

03081
5
2eje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades - Sede Instituto de Fisiología
Celular

**EL AGUA EN LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS
ENZIMAS:**

**Catálisis, Estabilidad y Renaturalización en sistemas de bajo
contenido de agua.**

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Investigación Biomédica
Básica (Orientación Bioquímica)

Presenta

Georgina Regina Garza Ramos Martínez

México, D. F., Marzo de 1994.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Existe un gran número de trabajos en los que se describe catálisis enzimática en solventes orgánicos. Fundamentalmente han surgido dos enfoques experimentales para estudiar a las enzimas en sistemas en los cuales un solvente orgánico es el componente principal. En uno se estudian las propiedades de enzimas liofilizadas a distintos grados de hidratación, la cuales se suspenden directamente en un solvente orgánico apolar. En el otro, las enzimas disueltas en agua se solubilizan en el interior acuoso de una micela invertida. Las enzimas en solventes orgánicos con cantidades restringidas de agua generalmente muestran actividades mucho menores que en sistemas totalmente acuosos; sin embargo, aumentan considerablemente su termoestabilidad. Se propone que en un espacio de agua limitante se restringen las interacciones entre la proteína y el medio que la rodea, haciendo que la flexibilidad conformacional que se requiere para la catálisis disminuya.

Nosotros hemos utilizado el sistema de micelas invertidas para estudiar el papel del agua y/o del solvente en la catálisis enzimática y en la estabilidad funcional y estructural de algunas enzimas. Aprovechando las ventajas que ofrece este sistema se estudió el efecto del agua en dos procesos biológicos fundamentales:

I) La reactivación y asociación entre subunidades de la triosafosfato isomerasa (TPI). En este trabajo se caracterizó la reactivación de la TPI en micelas invertidas formadas por el detergente catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio, hexanol y octano. La enzima desnaturalizada en una solución de cloruro de guanidina se transfirió al sistema de micelas invertidas, diluyendo al desnaturalizante 100 veces. En condiciones óptimas se recupera el 100 % de la actividad enzimática. La velocidad de reactivación aumenta con la concentración de proteína, lo cual indica que la catálisis depende de la formación del dímero. Se encontró que la reactivación depende del contenido de agua en el sistema. A concentraciones de agua menores a 3.5 % (v/v) se recupera menos del 20 % de la actividad, debido a la formación inmediata de estructuras inactivas estables.

II) La desamidación de la TPI en sistemas de bajo contenido de agua. La desamidación específica de la Asn71 en la TPI se estimula por la unión del sustrato y la catálisis. La desamidación de esta asparagina es uno de los primeros eventos en la disociación, la desnaturalización y la degradación de la proteína. En este trabajo se estudió la relación entre la velocidad de recambio de la TPI de conejo y su desamidación. La enzima se transfirió al sistema de micelas invertidas con diferentes cantidades de agua para regular su velocidad catalítica y se cuantificó el grado de desamidación. Los resultados muestran que la desamidación fué mayor en la enzima con un menor número de recambio catalítico. Esto implica que todos o algunos pasos del ciclo catalítico tienen un tiempo de vida más grande; por tanto, la velocidad de desamidación no solo depende del número de ciclos catalíticos, sino que también se relaciona con el tiempo en el cual la Asn71 se encuentra en una conformación o en un ambiente más favorable para desamidarse.

Vo.Bo.

A. Gómez Puyou
Dr. Armando Gómez-Puyou

ABSTRACT

A considerable amount of work has accumulated on the behavior of enzymes in system formed predominantly with organic solvents. The studies have been carried out with enzymes dispersed in the solvent or entrapped in the interior of reverse micelles. One of the salient features of enzymes in either of the two conditions is that, when they are in contact with low amounts of water, they exhibit a high thermostability and low catalytic rates. It has been proposed that these two phenomena result from restrictions in enzyme conformational mobility as imposed by the low-water environment.

Due to their unique characteristics, reverse micelles provide a useful system to circumvent fundamental problems of enzymology that in conventional water systems, are difficult to approach. In this work, we utilized reverse micelles to characterize:

I) The dimerization and reactivation of dimeric triosephosphate isomerase (TPI). The enzyme was denatured in conventional aqueous mixtures with guanidine hydrochloride and transferred to reverse micelles. Under optimal reactivation conditions, 100 % of the enzyme activity could be recovered. The rate of appearance of the catalytic activity increased with the concentration of protein. This indicated that catalysis required the formation of the dimer and that the rate limiting step was formation of active dimers from monomers. Reactivation critically depended on the amount of water in the reverse micelles. The plot of the extent of reactivation versus the amount of water (2.5-7.0 %) was markedly sigmoidal. The results indicate that reverse micelles provide a useful system to probe events involved in the transformation of unfolded monomers to polymeric enzymes.

II) The deamidation of TPI in reverse micelles with different water contents. The specific deamidation of asparagine-71 of TPI increases upon substrate binding and catalysis. This deamidation at the dimer interface initiates subunit dissociation, unfolding and protein degradation. In order to further explore the phenomenon, TPI was entrapped in reverse micelles with different water contents that support different catalytic rates. The deamidation was quantified and correlated with the catalytic turnover. Both in 100 % water and reverse micelles with 3 % and 6 % water, substrate binding enhanced deamidation. The studies described here show that as the rate of catalysis is diminished by low water, deamidation is increased. However, at very low water concentrations in which catalysis is hardly detectable, deamidation is prevented. At these low water concentrations, TPI exhibits a high thermostability and resistance to covalent modification. The data suggest that the rate of deamidation is not only dependent on the number of catalytic events, but is also related to the time that asparagine-71 exist in a conformation or solvent environment more favorable for deamidation.

Vo.Bo.

Dr. Armando Gómez-Puyou

A. Gómez Puyou

A FEDRO

(con más amor)

A MIS PAPAS Y MIS HERMANOS

Este trabajo se realizó con la asesoría del Dr. Armando Gómez-Puyou, en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Y con la colaboración del Dr. Robert W. Gracy y el Dr. Ümit Yuksel, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Texas College of Osteopathic Medicine, Texas, U.S.A.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial agradezco al Dr. Armando Gómez-Puyou y la Dra. Marietta Tuena por haberme enseñado lo apasionante de este camino, por brindarme un sitio único para trabajar y por su apoyo incondicionales.

A los doctores: Ruy Perez Montfort, Antonio Peña Dfáz, Alberto Darszon Israel, Diego González Halphen, Alicia González M. y Georges Dreyfus Cortés, por sus valiosos comentarios y sugerencias a este trabajo.

A Lety, Alejandro, José, Rafael, Liora, Pachis y demás miembros del laboratorio 104 y 105. Gracias por todo.

A Eduardo Garza Ramos por su ayuda computacional.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Interacciones agua-proteína	4
Enzimas en Solventes Orgánicos	10
- Sistema de Micelas Invertidas	11
- Catálisis Enzimática en Micelas Invertidas	14
Efecto del agua en la estabilidad y la actividad de las enzimas en solventes orgánicos	17
- Agua y termoestabilidad	18
Efecto de los desnaturalizantes en la catálisis enzimática	21
Estabilización de Intermediarios catalíticos en los sistemas de bajo contenido de agua	25
Estudio del papel del agua en la desnaturalización y renaturalización de las proteínas	27
Triosafosfato Isomerasa	28
- Estructura y función de la TPI	30
- Plegamiento y asociación de la triosafosfato isomerasa	33
- Desamidación de la triosafosfato isomerasa	35
Objetivo	39
Resultados	
I) Efecto del agua en la reactivación y asociación entre subunidades de la triosafosfato isomerasa	40
II) Desamidación de la TPI en sistemas de bajo contenido de agua	41
Discusión	42
Referencias	47

RESUMEN

Existe un gran número de trabajos en los que se describe catálisis enzimática en solventes orgánicos. Fundamentalmente han surgido dos enfoques experimentales para estudiar a las enzimas en sistemas en los cuales un solvente orgánico es el componente principal. En uno se estudian las propiedades de enzimas liofilizadas a distintos grados de hidratación, las cuales se suspenden directamente en un solvente orgánico apolar. En el otro, las enzimas disueltas en agua se solubilizan en el interior acuoso de una micela invertida. Las enzimas en solventes orgánicos con cantidades restringidas de agua generalmente muestran actividades mucho menores que en sistemas totalmente acuosos; sin embargo, aumentan considerablemente su termoestabilidad. Se propone que en un espacio de agua limitante se restringen las interacciones entre la proteína y el medio que la rodea, haciendo que la flexibilidad conformacional que se requiere para la catálisis disminuya.

Nosotros hemos utilizado el sistema de micelas invertidas para estudiar el papel del agua y/o del solvente en la catálisis enzimática y en la estabilidad funcional y estructural de algunas enzimas. Aprovechando las ventajas que ofrece este sistema se estudió el efecto del agua en dos procesos biológicos fundamentales:

I) La reactivación y asociación entre subunidades de la triosafosfato isomerasa (TPI). En este trabajo se caracterizó la reactivación de la TPI en micelas invertidas formadas por el detergente catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio, hexanol y octano. La enzima desnaturalizada en una solución de cloruro de guanidina se transfirió al sistema de micelas invertidas, diluyendo al desnaturalizante 100 veces. En condiciones óptimas se recupera el 100 % de la actividad enzimática. La velocidad de reactivación aumenta con la concentración de proteína, lo cual indica que la catálisis depende de la formación del dímero. Se encontró que la reactivación depende del contenido de agua en el sistema. A concentraciones de agua menores a 3.5 % (v/v) se recupera menos del 20 % de la actividad, debido a la formación inmediata de estructuras inactivas estables.

II) La desamidación de la TPI en sistemas de bajo contenido de agua. La desamidación específica de la Asn71 en la TPI se estimula por la unión del sustrato y la catálisis. La desamidación de esta asparagina es uno de los primeros eventos en la disociación, la desnaturalización y la degradación de la proteína. En este trabajo se estudió la relación entre la velocidad de recambio de la TPI de conejo y su desamidación. La enzima se transfirió al sistema de micelas invertidas con diferentes cantidades de agua para regular su velocidad catalítica y se cuantificó el grado de desamidación. Los resultados muestran que la desamidación fué mayor en la enzima con un menor número de recambio catalítico. Esto implica que todos o algunos pasos del ciclo catalítico tienen un tiempo de vida más grande; por tanto, la velocidad de desamidación no solo depende del número de ciclos catalíticos, sino que también se relaciona con el tiempo en el cual la Asn71 se encuentra en una conformación o en un ambiente más favorable para desamidarse.

ABSTRACT

A considerable amount of work has accumulated on the behavior of enzymes in system formed predominantly with organic solvents. The studies have been carried out with enzymes dispersed in the solvent or entrapped in the interior of reverse micelles. One of the salient features of enzymes in either of the two conditions is that, when they are in contact with low amounts of water, they exhibit a high thermostability and low catalytic rates. It has been proposed that these two phenomena result from restrictions in enzyme conformational mobility as imposed by the low-water environment.

Due to their unique characteristics, reverse micelles provide a useful system to circumvent fundamental problems of enzymology that in conventional water systems, are difficult to approach. In this work, we utilized reverse micelles to characterize:

I) The dimerization and reactivation of dimeric triosephosphate isomerase (TPI). The enzyme was denatured in conventional aqueous mixtures with guanidine hydrochloride and transferred to reverse micelles. Under optimal reactivation conditions, 100 % of the enzyme activity could be recovered. The rate of appearance of the catalytic activity increased with the concentration of protein. This indicated that catalysis required the formation of the dimer and that the rate limiting step was formation of active dimers from monomers. Reactivation critically depended on the amount of water in the reverse micelles. The plot of the extent of reactivation versus the amount of water (2.5-7.0 %) was markedly sigmoidal. The results indicate that reverse micelles provide a useful system to probe events involved in the transformation of unfolded monomers to polymeric enzymes.

II) The deamidation of TPI in reverse micelles with different water contents. The specific deamidation of asparagine-71 of TPI increases upon substrate binding and catalysis. This deamidation at the dimer interface initiates subunit dissociation, unfolding and protein degradation. In order to further explore the phenomenon, TPI was entrapped in reverse micelles with different water contents that support different catalytic rates. The deamidation was quantified and correlated with the catalytic turnover. Both in 100 % water and reverse micelles with 3 % and 6 % water, substrate binding enhanced deamidation. The studies described here show that as the rate of catalysis is diminished by low water, deamidation is increased. However, at very low water concentrations in which catalysis is hardly detectable, deamidation is prevented. At these low water concentrations, TPI exhibits a high thermostability and resistance to covalent modification. The data suggest that the rate of deamidation is not only dependent on the number of catalytic events, but is also related to the time that asparagine-71 exist in a conformation or solvent environment more favorable for deamidation.

INTRODUCCION

En el contexto de la Bioquímica clásica, no es común un enfoque que presente a las enzimas catalizando en un medio no acuoso, formado principalmente por solventes orgánicos. La adición de solventes orgánicos a una proteína suele emplearse para su precipitación o para estudiar su desnaturalización. Sin embargo, el estudio de la acción de una enzima en solventes orgánicos es un aspecto reciente de la enzimología, que se ha desarrollado en los últimos años debido a su gran variedad de aplicaciones.

La catálisis enzimática en solventes orgánicos ofrece la posibilidad de llevar a cabo transformaciones químicas que en un medio acuoso tienen impedimentos cinéticos o termodinámicos. La eficiencia de algunas reacciones, como la síntesis de los enlaces amida por las enzimas proteolíticas, se puede incrementar considerablemente si la reacción se lleva a cabo en un medio no acuoso (Gupta, 1992). Otra característica de las enzimas en solventes orgánicos es que pueden transformar sustratos orgánicos, insolubles en agua (Klibanov, 1986; Laane *et al.*, 1987; Dordick, 1989).

Por otro lado, el agua participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes que mantienen la conformación nativa de una proteína (Kauzmann, 1959), así como en las reacciones que conducen a la pérdida irreversible de la actividad enzimática y estructura nativa de la proteína (Ahern y Klibanov, 1985). En un solvente orgánico con cantidades restringidas de agua, la estabilidad y la termoestabilidad de una enzima puede aumentar considerablemente (Zaks y Klibanov, 1984; Klibanov, 1986; Gupta, 1991; Zaks, 1992).

Nuestro interés principal es caracterizar el papel del agua en la regulación de la función y estructura de las enzimas. Los sistemas de bajo contenido de agua que tienen un solvente orgánico como componente principal, permiten modular el contenido y las propiedades del agua que rodea a una enzima. En este trabajo se investigó si el medio en el que se encuentran las enzimas puede modificar su comportamiento y algunas de sus propiedades.

INTERACCIONES AGUA-PROTEINA

Las proteínas en su ambiente nativo son sistemas dinámicos cuya estructura fluctúa alrededor de la conformación cinética y termodinámica más estable (Levitt y Chothia, 1976; Gruetter *et al.*, 1979). La geometría particular de una cadena polipeptídica plegada está determinada por una disminución en la energía libre debida a la contribución de las interacciones intramoleculares de los grupos de la proteína y del solvente. Cuando la energía libre de solvatación disminuye, algunos residuos se secuestran de la fase acuosa, mientras que otros se exponen a ésta, por tanto, las propiedades del solvente y sus alteraciones afectan la estabilidad de la estructura macromolecular nativa (Jaenicke, 1981).

El agua participa en las interacciones no covalentes que estabilizan la conformación nativa de una proteína y mantienen catalíticamente activa a una enzima, i.e. puentes de hidrógeno, efecto hidrofóbico, interacciones de Van der Waals y pares iónicos (Kauzmann, 1959; Saenger, 1987). También es importante señalar que la actividad biológica requiere de continuos ajustes conformacionales en la proteína, es decir, de la flexibilidad conformacional de los grupos funcionales, segmentos de cadenas y dominios de la proteína, ya que estos participan en la unión del sustrato al sitio catalítico y en los distintos pasos del ciclo catalítico (Brooks y Karplus, 1989; Jaenicke, 1991). Esto se infiere de múltiples experimentos que demuestran que los movimientos que se dan durante el ciclo catalítico se acompañan de rearrreglos continuos de las moléculas de agua que interactúan con distintos grupos de la proteína (Holbrook *et al.*, 1975; Quioco *et al.*, 1989; Joseph *et al.* 1990).

Se han realizado varios estudios encaminados a determinar cómo el proceso de hidratación afecta la conformación y la flexibilidad de una proteína, así como a explorar el papel del agua en la aparición de la actividad enzimática. Careri y cols (1980), Rupley y cols (1983) y Finney y Poole (1984) estudiaron el proceso de hidratación de la lisozima, mediante técnicas de espectroscopía de infrarrojo (IR), resonancia paramagnética del electrón (EPR), resonancia magnética nuclear (NMR) y mediciones de la capacidad calorífica y actividad enzimática se demostró que el proceso de hidratación de esta enzima involucra tres estados bien definidos:

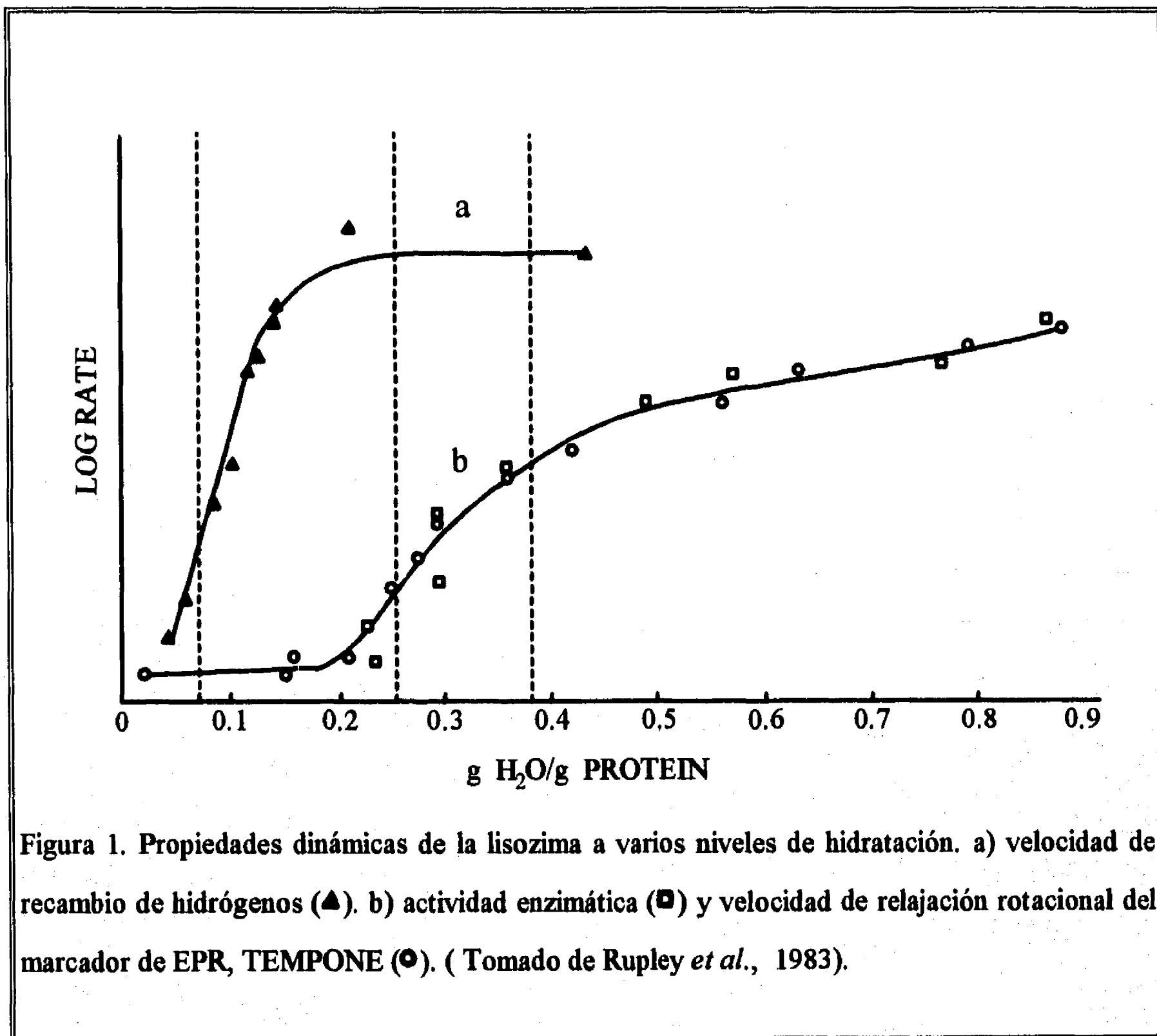
- de 0 a 0.07 g de agua/g de proteína (h), el agua produce la hidratación de los grupos cargados de la proteína, seguida de la de los grupos polares. En la proteína existe una redistribución de protones en los residuos ácidos y básicos (se restaura su pK normal).
- entre 0.07 y 0.25 h se forman agrupamientos de moléculas de agua que saturan los sitios polares remanentes. En la proteína se observan cambios conformacionales de las cadenas laterales y del esqueleto polipeptídico. Entre 0.2 y 0.25 h aparece la actividad enzimática.
- de 0.25 a 0.38 h se hidratan los grupos de la superficie que interactúan débilmente con el agua; ésta satura los grupos -NH- y -CO- del enlace peptídico. Ocurre la condensación y rearrreglo de la estructura del agua. A 0.38 h la lisozima queda cubierta por una monocapa de moléculas de agua, que corresponde a 300 moléculas de agua/molécula de lisozima.

Cuando la proteína alcanza este nivel de hidratación (0.38 h) y está completamente hidratada, sus propiedades termodinámicas, como volumen, capacidad calorífica y entalpía tienen valores semejantes a los obtenidos en solución (Schinkel *et al.*, 1985). Con respecto a las propiedades del agua, se encontró que el agua unida incrementa su movilidad entre 0.2 y 0.3 g/g de proteína (Bone y Pethig, 1982). De manera similar al comportamiento de la proteína, en este punto de hidratación, las propiedades dinámicas y termodinámicas del solvente en la interfase difieren muy poco de las del agua en solución o agua "bulto".

La actividad catalítica de la lisozima se midió a varios niveles de hidratación y simultáneamente se midió la velocidad de relajación rotacional de un marcador de EPR, TEMPONE, que se une a la enzima de manera no covalente en función del grado de hidratación (Rupley *et al.*, 1983). Los resultados muestran que el incremento en la actividad se acompaña de un aumento en la movilidad del marcador de EPR (Figura 1). Estos resultados sugieren que se requiere cierto grado de flexibilidad antes de que la lisozima pueda manifestar su actividad, esta flexibilidad es necesaria para la catálisis y está dada por las interacciones de la proteína con el agua.

Uno de los aspectos más relevantes de estos trabajos es que no se requiere de la hidratación completa de la proteína para que la actividad enzimática ocurra. Se observó catálisis a partir de 0.2 g de agua/g de proteína, condiciones en las cuales la lisozima tiene aproximadamente la mitad

de las moléculas de agua que se requieren para cubrir su superficie (Finney y Poole, 1984). En estudios posteriores sobre la relación entre la hidratación de la lipasa pancreática, la α -lactoalbúmina y la ribonucleasa A y la actividad enzimática, también se observó actividad catalítica a niveles de hidratación en los cuales no se ha completado una monocapa de agua (Hwang y Arnold, 1991).



El conjunto de estos resultados puede explicar el papel molecular del agua para sostener los cambios conformacionales y aumentar la flexibilidad de las proteínas. La penetración del solvente

al interior de la proteína hace que el agua compita con los péptidos en la formación de los puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno que se establecen entre el agua y los péptidos tienen energías semejantes a los enlaces de hidratación internos de la proteína; ésto hace que se establezca un equilibrio dinámico: agua-proteína \leftrightarrow proteína-proteína, el cual es necesario en la flexibilidad proteica (Bone y Pethig, 1985).

El hecho de que el agua confiera flexibilidad a las proteínas, no determina qué tan flexibles sean a nivel de sus movimientos intramoleculares. En la actualidad, por medio de estudios de dinámica molecular es posible determinar la movilidad de los átomos de la proteína en sus posiciones al equilibrio (Karplus y McCammon, 1983). En algunos de estos estudios se han incorporado los efectos del solvente, sin embargo, las técnicas actuales tienen limitaciones computacionales y en las simulaciones se considera como un todo la dinámica de la proteína y la del solvente unido a la superficie por interacciones de van der Waals. El análisis comparativo de los movimientos atómicos del inhibidor de la tripsina pancreática de bovino, BPTI al vacío y en presencia de solvente (Swaminathan *et al.*, 1983), sugiere que las fluctuaciones atómicas en la proteína se deben a oscilaciones locales que se sobreponen a movimientos colectivos. Las oscilaciones locales tienen escalas de tiempo menores a 1 picosegundo y tienden a ser uniformes a lo largo de la estructura de la proteína, los movimientos colectivos implican movimientos cooperativos de los grupos de átomos y tienen escalas de tiempo más largas (≥ 10 ps). Estos últimos se pueden trasladar a diferentes partes de la proteína y se piensa que son los más sensibles al solvente y a otro tipo de factores externos. En otro trabajo realizado con la ribonucleasa T1 (MacKerell *et al.*, 1988), la simulación de la dinámica molecular considera los efectos del solvente y los puentes de hidrógeno. Los resultados indican que el solvente incrementa los movimientos colectivos tanto de la superficie como del interior de la proteína. El incremento en estas fluctuaciones se atribuye al rompimiento de los puentes de hidrógeno entre grupos de la proteína y a la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas del agua y la proteína.

Efecto del agua en las interacciones que estabilizan a las proteínas

Como se mencionó anteriormente, las propiedades dinámicas y termodinámicas de la lisozima y del agua unida a ella, alcanzan sus valores en solución a niveles de hidratación de 0.38 g de agua/g de proteína (Schinkel *et al.*, 1985). Aparentemente el agua en exceso en una solución de proteína diluye al sistema sin tener ninguna contribución extra en la energía de interacción con la proteína. Esta agua se puede remover de la proteína sin que se alteren sus propiedades termodinámicas y su conformación catalíticamente activa. Por el contrario si se remueve el agua unida o "esencial" de una proteína se tendrá un efecto sobre las interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas y de van der Waals que estabilizan la conformación plegada de una proteína (Zaks, 1992).

El efecto hidrofóbico es el factor más importante que contribuye a la estabilidad global de una proteína (Kauzmann, 1959; Tanford, 1980; Dill, 1990). La solvatación de un compuesto hidrofóbico disminuye la entropía del solvente que lo rodea, debido a que se incrementa su orden local (Privalov y Gill, 1988). En las proteínas este cambio de entropía se evita porque las cadenas laterales de los aminoácidos no polares se acomodan en la región hidrofóbica, donde el contacto entre ellas minimiza su interacción con el solvente. Si se remueve el agua de la superficie de una molécula de proteína, se disminuye la contribución del efecto hidrofóbico y se desplaza el equilibrio hacia el estado desdoblado por lo tanto se desestabiliza a la proteína (Zaks, 1992).

El cambio en la cantidad de agua en contacto con la proteína puede cambiar las energías de los estados plegado y desplegado. Al remover el agua unida a la proteína se disminuye el número total de puentes de hidrógeno intermoleculares entre las moléculas de agua y las de proteína. Sin embargo este efecto puede ser más dramático en el estado desplegado de la proteína, el cual está más solvatado y sus interacciones más importantes son los puentes de hidrógeno intermoleculares de la proteína y el agua en solución. Por lo que al quitar el agua unida de la proteína se estabilizaría preferencialmente la conformación plegada (Zaks, 1992).

Se suele aceptar que las interacciones electrostáticas en una proteína se estabilizan debido a que el interior de la proteína se comporta como un dieléctrico con una constante baja, así como

también por efectos entrópicos asociados al solvente (Kauzmann, 1959). Si se quita el agua alrededor de la proteína se puede reducir la contribución del factor entrópico a la estabilización global del estado plegado. Rashin y Honig (1984), calcularon que aproximadamente el 20 % de los grupos cargados internos, protegidos del solvente, no forman pares iónicos y están solvatados formando puentes de hidrógeno con moléculas de agua internas. Sin embargo, al remover el agua, se pueden exponer estas cargas y desestabilizar la conformación plegada. Este efecto desestabilizante se puede contrarrestar si el agua se substituye por un medio con una constante dieléctrica baja, en el cual las interacciones electrostáticas se favorezcan.

Todos los estudios existentes señalan que el agua desempeña un papel fundamental en la estabilización de la estructura tridimensional de una proteína, determina la conformación local de los residuos expuestos y confiere a la proteína la flexibilidad necesaria para desempeñar su función biológica. Esto ha llevado a estudiar cuál es el comportamiento de las enzimas en condiciones en que la flexibilidad está restringida y si el agua se puede substituir por solventes que incrementen la flexibilidad proteica.

ENZIMAS EN SOLVENTES ORGANICOS

Existe en la literatura un gran número de trabajos en los que se observa catálisis enzimática en solventes orgánicos. Aunque en estos medios de reacción el agua no es el componente más abundante, se ha encontrado que las enzimas requieren de una cantidad definida de agua para que sean catalíticamente activas. Las enzimas en solventes orgánicos con cantidades restringidas de agua pueden mostrar características iguales o muy diferentes a aquellas que se observan en soluciones totalmente acuosas; esto dependerá de las características y de la cantidad de agua que se añade al sistema.

Fundamentalmente han surgido dos enfoques experimentales para abordar el estudio de las enzimas en un solvente orgánico (Figura 2). En uno de éstos se estudian las propiedades de enzimas liofilizadas a distintos grados de hidratación, las cuales se suspenden directamente en un solvente orgánico apolar (Zaks y Klibanov, 1984). En el otro, las enzimas disueltas en agua se solubilizan en el interior acuoso de una micela invertida (Luisi y Magid, 1986; Martinek *et al.*, 1986). En ambos sistemas, el principal componente es un solvente orgánico apolar. Existen diferencias importantes en las propiedades fisicoquímicas y en el arreglo estructural que adquiere la enzima en los dos sistemas.

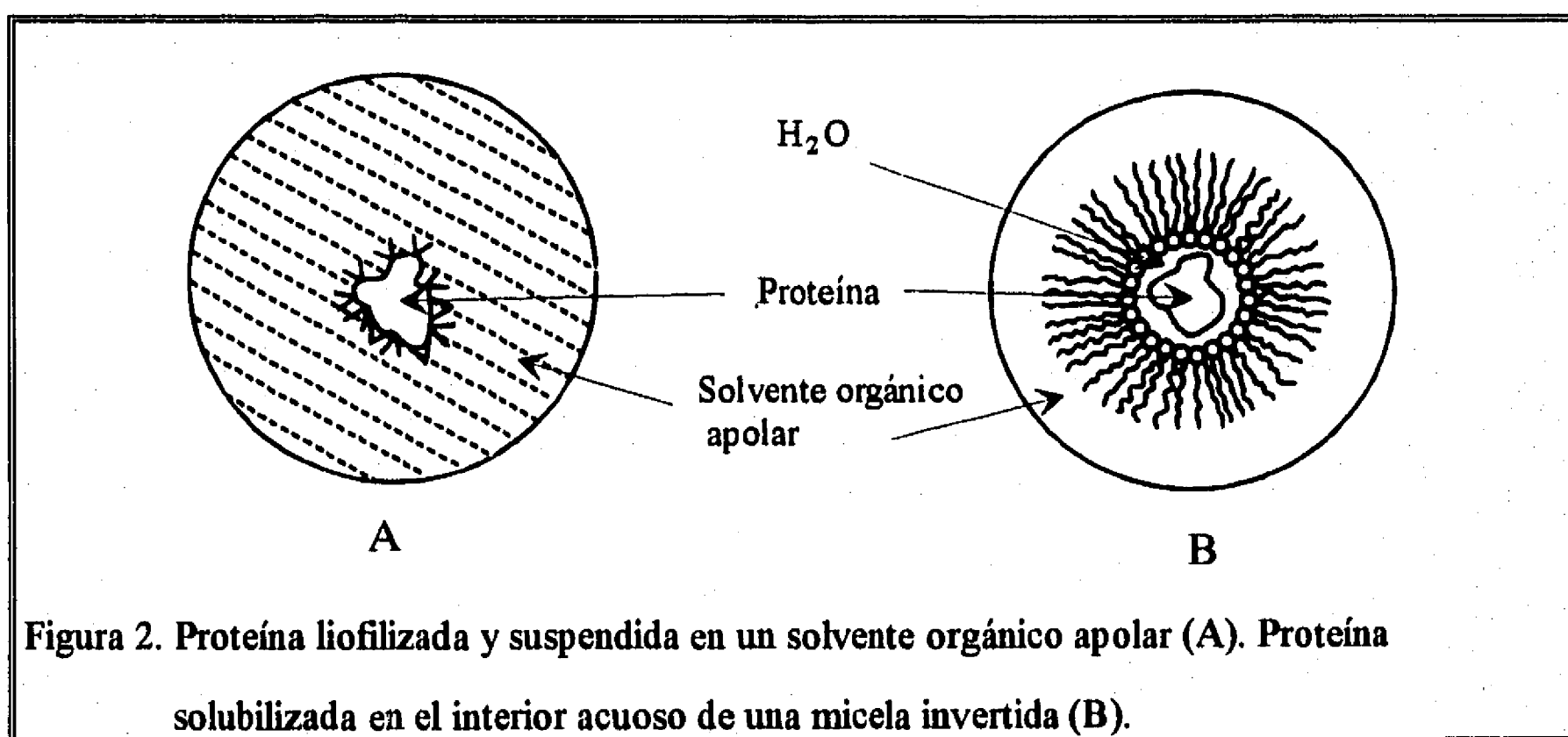


Figura 2. Proteína liofilizada y suspendida en un solvente orgánico apolar (A). Proteína solubilizada en el interior acuoso de una micela invertida (B).

Sistema de Micelas Invertidas

Una mezcla de surfactante (detergente o fosfolípido), agua y solvente orgánico apolar en un amplia área de los diagramas de fase, puede formar soluciones isotrópicas, transparentes y fluidas, llamadas microemulsiones o micelas invertidas (Ekwall *et al.*, 1970). Estas consisten en agregados esféricos de agua que se dispersan en el solvente apolar y se estabilizan por una capa interfacial de uno ó más surfactantes anfifílicos (Barbaric y Luisi, 1981; Martinek *et al.*, 1981). Las cabezas polares del surfactante se orientan espontáneamente hacia el interior acuoso, mientras que sus cadenas hidrofóbicas están en contacto con el solvente orgánico.

Las propiedades de las micelas invertidas dependen de las características de sus componentes, *i.e.* surfactante, solvente orgánico y agua. Los surfactantes o compuestos anfifílicos son moléculas que poseen dos grupos que difieren en sus relaciones de solubilidad: un grupo hidrofílico soluble en agua, que puede ser, $-\text{OH}$, $-\text{CO}_2\text{Na}$, $-\text{SO}_3\text{K}$, $-\text{NMe}_3\text{Br}$, $-\text{O}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$ y un grupo lipofílico, soluble en hidrocarburos como $-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, $-\text{C}_{17}\text{H}_{33}$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_2\text{CCH}-\text{CH}_2-\text{CO}_2-\text{C}_8\text{H}_{17}$. Cada tipo de surfactante posee un balance hidrofílico-lipofílico (H-L-B) particular, que depende de cual de las funciones en la molécula predomina. Para la formación de micelas invertidas y la solubilización de agua e hidrocarburos, los mejores surfactantes son aquellos en los que ambas funciones, la del grupo hidrofílico y la del grupo lipofílico, son fuertes (Douzou, 1980) (Tabla I).

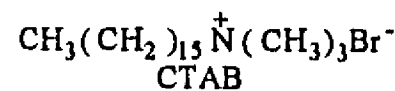
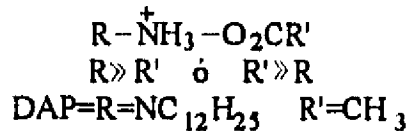
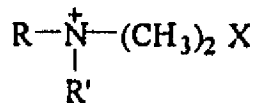
Se ha estudiado una gran cantidad de solventes apolares en los cuales es posible la formación espontánea de micelas; algunos ejemplos son: el n-octano, el n-hexano, el n-heptano, también el benceno, el tetracloroetileno, el tetracloruro de carbono, el éter dietílico o combinaciones de algunos de ellos (Douzou, 1980; Luisi y Magid, 1986; Martinek *et al.*, 1986). El número de agregación de las micelas invertidas depende del tipo de solvente que se utilice.

Las moléculas de surfactante se asocian en el solvente, como consecuencia de interacciones de tipo dipolo-dipolo y pares iónicos entre los anfifílicos (Fendler, 1982). La agregación de estas moléculas en el solvente sigue un comportamiento muy complejo. Se ha sugerido que la presencia de agua, al menos en cantidades de traza es un prerequisite para que un surfactante se

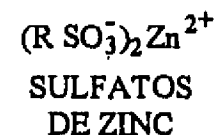
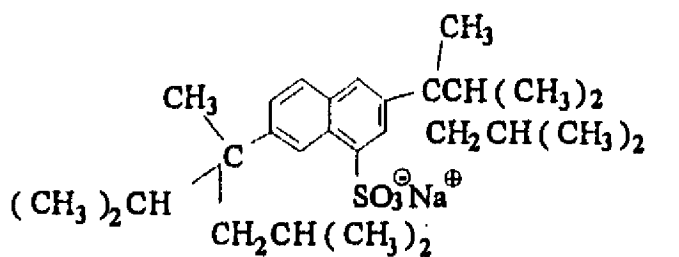
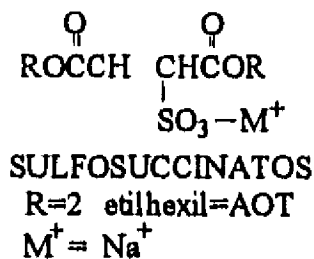
TABLA I

CLASES DE SURFACTANTES QUE FORMAN AGREGADOS EN SOLVENTES APOLARES

I) CATIONICOS

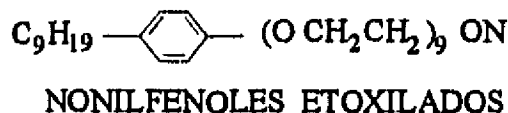
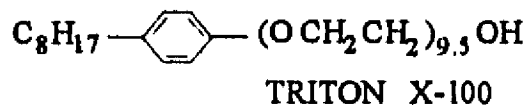


II) ANIÓNICOS

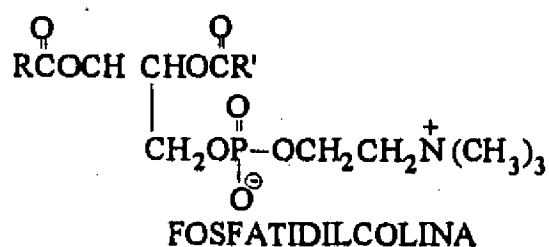


DINONILNAFTALENOSULFONATO DE SODIO

III) NO IÓNICOS



IV) ZWITTERIÓNICOS



agregue en el solvente (Eicke y Christen, 1978)). Las interacciones y el tamaño de los agregados en un medio no polar dependen del tipo y la concentración del surfactante, así como también de la naturaleza del solvente y del ion que acompaña al detergente (Fabre *et al.*, 1981; Fendler, 1982). La adición de agua al sistema, tiene un efecto dramático en la agregación. Esta incrementa el número promedio y el tamaño del centro acuoso de las micelas (Eicke y Christen, 1978). Se sabe también que los cambios en la concentración de los componentes y la temperatura, alteran la forma micelar y su equilibrio múltiple. Esto hace que las micelas tengan un carácter estadístico y que se consideren como estructuras dinámicas que pueden disociarse y asociarse rápidamente.

Una de las características más atractivas de estos sistemas es que el tamaño del centro acuoso está determinado por la relación molar [agua]/[surfactante] o W_o . De esta manera, manteniendo una concentración constante de surfactante, el tamaño de la micela depende de la cantidad de agua en el sistema. Se calcula que el interior acuoso de las micelas invertidas puede tener un diámetro entre 10 y 200 Å (Barden y Holt, 1978; Maitra, 1984). Una enzima hidrofílica se acomoda preferentemente en el espacio acuoso de la micela (Kabanov *et al.*, 1988; Bru *et al.*, 1989), por lo que al variar el W_o se puede aumentar o disminuir la cantidad de agua que la rodea.

Otra característica importante de estos sistemas es que al variar el W_o se modifican las propiedades del agua que forma la cavidad acuosa de la micela (Menger *et al.*, 1973; Kumar y Balasubramanian, 1980; Tsujii *et al.*, 1983). Utilizando técnicas como espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) para analizar la movilidad de los protones del agua, por desplazamiento químico y tiempo de relajación del spin, se demostró que a un $W_o < 6$, el agua existe prácticamente como agua unida. Su movilidad aumenta con el contenido de agua en el sistema micelar (Wong *et al.*, 1977). Dependiendo del contenido de agua en el sistema, es decir del W_o , se pueden variar la polaridad, la constante dieléctrica, la microviscosidad, la actividad y el potencial para formar puentes de hidrógeno de las moléculas de agua en la cavidad acuosa de la micela (Gallay *et al.*, 1987).

Cuando una proteína se transfiere a un sistema de micelas invertidas se altera el equilibrio del sistema, y como consecuencia se produce una redistribución de las moléculas del detergente y de las moléculas del agua alrededor de la proteína. Se han propuesto distintos modelos para representar el arreglo de las proteínas en el interior de la micela. En el caso de las enzimas hidrofílicas, éstas se acomodan en el interior acuoso de la micela y quedan rodeadas por moléculas de agua (Luisi y Magid, 1986; Martinek *et al.*, 1986; Luisi *et al.*, 1988). Sin embargo, el citocromo *c* (Eromin y Metelitsa, 1984) o la proteína básica de la mielina (MBP) (Nicot *et al.*, 1985; Chatenay *et al.*, 1987), al transferirse a un sistema de micelas invertidas, se asocian con la superficie interna de la micela. Se ha sugerido que las proteínas integrales de membrana del tipo de la rodopsina (Ramakrishnan *et al.*, 1983), citocromo oxidasa (Escamilla *et al.*, 1989), Ca-

ATPasa de retículo sarcoplásmico (Ferreira y Verjovski-Almeida, 1989) y la ATPasa mitocondrial (Garza-Ramos *et al.*, 1990a) se acomodan en la micela de tal forma que la porción hidrofílica de la proteína está en contacto con la poza acuosa, mientras que la parte hidrofóbica tiende a asociarse con las cadenas hidrocarbonadas del surfactante o directamente con el solvente orgánico.

Catálisis Enzimática en Micelas Invertidas

Muchas enzimas se han transferido a un sistema de micelas invertidas (Luisi y Magid, 1986; Martinek *et al.*, 1986), en la mayoría de los casos se ha observado que en dichas condiciones las enzimas mantienen su actividad catalítica y su especificidad por el sustrato. En estos sistemas, las enzimas muestran una actividad dependiente de la cantidad de agua que se introduce a la micela o W_o (Fig. 3). A un W_o óptimo, que varía de una enzima a otra, algunas enzimas alcanzan el valor de la velocidad catalítica que muestran en agua (Martinek *et al.*, 1989), y en algunos casos se ha visto una actividad mayor a la que se observa en medios totalmente acuosos (Menger y Yamada, 1979; Barbaric y Luisi, 1981).

Los estudios cinéticos de varias enzimas en micelas invertidas muestran que cuando la concentración de sustrato es mayor a la concentración de la enzima, éstas siguen una cinética clásica, del tipo de Michaelis-Menten (García-Carmona *et al.*, 1992). Sin embargo, la complejidad del sistema dificulta el diseño de modelos cinéticos que expliquen el comportamiento catalítico de las enzimas en micelas invertidas. Actualmente existe controversia entre diferentes grupos sobre los distintos factores que determinan la expresión de la actividad enzimática en las micelas, a continuación se describen los distintos puntos de vista:

i) Para algunos autores, los parámetros cinéticos intrínsecos de las enzimas no se alteran cuando se transfieren al sistema micelar (Verhaert *et al.*, 1990; Oldfield, 1990; Verhaert *et al.*, 1992). La velocidad de la reacción enzimática depende de la velocidad de recambio entre micelas; los cambios de K_m y V_{max} "aparentes" se deben a que el sistema está limitando la accesibilidad del sustrato. Por lo tanto, la difusión entre micelas es el factor limitante de la actividad catalítica.

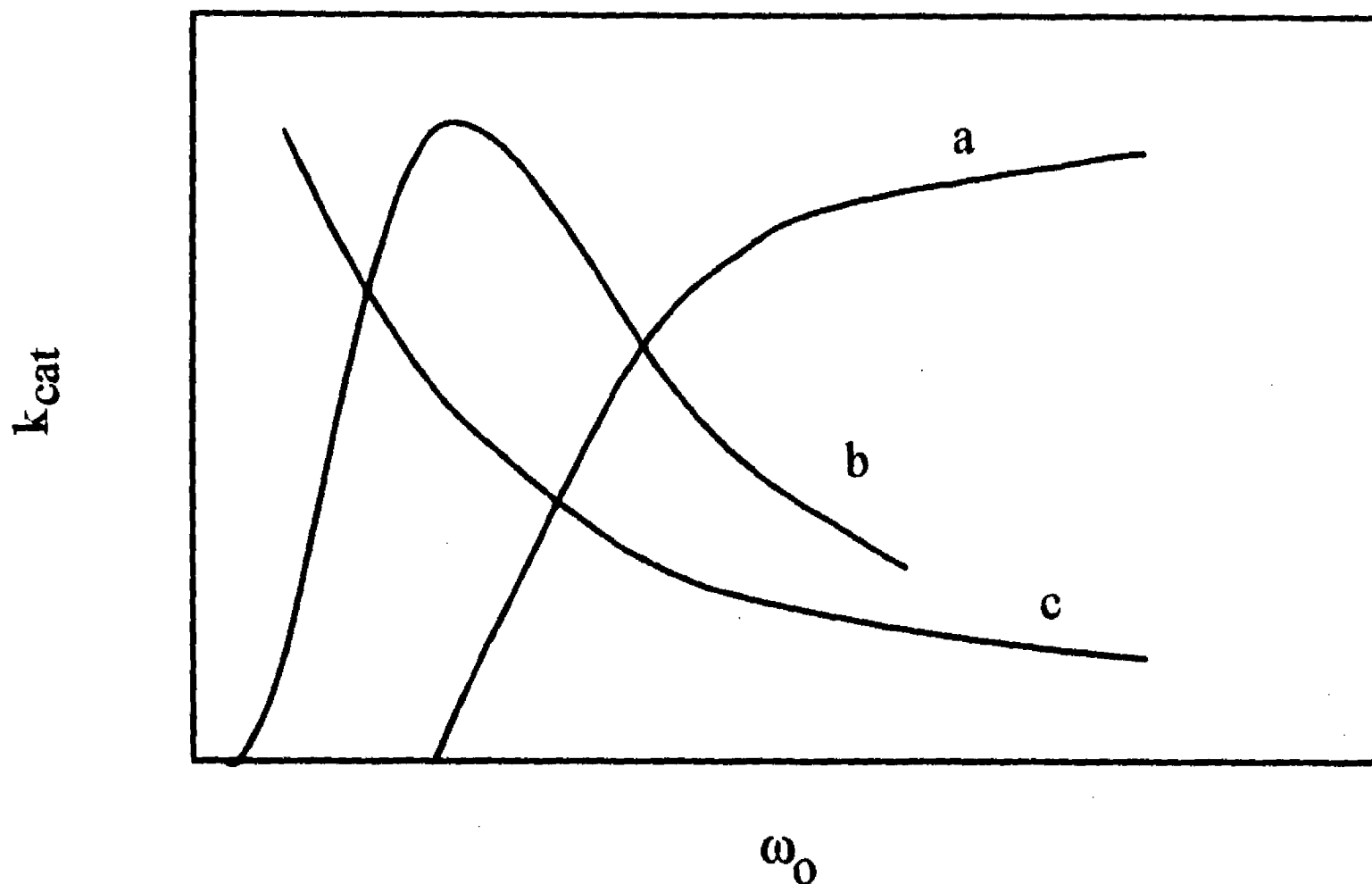


Figura 3. Efecto del tamaño micelar (W_o) en el comportamiento cinético de las enzimas. a) curva de saturación, b) comportamiento de tipo campana y c) disminución continua de la actividad en función del W_o . (Tomado de García-Carmona *et al.*, 1992)

En este sentido, los datos experimentales que se reportan en la literatura indican que las colisiones y el recambio entre micelas son procesos que se dan en valores de tiempo del orden de microsegundos (Eicke *et al.*, 1976; Tabony y Drifford, 1983). De estos resultados se infiere que la actividad enzimática, con ciclos catalíticos de milisegundos, no está limitada por la transferencia del sustrato a la enzima.

ii) Otros grupos han propuesto que los parámetros cinéticos, K_{cat} y K_m , se alteran por cambios en la estructura de la proteína. La actividad depende principalmente del microambiente (surfactante, solvente apolar y agua unida o libre) en el que se distribuyan la enzima y los sustratos en el sistema micelar (Bru *et al.*, 1989; García-Carmona *et al.*, 1992). En este modelo la

difusión micelar no es el factor limitante de la catálisis y se supone que la enzima trabaja en presencia de concentraciones saturantes de sustrato.

Existen algunos trabajos en los cuales ha sido posible correlacionar los cambios en la actividad enzimática con las alteraciones estructurales que sufren las enzimas cuando se transfieren a la cavidad acuosa de las micelas. La "superactividad" de la α -quimotripsina que se observa en micelas invertidas tiene correlación con un incremento en el contenido de estructura helicoidal (Barbaric y Luisi, 1981). En micelas con bajo contenido de agua ($W_o \leq 13.5$), la enzima adquiere una conformación más rígida que la que se observa en 100 % de agua, a la vez que aumenta su estabilidad y el número de recambio y disminuye su afinidad por el sustrato. Los cambios estructurales que puede sufrir una enzima no necesariamente favorecen la catálisis, por ejemplo la tripsina, una enzima proteolítica por excelencia, cataliza la hidrólisis de ésteres o amidas con una eficiencia mucho menor que en 100 % de agua (Walde *et al.*). Los datos estructurales muestran que el ambiente micelar induce una desnaturalización parcial de la enzima. Ramírez-Silva *et al.*, (1993) estudiaron a la piruvato cinasa de músculo en un sistema de micelas invertidas formadas por el detergente catiónico CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), octano, hexanol y diferentes cantidades de agua. Los resultados obtenidos indican que la piruvato cinasa en las micelas muestra una actividad sin potasio (activador esencial de la enzima) que representa el 20 % de la actividad en 100 % de agua y en presencia de potasio. Los datos de fluorescencia indican que la piruvato cinasa en un ambiente restringido de agua adquiere espontáneamente la conformación activa que en solución acuosa requiere de la unión de los ligandos específicos. El equilibrio entre las formas activa e inactiva se puede controlar variando la cantidad de agua que rodea a la enzima.

EFFECTO DEL AGUA EN LA ESTABILIDAD Y LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS EN SOLVENTES ORGANICOS

La mayoría de las enzimas son insolubles en solventes orgánicos que contienen pequeñas cantidades de agua. El grupo de Klibanov (1986) y de Dordick (1989) principalmente, han mostrado que en estas condiciones varias enzimas son capaces de llevar a cabo catálisis enzimática.

Klibanov y cols. determinaron que la velocidad catalítica de diferentes enzimas suspendidas directamente en el solvente orgánico, aumenta con la cantidad de agua (Zaks y Klibanov, 1984; 1988b). Se encontró que para cada enzima existe un requerimiento específico de agua que depende de las propiedades del solvente orgánico, por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa trabaja con la misma eficiencia si se la coloca en solventes hidrofóbicos o parcialmente miscibles en agua, mientras que la alcohol oxidasa es activa únicamente en solventes hidrofóbicos (Zaks y Klibanov, 1988b). La subtilisina cataliza una reacción de transesterificación en dimetilformamida (Riva *et al.*, 1988), mientras que en las mismas condiciones la quimotripsina es completamente inactiva (Zaks y Klibanov, 1988a), sin embargo, ambas funcionan cuando se suspenden en un solvente como el octano. No hay evidencia experimental que indique que la sensibilidad al solvente se deba a diferencias en la estabilidad conformacional de las distintas enzimas. De hecho estudios de EPR y NMR con la deshidrogenasa láctica y la proteasa α -lítica suspendidas en solventes orgánicos de diferente polaridad, muestran que la conformación de las proteínas no se modifica en función del solvente (Hwang y Arnold, 1991). El grupo de Klibanov propone que esta sensibilidad diferencial de las enzimas por el solvente orgánico es producto de la capacidad del solvente para deshidratar a la proteína (Zaks y Klibanov, 1988b). Si se aumenta la hidrofobicidad del solvente se requiere menos agua para la actividad enzimática. En un solvente menos apolar, el agua en contacto con la enzima se reparte en mayor proporción hacia el solvente; en consecuencia, la actividad de la enzima decrece. De estos datos se infiere que la actividad enzimática depende de la cantidad de agua que rodea a la enzima y no del contenido total de agua en el solvente.

La idea central del grupo de Klibanov de que la actividad de una enzima depende

exclusivamente de la cantidad de agua en contacto con la proteína y no del agua libre en el solvente orgánico, se puede ejemplificar con los datos obtenidos para la α -quimotripsina (Zaks y Klibanov, 1988a). Primero, se demostró que la α -quimotripsina es capaz de catalizar una reacción de transesterificación cuando se coloca en octano anhidro. En estas condiciones la cantidad de agua unida a la enzima fué 2.5 % (p/p). Esta cantidad de agua corresponde a menos de 50 moléculas de agua/molécula de proteína: relación molar que es 10 veces menor a la que se necesita para formar una monocapa de agua en la superficie de la proteasa. En un solvente más hidrofílico como la acetona, la α -quimotripsina retuvo el 1.2 % de agua, condiciones en las cuales su eficiencia catalítica disminuyó un orden de magnitud con respecto a la obtenida en octano.

Agua y termoestabilidad

La inactivación enzimática por altas temperaturas puede ser reversible o irreversible. Durante la pérdida reversible de la actividad por temperaturas superiores al punto de fusión, la conformación nativa de la enzima se perturba debido a que se favorece el equilibrio hacia la forma desplegada de la proteína. Cuando la preparación se enfría, la actividad se recupera. La inactivación irreversible resulta de cambios estructurales y/o modificaciones químicas en la composición de la proteína. Los mecanismos de inactivación irreversible de una enzima incluyen la agregación de las cadenas polipeptídicas, la formación de estructuras incorrectas, la desamidación de residuos de glutamina y asparagina, hidrólisis de los enlaces peptídicos, β -eliminación y oxidación de residuos de cisteína (Ahern y Klibanov, 1985; Zale y Klibanov, 1986; Zaks, 1992). La velocidad de estos procesos depende de la temperatura y de las condiciones del medio. En la mayoría de estas reacciones el agua participa como substrato, además de que induce la movilidad conformacional que se requiere para que la enzima se desnaturalice.

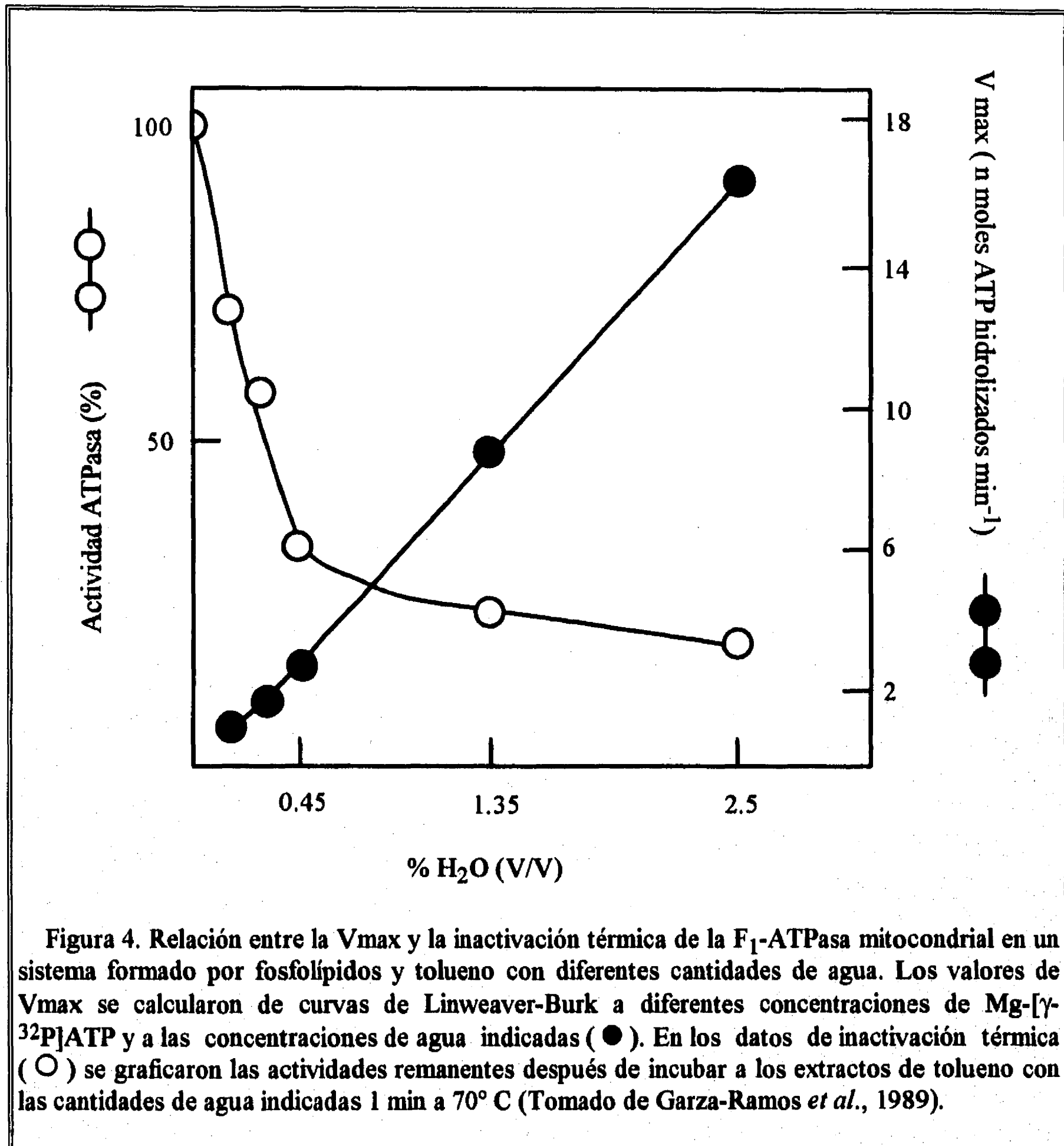
Klibanov y cols. proponen que todos los procesos químicos deletéreos y los cambios conformacionales responsables de la inactivación de una proteína por altas temperaturas, se inhiben significativamente cuando ésta se suspende en un solvente orgánico apolar, debido a que disminuye la cantidad de agua en contacto con la enzima (Zaks y Klibanov, 1984). De acuerdo

con esta idea, se determinó la termoestabilidad de varias enzimas suspendidas en solventes orgánicos de diferente polaridad. Para la α -quimotripsina incubada en octano anhidro, se encontró que a 100° C su vida media fue de 270 min; en 100 % de agua el tiempo de vida media a 55° C fué de 15 min (Zaks y Klibanov, 1988a). La termoestabilidad depende del contenido de agua en contacto con la enzima. Al aumentar la cantidad de agua en el solvente, la termoestabilidad de la enzima disminuyó drásticamente. Se obtuvieron resultados semejantes con la lipasa pancreática (Zaks y Klibanov, 1984), la terpeno ciclasa (Wheeler y Croteau, 1986), la subtilisina (Russell y Klibanov, 1988) y la ribonucleasa (Volkin y Klibanov, 1990).

La lipasa pancreática suspendida en un solvente orgánico seco, a 100°C tiene una vida media de 12 hrs. Zaks y Klibanov demostraron que en estas condiciones extremas, la enzima puede catalizar una reacción de transesterificación entre la tributirina y el heptanol a 100°C (la reacción no se lleva a cabo en ausencia de lipasa). De hecho se encontró que la lipasa a un contenido de agua de 0.015 % y 100°C es capaz de catalizar con una eficiencia 5 veces mayor que la observada en el mismo sistema a 20°C (Zaks y Klibanov, 1984). Los resultados indican que la lipasa mantiene su conformación catalíticamente activa a 100°C. De estos datos se propone que un incremento en la estabilidad conformacional de una enzima (por deshidratación) se acompaña por un aumento en la termoestabilidad.

Se ha demostrado que la estabilidad de las enzimas en micelas invertidas depende del contenido de agua del sistema. Ayala y cols. (1986) encontraron que la citocromo oxidasa y la ATPasa mitocondrial transferidas a un sistema compuesto por fosfolípidos y tolueno resisten temperaturas de 70 a 90°C por períodos largos de tiempo. Es importante recalcar, que en el sistema compuesto por fosfolípidos y no por surfactantes sintéticos, las enzimas pueden aumentar considerablemente su termoestabilidad (Lee y Biellmann, 1987; Khmel'nitski *et al.*, 1988; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1988), ésto se debe a que el sistema de fosfolípidos es estable, mientras que los otros sistemas no se pueden estudiar a altas temperaturas. El tiempo de vida media de la F₁-ATPasa mitocondrial a 70°C y en presencia de 0.03 % de agua (v/v de solvente orgánico) fué de más de 24 hr. Si se aumenta el agua a 0.3 % (v/v) la termoestabilidad es 10³ veces menor con

respecto a la obtenida en 0.03 % de agua (Garza-Ramos *et al.*, 1989). Es importante señalar que a 25°C la F₁-ATPasa empieza a mostrar actividad catalítica a concentraciones de agua mayores a 0.15 % (v/v) (Figura 4).



La adición de un segundo surfactante, el Tritón X-100 al sistema de fosfolípidos y tolueno modifica de manera significativa la dependencia de la termoestabilidad con respecto a la concentración de agua (Garza-Ramos *et al.*, 1990a). En este sistema la ATPasa mitocondrial permanece estable a 70°C en presencia de 1.3 % de agua (v/v). A esta concentración de agua, la enzima es capaz de catalizar la hidrólisis de ATP a una temperatura de 90°C. La catálisis a estas temperaturas depende de la cantidad de agua; a concentraciones menores o mayores de 1.6 % la actividad fué menor o no se detectó.

Todo esto indica que hay una relación inversa entre la termoestabilidad y la catálisis enzimática. Esto se puede explicar en términos de rigidez y/o flexibilidad conformacional. El incremento progresivo de la cantidad de agua que rodea a una enzima se acompaña de un aumento en la flexibilidad de la proteína, que se refleja en la capacidad de la enzima para llevar a cabo catálisis. La flexibilidad inducida por el agua promueve cambios conformacionales y químicos que llevan a la enzima a su inactivación o desnaturalización térmica.

EFFECTO DE LOS DESNATURALIZANTES EN LA CATALISIS ENZIMATICA.

Se ha estudiado la actividad de varias enzimas en un sistema micelar formado por fosfolípidos, Tritón X-100, tolueno (TPT) y cantidades de agua que varían de 1 a 6.5% (Garza-Ramos *et al.*, Garza-Ramos *et al.*, 1990b; Garza-Ramos *et al.*, 1992; Barrabin *et al.*, 1993). Recientemente se hizo la caracterización fisicoquímica de este sistema por medio de titulaciones de fase y dispersión de luz dinámica (Rodríguez *et al.*, 1993). En el sistema del TPT la mayoría de las enzimas estudiadas muestran una actividad catalítica que es más de un orden de magnitud menor que en medios totalmente acuosos (Tabla II). La actividad incrementa de manera gradual al aumentar el contenido de agua en el sistema. Como se mencionó anteriormente, ésto se debe a que en un espacio de agua limitante se restringen las interacciones de la proteína con el medio que la rodea, haciendo que la flexibilidad conformacional que se requiere para la catálisis disminuya.

TABLA II
Relación de las Actividades Catalíticas de algunas Enzimas
en 100% de Agua y en el TPT a 3.8% de Agua.

	$\frac{100\%}{3.8\%}$	H ₂ O	Referencia
DESHIDROGENASAS:			
Lactato			
-Corazón de Bovino		30	Garza-Ramos et al., 1990b
-Músculo de puerco		25	Garza-Ramos et al., 1992
-Músculo de conejo		25	Datos no publicados
α -Glicerolfosfato		28	Garza-Ramos et al., 1992
Gliceraldehido-3-fosfato		23	Garza-Ramos et al., 1992
CINASAS:			
Hexocinasa		15	Garza-Ramos et al. 1992
Piruvato		12	Ramírez-Silva et al., 1993
HIDROLITICAS:			
F ₁ -ATPasa		80	Garza-Ramos et al., 1989
Pirofosfatasa		100	Garza-Ramos et al., 1992
MEMBRANALES:			
ATPasa (PSM)		100	Garza-Ramos et al., 1990a
Citocromo Oxidasa		∞	Escamilla et al., 1989
Ca-ATPasa		6	Barrabin et al., 1993

Estos resultados llevaron a explorar si la restricción catalítica que se obtiene al transferir a una enzima a un sistema de bajo contenido de agua se libera al adicionar agentes desnaturalizantes como las sales de guanidina y la urea (Garza-Ramos *et al.*, 1992). Se sabe que estos agentes aumentan la capacidad del medio para solubilizar grupos proteicos (Pace, 1975). El mecanismo por el cual las sales de guanidina y la urea producen la pérdida de la estructura nativa de las enzimas involucra: i) solubilización de residuos de aminoácidos poco polares (se disminuye la

magnitud del efecto hidrofóbico hasta en un tercio) (Tanford, 1964; Nozaki y Tanford, 1970; Creighton, 1979), ii) interacciones o uniones directas de estas moléculas con grupos particulares de la proteína (Lee y Timasheff, 1974; Arakawa y Timasheff, 1984), y iii) cambios en la organización del agua (Creighton, 1984), dando como resultado que los grupos proteicos incrementen su exposición al solvente.

En los sistemas acuosos convencionales algunos autores han tratado de correlacionar los cambios en la actividad y en la conformación de la enzima durante el proceso de desnaturalización, y se ha encontrado que para varias enzimas ambos parámetros corren en paralelo (Morl *et al.*, 1981; Johnson y Price, 1987). Sin embargo, algunas enzimas como la creatina cinasa (Yao *et al.*, 1984), la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Liang *et al.*, 1990) y la alcohol deshidrogenasa (Strambini y Gonnelli, 1986) pierden su actividad catalítica a concentraciones de desnaturalizante que no producen cambios estructurales gruesos. También se ha observado el caso contrario; la actividad de algunas enzimas aumenta a concentraciones de desnaturalizante que sólo producen cambios mínimos en la estructura de la proteína (Sheibe y Fickenschen, 1985; Paudel y Carlsson, 1990). La interpretación que se ha dado a estos resultados es que los desnaturalizantes pueden inducir un incremento en la flexibilidad de la enzima o alteraciones en su sitio catalítico; Tsou (1986) propone que los sitios activos de estas enzimas se encuentran en regiones limitadas y relativamente frágiles, por lo que su integridad conformacional es más sensible a la acción de los desnaturalizantes.

Con estos antecedentes, se exploró si la baja actividad enzimática en sistemas de bajo contenido de agua podría incrementarse en presencia de agentes desnaturalizantes. Se estudió el efecto de la urea y el cloruro de guanidina sobre la actividad de la lactato deshidrogenasa transferida a un sistema micelar formado por tolueno, fosfolípidos y Tritón X-100 (Garza-Ramos *et al.*, 1990b; 1992). A 3.8 % de agua (v/v), en presencia de concentraciones óptimas de GdnHCl, la actividad de la enzima se incrementó aproximadamente 20 veces. La actividad depende de la concentración de GdnHCl, llegando a su máximo a una concentración de 1.5 M GdnHCl. Concentraciones mayores del desnaturalizante producen la inactivación de la enzima. La

concentración del desnaturizante que en el sistema de bajo contenido de agua produce la máxima activación, en un medio acuoso induce la completa inactivación de la enzima. El efecto activador de estos agentes desnaturizantes depende de la cantidad de agua que se añade al sistema (Fig. 5). Las concentraciones de GdnHCl que se requieren para producir la máxima

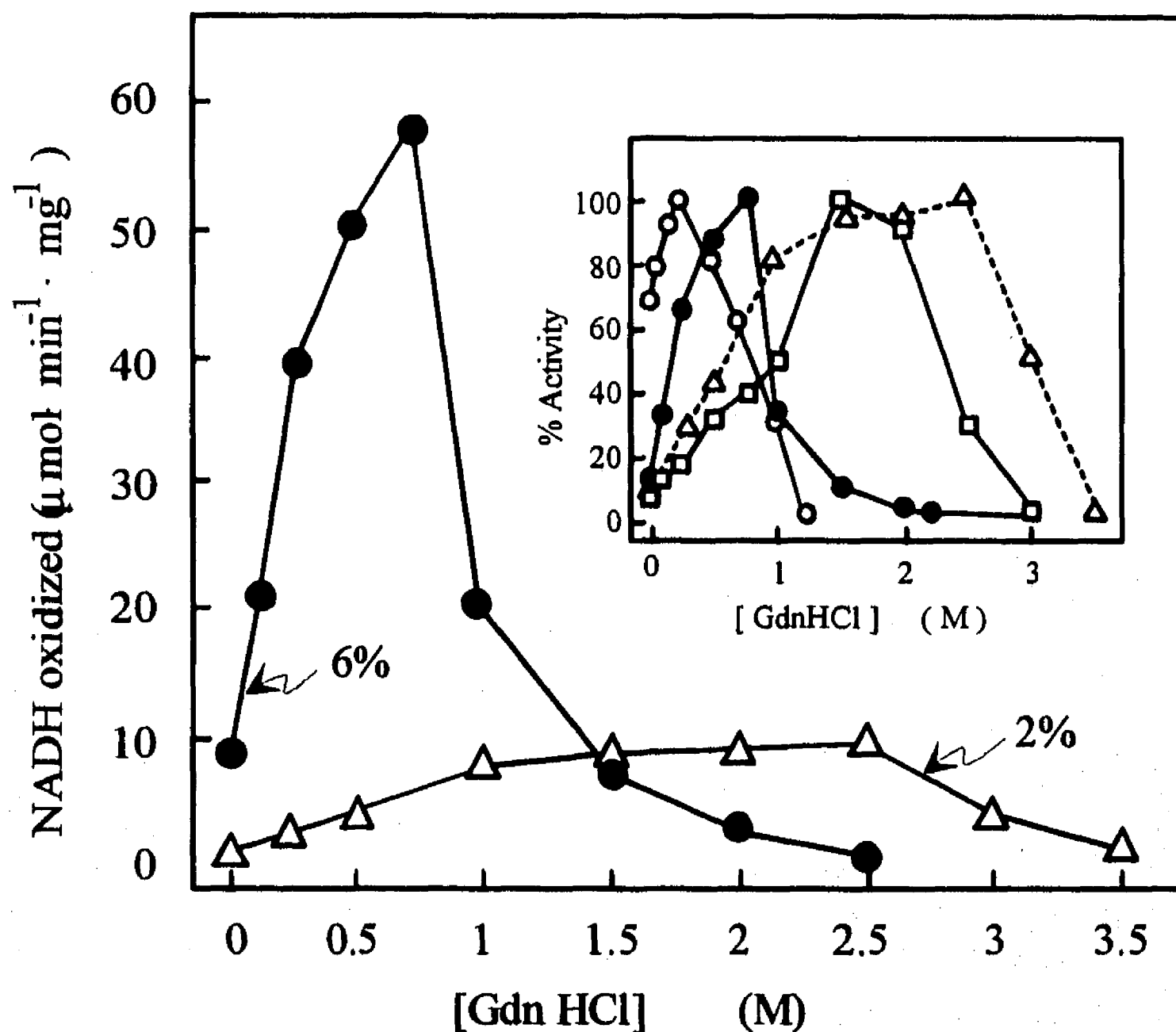


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de GdnHCl sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica en el TPT con distintas cantidades de agua. La actividad de la enzima se midió en presencia del desnaturizante a las concentraciones indicadas. En el recuadro se muestra el efecto de distintas concentraciones de GdnHCl sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica en 100% de agua (○) y en el TPT a 6.0% (●), 3.8% (□) y 2.0% (△) de agua (v/v). Los datos se normalizaron considerando el 100 % como la actividad máxima a cada concentración de agua. (Tomado de Garza-Ramos *et al.*, 1992)

activación y el 50 % de inactivación están relacionadas de manera inversa con la cantidad de agua que rodea a la enzima (Garza-Ramos *et al.*, 1992).

Un estudio más extenso demostró que otras enzimas como la α -glicerolfosfato deshidrogenasa, la hexocinasa y la pirofosfatasa inorgánica soluble incrementan su actividad por sales de guanidina o de urea (Garza-Ramos *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera: 1) no todas las enzimas se activan en la misma magnitud. 2) Las diferentes enzimas alcanzan su máxima activación a distintas concentraciones del agente desnaturizante. 3) El cloruro de guanidina incrementa la actividad de la hexocinasa y la pirofosfatasa a concentraciones que en medios totalmente acuosos producen su inactivación. 4) La gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa no se activa por los desnaturizantes. Estos datos señalan que la respuesta diferencial que muestran las enzimas a la acción de los desnaturizantes en el sistema micelar se debe a sus características estructurales y funcionales (Fernández-Velasco *et al.*, 1992).

De estos resultados se puede concluir que en un sistema de bajo contenido de agua, los desnaturizantes liberan las restricciones catalíticas de las enzimas, tal vez porque se incrementan las interacciones proteína-solvente que se requieren para la expresión catalítica, y que al cambiar las características del solvente, se puede disminuir drásticamente la cantidad de solvente que se requiere para la catálisis.

ESTABILIZACION DE INTERMEDIARIOS CATALITICOS EN LOS SISTEMAS DE BAJO CONTENIDO DE AGUA.

Se ha descrito que es posible estabilizar una conformación particular y/o los intermediarios del ciclo catalítico de una enzima si se disminuye la cantidad de agua que la rodea. En un sistema de micelas invertidