de las subunidades se muestra en diferente color. Se señala el lazo 3 comentado en el texto.

1.3 Estudios previos de desplegamiento y replegamiento de la triosafofosato isomerasa.

Los estudios de la cinética de replegamiento de la TIM a partir de sus monómeros desplegados en cloruro de guanidinio (GuHCl) han demostrado que la recuperación de la actividad enzimática está relacionada con una reacción bimolecular (Waley, 1973; Zabori *et al.*, 1980 y McVittie *et al.*, 1977). Además, se ha informado de la existencia de una reacción unimolecular antes de la formación del dímero. Rietveld y Ferreira (1998) propusieron un modelo de replegamiento para la TIM de músculo de conejo después del desplegamiento por GuHCl en el que los monómeros desplegados forman monómeros

plegados inactivos y después dímeros activos, idénticos a la proteína nativa. Por lo tanto, el mecanismo de la renaturalización de la TIM se ha descrito generalmente como una ruta secuencial en la que el plegamiento de los monómeros precede al paso de asociación (ver ecuación 1.7). Sin embargo, el grado de consolidación estructural en el monómero “plegado” se desconoce hasta el momento. Recientemente, se ha demostrado que en presencia de concentraciones moderadas de GuHCl la TIM de levadura se disocia en monómeros parcialmente plegados (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000, y Morgan *et al.*, 2000). Esta forma monomérica retiene una cantidad significativa de estructura secundaria, pero carece de la mayoría de los contactos terciarios presentes en la forma nativa. Como se ha sugerido, (Morgan *et al.*, 2000), este intermediario monomérico podría participar en el paso de asociación en la ruta de renaturalización.

Con respecto a la estabilidad térmica de la TIM, se han llevado a cabo diversos estudios de desnaturalización térmica de la isomerasa de varias especies, así como de algunas de sus mutantes (Schliebs *et al.*, 1996; Schliebs *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 1998; Gopal *et al.*, 1999; Sun y Sampson, 1999, Mainfroid *et al.*, 1996). En la mayoría de los casos, se ha encontrado que el proceso de desplegamiento es irreversible y está ligado a la agregación de la proteína desnaturalizada. Sin embargo, Mainfroid y colaboradores (1996) lograron encontrar condiciones de equilibrio en el desplegamiento de la TIM de humano utilizando concentraciones bajas de proteína. La dependencia con la concentración de las transiciones térmicas indicó que en este caso la desnaturalización es compatible con un modelo de dos estados, el cual involucra al dímero nativo y a los monómeros desplegados como únicos estados poblados en el equilibrio. Sin embargo, no se ha estudiado la cinética del proceso, ni el grado de desplegamiento alcanzado después de la desnaturalización.

1.4 Objetivos.

Objetivo General.

Caracterizar el desplegamiento térmico de la triosafosfato isomerasa de levadura.

Objetivos específicos.

Buscar condiciones de reversibilidad para el proceso de desplegamiento térmico de la TIM de levadura, el grado de reversibilidad se determinará utilizando dicroísmo circular (DC).

Definir si el proceso de desplegamiento de la TIM de levadura está en equilibrio o bajo control cinético estudiando el efecto de la velocidad de calentamiento en los barridos térmicos seguidos por DC.

Obtener los parámetros ΔH y ΔC_p para el desplegamiento de la TIM de levadura utilizando la calorimetría diferencial de barrido.

Determinar mediante dicroísmo circular y fluorescencia las constantes cinéticas de los procesos de desplegamiento (k_u) y replegamiento (k_r) de la TIM de levadura. A partir de la dependencia con la temperatura de las constantes de velocidad determinar los parámetros de activación ΔH^\ddagger , ΔC_p^\ddagger que describan las reacciones de desplegamiento y replegamiento de la enzima.

Describir el mecanismo de desplegamiento y replegamiento térmicos de la TIM de levadura.

Es la dicha tratar de investigar lo
investigable y contemplar
serenamente lo inasequible a la
investigación .

Fausto.

Johann Wolfgang von Goethe

Capítulo 2: Materiales y

Métodos

2 Materiales y métodos

2.1 *Triosafosfato isomerasa de levadura.*

En este trabajo se utilizaron dos lotes de triosafosfato isomerasa de levadura. Uno de ellos se adquirió de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) y se repurificó en la columna de intercambio iónico monoQ HR 10/10. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 100 mM en regulador de trietanolamina (TEA) 10 mM, etilendiamintetraacetato de sodio EDTA (1.0 mM) y ditioneitol (DTT) 1.0 mM (regulador A) ajustado a pH 8.0.

El otro lote se obtuvo en el Instituto de Fisiología Celular y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, mediante la técnica de purificación montada por los doctores Edgar Vázquez Contreras y Alejandro Fernández Velasco, con la apreciable colaboración del Biólogo Hugo Nájera Peña (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000). La expresión del gen de TIM de levadura se realizó en el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Monfort, con la valiosa participación de la Bióloga Maria Elena Chanez Cardenas. El gen de TIM de levadura se insertó en un plásmido de expresión que a su vez se sobreexpresó en la bacteria *E. coli*. El crecimiento celular se llevó a cabo a 37 °C en medio Luria-Bertani complementado con 0.1 mg mL⁻¹ de ampicilina. La sobreproducción de la proteína se indujo, cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm (1 cm de recorrido óptico) era cercana a 0.8, mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. El crecimiento celular continuó por 12 horas. El precipitado de las células se resuspendió en regulador de tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS) 10mM, pH 8.0, fluoruro de p-metilsulfonilo (PMSF) 20 mM, y dimetilsulfóxido

(DMSO) 20 mM. Después las células se lisaron por cambios de presión en la prensa de French (1500 psi, 4 °C, 3 veces). El prensado se centrifugó 60 minutos a 63000 g. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 64%, dejando un día de reposo a 4 °C. Después se centrifugó durante 20 minutos a 29000 g, y al sobrenadante se le adicionó el sulfato de amonio necesario para alcanzar una saturación de 90%, dejando un día de reposo, en refrigeración. Se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 29000 g y se resuspendió el precipitado en un regulador A, ajustado a pH 7.6. Esta muestra se dializó contra el mismo regulador y se filtró. El filtrado se inyectó en una columna de Sephacryl S-300, instalada en un cromatógrafo FPLC (fast protein liquid chromatograph) de Pharmacia (Piscataway, NJ), equilibrando y eluyendo contra el regulador A. Posteriormente, la muestra se aplicó a una columna de intercambio iónico MonoQ HR 10/10, equilibrada con el mismo regulador A y se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio (NaCl) de 0 a 100 mM. Después, las fracciones que presentaron mayor actividad se ajustaron a pH 8.0, y se inyectaron nuevamente a la columna MonoQ HR 10/10, esta vez equilibrada a pH 8.0 y se eluyó con gradiente salino de NaCl de 0 a 100 mM.

Las muestras obtenidas de las diferentes etapas de la purificación se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE, y Native-PAGE; Pharmacia). La homogeneidad de la muestra después de completar el protocolo de purificación se verificó, también por electroforesis, obteniéndose una sola banda detectable. La concentración de las muestras se determinó a partir de sus absorbancias a 280 nm ($\epsilon_{1\text{cm}},^{(1\%)} = 10.0$ (Norton y Hartman, 1972)).

Las proteínas de los dos lotes utilizados mostraron características idénticas respecto a su actividad enzimática, sus propiedades espectroscópicas y sus curvas de desnaturalización. Sin embargo, la TIM comercial fue incapaz de replegarse después de su desplegamiento térmico. Todos los experimentos (a menos que se indique lo contrario) se realizaron en solución amortiguadora de TRIS 50 mM ajustado con ácido clorhídrico a un pH de 8.5 a 25 °C.

2.2 Ensayos de actividad.

La actividad enzimática de la TIM de levadura se determinó espectrofotométricamente, midiendo la velocidad de conversión del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), el cual a su vez se convierte a α -glicerofosfato (α -GP) por acoplamiento con la enzima α -glicerofosfato-deshidrogenasa (α -GDH). Esta última reacción consume un mol de nicotinadenin dinucleótido, en su forma reducida (NADH), por cada mol de DHAP que reacciona (Rozacky *et al.*, 1971). Con un exceso de deshidrogenasa, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la velocidad de oxidación de NADH (figura 2.1), que se mide por la disminución de absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las unidades de actividad enzimática se expresan en μ moles de sustrato transformado por minuto. La actividad específica se refiere a los moles de sustrato convertido por minuto por miligramo de enzima (unidades de actividad enzimática, Gracy, 1975).

Los ensayos de actividad se realizaron a 25 °C, en 1 mL de solución que contenía: TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de α -GDH y gliceraldehído-3-fosfato (G3P) 1 mM como sustrato (condiciones estándar). La reacción se

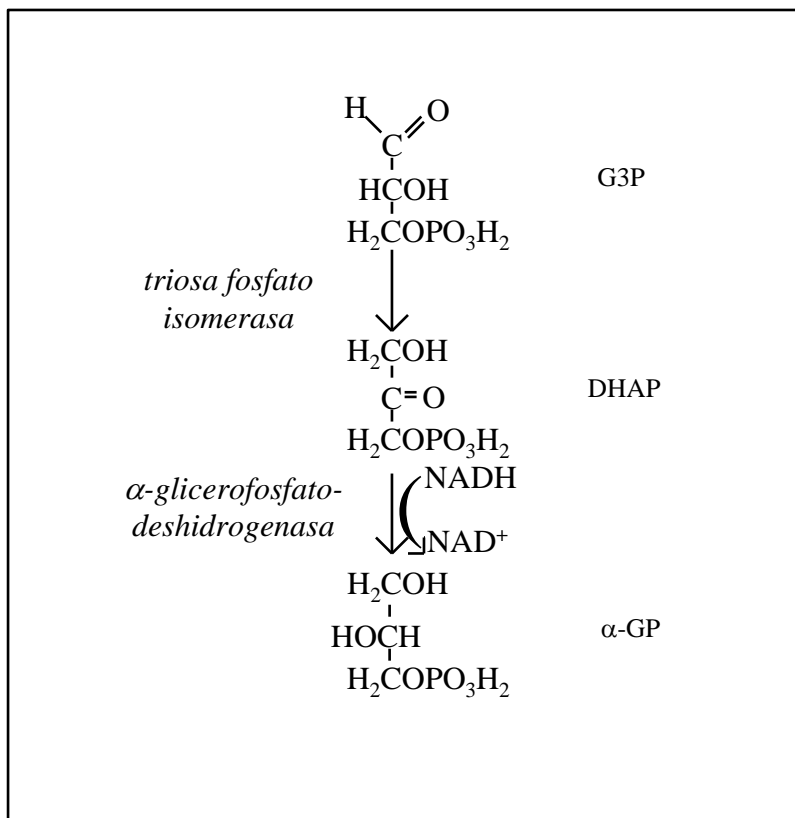


Figura 2.1 Reacción acoplada para la cuantificación de la actividad enzimática de la TIM de levadura. Gliceraldehído-3-fosfato (G3P), fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), α -glicerofosfato (α -GP) y nicotinadenin dinucleótido en su forma reducida (NADH) y oxidada (NAD⁺)

inició por la adición de 4 ng de TIM. Los ensayos de actividad también se llevaron a cabo a

43.2 °C en solución amortiguadora de TRIS 100 mM, pH 8.5. Todos los reactivos se utilizaron en concentraciones similares a las condiciones estándar, excepto la enzima acoplada, que en este caso se incrementó hasta 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En estas condiciones, ambas enzimas presentaron estabilidad suficiente para medir la velocidad de reacción durante varios minutos.

La pureza de todos los reactivos utilizados fue grado analítico, y el agua utilizada fue destilada y desionizada.

2.3 Técnicas experimentales.

2.3.1 Transiciones térmicas obtenidas por espectroscopía de dicroísmo circular.

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de la temperatura y agitación magnética. Las transiciones de desnaturalización térmica se obtuvieron siguiendo los cambios de elipticidad a una longitud de onda fija de 220 nm, mientras la temperatura de la muestra se incrementó a una velocidad constante. En todos los casos la temperatura de la muestra se registró directamente introduciendo el termopar del equipo Peltier en el interior de la celda. Como una primera etapa del estudio del desplegamiento térmico de la TIM, se buscaron condiciones de reversibilidad explorando diferentes valores de pH: 2.0 (glicina-HCl, 0.05 mM); 3.9, 4.5, 5.0 (acetatos,

0.05 mM); 7.4, 8.0, 8.5, 9.0 (TRIS, 0.05 mM); 9.5 y 10.0 (glicina-NaOH, 0.05 mM). En el valor de pH donde la TIM mostró mayor reversibilidad (8.5) se estudió el efecto de la velocidad de calentamiento en las transiciones térmicas. El intervalo de velocidades de calentamiento fue de 0.05 a 3.0 °C min⁻¹, con tiempos de respuesta de 8 y 16 segundos. Frecuentemente se acostumbra utilizar concentraciones de proteína del orden de 0.1 mg mL⁻¹ en los estudios de DC, con celdas de 0.1 cm de recorrido óptico. Sin embargo, en este estudio fue necesario disminuir la concentración de proteína para evitar la agregación de la muestra; por lo tanto, la concentración generalmente fue de 0.010 mg mL⁻¹ y se utilizó una celda de 1.0 cm de recorrido óptico. Las transiciones de replegamiento se obtuvieron después de completarse la transición de desplegamiento. Las velocidades de enfriamiento también se controlaron mediante el sistema Peltier.

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron utilizando celdas de 1.0 y de 0.1 cm de recorrido óptico. Las elipticidades molares [θ] se reportan por residuo calculadas con una masa promedio de 107.9 gramos por mol de aminoácido. Los espectros obtenidos se analizaron con el programa de estimación de estructura secundaria "SELCON" (Sreerama y Woody, 1993). El programa original contiene dos bases de datos: una de ellas contiene los espectros de DC y la otra la asignación de estructura secundaria para cada una de las 17 proteínas de la base (incluyendo la proteína problema). La lista de asignación de estructura secundaria consta de varias columnas, que corresponden a los porcentajes de los tipos estructurales α , β , giro, otros y la suma de todos los tipos para cada proteína. La sexta columna tiene asignado un valor de cero para todas las proteínas. Esta columna se usó para modificar la base de datos y definir un nuevo tipo estructural "desplegado". Las bases de

datos del programa se modificaron del siguiente modo: a la base de los espectros se le incluyó el espectro de la lisozima térmicamente desnaturalizada; en la lista de asignación de estructura secundaria, a esta proteína se le dio un valor de estructura secundaria de 1.0 en la sexta columna, creando así el nuevo tipo estructural "desplegado" y un valor de 0.0 al resto de los tipos estructurales. Esta asignación fue posible ya que desde el punto de vista termodinámico se considera a la lisozima como una proteína totalmente desnaturalizada (Privalov, 1979). En otra estimación, además de incluir el espectro de la lisozima térmicamente desnaturalizada, la base de datos se redujo en el número de proteínas contenidas, dejando únicamente una proteína representativa de cada tipo estructural para que cada tipo espectral tuviera un peso similar en el análisis.

2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido.

Los ensayos calorimétricos se llevaron a cabo con un microcalorímetro diferencial de barrido MicroCal MC-2 (Microcal Inc., Northampton, MA). Las mediciones se hicieron en soluciones amortiguadoras, pH 8.5 (TRIS, 0.05 M) y pH 10.0 (glicina, 0.05 M), utilizando velocidades de calentamiento desde 0.2 hasta 1.0 °C min⁻¹. También se examinó el efecto de la concentración de proteína en el intervalo de 0.7 a 2.27 mg mL⁻¹ a pH 8.5. Las soluciones de proteína se dializaron contra el regulador del experimento, se desgasificaron y filtraron antes de ser inyectadas en la celda calorimétrica. Se utilizó una presión total de 2.7 atm, que se logró aplicando nitrógeno gaseoso en ambas celdas. A cada curva calorimétrica se le restó la línea base correspondiente. Éstas últimas fueron obtenidas inyectando en ambas celdas regulador y realizando los barridos calorimétricos con las mismas condiciones de los ensayos para proteína. Todos los datos termodinámicos (a

menos que se indique lo contrario) están dados por mol de dímero de proteína (53.3 kDa). El programa Origin (MicroCal) fue empleado para el análisis de los datos, incluyendo la resta de la línea base y el cálculo de los cambios de entalpía calorimétrica (ΔH_{cal}).

2.3.3 Cinética de desnaturalización.

La desnaturalización térmica de la TIM en función del tiempo se siguió, a diferentes temperaturas, por cambios de elipticidad a 220 nm. La celda (1.0 cm de recorrido óptico) llena hasta el 98% de su volumen total (3.0 mL) con solución amortiguadora de TRIS (pH 8.5), se equilibró a la temperatura del experimento. Para completar el volumen de la celda se inyectó la cantidad necesaria de solución concentrada de TIM para alcanzar una concentración final de 0.010 a 0.050 mg mL⁻¹. Las muestras se agitaron (200 rpm) para que el mezclado y equilibrio térmico se alcanzaran rápidamente. Bajo estas condiciones el tiempo muerto de los experimentos fue menor a 10 segundos. Los datos cinéticos se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial simple (ver en el Apéndice la sección 6.2.1):

$$\theta_t = \theta_f + (\theta_0 - \theta_f) \exp(-k_u t) \quad (2.1)$$

donde θ_t es la elipticidad medida al tiempo t , θ_f es el valor de elipticidad final, θ_0 representa el valor correspondiente al tiempo cero, y k_u es la constante de velocidad de desplegamiento.

La cinética de desplegamiento también se estudió por cambios en la señal de dicroísmo circular en la región del ultravioleta cercano (285 nm); en este caso, se

inyectaron volúmenes mayores de solución de TIM concentrada para alcanzar una concentración final de 0.5 mg mL^{-1} . El equilibrio térmico en la celda se alcanzó después de 40 segundos, aproximadamente.

2.3.4 Cinética de replegamiento.

La cinética de replegamiento de la TIM se estudió por medio de cambios en la elipticidad a 220 nm. Una celda de 1.0 cm de recorrido óptico, que contenía de 2700 a 2860 μL de solución amortiguadora de TRIS se equilibró a la temperatura del experimento. Después, se inyectaron en la celda de 140 a 300 μL de TIM térmicamente desnaturalizada (una solución de TIM, de concentración menor a 0.150 mg mL^{-1} , calentada por 3.0 minutos a $63.7 \text{ }^\circ\text{C}$, ver la sección de Resultados, página 56). El equilibrio térmico a una temperatura cercana a la del experimento (± 0.15) se alcanzó en 20 a 30 segundos. Con éste método, el replegamiento se estudió en un intervalo de concentraciones de 0.007 a 0.015 mg mL^{-1} . Para concentraciones mayores de TIM un segundo método resultó más apropiado: la muestra de TIM primero se desnaturalizó a $63.7 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 3 minutos, como en un experimento típico de cinética de desplegamiento. Después, la temperatura del portaceldas tipo Peltier se fijó a un valor de 1.0 a $1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ por debajo de la temperatura deseada para el experimento de replegamiento; esto permitía que la muestra se enfriara rápidamente (aproximadamente $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). Cuando la temperatura de la celda estaba $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ por arriba del valor deseado, la temperatura del portaceldas se fijó a la temperatura del experimento. Dentro de la celda las oscilaciones de temperatura eran menores a $\pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, con respecto al valor final alcanzado, en menos de un minuto. Este método se utilizó solamente cuando el tiempo de vida media de la reacción era mayor a 4 minutos. Los datos cinéticos se ajustaron a una ecuación de una reacción de segundo orden (Apéndice, sección 6.2.3):

$$\theta_t = \theta_f + (\theta_0 - \theta_f) / (2C_0 k_r t + 1) \quad (2.2)$$

donde C_0 es la concentración inicial de TIM en términos de monómeros, k_r es la constante de replegamiento, y el resto de los parámetros tienen significados similares a los descritos anteriormente para la ecuación de decaimiento exponencial simple (ecuación 2.1).

2.3.5 *Espectroscopía de fluorescencia.*

Los experimentos de espectroscopía de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro PC1 marca ISS (Champaign, IL). Este instrumento está equipado con un portaceldas con camisa de circulación de agua y baño con termostato y bomba recirculadora, para el control de temperatura. En este caso, para obtener una buena señal y detectar sus cambios durante el proceso de desplegamiento fue necesario utilizar una concentración de TIM de 0.050 mg mL^{-1} . Para la obtención de espectros se utilizaron celdas de 1.0 cm de recorrido óptico, las muestras se excitaron a 290 nm, y la emisión se detectó de 300 a 400 nm. Los experimentos cinéticos se llevaron a cabo con excitación a 290 nm y emisión de 318 nm. Los experimentos cinéticos se iniciaron diluyendo la muestra de forma similar a como se describió para los experimentos de dicroísmo circular. En este caso el tiempo muerto de los experimentos fue de aproximadamente 35 segundos. La temperatura se registró utilizando una sonda de temperatura modelo 5611 conectada a un termómetro digital 1504 Hart (Hart Scientific, American Fork, UT), cuya calibración es rastreable al National Institute of Standards and Technology. Todas las otras sondas de temperatura se calibraron contra el instrumento Hart.

Heureux celui qui porte en soi un dieu, un idéal de la beauté et qui lui obéit: idéal de l'art, idéal de la science, idéal de la patrie, idéal des vertus de l'Évangile

Luis Pasterur

Capítulo 3: Resultados

3 Resultados

3.1 Transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento de la TIM de levadura.

Los procesos de desplegamiento y replegamiento térmico de la TIM se estudiaron siguiendo la elipticidad a 220 nm con velocidades de calentamiento y enfriamiento constantes. Las transiciones térmicas se estudiaron con una concentración de proteína de 0.010 mg mL⁻¹ a una velocidad de 2 °C min⁻¹, en distintos ambientes de pH: cerca a la neutralidad (pH 7.4, 8.0, y 8.5), en medio ácido (pH 2.0, 3.9, 4.5, y 5.0) y en medio básico (pH 9.0, 9.5, y 10.0). El desplegamiento térmico de la TIM de levadura se encontró totalmente irreversible a los valores de pH 2.0, 3.9, 4.5, y 5.0, 7.4, 9.5, y 10.0. La figura 3.1 muestra ejemplos de la irreversibilidad del proceso de desplegamiento térmico obtenido para valores de pH 4.5 y 10.0. Un comportamiento similar se observó en el resto de los valores de pH mencionados. Además, en el caso de los experimentos realizados a pH 2.0, el espectro de la proteína nativa a 25 °C mostró una disminución importante en la cantidad de estructura secundaria, lo cual impidió que se observara claramente una transición de desplegamiento. Se observó reversibilidad parcial en el proceso de desplegamiento térmico en los valores de pH de 8.0 y 9.0. El proceso que presentó mayor reversibilidad fue el estudiado a pH 8.5. Por lo tanto, el resto de los estudios se llevaron a cabo a este pH. La figura 3.2 muestra los resultados obtenidos a pH 8.5, 0.010 mg mL⁻¹ de TIM y diferentes velocidades de calentamiento. En esta figura se observa que a una velocidad de calentamiento de 2 °C min⁻¹, se obtiene un ciclo de histéresis casi perfecto, es decir la elipticidad regresa prácticamente a su valor original pero por un camino diferente (los barridos térmicos obtenidos a velocidades mayores a 2 °C min⁻¹ presentaron un

comportamiento similar). Bajo estas condiciones, después del replegamiento el espectro de DC en la región del UV-lejano era prácticamente idéntico al de la TIM nativa, y se obtuvo una recuperación de la actividad enzimática mayor al 95%.

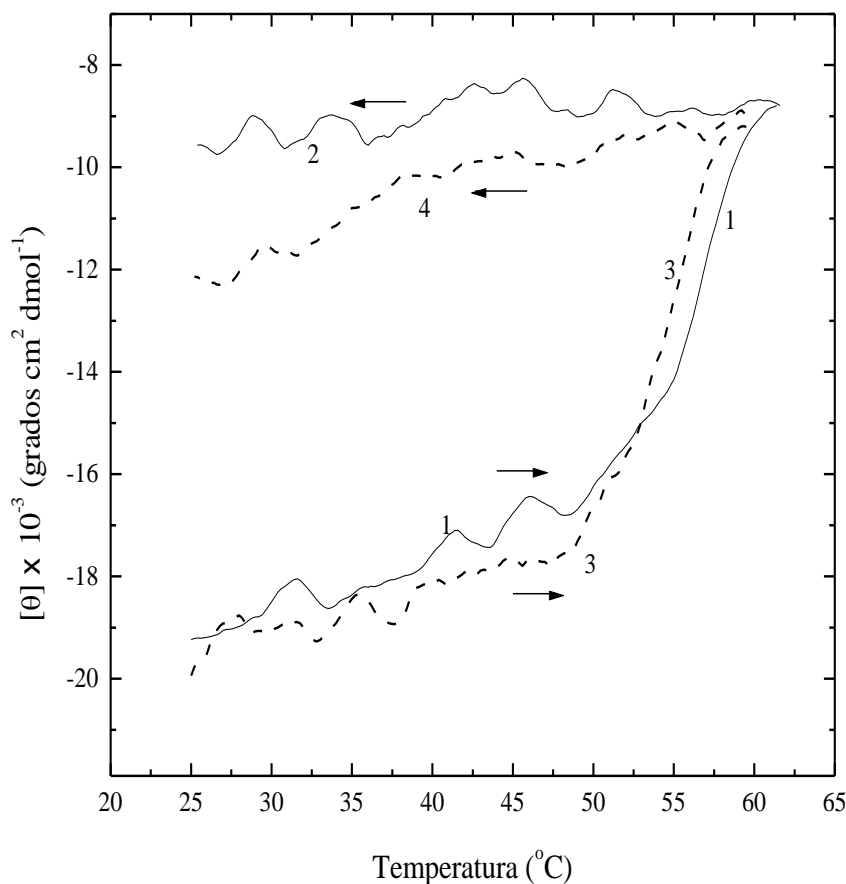


Figura 3.1. Transiciones de calentamiento y enfriamiento obtenidas en pH. 4.5 (curvas 1 y 2) y 10.0 (curvas 3 y 4). Las transiciones se obtuvieron con una concentración de proteína de 0.010 mg mL^{-1} , con una velocidad de calentamiento de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

En la figura 3.2 se observa que las transiciones de desnaturalización dependen fuertemente de la velocidad de calentamiento. Al disminuir la velocidad de barrido las curvas se desplazan a temperaturas menores, lo cual es una característica típica de transiciones que están bajo control cinético (Freire *et al.*, 1990; Sánchez-Ruíz, 1992; Tello-Solís y Hernández-Arana, 1995). Sería de esperarse que al disminuir la velocidad de barrido las curvas de desplegamiento y replegamiento se acercaran lo suficiente hasta

coincidir y así obtener la curva de equilibrio. Sin embargo, al reducir la velocidad de calentamiento en el desplegamiento conduce a una pronunciada irreversibilidad en la transición de replegamiento, por ejemplo, a velocidades de barrido menores a $0.2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, la desnaturalización fue completamente irreversible, a juzgar por la señal de elipticidad. Esto sugiere que la irreversibilidad de la desnaturalización está relacionada con el tiempo de exposición de la TIM a temperaturas altas.

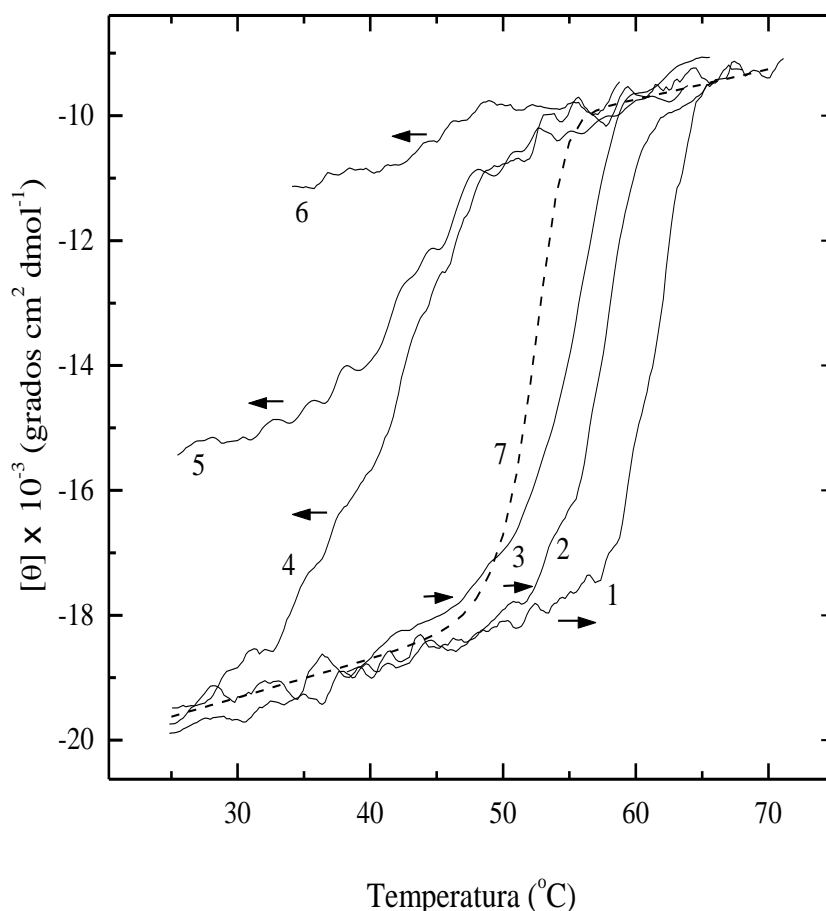


Figura 3.2. Transiciones de desplegamiento y replegamiento térmico de la TIM de levadura, obtenidas a pH 8.5. Las transiciones se obtuvieron a distintas velocidades de calentamiento y enfriamiento, como se indica a continuación: curvas 1 y 4, $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$; curvas 2 y 5, $0.2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$; y curvas 3 y 6, $0.05\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Las transiciones se obtuvieron siguiendo la elipticidad a 220 nm, con una concentración de TIM de 0.010 mg mL^{-1} . El trazo 7 representa la curva de equilibrio hipotética, calculada asumiendo un modelo reversible de dos estados.

Es evidente que las reacciones que causan dicha irreversibilidad no cambian la señal de UV-DC de la TIM desnaturalizada, como indican los valores coincidentes de elipticidad en la región posterior a la desnaturalización de las diferentes transiciones mostradas en la figura 3.2. Los valores esperados de elipticidad inicial y final en las cinéticas de desnaturalización se estimaron a partir

de extrapolaciones lineales de las regiones de pre y postdesnaturalización de las curvas de transición.

Para efectos de comparación, en la figura 3.3 se muestran las curvas de desplegamiento y replegamiento de la lisozima, experimento realizado a pH 2.5, con una concentración de proteína de 0.025 mg mL^{-1} . En este caso, el desplegamiento es completamente reversible y no se observa histéresis. Esto descarta la posibilidad de que la metodología experimental sea el origen del desfase de las curvas.

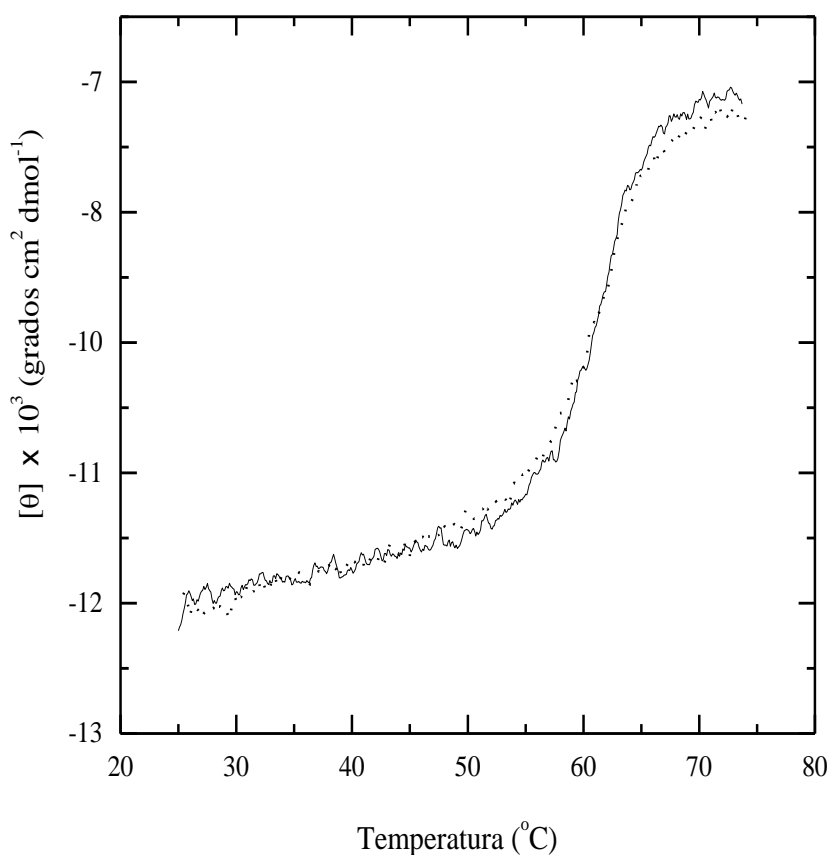


Figura 3.3. Transición de desplegamiento y replegamiento térmicos de la lisozima, obtenidas en regulador de glicina 0.05 mM, pH 2.5. La curva continua representa el desplegamiento y la curva punteada es el replegamiento, ambos a una velocidad de $1 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Las transiciones se obtuvieron siguiendo la elipticidad a 220 nm, con una concentración de proteína de 0.025 mg mL^{-1} .

Las muestras de la TIM que se sometieron a ciclos de calentamiento y enfriamiento consecutivos también presentaron el efecto de histéresis, sin embargo, la cantidad de proteína replegada disminuyó después de cada ciclo. Esto se muestra en la figura 3.4, donde

se observan dos ciclos de calentamiento y enfriamiento sucesivos, a una velocidad de 2 °C min⁻¹.

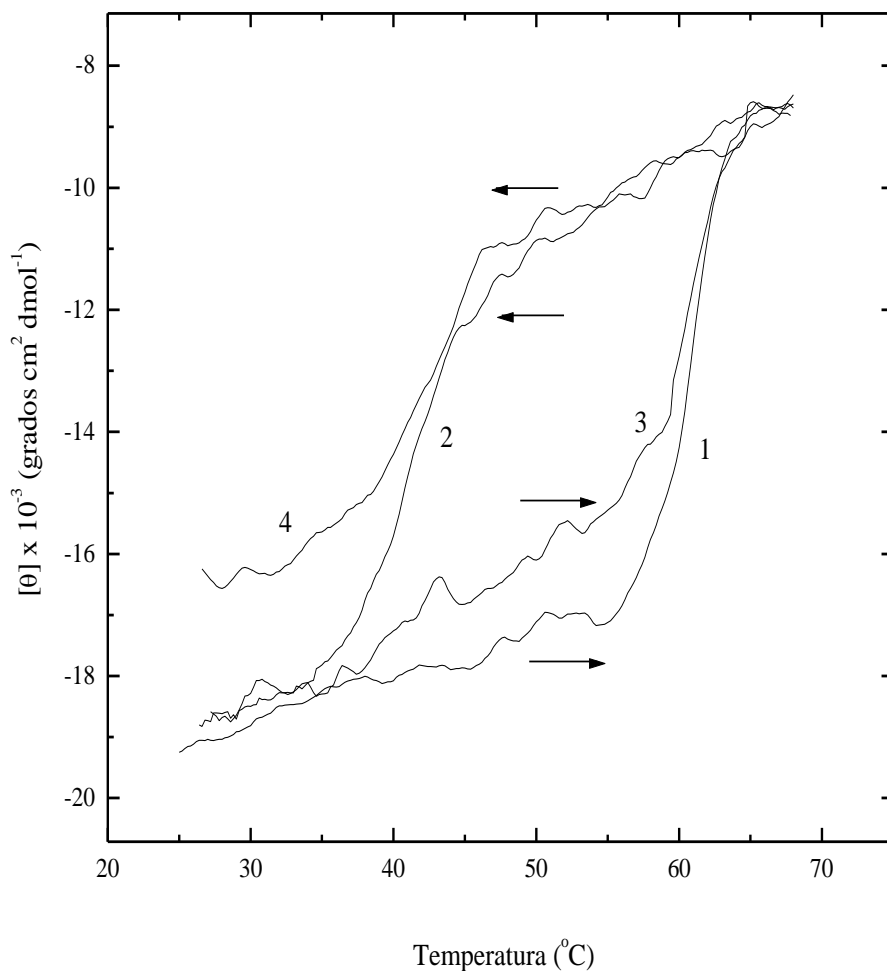


Figura 3.4. Transiciones sucesivas de desplegamiento y replegamiento térmico de la TIM de levadura, obtenidas a pH 8.5. Las transiciones se obtuvieron a una velocidad de calentamiento de 2 °C min⁻¹, siguiendo la elipticidad a 220 nm, con una concentración de TIM de 0.010 mg mL⁻¹. Las líneas 1 y 2 representan el primer ciclo, y las curvas 3 y 4 al segundo.

Cabe mencionar que el envejecimiento de la muestra resultó ser perjudicial para su capacidad de replegamiento. En muestras almacenadas (en refrigeración, en regulador TEA 10 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM, a un pH de 8.0) por un período de 4 meses, la reversibilidad disminuía hasta un 90% aproximadamente. Después de un año de almacenamiento, la enzima era completamente incapaz de replegarse después del desplegamiento térmico. Por el contrario, el envejecimiento de la muestra no presentó

ningún efecto en las características espectroscópicas, actividad catalítica o en la transición de desplegamiento de la TIM.

Los espectros de DC en la región del UV-lejano de la TIM nativa y TIM desnaturalizada se muestran en la figura 3.5. La forma de estos espectros refleja cambios en la estructura secundaria de la proteína. Sin embargo, el espectro de la TIM obtenido a 75 °C no tiene la forma típica de una proteína desnaturalizada térmicamente. Se ha observado que varias proteínas monoméricas pequeñas presentan una forma común de espectro después del desplegamiento térmico, que se caracteriza por un hombro ancho negativo alrededor de 220 nm y un pico negativo pronunciado cercano a 200 nm (López-Arenas *et al.*, 1999 y referencias ahí citadas). Un ejemplo de este tipo de espectro es el de la lisozima térmicamente desnaturalizada (figura 3.5, línea 4), la cual se considera como una proteína completamente desplegada desde el punto de vista termodinámico (Privalov, 1979). Estas características no se presentan en el espectro de la TIM desnaturalizada.

Los espectros de la TIM nativa y desplegada se analizaron con el programa SELCON (Sreerama y Woody, 1993) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1. Inicialmente, el análisis se hizo con la base de datos original; aparentemente la TIM desnaturalizada disminuye su contenido de hélice- α en un 50%, pero aumenta el contenido de hojas- β , con respecto de la TIM nativa. Sin embargo, este resultado es poco confiable

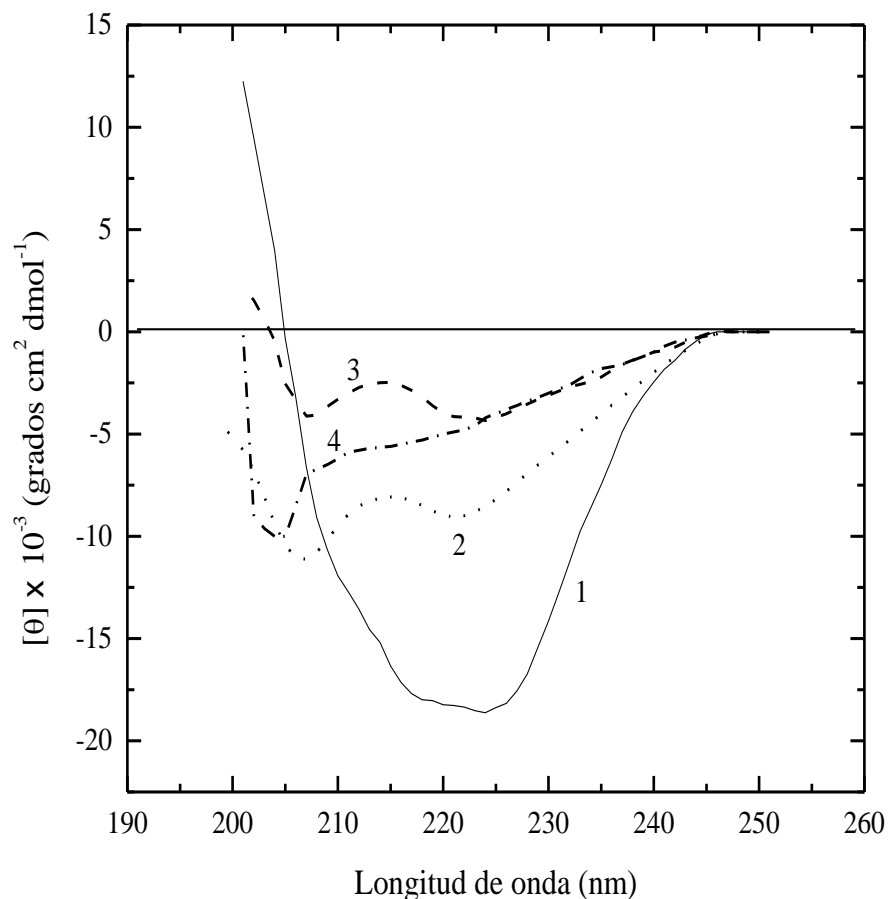


Figura 3.5. Espectros de dicroísmo circular (UV-lejano) de la TIM de levadura. Los espectros se obtuvieron en regulador 50 mM de TRIS (pH 8.5), la concentración de TIM fue 0.010 mg mL⁻¹. TIM nativa a 25 °C (curva 1); enzima térmicamente desnaturalizada a 75 °C (curva 2). Se muestra la curva diferencial obtenida de restar la lisozima de la TIM, ambas térmicamente desnaturalizadas (curva 3). También se muestra el espectro de la lisozima térmicamente desnaturalizada (curva 4). El espectro se obtuvo a pH 2.9, a una temperatura de 60 °C, la concentración de proteína fue de 0.110 mg mL⁻¹.

dado que la base de datos original no contiene ningún espectro representativo de una proteína térmicamente desnaturalizada. Para subsanar esta deficiencia, la base de datos se complementó con el espectro de la lisozima desplegada por temperatura y se repitió la estimación (ver sección 2.3.1) . En este caso, la TIM desnaturalizada también presenta una disminución importante en el contenido de hélice- α , así como un aumento en el contenido de hojas- β . Además, el contenido de “estructura desplegada” en la TIM desnaturalizada es

1 del 10%, comparado con la TIM nativa que presenta solo el 1%. Para refinar aún más el cálculo, la base de datos se redujo de tal modo que cada tipo estructural tuviera el mismo peso en el análisis. Los resultados con la base de datos reducida muestran que la TIM desplegada sufre una disminución hasta un 10% del contenido de hélice- α , las hojas- β permanecen prácticamente sin cambio y la “estructura desplegada” aumenta considerablemente, todo esto con respecto a la TIM nativa. El análisis de los espectros con la base de datos reducida podría considerarse más confiable que las estimaciones realizadas con las otras dos bases, especialmente para el estudio de proteínas desplegadas. Esto se debe a que contiene un espectro representativo de enzima desnaturalizada térmicamente y todos los tipos estructurales tienen un peso similar en el análisis.

El espectro de la lisozima se restó del espectro de TIM, ambas térmicamente desnaturalizadas; el resultado que se obtuvo fue el espectro diferencial que se muestra en la figura 3.5 (línea 3). La forma del espectro diferencial confirma que la TIM mantiene una cantidad significativa de estructura secundaria después del desplegamiento térmico.

Tabla 3.1. Contenido de estructura secundaria determinado para los espectros de TIM de levadura nativa y térmicamente desnaturalizada, utilizando el programa SELCON. El programa se utilizó en su forma original (1), con la base de datos modificada incluyendo la lisozima térmicamente desnaturalizada (2) y reducida incluyendo la lisozima desnaturalizada por calor (3) (descritas en la sección 2.3.1).

Base de datos	TIM	α	β	desplegado	giro	otro	suma
1	Nativa	0.50	0.31	-----	0.05	0.15	1.01
	Desnaturalizada	0.24	0.41	-----	0.17	0.18	1.00
2	Nativa	0.58	0.18	0.01	0.13	0.10	1.00
	Desnaturalizada	0.31	0.27	0.11	0.19	0.13	1.01
3	Nativa	0.56	0.21	0.03	0.12	0.06	0.98
	Desnaturalizada	0.10	0.26	0.40	0.20	0.03	0.98

3.2 Calorimetría de desnaturalización térmica de la TIM de levadura.

La endoterma de desnaturalización de la TIM de levadura se presenta en la figura 3.6 (concentración de 2.27 mg mL^{-1} , pH 8.5, a una velocidad de calentamiento de $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). El termograma exhibe un pico único, marcadamente asimétrico y con un máximo a una temperatura de $60.3 \text{ }^\circ\text{C}$. La temperatura a la cual el proceso de desnaturalización presenta un 50% de avance ($T_{1/2}$), se determinó en las curvas calorimétricas estimando el 50% del área bajo la curva. En el experimento del gráfico 3.6 la $T_{1/2}$ del proceso fue de $59.5 \text{ }^\circ\text{C}$.

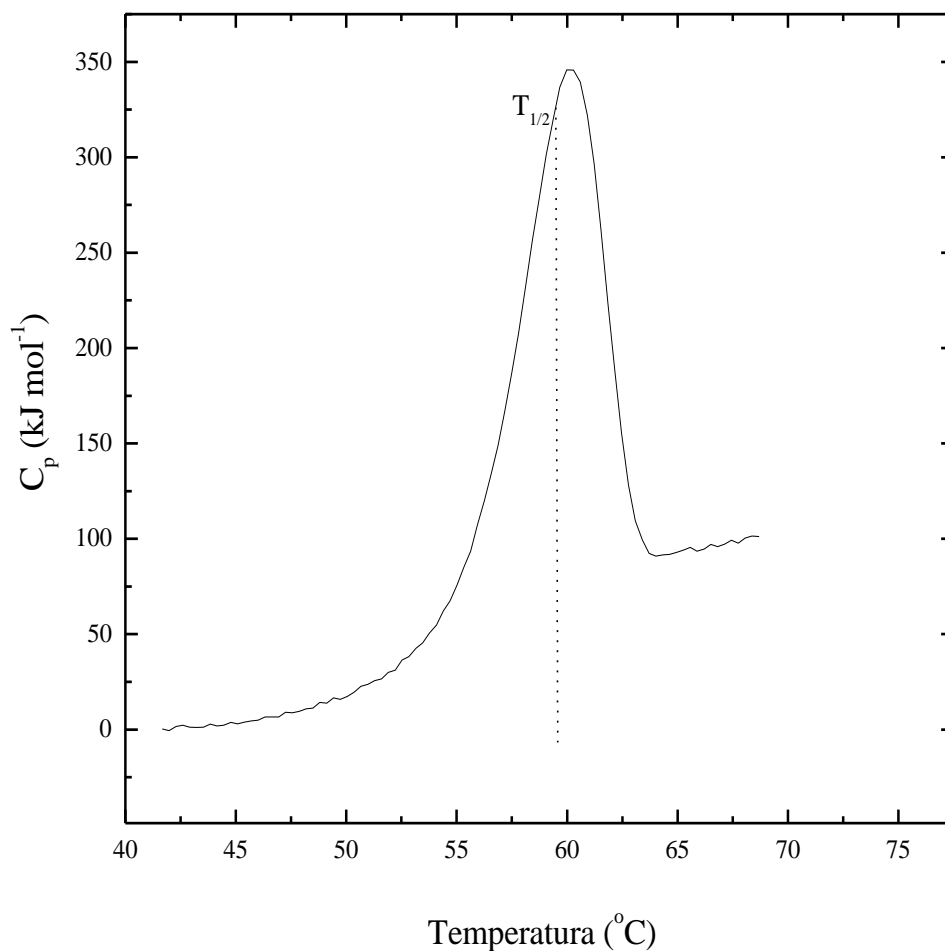


Figura 3.6. Curva calorimétrica del desplegamiento de la TIM de levadura, después de restar la línea base de un barrido regulador-regulador. El experimento se realizó a una velocidad de calentamiento de $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, y con concentración de proteína = 2.27 mg mL^{-1} (pH 8.5).

La temperatura del máximo de la endoterma y la $T_{1/2}$ son valores muy cercanos entre sí, pero no coinciden, debido a que esto sucede únicamente cuando el cambio de

capacidad calorífica entre la proteína nativa y desnaturalizada (ΔC_p) es cero (Robertson y Murphy, 1997).

Los experimentos calorimétricos se hicieron a varias concentraciones de proteína en el intervalo de 0.73 a 2.27 mg mL⁻¹. La concentración de proteína no ejerció efecto notable en el valor de $T_{1/2}$, como se aprecia en la figura 3.7. La $T_{1/2}$ promedio (59.1 ± 0.4 °C) fue muy similar a la que se determinó por medio de las transiciones de DC a concentraciones bajas (por ejemplo 0.010 mg mL⁻¹) de TIM y con la misma velocidad de calentamiento (figura 3.7). En todos los casos las transiciones calorimétricas fueron irreversibles, esto se comprobó en un segundo ciclo recalentando las muestras que habían sido enfriadas después del primer barrido. Además, las muestras extraídas de la celda calorimétrica después de un primer barrido mostraron agregación evidente, la que aumentó al incrementar la concentración de proteína.

Los valores de entalpía calorimétrica (ΔH_{cal}), obtenidos de seis experimentos independientes, no presentaron dependencia con la concentración de la proteína, lo que hace suponer que los efectos calóricos de la agregación no son muy importantes. Cuando los efectos de la agregación no son muy grandes, el valor de ΔH_{cal} es un parámetro termodinámico confiable, a pesar de la irreversibilidad del proceso (Milardi *et al.*, 1994). El promedio de ΔH_{cal} fue de 1330 ± 100 kJ mol⁻¹, que corresponde a 2.7 ± 0.2 kJ por mol de residuo de aminoácido. Este valor es cercano, pero ligeramente menor, al valor normalizado de la entalpía de desnaturalización de varias proteínas globulares (Murphy y Freire, 1992), cuyo promedio a 60 °C es de 3.2 ± 0.4 kJ por mol de residuo. Por lo tanto, de

acuerdo a este criterio termodinámico, la TIM térmicamente desnaturalizada, parece estar extensamente desplegada.

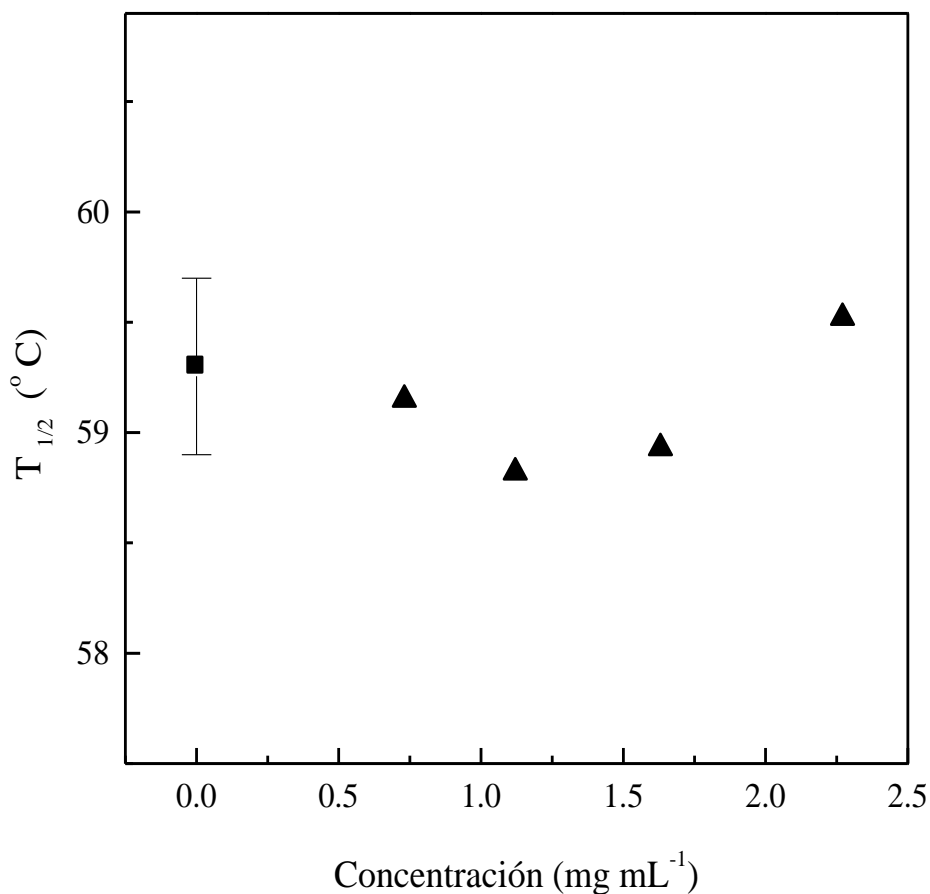


Figura 3.7. Dependencia de la $T_{1/2}$ con la concentración de proteína. Las temperaturas del 50% de avance del proceso (de acuerdo al calor absorbido) se obtuvieron de varios barridos calorimétricos (▲) a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (pH 8.5). También se muestra la $T_{1/2}$ obtenida por DC a una concentración de 0.010 mg mL^{-1} (◼).

A partir de un experimento calorimétrico se podría calcular el ΔC_p de la transición, en base al desplazamiento de la línea base en las zonas de pre y pos-desnaturalización. Sin embargo, en la práctica esto no siempre es posible, debido a que en ocasiones (como en el caso de la TIM) se observa una marcada curvatura en la tendencia final del trazo calorimétrico haciendo difícil la extrapolación hacia el centro del pico y originando con ello mucha variabilidad en la determinación del ΔC_p . Generalmente, se llevan a cabo varios

experimentos en los que se perturba la temperatura de aparición del pico calorimétrico. Esto se hace cambiando el pH (suponiendo que el cambio de pH no tiene efecto en ΔH_{cal}). En el caso de la TIM el proceso es irreversible (en las condiciones experimentales empleadas) y por lo tanto al disminuir la velocidad de barrido también disminuye la temperatura de aparición del pico calorimétrico. Es generalmente aceptado que en un amplio intervalo de temperatura el ΔH_{cal} se puede describir como una función lineal de la temperatura, cuya pendiente es igual al ΔC_p (Privalov, 1979; Privalov y Gill, 1988). Los barridos calorimétricos de la TIM de levadura se llevaron a cabo en pH 8.5 con velocidades de calentamiento de 0.2, 0.75 y 1.0 °C min⁻¹ y en pH 10.0 con velocidades de 0.5 y 1 °C min⁻¹. Cabe mencionar, que en la búsqueda de condiciones de pH para determinar el valor de ΔH_{cal} a diferentes temperaturas se probó el pH de 4.3. La TIM de levadura, en estas condiciones de pH, y en concentración cercana a 1 mg mL⁻¹, se agregó durante el proceso de diálisis. Los experimentos calorimétricos probaron que al reducir la velocidad de calentamiento se reduce $T_{1/2}$, en concordancia con los resultados mencionados anteriormente para DC. Estos resultados se usaron para construir el gráfico de ΔH_{cal} vs. $T_{1/2}$. Como puede observarse en la figura 3.8 la relación entre el ΔH_{cal} y la temperatura se describe adecuadamente mediante una línea recta, en concordancia con los resultados encontrados para muchas proteínas pequeñas (Privalov, 1979). Por lo tanto, de la línea recta de la figura 3.8 se estimó un valor de ΔC_p de 49 ± 3 kJ mol⁻¹ K⁻¹.

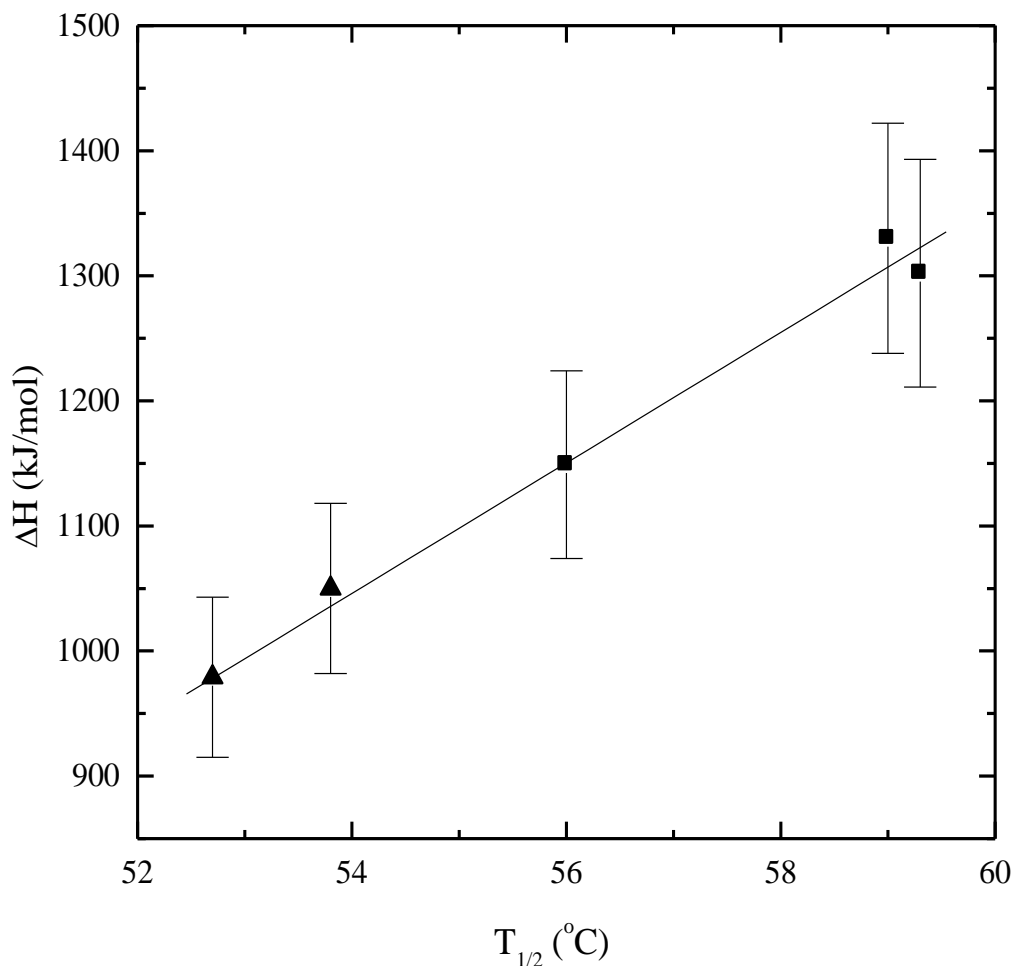


Figura 3.8. Dependencia del cambio de entalpía calorimétrica con la temperatura media de desnaturalización ($T_{1/2}$). Los experimentos se realizaron en pH 8.5 (□) y pH 10.0 (▲)

El valor de ΔC_p de desplegamiento de una proteína puede predecirse a partir de los cambios de área polar y no polar accesible al solvente (ΔASA_{polar} y $\Delta ASA_{no\ polar}$ respectivamente) que ocurren durante el proceso. Para calcular el valor de ΔC_p se han parametrizado las ecuaciones: $\Delta C_p = 0.45 \Delta ASA_{no\ polar} - 0.26 \Delta ASA_{polar}$ (Murphy y Freire, 1992) y $\Delta C_p = 0.33 \Delta ASA_{no\ polar} - 0.16 \Delta ASA_{polar}$ (Spolar *et al.*, 1992). Se calculó el cambio de área superficial polar y no polar accesible al solvente entre los estados nativo y desplegado de la TIM de levadura. Esto se hizo estimando la diferencia entre el dímero nativo (Protein Data Bank archivo 7TIM) y las cadenas completamente extendidas. Los

átomos de carbono y azufre se consideraron como apolares, mientras que los átomos de oxígeno y nitrógeno como polares. Los cálculos de área se llevaron a cabo con el programa NACCESS (Simon Hubbard, University College, Inglaterra), una implementación del algoritmo de Lee y Richards (Lee y Richards, 1971), utilizando un radio de prueba de 1.4 Å y un ancho de corte de 0.05 Å. Si se asume que la desnaturalización incluye la disociación y desplegamiento completo de los monómeros, el valor esperado de ΔC_p sería entre 35 y 46 kJ mol⁻¹ K⁻¹, que concuerda razonablemente con la estimación experimental.

3.3 Cinética de desnaturalización.

El desplegamiento térmico de la TIM de levadura se estudió en función del tiempo siguiendo los cambios de elipticidad a 220 nm. Esto permitió estimar los cambios en la estructura secundaria de la proteína. La figura 3.9 muestra las cinéticas resultantes a distintas temperaturas. En todos los casos, los datos experimentales se ajustaron bien a curvas de decaimiento exponencial simple (ecuación 2.1). Los valores de elipticidad extrapolados al tiempo cero fueron muy similares a la señal esperada para la proteína nativa, indicando que no hay una fase rápida de cambios estructurales significativos, que pudiera perderse en el tiempo muerto de los experimentos. En un intervalo de 0.010 a 0.060 mg mL⁻¹ la concentración de proteína no tuvo prácticamente ningún efecto en la constante de velocidad, lo que remarca que la desnaturalización de la TIM sigue una cinética simple de primer orden. Una característica sobresaliente de las curvas de desnaturalización es que todas ellas alcanzan valores finales de elipticidad similares; esto significa que la reacción avanza hasta completarse, como sucede en una reacción irreversible. Sin embargo, a temperaturas altas (mayores a 63 °C), cuando el desplegamiento ocurre en tiempos cortos, el proceso fue completamente reversible. Por ejemplo, a una temperatura de 63.7 °C, la

pérdida de estructura secundaria ocurre rápidamente (en 3 minutos, la reacción ha avanzado más del 98%, a juzgar por la señal de DC), pero la estructura nativa se recupera por completo cuando la muestra se enfría rápidamente ($15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) hasta $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando la TIM permanece períodos de incubación más largos a temperaturas altas, no se observan más cambios en la señal de DC, pero su capacidad de replegarse disminuye notablemente. Esto indica que las reacciones que causan la irreversibilidad ocurren después del desplegamiento de la TIM, pero no alteran la señal de DC en la región del UV-lejano.

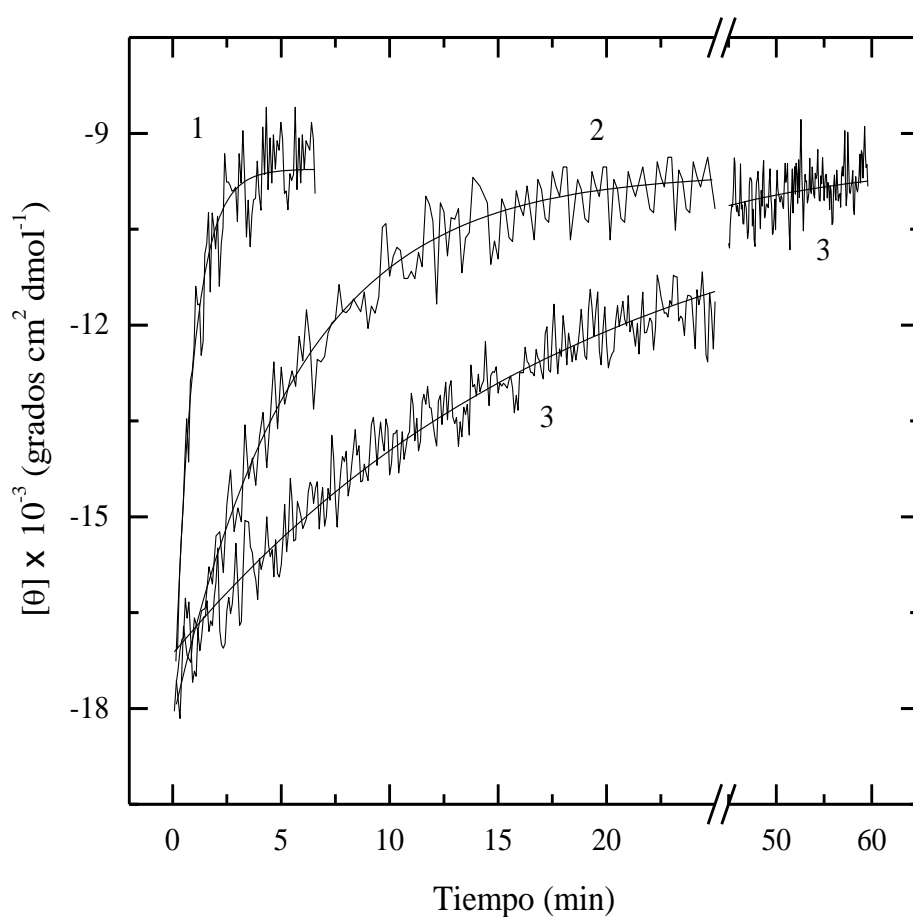


Figura 3.9. Cinética de desnaturalización térmica de la TIM a diferentes temperaturas seguida por cambios de elipticidad a 220 nm . Los datos mostrados corresponden a las siguientes temperaturas: 62.8 (curva 1), 57.8 (curva 2) y $52.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (curva 3). Las líneas suaves son el ajuste de los datos experimentales a curvas de decaimiento exponencial simple. La concentración de proteína fue de 0.010 mg mL^{-1} .

Los cambios en las interacciones terciarias durante el desplegamiento de la TIM se estudiaron siguiendo la elipticidad a 285 nm, con soluciones de proteína de 0.5 mg mL^{-1} . Los experimentos se llevaron a cabo a 55.2 y 58.5 °C (figura 3.10). A la temperatura de 58.5 °C se obtuvo una curva cinética claramente bifásica. El ajuste de esta curva, de acuerdo a un modelo de decaimiento exponencial doble, indica que la fase rápida comprende una amplitud del 68 al 72% (con respecto al cambio de elipticidad total); el valor obtenido de la constante de velocidad para esta fase es, dentro del error experimental, igual al determinado mediante los experimentos de DC en la región de UV-lejano a la misma temperatura (Tabla 3.2). La fase lenta, asociada a la aparición de turbidez de la solución de la TIM, tuvo una constante de velocidad 13 veces menor que la de la fase rápida (Tabla 3.2).

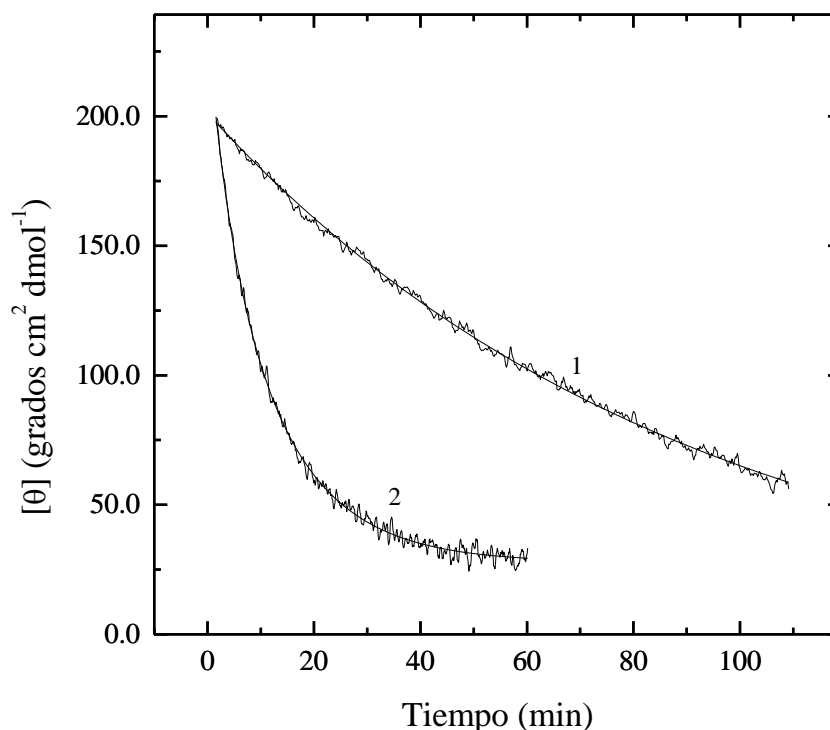


Figura 3.10. Cinética de desnaturalización de la TIM obtenida por DC en la región del UV-cercano. Las curvas que se muestran corresponden a las temperaturas que se indican: 55.2 °C (curva 1) y 58.5 °C (curva 2). Las curvas suaves corresponden a los ajustes de los datos experimentales de acuerdo a los modelos de decaimiento exponencial simple y doble respectivamente. La concentración de proteína fue 0.5 mg mL^{-1} .

} Tratando de separar los efectos de las dos fases cinéticas en el espectro de DC en la región del UV-cercano de la TIM desnaturalizada, se llevaron a cabo experimentos en los que se permitía que la fase rápida avanzara hasta un 90%, mientras que la fase lenta sólo había avanzado un 15%, inmediatamente se obtuvo el espectro de DC en la región del UV-cercano. El promedio de los dos espectros logrados de este modo se muestra en la figura 3.11; comparando con el espectro de la proteína nativa (también en la figura 3.11) se aprecia que la fase rápida conlleva cambios importantes de las interacciones terciarias. En contraste, la cinética de desplegamiento monitoreada por elipticidad en la región del UV-cercano a una temperatura de 55.2 °C sigue un modelo de decaimiento exponencial simple (figura 3.10). Este cambio también está asociado a la aparición de turbidez en la muestra.

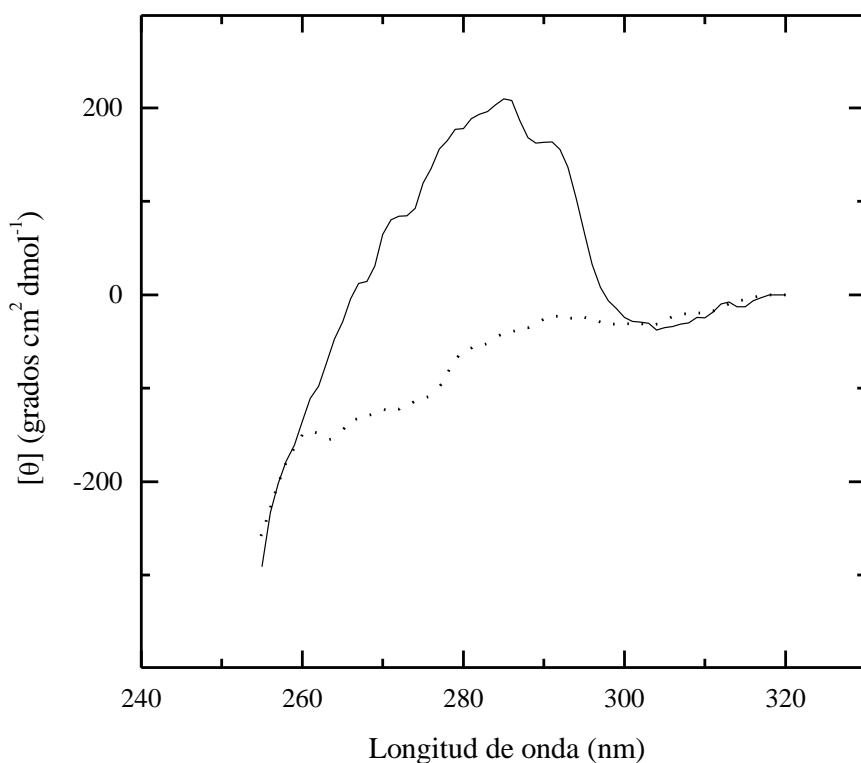


Figura 3.11. Espectros de DC en la región del UV-cercano de la TIM de levadura. Los espectros se obtuvieron en regulador de TRIS 50 mM pH 8.5, con una concentración de proteína de 0.5 mg mL⁻¹. Proteína nativa a 25 °C (línea continua); promedio de los espectros obtenidos después de la fase rápida de la cinética de desplegamiento seguida por DC-UV cercano a 58.5 °C (línea punteada).

Tabla 3.2. Constantes de desplegamiento obtenidas por DC en las regiones de UV-cercano y lejano en una temperatura de 58.5 °C

Técnica de obtención	Constante de velocidad (s ⁻¹)
UV-lejano	$1.6 \times 10^{-3} \pm 4.2 \times 10^{-4}$
UV-cercano fase rápida	$2.0 \times 10^{-3} \pm 2.8 \times 10^{-4}$
UV-cercano fase lenta	$1.5 \times 10^{-4} \pm 7.5 \times 10^{-5}$

La desnaturalización de la TIM también se estudió por medio de espectroscopía de fluorescencia. Estos estudios permitieron detectar los cambios de polaridad en el entorno de los residuos de triptofano, que se reflejan como corrimientos en el espectro hacia longitudes de onda mayores. Los espectros de emisión se obtuvieron a intervalos de 540 segundos a 56.0 y 56.8 °C durante el curso del desplegamiento de la TIM. Los espectros que se muestran en la figura 3.12 ejemplifican los cambios que ocurren en este proceso (56.8 °C). La ausencia de un punto isofluorescente indica que hay más de dos especies involucradas en el proceso. Además, se pueden distinguir fácilmente dos tendencias: Los espectros correspondientes a tiempos menores a 45 minutos presentan un corrimiento progresivo en la longitud de onda de máxima emisión (λ_{\max}) de 320 a 328 nm y manifiestan una disminución importante en la intensidad a longitudes de onda menores. La reacción de desplegamiento a tiempos superiores a 45 minutos se caracteriza por un mayor corrimiento de la señal hacia longitudes de onda mayores, y por un incremento de intensidad de la señal en longitudes de onda cercanas a 330-335 nm.

De acuerdo a lo anterior, se construyeron curvas cinéticas a partir de las intensidades medidas a una longitud de onda particular, estas resultaron ser claramente bifásicas; sin embargo, fue más fácil distinguir las dos fases con una longitud de onda de 318 nm (figura 3.13). Por lo tanto, esta longitud de onda se escogió para las mediciones cinéticas a otras temperaturas (figura 3.14). Los datos cinéticos se ajustaron adecuadamente a una ecuación de decaimiento exponencial doble (Ver sección 6.2.2 del Apéndice). Los valores obtenidos de las constantes de velocidad de la fase rápida resultaron ser muy similares a los calculados para los experimentos de DC (Tabla 3.3).

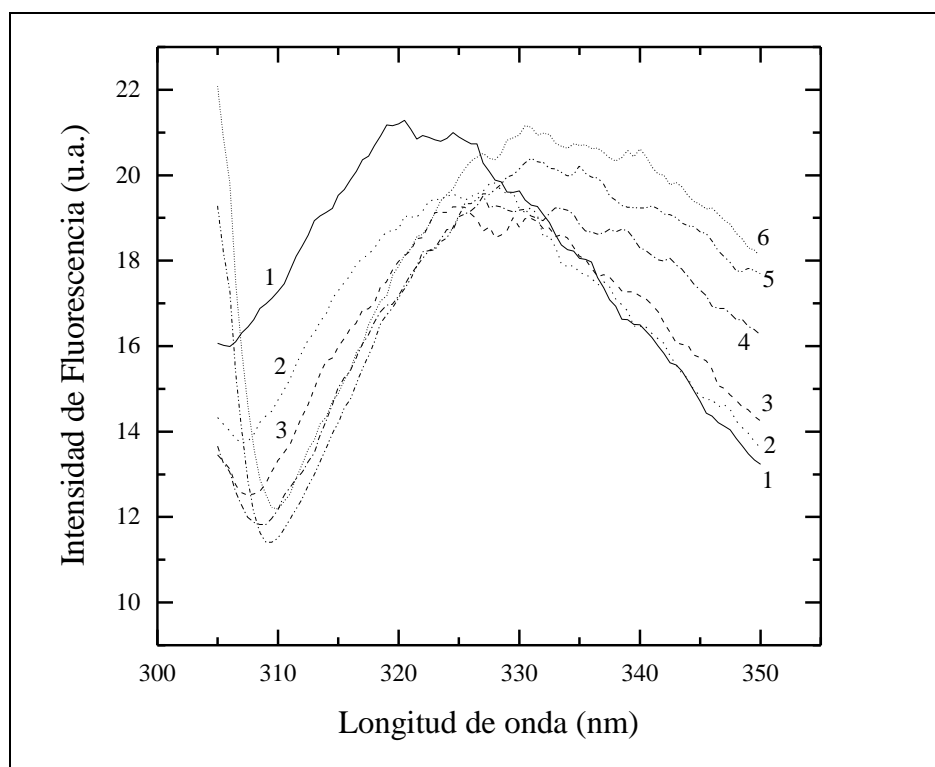


Figura 3.12. Espectros de emisión de fluorescencia (longitud de onda de excitación 290 nm). Los espectros se registraron en diferentes tiempos después de iniciar la reacción de desplegamiento de la TIM a 56.8 °C: 0.7 (curva 1), 9 (curva 2), 18 (curva 3), 36 (curva 4), 126 (curva 5) y 216 minutos (curva 6). La concentración de proteína fue de 0.050 mg mL⁻¹.

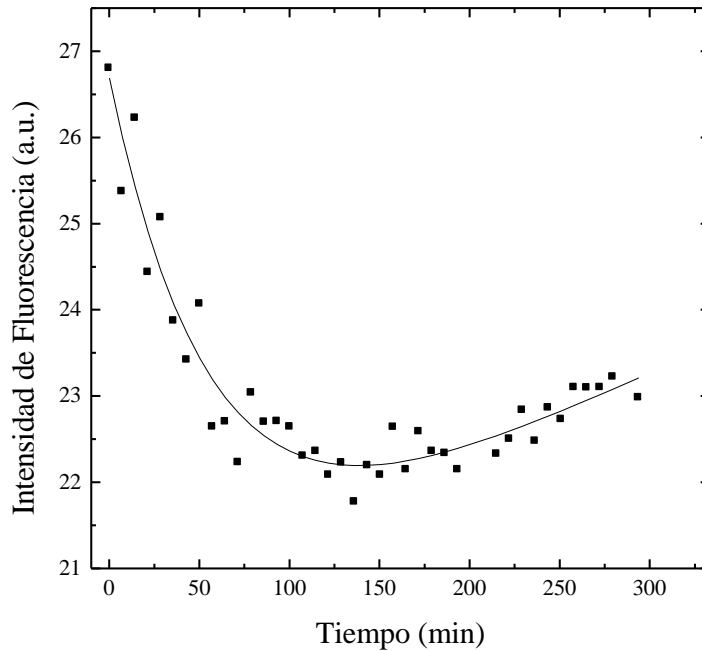


Figura 3.13. Curva cinética construida a partir de la intensidad medida a 318 nm, de la serie de espectros de emisión de fluorescencia obtenidos a 56.8 °C (excitación = 290 nm). La línea suave representa el ajuste de los datos experimentales (\square) a una ecuación de decaimiento exponencial doble.

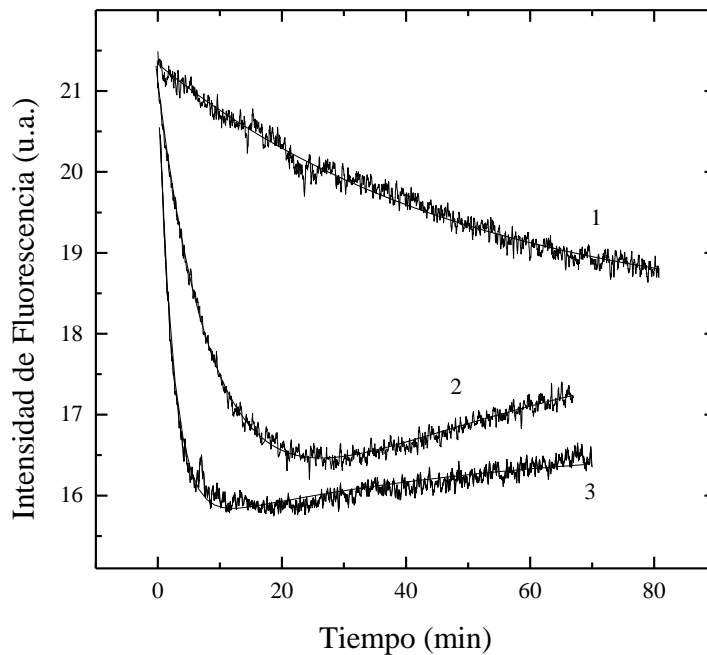


Figura 3.14. Curvas cinéticas de desplegamiento de la TIM de levadura obtenidas por fluorescencia intrínseca (excitación = 290 nm, emisión = 318 nm). Los datos mostrados corresponden a las siguientes temperaturas: 54.9 (curva 1), 59.8 (curva 2) y 61.8 °C (curva 3). Los datos experimentales se ajustaron a curvas de decaimiento exponencial bifásico (curvas suaves). La concentración de proteína fue de 0.050 mg mL⁻¹.

Tabla 3.3. Constantes de desplegamiento k_u obtenidas por DC en la región del UV-lejano y fluorescencia (fase rápida) a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Fluorescencia (s ⁻¹)	Dicroísmo Circular (s ⁻¹)
54.9	$4.0 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$
57.2	$9.0 \times 10^{-4} \pm 3.5 \times 10^{-4}$	$8.8 \times 10^{-4} \pm 3.2 \times 10^{-4}$
59.3	$4.0 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$
59.8	$2.0 \times 10^{-3} \pm 0.8 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-3}$
61.6	$1.4 \times 10^{-2} \pm 0.5 \times 10^{-2}$	$9.8 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-3}$

De acuerdo a estos resultados, la cinética de desnaturalización de la TIM se puede describir como una ruta secuencial cuyo primer paso conduce a la pérdida simultánea de interacciones terciarias y una parte considerable de la estructura secundaria de la molécula. Este paso de desplegamiento también comprende un incremento en la polaridad de los alrededores de los residuos de triptofano. Las reacciones subsecuentes no conllevan cambios en la estructura secundaria, pero aparentemente causan cambios posteriores en el entorno de los residuos de triptofano y llevan a la proteína desplegada a un estado irreversiblemente desnaturalizado. A concentraciones de proteína mayores (0.5 mg mL⁻¹) la irreversibilidad está claramente ligada a la aparición de turbidez en la muestra lo que sugiere la formación de agregados moleculares macroscópicos.

3.4 Dependencia de la constante de despliegamiento con la temperatura.

El efecto de la temperatura en la constante de velocidad del despliegamiento (k_u) en la desnaturalización de la TIM se ilustra en la figura 3.15. El gráfico de $\ln(k_u/T)$ en función de $(1/T)$ representa la ecuación de Eyring (ver apéndice sección 6.2.4):

$$\ln(k/T) = \ln E + \Delta S^\ddagger/R - (\Delta H^\ddagger/R) (1/T) \quad (3.1)$$

donde k es la constante de velocidad de una reacción elemental; E representa el factor preexponencial, que en la ecuación de Eyring es igual a la razón de la constante de Boltzmann entre la constante de Planck; ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger son la entalpía y entropía de activación, respectivamente. Cuando se considera la variación del ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger con la temperatura, la ecuación 3.1 se transforma en (Chen *et al.*, 1989):

$$\ln(k/T) = A - B(1/T) - (\Delta C_p^\ddagger/R) \ln(1/T) \quad (3.2)$$

donde se asume que la capacidad calorífica de activación, ΔC_p^\ddagger , es independiente de la temperatura. Los coeficientes A y B se expresan como combinaciones de los parámetros de activación; en este caso representadas como:

$$A = \ln E + (\Delta S^\ddagger - \Delta C_p^\ddagger \ln T_r)/R,$$

$$B = (\Delta H^\ddagger T_r - \Delta C_p^\ddagger T_r)/R,$$

la que permite calcular fácilmente el ΔH^\ddagger a cualquier temperatura T_r , escogida como referencia.

Mediante el análisis de los datos para el desplegamiento en la figura 3.15 de acuerdo a la ecuación 3.2, se estimó el $\Delta C_{p,u}^\ddagger$ igual a $2.1 \pm 5.9 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. En comparación con el ΔC_p calorimétrico ($49 \pm 3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), $\Delta C_{p,u}^\ddagger$ es prácticamente insignificante. Este resultado concuerda con estudios previos del desplegamiento de proteínas monoméricas en solución acuosa (López-Arenas *et al.*, 1999; Pohl, 1968; Segawa y Sugihara, 1984; Jackson y Fersht, 1991; Alexander *et al.*, 1992 y Oliveberg y Fersht, 1996), donde se han reportado gráficos de $\ln(k_u/T)$ vs. $1/T$ lineales o casi lineales. El ajuste de los datos a un modelo lineal (ecuación 3.1) da como resultado un ΔH_u^\ddagger de 480 kJ mol^{-1} . En comparación, los valores de ΔH_u^\ddagger para proteínas monoméricas están en el intervalo de 100 a 350 kJ mol^{-1} (Solís-Mendiola *et al.*, 1998).

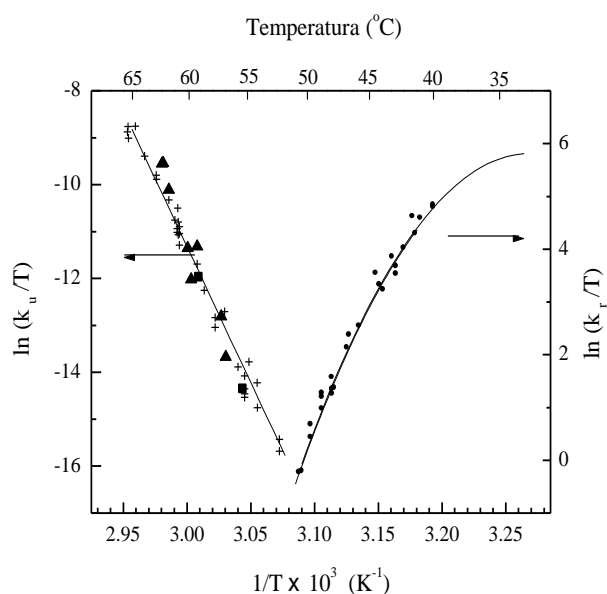


Figura 3.15. Gráfico de Eyring para las constantes de desplegamiento (k_u) y replegamiento (k_r) de la TIM de levadura. Los datos de desnaturalización se obtuvieron por medio de: DC en la región del UV-lejano (\ominus), DC-UV cercano (+), y espectroscopia de fluorescencia (\blacktriangle). Las constantes de replegamiento (\blacktriangle) se determinaron de los experimentos de DC en el UV-lejano. Las líneas muestran las regresiones de mínimos cuadrados de acuerdo a la ecuación 3.1 (desplegamiento):

$$\ln(k_u/T) = 162 (\pm 4) - 57900 (\pm 1500) (1/T),$$

o la ecuación 3.2 (replegamiento):

$$\ln(k_r/T) = 2500 (\pm 5500) - 1.16 \times 10^6 (\pm 0.26 \times 10^6) (1/T) + 3800 (\pm 800) (\ln(1/T));$$

k_u y k_r están dadas en s^{-1} y $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente.

3.5 Cinética de replegamiento.

La recuperación de estructura secundaria durante el replegamiento de la TIM se estudió por medio de los cambios en la elipticidad a 220 nm. Los experimentos se iniciaron con una solución de TIM, a concentración menor de 0.150 mg mL^{-1} , previamente desnaturalizada durante 3 minutos a $63.7 \text{ }^\circ\text{C}$. Como se ha mencionado anteriormente (ver sección 3.3), estas condiciones aseguraron la formación de un estado reversiblemente desplegado. Los experimentos de replegamiento se iniciaron por alguno de los dos métodos descritos en el capítulo de Materiales y Métodos (sección 2.3.4).

La figura 3.16 muestra las curvas cinéticas, obtenidas a $48.3 \text{ }^\circ\text{C}$, para dos concentraciones de TIM. En ambos casos la elipticidad observada a tiempos largos es cercana a la mostrada por la TIM nativa a la misma temperatura (deducida de la región de pre-desnaturalización en la figura 3.2), indicando que el replegamiento es prácticamente completo en estas condiciones. Los experimentos de replegamiento se llevaron a cabo en el intervalo de concentración de proteína de 0.007 a 0.040 mg mL^{-1} ; los valores observados de tiempos de vida media ($t_{1/2}$) se graficaron contra el recíproco de la concentración molar de TIM (en términos de monómeros). En la figura 3.17 se observa el comportamiento a $48.3 \text{ }^\circ\text{C}$. En este gráfico se muestra que la vida media de la reacción disminuye al aumentar la concentración de proteína. A pesar del error experimental, es evidente que la linealidad del gráfico es consistente con la relación esperada para una reacción de segundo orden (ver en el Apéndice la sección 6.2.3):

$$t_{1/2} = 1/(2 C_0 k_r) \quad (3.3)$$

donde k_r es la constante de velocidad de replegamiento y C_0 es la concentración inicial de monómeros. Además, el valor de k_r calculado de la línea de la figura 3.18 ($1.5 \times 10^3 \pm 0.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) concuerda satisfactoriamente con el promedio de la constante ($1.4 \times 10^3 \pm 0.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) obtenida a $48.3 \text{ }^\circ\text{C}$ a través del ajuste de los experimentos individuales a curvas cinéticas de segundo orden.

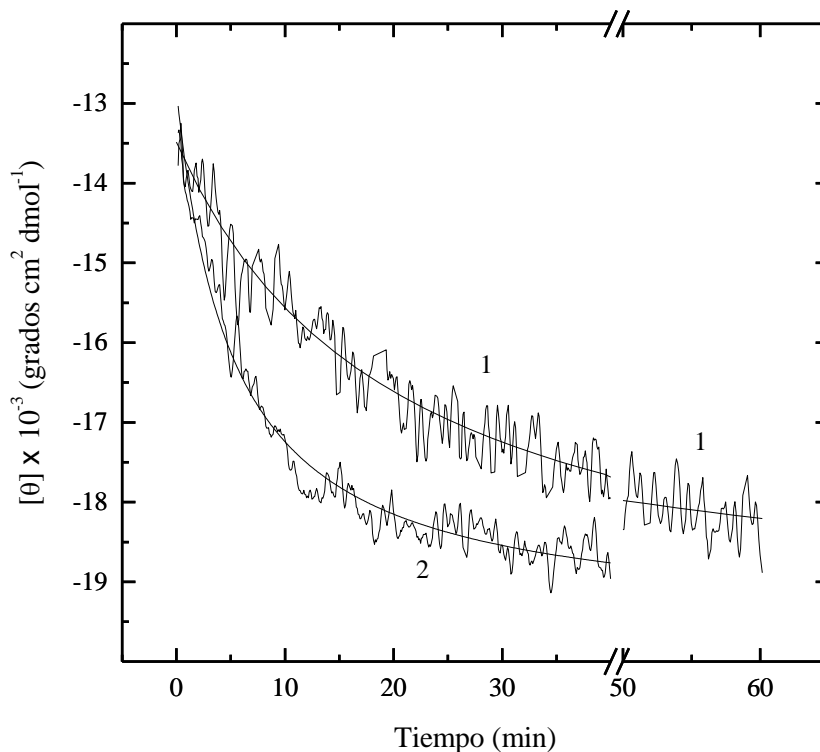


Figura 3.16. Cinéticas de replegamiento de la TIM de levadura obtenidas a $48.3 \text{ }^\circ\text{C}$ y dos diferentes concentraciones de proteína. El replegamiento se siguió por cambios en la elipticidad a 220 nm . Los datos mostrados corresponden a 0.007 mg mL^{-1} (curva 1) y 0.040 mg mL^{-1} (curva 2). Los datos experimentales se ajustaron de acuerdo a un modelo para una reacción simple de segundo orden (línea suave)

La TIM replegada en las condiciones descritas anteriormente, mostró una recuperación de la actividad enzimática mayor al 95% cuando el ensayo se llevó a cabo en condiciones estándar (pH 7.4, $25 \text{ }^\circ\text{C}$). La recuperación de actividad enzimática también se estudió en las condiciones del replegamiento (pH 8.5 y $43.2 \text{ }^\circ\text{C}$). Los ensayos que se hicieron con muestras de TIM que se había replegado en un 95% indicaron que la actividad

recuperada es mayor al 90% con respecto a la observada en la TIM nativa, en ensayos a las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, no se pudo llevar a cabo un estudio detallado de la recuperación de actividad durante el replegamiento, debido a que el sustrato parecía promover la reactivación. En efecto, cuando la TIM desplegada se inyectó en la celda de reacción, inicialmente no mostraba actividad enzimática, pero la actividad aumentaba durante el tiempo del ensayo.

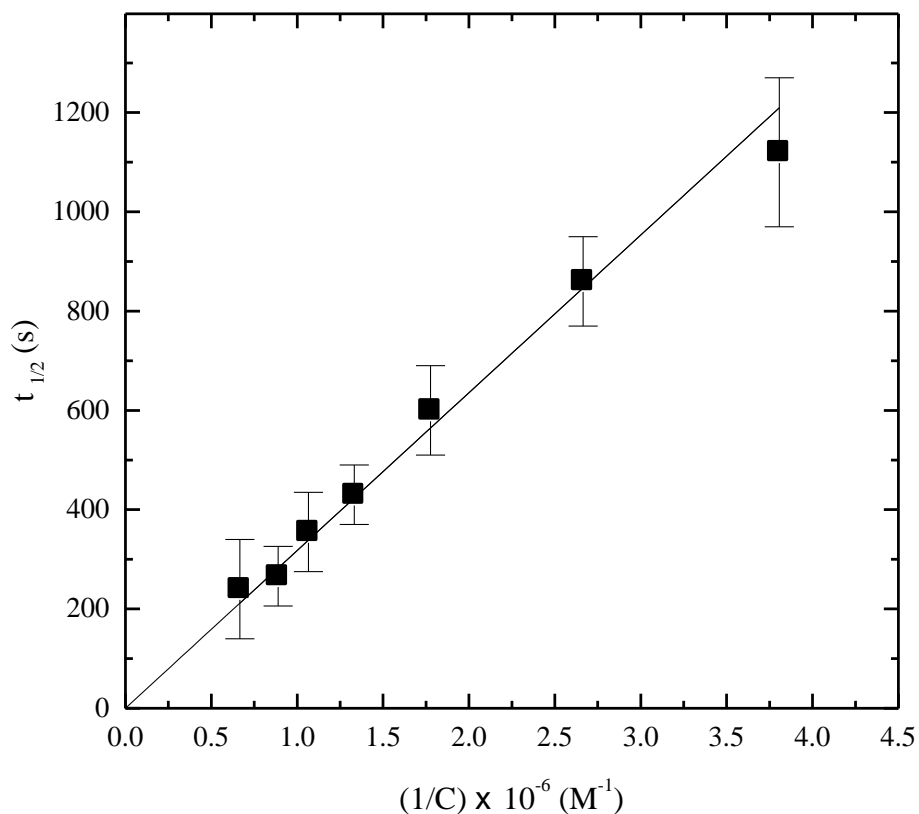


Figura 3.17. Efecto de la concentración de proteína en el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del replegamiento de la TIM. Los experimentos se llevaron a cabo a 48.3 ± 0.2 °C, las concentraciones de las muestras de TIM fueron desde 0.007 hasta 0.040 mg mL⁻¹. La concentración se expresa en términos de molaridad de monómeros ($M_r = 26\ 650$). De la pendiente de este gráfico se calculó $k_r = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ecuación 3.3) referida en el texto.

3.6 Dependencia de la constante de replegamiento con la temperatura.

El valor de la constante de replegamiento, k_r , se determinó en un intervalo de temperaturas de 40 a 51 °C. En la mayoría de los experimentos la concentración de proteína

fue de 0.010 mg mL⁻¹. Sin embargo, en los experimentos que se llevaron a cabo a temperaturas mayores a 48 °C la concentración de TIM se incrementó (0.030 a 0.040 mg mL⁻¹) para reducir el tiempo requerido para el replegamiento. Esto se hizo para evitar la aparición de especies irreversiblemente desnaturalizadas. En todos los casos, k_r se determinó de los experimentos en que el replegamiento era mayor al 95%. Los resultados se muestran en la figura 3.15. Es evidente la curvatura que se observa en este gráfico, semejante a lo reportado para curvas análogas del replegamiento de proteínas monoméricas (Pohl, 1968; Segawa y Sugihara, 1984; Jackson y Fersht, 1991, y Alexander *et al.*, 1992) o para la reacción de replegamiento y asociación del represor Arc P22 (Milla y Sauer, 1994); este comportamiento es consistente con un valor de $\Delta C_{p,r}^\ddagger$ negativo. El ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación 3.2 aporta el juego de parámetros que se muestra en la figura 3.16, entre los que destaca el valor de $\Delta C_{p,r}^\ddagger = -31 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos.

William Lawrence Bragg

Capítulo 4: Discusión

4 Discusión

El desplegamiento térmico de la TIM silvestre de varias especies biológicas y de algunas de sus mutantes se ha estudiado ampliamente. En la mayor parte de los casos se ha observado que el proceso es irreversible, debido probablemente a la agregación de la proteína desplegada (Schliebs *et al.*, 1996; Schliebs *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1998; Gopal *et al.*, 1999; Sun, y Sampson, 1999). En contraste Mainfroid y colaboradores (1996) realizaron estudios en equilibrio de la TIM de humano, encontrando que el desplegamiento se lleva a cabo a través de un proceso de dos estados, que involucra al dímero nativo y a los monómeros desplegados como únicas especies pobladas en el equilibrio. Los datos presentados en esta tesis indican que el desplegamiento térmico de la TIM de levadura es un proceso irreversible en diversas condiciones, como se ha observado para la TIM de varias especies. Sin embargo, en las condiciones óptimas de reversibilidad (pH 8.5 y concentraciones bajas de proteína), se observaron transiciones completamente reversibles de desplegamiento y replegamiento en barridos térmicos a velocidades mayores a $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. En estas circunstancias, las dos transiciones están completamente separadas. Este resultado implica que una barrera cinética importante interviene entre los procesos de calentamiento y enfriamiento impidiendo alcanzar el equilibrio. Los intentos para lograr el equilibrio disminuyendo las velocidades de barrido fueron infructuosos, debido a la irreversibilidad del proceso.

Los resultados de la cinética de desnaturalización indican que el primer paso de la ruta de desplegamiento corresponde a una reacción de primer orden. Esta reacción produce la especie que en esta tesis se denomina "TIM térmicamente desplegada" representada por el símbolo *U*. Esta estructura carece de la mayoría de las interacciones terciarias presentes

en la forma nativa N . A juzgar por el corrimiento hacia el rojo en λ_{\max} de los espectros de fluorescencia, los residuos de triptofano parecen estar más expuestos al solvente en U que en N . Se ha observado que la hidratación de grupos hidrofóbicos que se exponen al solvente durante el desplegamiento de una proteína está acompañada de un incremento en la capacidad calorífica de la solución. En este sentido, U parece exponer amplias zonas que originalmente se encontraban ocultas en la proteína nativa, como lo sugiere el valor elevado de ΔC_p de desnaturalización. Cabe señalar, que todas las cinéticas de desnaturalización alcanzaron la elipticidad esperada para la proteína desnaturalizada. Cuando la especie U se expone a alta temperatura por períodos largos no se observan cambios en la señal de elipticidad en la región del UV-lejano. Sin embargo, dado que esta especie parece exponer zonas hidrofóbicas al solvente, sería susceptible de agregarse, lo que probablemente sea la principal causa de irreversibilidad del proceso de desplegamiento. Esto concuerda con lo observado frecuentemente para la TIM de varias especies biológicas y para varias proteínas oligoméricas (Garel, 1992). Sin embargo, de acuerdo a las evidencias de los espectros de DC en la región de UV-lejano, aparentemente U conserva una cantidad significativa de estructura secundaria (incluyendo, quizá, regiones helicoidales y hojas- β) Estas características se han observado previamente en el intermediario de desplegamiento de TIM de levadura en concentraciones moderadas de desnaturalizante (GuHCl), que se ha descrito como un monómero parcialmente plegado que carece de las interacciones terciarias, pero que conserva parte de la estructura secundaria, (Morgan *et al.*, 2000).

A pesar de la propensión de U a agregarse, se encontró que a temperaturas mayores de 63°C y concentraciones bajas de proteína (menores a 0.150 mg mL⁻¹), el tiempo

requerido para la reacción de desplegamiento es mucho menor que el tiempo de aparición de las reacciones que originan irreversibilidad. La TIM desplegada fue completamente capaz de replegarse a través de una reacción de segundo orden que produce una TIM dimérica indistinguible de la forma nativa, lo cual pone de manifiesto el carácter monomérico de la especie *U*.

Los ajustes estructurales de la proteína necesarios para el desarrollo de la actividad enzimática no pudieron estudiarse en detalle. Sin embargo, la cinética de replegamiento pudo estudiarse siguiendo los cambios de elipticidad a 220 nm. Al estudiar la dependencia de la constante de replegamiento con la temperatura se encontró un valor de $\Delta C_p^{\ddagger r}$ muy negativo. Esto concuerda con lo reportado para la cinética de replegamiento de varias proteínas monoméricas (Pohl, 1968; Segawa y Sugihara, 1984; Jackson y Fersht, 1991; Alexander *et al.*, 1992). La formación del dímero involucra la recuperación de la estructura secundaria nativa y probablemente la mayoría de las interacciones terciarias podrían consolidarse en este paso, esto dado que se ocultan grandes extensiones de área superficial accesible al solvente. De acuerdo a la curva trazada en la Figura 3.15, k_r alcanzaría un valor máximo igual a $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ alrededor de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Resulta interesante que esta magnitud sea comparable con lo reportado anteriormente para la constante de velocidad del paso de asociación (k_{bi}) en la renaturalización de la TIM desplegada por GuHCl: para la TIM de músculo de conejo (pH 7.5, GuHCl 0.065 M) k_{bi} es igual a $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Zabori *et al.*, 1980); en el caso de la enzima de músculo de pollo (pH 7.5, GuHCl 0.40 M) k_{bi} es aproximadamente igual a $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ cerca de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (McVittie *et al.*, 1977). Cabe hacer notar, sin embargo, que la renaturalización de la TIM, desde sus monómeros

desplegados por GuHCl, se ajusta adecuadamente a un mecanismo cinético secuencial unimolecular:

monómero desplegado → monómero intermediario → dímero nativo,

donde el intermediario se ha descrito como un monómero "plegado" o compacto (Zabori *et al.*, 1980; Rietveld y Ferreira, 1998; Gao *et al.*, 1998, y Gokhale *et al.*, 1999). Sin embargo, dado que la recuperación de estructura secundaria durante la renaturalización no se ha abordado en estudios previos, no puede evaluarse hasta la fecha el grado de organización estructural de dicho intermediario. Con respecto a esto, estudios recientes del desplegamiento de la TIM de levadura inducido por GuHCl han demostrado la presencia de un intermediario parcialmente plegado en concentraciones moderadas de desnaturalizante (Morgan *et al.*, 2000). Este intermediario carece de las interacciones terciarias, pero, a juzgar por su espectro de DC en la región del UV-lejano, parece conservar estructura secundaria residual. Queda por demostrarse, si un monómero parcialmente plegado aparece como intermediario cinético en la formación de la TIM dimérica, bajo condiciones que favorecen al estado nativo; Morgan y colaboradores, han sugerido que tal hecho pudiera ser posible. Tal propuesta ahora puede apoyarse fuertemente en vista de la similitud estructural del intermediario mencionado, con el monómero desplegado que se encontró en este trabajo, el cual es capaz de dimerizar. En condiciones cercanas a las fisiológicas, el replegamiento de la TIM de levadura a partir de sus monómeros poco estructurados (como aparece en el desplegamiento por GuHCl), podría involucrar dos grandes pasos de plegamiento: 1) La formación rápida de una estructura intermediaria, similar al monómero

desplegado térmicamente. En este paso la disminución de la concentración del desnaturalizante por dilución, podría inducir un colapso rápido de la cadena polipeptídica dando origen a la aparición de algunos elementos de estructura secundaria, como lo indican nuestras observaciones, dicha estructura es estable en la ausencia de desnaturalizante, sufriendo sólo cambios graduales incluso a temperaturas de hasta 75 °C. 2) El paso de asociación que conduce a la formación del dímero, va acompañado de la ganancia del resto de la estructura secundaria y el ocultamiento de grandes cantidades de área superficial accesible al solvente. Probablemente la mayoría de las interacciones terciarias podrían formarse durante esta etapa. Lamentablemente, la recuperación de la estructura cuaternaria a través de la restitución de la actividad catalítica no pudo medirse con precisión por la curvatura en los trazos de oxidación del NADH (ver sección 2.2).

A pesar de que el desplegamiento térmico de la TIM es un proceso reversible, el estudio de sus propiedades cinéticas y de equilibrio, en condiciones donde se espera que tanto U como N estén apreciablemente poblados en el equilibrio, no fue posible por la tendencia de la especie U a formar agregados irreversiblemente desnaturalizados, junto con la aparente lentitud de la reacción de desplegamiento. Por lo tanto, es imposible determinar si coexisten o no intermediarios en equilibrio con N y U dentro de un particular intervalo de temperaturas. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo en la cinética de plegamiento y desplegamiento sugieren que un simple modelo de dos estados, podría dar una descripción razonable del desplegamiento en equilibrio:



La similitud del ΔC_p y ΔH (vistos como descriptores del proceso global) con el $-\Delta C_{p_r}^\ddagger$ y la resta de las entalpías de activación ($\Delta H_u^\ddagger - \Delta H_r^\ddagger$) puede considerarse como evidencia en favor del modelo propuesto en la ecuación 4.1. Ambos juegos de parámetros se resumen en la Tabla 4.1.

Si suponemos que el mecanismo 4.1 es válido, entonces debe cumplirse la aproximación de $\Delta C_{p\ cal} \approx -\Delta C_{p_r}^\ddagger$, dado que $\Delta C_{p_u}^\ddagger$ es insignificamente pequeño. Sin embargo, el valor de $49\ \text{kJ mol}^{-1}\ \text{K}^{-1}$ de $\Delta C_{p\ cal}$ está fuera del intervalo de 95% de confianza para $-\Delta C_{p_r}^\ddagger$ ($31 \pm 13\ \text{kJ mol}^{-1}\ \text{K}^{-1}$, calculado de su error estándar en la regresión de la ecuación 3.3), indicando que la diferencia en las capacidades caloríficas puede ser significativa. Asimismo, la suma del ΔH_u^\ddagger y $-\Delta H_r^\ddagger$ excede significativamente el valor de ΔH_{cal} (extrapolado) a baja temperatura, a pesar de que por arriba de $53\ ^\circ\text{C}$ ambos valores de la entalpía global de desplegamiento concuerdan satisfactoriamente (Tabla 4.1). Las discrepancias descritas pueden indicar la existencia de un estado intermediario entre *N* y *U* o que el desplegamiento y replegamiento siguen rutas distintas. Sin embargo, es posible que la falta de concordancia entre los resultados calorimétricos y cinéticos tenga su origen en la sobrestimación del $\Delta C_{p\ cal}$ debido a la agregación. Ciertamente, un pequeño efecto exotérmico puede tener poca influencia en el ΔH_{cal} a una determinada temperatura, pero si la magnitud de este efecto disminuye con la temperatura, el $\Delta C_{p\ cal}$ aparente (medido a partir de la pendiente del gráfico de ΔH_{cal} vs. $T_{1/2}$) sería mayor que el ΔC_p real de la transición de desplegamiento.

Tabla 4.1: Parámetros calorimétricos y de activación que caracterizan el desplegamiento y repliegamiento de la TIM de levadura^a

entalpía (kJ mol ⁻¹)				
Temperatura (°C)	ΔH_u^\ddagger	ΔH_r^\ddagger	$\Delta H_u^\ddagger - \Delta H_r^\ddagger$	ΔH_{cal}
49.0	480 (10)	-510 (30)	990 (30)	810 (50) ^b
53.8	480 (10)	-660 (60)	1140 (60)	1050 (70)
59.0	480 (10)	-830 (90)	1310 (90)	1330 (90)
Capacidad calorífica molar (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)				
	$\Delta C_{p,u}^\ddagger$	$\Delta C_{p,r}^\ddagger$		$\Delta C_{p,cal}$
	≈0	-31 (7)		49 (2)

^a Los parámetros de activación se calcularon a partir de las regresiones de mínimos cuadrados mostrados en la Figura 3.15. La entalpía calorimétrica se midió a partir de barridos calorimétricos y el $\Delta C_{p,cal}$ a partir de la pendiente de la línea de la Figura 3.8. Entre paréntesis están indicadas las desviaciones estándar de los valores.

^b Valor extrapolado de la línea de la Figura 3.8.

4.1 Evaluación de la estabilidad termodinámica de un supuesto modelo de dos estados.

A pesar de que no podemos concluir que el desplegamiento de la TIM de levadura se lleva a cabo mediante un modelo de dos estados, este modelo está sustentado en la TIM de humano mediante resultados del desplegamiento térmico en equilibrio estudiado por fluorescencia (Mainfroid *et al.*, 1996). Por lo tanto, es interesante estimar la estabilidad de la TIM de levadura asumiendo un modelo reversible de dos estados y comparar dichos resultados con los reportados para la TIM de humano.

Bajo la consideración anterior, la constante de equilibrio (K_u) para el desplegamiento de la TIM de levadura puede obtenerse de la relación:

$$K_u = k_u/k_r \quad (4.2)$$

Por otro lado, K_u está relacionado con la fracción de proteína desplegada, f_u , mediante la ecuación 4.3 (ver en el Apéndice la sección 6.1.1):

$$K_u = 2C_t[f_u^2/(1 - f_u)] \quad (4.3)$$

donde C_t es la concentración total de proteína expresada por mol de monómeros. Dado que la dependencia de k_u y k_r con la temperatura es conocida (pie de la figura 3.16), es posible calcular f_u en función de la temperatura. Para una concentración de proteína de 0.010 mg mL⁻¹, se calculó la curva de transición que se presenta en la Figura 3.2 (línea 7). Esta curva presenta una temperatura media de desnaturalización ($T_{1/2}$) de 51.8 °C, que es similar a la reportada para la TIM de humano (aproximadamente 54 °C) en pH 8.0 y la misma concentración de proteína (Mainfroid *et al.*, 1996). Los valores de K_u obtenidos se utilizaron para estimar el cambio de energía libre de Gibbs para el proceso de desplegamiento de la TIM de levadura (Figura 4.1). Como se observa en este gráfico, se espera que el valor máximo de ΔG_u (90 kJ mol⁻¹) aparezca alrededor de 21 °C. Para la TIM de humano, el ΔG_u estimado fue de 80.7 kJ mol⁻¹ (19.3 kcal mol⁻¹) a 25 °C. Sin embargo, la concordancia en ΔG_u para ambas enzimas parece ser fortuita, dado que hay una gran discrepancia entre el $\Delta C_{p,u}$ de 31 kJ mol⁻¹ K⁻¹ usado en nuestros cálculos ($\Delta C_{p,u} \approx -\Delta C_{p,r}^\ddagger$) y el pequeño valor para $\Delta C_{p,u}$ (6.3 kJ mol⁻¹ K⁻¹) estimado por Mainfroid y colaboradores

(1996) a partir de la variación de ΔH_u con $T_{1/2}$. Cabe mencionar que estos autores determinaron ΔH_u por el análisis de van't Hoff de las transiciones obtenidas por espectroscopia de fluorescencia; desafortunadamente, no se reportaron los valores de ΔH_u . Es evidente que se requieren más estudios para conocer con precisión las propiedades termodinámicas de esta familia de enzimas diméricas.

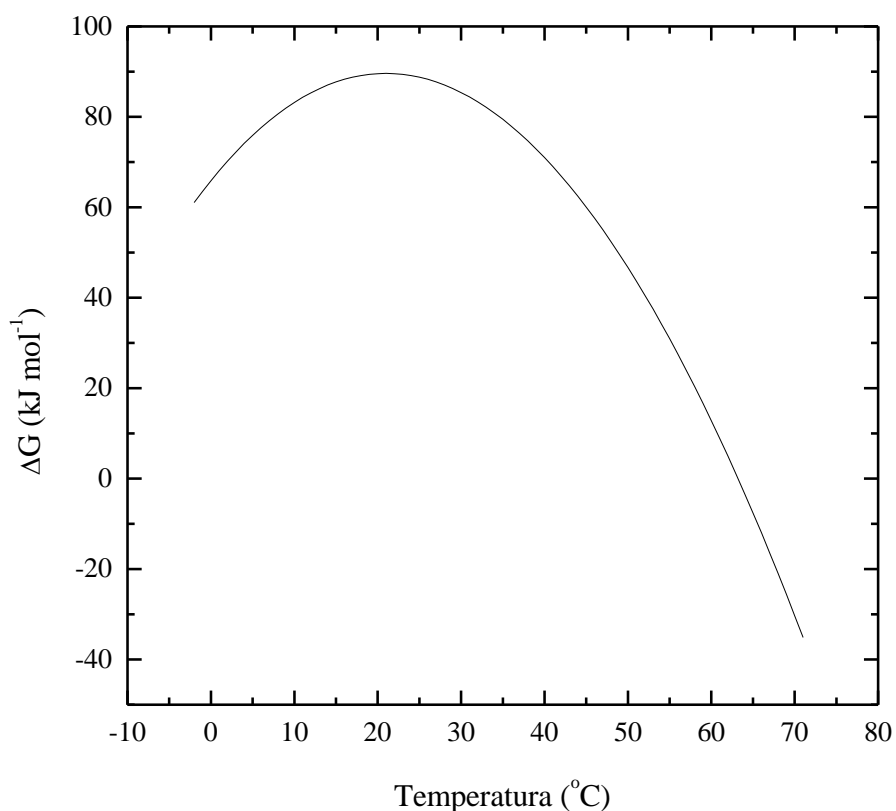


Figura 4.1. Cambio de energía libre de Gibbs (ΔG_u) a partir los valores de la constante de equilibrio de la curva de transición teórica (línea 7) presentada en la figura 3.2.

4.2 Histéresis en las transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento térmico.

En la Figura 3.2 se observa una marcada histéresis en los barridos térmicos de la TIM, resultado que contrasta con lo observado para varias proteínas monoméricas pequeñas, cuyas transiciones térmicas, obtenidas a velocidades de calentamiento de uno o

dos grados por minuto, están cerca de una curva de equilibrio. La explicación más simple de tal comportamiento es que en la región de la transición la cinética de desplegamiento-replegamiento de la TIM es mucho más lenta que para una proteína típica monomérica. Por ejemplo, en la temperatura media de desplegamiento el valor de las constantes de desplegamiento y replegamiento de la lisozima (Segawa y Sugihara, 1984) oscilan entre 0.05 y 0.90 s⁻¹, dependiendo del pH. Esto significa que las poblaciones de moléculas plegadas y desplegadas se aproximan hacia los valores de equilibrio, después de una perturbación térmica, con un tiempo de relajación ($\tau = 1/(k_u + k_r)$) de 0.5 a 10 segundos. Aún para una proteína más grande, la tripsina bovina (Pohl, 1968), el τ esperado es de 0.5 minutos en $T_{1/2}$. Para un sistema compuesto de dímeros nativos en equilibrio con monómeros desplegados la respuesta a una perturbación pequeña se caracteriza por un tiempo de relajación que está dado por (Nölting, 1999):

$$\tau = 1/(k_u + 4k_r [U]_e) \quad (4.3)$$

donde $[U]_e$ es la concentración de equilibrio de los monómeros desplegados antes de aplicar la perturbación (ver la sección 6.2.3 del Apéndice). En el caso de la TIM, k_u y k_r evaluados a una supuesta $T_{1/2}$ (51.8 °C) tienen valores de 4.5 x 10⁻⁵ s⁻¹ y 124 M⁻¹ y s⁻¹, respectivamente. Para una concentración total de proteína de 0.010 mg mL⁻¹ $[U]_e = 1.87 \times 10^{-7}$ M y el tiempo de relajación para estas condiciones sería de 120 minutos, que es 200 veces mayor que el tiempo de relajación requerido para proteínas monoméricas. Por lo tanto, para alcanzar un equilibrio entre el dímero nativo y el monómero desplegado de una muestra de TIM se requerirían tiempos de incubación muy largos o velocidades de barrido muy pequeñas. Desafortunadamente, la aparición de reacciones subsecuentes (como la agregación

inespecífica de U) origina que el proceso se haga irreversible. A pesar de esto, dado el valor grande de ΔH_u^\ddagger , el desplegamiento ocurre rápidamente y hasta completarse cuando la temperatura es de unos pocos grados por arriba de $T_{1/2}$. Del mismo modo, el replegamiento está altamente favorecido, tanto cinética como termodinámicamente, en temperaturas ligeramente por debajo de $T_{1/2}$. Además, estas consideraciones indican que la termoestabilidad de la TIM, vista como el tiempo de vida media del dímero activo, está gobernada tanto por la barrera cinética de la reacción de desplegamiento como por la dependencia de esta barrera con la temperatura.

La ciencia es una forma de pensar, mucho
más que un cuerpo de conocimientos.

Carl Sagan,

Capítulo 5: Conclusiones y
perspectivas

5 Conclusiones y perspectivas

El desplegamiento de la TIM de levadura puede describirse como una reacción inicial de primer orden que conlleva a la formación de un estado térmicamente desplegado U , capaz de replegarse hasta la forma nativa si se enfría rápidamente. El replegamiento a partir de U se lleva a cabo a través de una reacción de segundo orden en donde la asociación de los monómeros está ligada a la recuperación de la estructura secundaria. Si el estado U permanece expuesto a temperaturas altas durante períodos prolongados puede formar un estado irreversiblemente desplegado (probablemente por agregación).

Aunque los resultados que se presentan en este trabajo describen detalles de diferentes facetas del desplegamiento de TIM, es evidente que es necesario realizar más estudios para caracterizar completamente este proceso. Sería interesante por ejemplo, determinar si en condiciones desfavorables para la formación del dímero de TIM, aparece una reacción de primer orden que conduzca a la formación de un monómero plegado, previo al paso de asociación. Esto podría estudiarse en concentraciones muy bajas de proteína en las que las colisiones monómero-monómero sean poco probables. Si la sensibilidad de las técnicas empleadas no permite disminuir suficientemente la concentración de proteína, una alternativa posible es el estudio de la cinética de replegamiento de una mutante monomérica de TIM, o bien el uso de agentes que aumenten la viscosidad del medio, por ejemplo el glicerol.

Por otro lado, se ha visto que el complejo entre la TIM y el ión fosfato tiene una constante de disociación de 5.0 ± 0.2 mM a 25 °C (Lambeir *et al.*, 1987); por lo que resulta interesante analizar cómo afecta la presencia de este inhibidor competitivo a la cinética de

desplegamiento y replegamiento de la enzima. Por ejemplo, se podrían hacer los experimentos cinéticos en presencia de diferentes concentraciones del ión fosfato. Esto ayudaría a evaluar la integridad del sitio activo en el estado de transición del desplegado y replegado.

Asimismo, para describir estructuralmente el estado de transición en las rutas de plegamiento y desplegado, se pueden estudiar diferentes mutantes. Las que a continuación se describen son mutantes en las que se ven alteradas algunas interacciones electrostáticas. Estas últimas son interesantes de estudiar porque pueden alterarse con cambios de pH y fuerza iónica. En algunas de ellas se pretende romper un puente salino existente y en otras formar una interacción electrostática potencial. Estudiando la cinética del desplegado y replegado de las distintas mutantes se pueden obtener las constantes cinéticas de los procesos y con ello calcular los parámetros de activación así como su dependencia con el pH y fuerza iónica. La diferencia de los parámetros de activación entre la proteína silvestre y las mutantes aquí propuestas nos ayudaría a saber el efecto de alterar una carga electrostática, explorando sitios particulares de la proteína.

5.1 Mutantes en las que se genera un puente salino.

En las mutantes que se sugieren a continuación se pretende formar una interacción electrostática. De llegarse a formar los puentes salinos se encontrarían en el extremo N-terminal del barril. La TIM de algunos organismos termófilos presentan algunos de los puentes salinos aquí propuestos.

T158K

T158 está en la base del barril en el segmento que conecta $\alpha 5$ y $\beta 6$. La lisina introducida en esta posición formaría un puente salino con E200 que se encuentra en el segmento que conecta $\alpha 6$ y $\beta 7$ (figura 5.1, A). La flexibilidad natural de la cadena podría permitir que 158K interactuara favorablemente con E200. Mediante cálculos de minimización de energía se estimó que la distancia entre 158K y E200 sería de 2.67 Å. T158 es vecino de W157, esto permitiría que los cambios en el entorno de esta posición sean detectable por fluorescencia intrínseca.

N148E

N148 se encuentra en $\alpha 5$ muy cerca de W157 y de W90 (figura 5.1, B), lo que facilita su caracterización mediante fluorescencia intrínseca. En esta mutante la cadena lateral de E148 formaría un puente salino con K195, que se encuentra en $\alpha 6$. Este puente salino es muy favorable geométricamente.

N35K

N35 se encuentra al final de $\alpha 1$ (en la base del barril) al sustituirse por K formaría un puente salino con el carboxilo terminal de N248. Este tipo de puente salino se encuentra entre E34 y R250 en *Bacillus stearothermophilus*.

5.2 Puentes salinos que podrían romperse.

K223Q

El puente salino formado por K223 y E179 se encuentra en el inicio de $\alpha 6$ y fin de $\alpha 7$, y está presente en *Leishmania mexicana* y levadura, pero no en la TIM de otras

especies. Por su posición podría alterar el entorno de W168 y ser detectable por fluorescencia.

5.3 Puente salino conservado.

D225Q

R189 forma puente con D227 a una distancia de 2.84 Å y con D225 a una distancia de 3.53 Å. Se propone cambiar D225 por Q rompiendo así el puente salino menos favorable.

5.4 Q65

Otra posición que resulta interesante de estudiar es la alteración de Q65. Este es un residuo conservado en la TIM de todas las especies a excepción de *Leishmania mexicana* y se encuentra al inicio del lazo 3. La glutamina está completamente escondida dentro de la interfase formando parte de una red de puentes de hidrógeno. La TIM de *Leishmania mexicana* en esta posición tiene un ácido glutámico. Recientemente se demostró que al cambiar E65 por Q en la TIM de *L. Mexicana* incrementa considerablemente la termo estabilidad de la enzima (la transición de desplegamiento se recorre aproximadamente 20 °C hacia temperaturas mas altas). Por lo anterior, resulta interesante estudiar el papel de Q en esta posición en la termoestabilidad de TIM

Estas son sólo algunas propuestas que pudieran desarrollarse en futuros trabajos para determinar detalladamente el mecanismo de desplegamiento y replegamiento de la TIM de levadura.

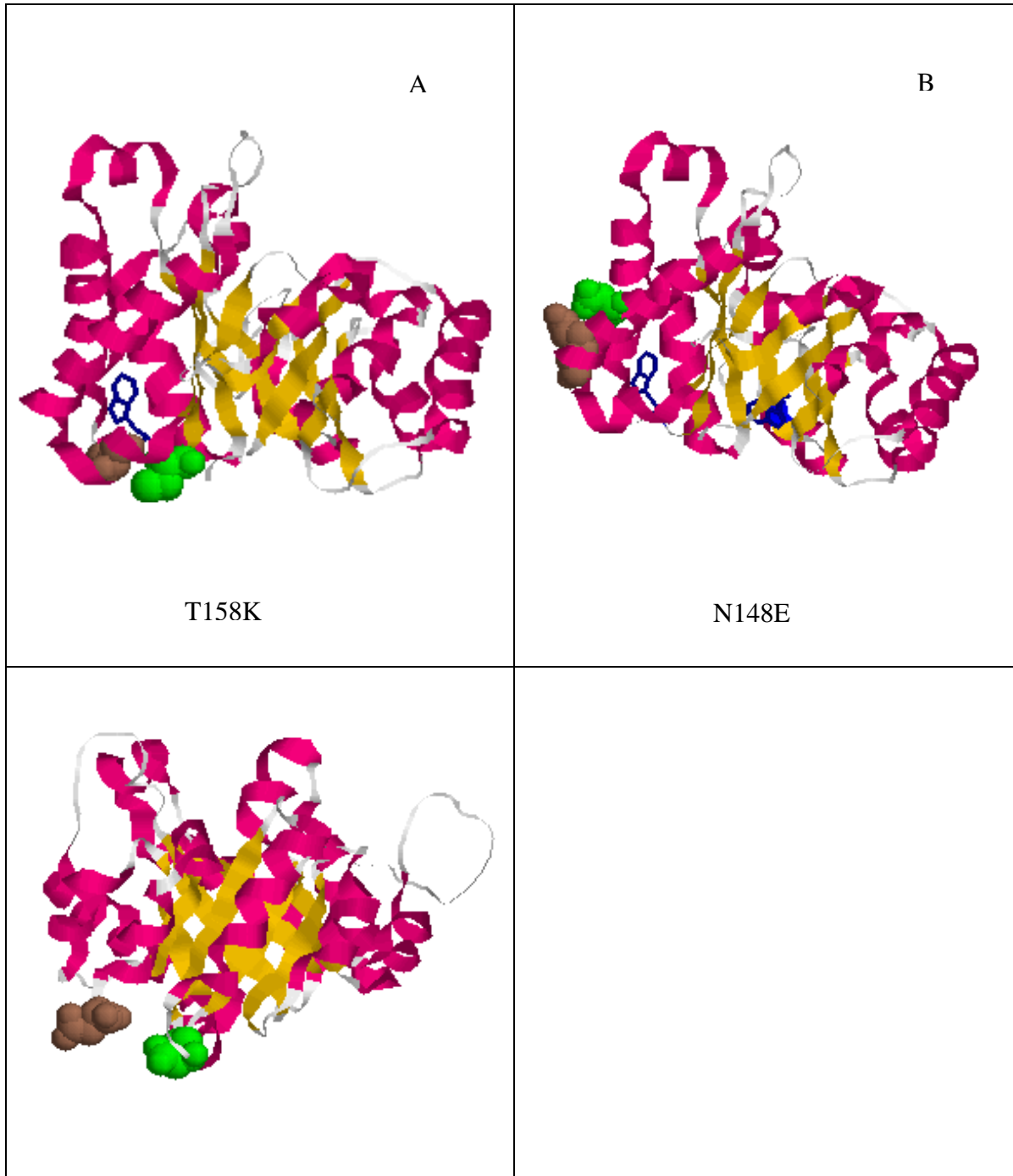


Figura 5.1. Representación de la estructura del monómero de TIM. En los tres paneles se indican las posiciones de los residuos $N35K$ interactuar en caso de que se formara el puente salino propuesto (ver el texto). Se res $N35K$ los residuos de triptofano vecinos a los puentes salinos (azul). Las ramas β aparecen en amarillo y las hélices α en rojo. Panel A: T158 (verde), E200 (café); panel B: N148 (verde), K195 (café); panel C: N35 (verde), N248 (café).



Figura 5.2. En los paneles A y B se representa la estructura del monómero de TIM y se resaltan las posiciones de los residuos que interactúan en los puentes salinos que se propone romper. Panel A: K223 (verde), E179 (café), W 168 (azul); panel B: D225 (verde), D227 (violeta), R189 (café). Panel C: se presenta el dímero de TIM resaltando el lazo 3 (azul) y Q65 (verde). En los tres recuadros las ramas β aparecen en amarillo y las hélices α en rojo.

Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía.

María Montessori.

Apéndice

Tratamiento de los datos

6.1 Estudios de desplegamiento en condiciones de equilibrio

6.1.1 Modelo reversible de dos estados para proteínas diméricas.

Si se encuentran condiciones de reversibilidad es posible estudiar el proceso de desnaturalización en el equilibrio; el modelo más sencillo es el mecanismo de dos estados (Cantor y Schimmel, 1980):



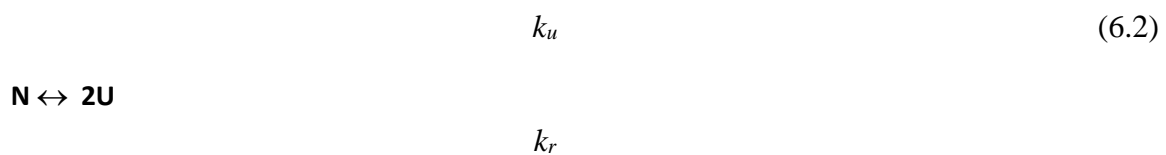
donde N y U representan a los estados nativo y desplegado respectivamente y k_u , y k_r son las constantes de velocidad de los procesos de desplegamiento y replegamiento.

Si el ambiente es modificado hacia condiciones que favorezcan el desplegamiento, la conformación nativa cambia inicialmente muy poco; es decir, puede haber cambios locales pero la estructura global se conserva. Al continuar la inducción del desplegamiento, ocurre una transición abrupta en un intervalo relativamente estrecho de condiciones del medio. Cuando el grado de desplegamiento se puede medir por diferentes técnicas y con todas ellas se determina la misma curva de transición, se puede proponer que el desplegamiento es un fenómeno de dos estados donde sólo el estado nativo y el desplegado existen en equilibrio; esto también sugiere que el proceso es cooperativo. En otras palabras la estabilidad de cada parte de la estructura es dependiente de las otras partes, y por lo

tanto, las estructuras parcialmente plegadas son inestables con respecto a las estructuras nativa y completamente desplegada.

Si la fracción de especies desnaturalizadas se puede determinar mediante señales biofísicas o espectroscópicas (como la elipticidad o la intensidad de fluorescencia), y se define al parámetro "y" como el observable utilizado para seguir la desnaturalización. El valor de ese parámetro debe modificarse con los cambios en la conformación molecular, y de esta manera es posible medir indirectamente la transición; las muestras en estado nativo así como en estado desplegado poseen sus propios valores del parámetro observable "y", siendo y_N y y_D respectivamente. Ya que ambos dependen de la concentración de agente desnaturalizante los valores de y_N y y_D , en cualquier punto de la transición se obtienen mediante la extrapolación líneal. Así mismo se definen f_N y f_U , como las fracciones de proteína nativa y desnaturalizada respectivamente.

En las proteínas diméricas las interacciones entre las cadenas pueden contribuir de manera significativa a la estabilidad conformacional de toda la proteína. El modelo más simple para describir el desplegamiento de enzimas diméricas es el reversible de dos estados, en los que la disociación y desplegamiento ocurren de manera simultánea (ver sección 1.1).



En este modelo, los dos estados en equilibrio son el dímero nativo N y el monómero desplegado U y la constante de equilibrio (K_u) puede calcularse de la relación: $K_u = 2[U]^2/[N]$.

La concentración total de proteína C_t expresada por monómero está dada por:

$$C_t = 2[N] + [U] \quad (6.3)$$

Por lo tanto las fracciones de proteína nativa y desplegada se obtienen de:

$$f_N = [N]/C_t = [N]/(2[N] + [U]) \quad (6.4)$$

$$f_U = [U]/C_t = [U]/(2[N] + [U]) \quad (6.5)$$

La fracción de proteína desplegada puede medirse espectroscópicamente. La constante de equilibrio está dada por la ecuación (ver sección 4.1):

$$K_U = [U]^2/[N_2] = 2C_t[f_U^2/(1-f_U)] \quad (6.6)$$

El cambio de energía libre del proceso (ΔG_U) puede calcularse fácilmente a partir de la constante de equilibrio.

$$\Delta G_U = - RT \ln K_U \quad (6.7)$$

Si el equilibrio representado por la ecuación 6.2 se perturba ligeramente mediante un cambio pequeño en las condiciones físicas o químicas del sistema las concentraciones de equilibrio original de las especies nativa ($[N]_e$) y desplegada ($[U]_e$) tenderán a

reequilibrarse. Después de la perturbación el equilibrio se desplaza hacia una nueva posición:

$$[N] = [N]_e + [n] \quad (6.8)$$

$$[U] = [U]_e + [u] \quad (6.9)$$

donde $[n]$ y $[u]$ son los pequeños cambios que sufren las concentraciones $[N]_e$ y $[U]_e$

Sabiendo que:

$$K_U = k_u/k_r \quad (6.10)$$

donde k_u y k_r representan las constantes de velocidad de desplegamiento y replegamiento respectivamente. La perturbación evoluciona en el tiempo de acuerdo a la ecuación 6.11.

$$d[n]/dt = -k_u[n] - 4k_r [n][U]_e \quad (6.11)$$

En este caso la constante de velocidad observable de un experimento (λ) sería (Nölting, 1999):

$$\lambda = k_u + 4k_r [U]_e \quad (6.12)$$

6.2 Estudios de desplegamiento fuera del equilibrio.

Los experimentos cinéticos permiten obtener información sobre el proceso de plegamiento y desplegamiento de proteínas. Es importante mencionar que partiendo únicamente de los datos cinéticos no puede determinarse sin ambigüedades el mecanismo a

través del cual ocurre el proceso. Los estudios cinéticos son útiles ya que permiten discriminar modelos que no se ajusten a los datos experimentales. El plegamiento y desplegamiento de las cadenas polipeptídicas son procesos intramoleculares, por lo que la cinética de estas reacciones siempre se describe en términos de ecuaciones de primer orden. Por otra parte, el plegamiento de especies multiméricas puede requerir la asociación de moléculas independientes y ser descrita por ecuaciones cinéticas de orden superior (Jaenicke y Lilie, 2000).

6.2.1 Modelo cinético de dos estados.

Se asume que inicialmente la muestra consiste exclusivamente de proteína nativa y que al someterla a un aumento súbito de temperatura se induce el desplegamiento molecular. De esta forma se origina una mezcla de especies conformacionalmente diferentes cuyas proporciones cambian con el tiempo.

Para la reacción:



la velocidad de reacción es (Cantor y Schimmel, 1980):

$$-d[N]/dt = k_u[N] - k_r[U] \quad (6.14)$$

$$-df_N/dt = k_u f_N - k_r f_U \quad (6.15)$$

definiendo " $f_N = \underline{f}_N + \Delta f_N$ " y " $f_U = \underline{f}_U + \Delta f_U$ ", donde \underline{f}_N y \underline{f}_U (ver la Figura 6.1) denotan las fracciones de equilibrio finales (y constantes), y sustituyendo en la ecuación 6.15, se obtiene:

$$-d\Delta f_N/dt = (k_u + k_r)\Delta f_N \quad (6.16)$$

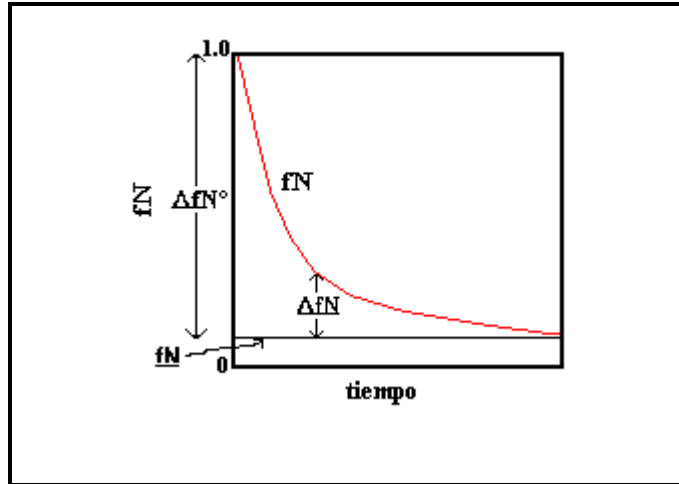


Figura 6.1 Esquema de la dependencia de f_N contra tiempo, ilustrando los parámetros discutidos en el texto.

En general la propiedad física observable "y" se considera aditiva:

$$y = f_N y_N + f_U y_U \quad (6.17)$$

Definimos

$$(k_u + k_r) = \lambda \quad (6.18)$$

y es conveniente trabajar con la variable Δy , donde:

$$\Delta y = y - \underline{y} = y_N \Delta f_N + y_U \Delta f_U \quad (6.19)$$

$$\Delta y = (y_N - y_U) \Delta f_N \exp^{-\lambda t} \quad (6.20)$$

$$\Delta y = \Delta y^0 \exp^{-\lambda t} \quad (6.21)$$

donde Δy^0 es el cambio del valor "y" desde $t = 0$ hasta su valor de equilibrio "y". Como se ha mencionado anteriormente, el observable "y" puede representar la señal de elipticidad o la intensidad de fluorescencia. Por ejemplo en el caso de las cinéticas de desplegamiento estudiadas por los cambios en la señal de dicroísmo circular, la ecuación 2.1 de la sección 2.3.3 podría derivarse fácilmente al sustituir $\Delta y = \theta_t - \theta_f$ y $\Delta y^0 = \theta_0 - \theta_f$ en la ecuación 6.21.

La ecuación 6.21 indica que la gráfica de: " $\ln(\Delta y/\Delta y^0)$ vs. t " debe ser lineal donde la pendiente de la recta es independiente de las condiciones iniciales de la propiedad medida.

En este caso el tiempo de relajación (τ) estaría dado por $1/\lambda$. Si se estudia el proceso en condiciones tales que la reacción este muy desplazada hacia la formación de U entonces k_r es insignificante y por lo tanto $\lambda = k_u$ y el tiempo de relajación sería igual a $1/k_u$.

6.2.2 Modelo cinético de tres estados.

Las cinéticas bifásicas se pueden describir mediante el esquema:



Este esquema involucra un intermediario en la ruta entre el estado nativo y el desplegado. Las ecuaciones de velocidad están dadas por (Cantor y Schimmel, 1980):

$$-d[N]/dt = k_{u1}[N] - k_{r1}[I] \quad (6.23)$$

$$d[U]/dt = k_{u2}[I] - k_{r2}[U] \quad (6.24)$$

Análogamente al caso de dos estados, se hacen las manipulaciones y sustituciones necesarias, y se obtienen formas alternativas de las ecuaciones anteriores:

$$-d\Delta f_N/dt = (k_{u1} + k_{r1}) \Delta f_N + k_{r1} \Delta f_U \quad (6.25)$$

$$-d\Delta f_U/dt = k_{u2}\Delta f_N + (k_{u2} + k_{r2}) \Delta f_U \quad (6.26)$$

Las ecuaciones 6.25 y 6.26 son ecuaciones diferenciales simultáneas lineales. La forma general de solución de dichas ecuaciones es asumir que las soluciones son del tipo:

$$\Delta f_N = c \exp^{-\lambda t} \quad (6.27)$$

$$\Delta f_U = c' \exp^{-\lambda t} \quad (6.28)$$

donde c , c' y λ son constantes. Sustituyendo las ecuaciones 6.27 y 6.28 en las ecuaciones 6.25 y 6.26 se obtiene:

$$0 = (k_{u1} + k_{r1} - \lambda) \Delta f_N + k_{r1} \Delta f_U \quad (6.29)$$

$$0 = k_{u2}\Delta f_N + (k_{u2} + k_{r2} - \lambda)\Delta f_U \quad (6.30)$$

Estas ecuaciones simultáneas se resuelven mediante un sistema de determinantes:

$$\begin{vmatrix} k_{u1} + k_{r1} - \lambda & k_{r1} \\ k_{u2} & k_{u2} + k_{r2} - \lambda \end{vmatrix} = 0 \quad (6.31)$$

Al resolver este sistema, se obtienen dos raíces de λ : λ_1 y λ_2 , al sustituirlas en las ecuaciones 6.27 y 6.28, se obtienen 4 constantes: c_1 , c_2 , c_3 y c_4 llegando así a la solución general del sistema:

$$\Delta f_N = c_1 \exp^{-\lambda_1 t} + c_2 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (6.32)$$

$$\Delta f_U = c_3 \exp^{-\lambda_1 t} + c_4 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (6.33)$$

Análogamente al caso sin intermediarios, en condiciones donde el proceso es irreversible;

$$\lambda_1 = k_{u1} \quad (6.34)$$

$$\lambda_2 = k_{u2} \quad (6.35)$$

donde k_{u1} y k_{u2} representan las constantes de velocidad de cada una de las reacciones que se describen en la ecuación 6.22.

Generalmente se mide la propiedad física “y”, cuya dependencia con el tiempo se da por la expresión:

$$\Delta y / \Delta y^\circ = A_1 \exp^{-\lambda_1 t} + A_2 \exp^{-\lambda_2 t} \quad (6.36)$$

donde $A_1 + A_2 = 1$.

6.2.3 Reacción de segundo orden.

La formación de un dímero plegado a partir de sus monómeros desplegados se lleva a cabo a través de una reacción de segundo orden. Cuando se consideran condiciones en las que la reacción está desplazada hacia la formación del dímero, el proceso se puede describir de la siguiente forma:



En tales casos la velocidad puede expresarse como

$$-d[U]/dt = 2k_r[U]^2 \quad (6.38)$$

Separando variables se obtiene

$$dU/[U]^2 = 2k_r dt \quad (6.39)$$

que al integrar da:

$$1/[U] = 2k_r t + c \quad (6.40)$$

donde c es una constante.

Cuando $t = 0$, $U = U_0$, por lo tanto

$$c = 1/[U_0]. \quad (6.41)$$

De ahí se desprende que:

$$[U_0]/[U] = 1/([U_0]2k_r t + 1) \quad (6.42)$$

Considerando las ecuaciones 6.3, 6.17, y 6.19, y al igual que en la sección 6.2.1 se hace uso de las relaciones $\Delta y = \theta_t - \theta_f$ y $\Delta y^0 = \theta_0 - \theta_f$ se puede llegar fácilmente a la ecuación 2.2.

La expresión de la vida media de la reacción ($t_{1/2}$), el tiempo necesario para que desaparezca la mitad del reactivo, puede obtenerse haciendo $U = [U_0]/2$. Entonces $t_{1/2}$ estaría dado por:

$$t_{1/2} = 1/(2 [U_0] k_r) \quad (6.43)$$

La vida media es inversamente proporcional a la constante de velocidad y también es inversamente proporcional a la concentración de U . Este resultado es característico de las reacciones de segundo orden.

6.2.4 Teoría del estado de transición.

El estado de transición o activado para el plegamiento de una proteína se define como una especie intermedia en el proceso que posee una alta energía libre. Se ha propuesto que esta conformación es una forma distorsionada de la forma nativa (Fersht, 1998).

Cuando se conocen las constantes de velocidad a varias temperaturas, los datos pueden analizarse de acuerdo a la ecuación de Eyring, cuya forma logarítmica se escribe:

$$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) - \Delta G^\ddagger/RT, \quad (6.44)$$

o en su forma alternativa

$$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) - \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT \quad (6.45)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, h la constante de Planck, R la constante de los gases y T es la temperatura absoluta; ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger representan la energía libre, la entalpía y entropía de activación respectivamente. Con estos parámetros cinéticos se puede caracterizar energéticamente al estado de transición.

El ΔG^\ddagger representa la barrera de energía libre para que el reactivo llegue al estado activado y de ahí la reacción ocurre espontáneamente. Análogamente el ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger son las diferencias de entalpía y entropía respectivamente, que separan al reactivo de su estado activado.

La variación de los parámetros ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger con la temperatura está dada por:

$$\Delta H^\ddagger = \Delta H^\ddagger_r + \Delta C_p^\ddagger (T - T_r) \quad (6.46)$$

$$\Delta S^\ddagger = \Delta S^\ddagger_r + \Delta C_p^\ddagger \ln(T/T_r) \quad (6.47)$$

donde ΔH_r^\ddagger y ΔS_r^\ddagger representan los parámetros de activación a una temperatura de referencia T_r . Reordenando términos se obtiene la dependencia de la ecuación 6.45 con la temperatura, que tiene la forma (ver ecuación 3.2 de la sección 3.4):

$$\ln(k/T) = A - B(1/T) - (\Delta C_p^\ddagger/R) \ln(1/T) \quad (6.48)$$

Por otro lado los parámetros cinéticos de una reacción se pueden relacionar con los parámetros termodinámicos de la misma, sabiendo que la constante de equilibrio K :

$$K = k_u/k_r \quad (6.49)$$

y considerando que:

$$K = \exp^{(-\Delta G_u/RT)} \quad (6.50)$$

donde ΔG_u es el cambio de energía libre de Gibbs del proceso. La constante de equilibrio también se puede expresar (Castellan, 1987)

$$K = \exp^{\Delta S_u/R} \exp^{-\Delta H_u/RT} \quad (6.51)$$

Análogamente

$$k_u = v \exp^{\Delta S_u^\ddagger/R} \exp^{-\Delta H_u^\ddagger/RT} \quad (6.52)$$

y para la reacción en sentido inverso se expresaría:

$$k_r = v \exp^{\Delta S^\ddagger_r/R} \exp^{-\Delta H^\ddagger_r/RT} \quad (6.53)$$

donde v es el factor preexponencial y los subíndices u y r indican la dirección de cada una de las reacciones. Separando los efectos entálpicos y entrópicos, se obtiene que:

$$\exp^{-\Delta H/RT} = \exp^{-\Delta H^\ddagger_u/RT} / \exp^{-\Delta H^\ddagger_r/RT} \quad (6.54)$$

y de ahí se deduce que:

$$\Delta H = \Delta H^\ddagger_u - \Delta H^\ddagger_r \quad (6.55)$$

Por otra parte, tomando 6.55 y sabiendo que el cambio de capacidad calorífica ΔC_p está definido como:

$$\Delta C_p = \partial \Delta H / \partial T \quad (6.56)$$

es claro que para que el modelo de dos estados sea válido, debe cumplirse que

$$\Delta C_p \approx -\Delta C_p^\ddagger_u + \Delta C_p^\ddagger_r \quad (6.57)$$

Si he visto más lejos es porque estoy
sentado sobre los hombros de gigantes

Isaac Newton.

Capítulo 7: **Referencias bibliográficas**

7 Referencias bibliograficas

- Albery RC, Knowles JR. *Biochemistry*. (1976); 15:5631-5640.
- Alexander P, Orban J, Bryan P. *Biochemistry*. (1992); 31:7243-8.
- Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D. *J Biol Chem*. (1998); 273:2199-206
- Anfinsen CB. *Science* (1973); 181:223-30.
- Arroyo-Reyna A, Hernández-Arana A. *Biochim Biophys Acta*. (1995); 1248:123-8.
- Cantor CR Y Schimmel PR (1980) *Biophysical Chemistry*, parte 3 PP1075 – 1107, WH Freeman, New York NY.
- Castellan GW (1987) *Fisicoquímica*, PP 841-892, Addison Wesley Iberoamericana Mexico
- Chen BL, Baase WA, Schellman JA. *Biochemistry*. (1989); 28:691-9.
- Davenport RC, Bash PA, Seaton BA, Karplus M, Petsko GA, Ringe D. *Biochemistry*. (1991); 30:5821-6.
- Dobson CM, Evans OPA, Radford SE. *Trends Biochem Sci*. (1994). 19:31-7. Review.
- Fersht A. (1998) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman, New York NY.
- Freire E, van Osdol WW, Mayorga OL, Sanchez-Ruiz JM. *Annu Rev Biophys Chem*. (1990); 19:159-88.

-
- Galisteo ML, Mateo PL, Sanchez-Ruiz JM. *Biochemistry*. (1991); 30:2061-6.
 - Gao XG, Garza-Ramos G, Saavedra-Lira E, Cabrera N, De Gómez-Puyou MT, Perez-Montfort R, Gómez-Puyou A. *Biochem J*. (1998); 332:91-6.
 - Garel JR (1992) in *Protein Folding* (Creighton TE, Ed) PP 405-454. W.H. Freeman, New York NY.
 - Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou A. *Eur J Biochem*. (1998); 253:684-91.
 - Gloss LM1, Matthews CR. *Biochemistry*. (1998); 37:15990-9.
 - Goins B, Freire E. *Biochemistry*. (1988); 27:2046-52.
 - Gokhale RS, Ray SS, Balaram H, Balaram P. *Biochemistry*. (1999);38:423-31.
 - Gopal B, Ray SS, Gokhale RS, Balaram H, Murthy MR, Balaram P. *Biochemistry*. (1999) ;38:478-86.
 - Gracy RW (1975) en *Methods in Enzymology*, (Wood WA. Ed) vol 41 PP 422-447- Academic Press. San Digo, CA.
 - Gracy RW, Yuksel KU, Gomez-Puyou A. (1994) en *Deamidation and Isoaspartate Formation in Pptides and Proteins* (Aswad DW Ed) PP 134-152 CRC USA
 - Jackson SE. *Fold Des*. (1998); 3:R81-91. Review.
 - Jackson SE, Fersht AR. *Biochemistry*. (1991);30:10436-43.
 - Jaenicke R, Lilie H. *Adv Protein Chem*. (2000); 53:329-401. Review.
 - Knowles JR. *Nature*. (1991); 350:121-4. Review.
 - Lambeir AM, Opperdoes FR, Wierenga RK. *Eur J Biochem*. (1987); 168:69-74.
 - Lee B, Richards FM. *J Mol Biol*. (1971); 55:379-400.

-
- Lolis E, Petsko GA. *Biochemistry*. (1990); 29:6619-25.
 - López-Arenas L, Solís-Mendiola S, Hernández-Arana A. *Biochemistry*. (1999); 38:15936-43.
 - Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, Frère JM, Mande SC, Hol WG, Martial JA, Goraj K. *J Mol Biol*. (1996); 257:441-56.
 - Mande SC1, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WG. *Protein Sci*. (1994) ;3:810-21.
 - McVittie JD, Esnouf MP, Peacocke AR. *Eur J Biochem*. (1977); 81:307-15.
 - Milardi D, La Rosa C, Grasso D. *Biophys Chem*. (1994); 52:183-9.
 - Milla ME, Sauer RT. *Biochemistry*. (1994); 33:1125-33.
 - Morgan CJ, Wilkins DK, Smith LJ, Kawata Y, Dobson CM. *J Mol Biol*. (2000); 300:11-6.
 - Murphy KP, Freire E. *Adv Protein Chem*. (1992); 43:313-61. Review.
 - Nolting B. (1999) *Protein Folding Kinetics*, PP 44-47, Springer Berlin
 - Norton IL, Hartman FC. *Biochemistry*. (1972); 11:4435-41.
 - Oliveberg M, Fersht AR. *Biochemistry*. (1996); 35:2726-37.
 - Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R. *Eur J Biochem*. (1997); 244:700-5.
 - Pohl FM. *Eur J Biochem*. (1968); 7:146-52.
 - Privalov PL. *Adv Protein Chem*. (1979); 33:167-241. Review.
 - Privalov PL, Gill SJ. *Adv Protein Chem*. (1988); 39:191-234.

-
- Rietveld AW, Ferreira ST. *Biochemistry*. (1998); 37:933-7.
 - Robertson AD, Murphy KP. *Chem Rev*. (1997); 97:1251-1268.
 - Rozacky EE, Sawyer TH, Barton RA, Gracy RW. *Arch Biochem Biophys*. (1971); 146:312-20.
 - Sanchez-Ruiz JM. *Biophys J*. (1992); 61:921-35.
 - Schliebs W1, Thanki N, Eritja R, Wierenga R. *Protein Sci*. (1996); 5:229-39.
 - Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. *Biochemistry*. (1997); 36:9655-62.
 - Segawa S, Sugihara M. *Biopolymers*. (1984); 23:2473-88.
 - Solís-Mendiola S, Gutiérrez-González LH, Arroyo-Reyna A, Padilla-Zúñiga J, Rojo-Domínguez A, Hernández-Arana A. *Biochim Biophys Acta*. (1998); 1388:363-72.
 - Spolar RS, Livingstone JR, Record MT Jr. *Biochemistry*. (1992); 31:3947-55.
 - Sreerama N, Woody RW. *Anal Biochem*. (1993); 209:32-44.
 - Sun J, Sampson NS. *Biochemistry*. (1999); 38:11474-81
 - Tello-Solis SR, Hernandez-Arana A. *Biochem J*. (1995) ; 311:969-74.
 - Vázquez-Contreras E, Zubillaga RA, Mendoza-Hernández G, Costas M, Fernández-Velasco DA. *Protein and Peptide Letters*. (2000); 7:57-64.
 - Zabori S, Rudolph R, Jaenicke R. *Z Naturforsch C*. (1980); 35:999-1004.



Casa abierta al tiempo

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DESIGNACIÓN DE LA TESIS

MECANISMO DEL DESPLEGAMIENTO Y REPLEGAMIENTO TERMICOS DE LA ENZIMA DIMERICA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE LEVADURA

En México, D.F. se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de JULIO del año 2001 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU;
DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO;
DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA;
DR. ABEL MORENO CARCAMO Y
DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron para proceder al Examen de Grado de

Doctora en: CIENCIAS



CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA

presentó una tesis producto de una investigación original cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, IV y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

APROBARLA

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISOR

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

DRA. MARIA JOSE ARROYO PANIAGUA
DIRECTORA DE DIVISION

PRESIDENTE

DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU

VOCAL

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO

VOCAL

DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

VOCAL

DR. ABEL MORENO CARCAMO

SECRETARIO

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA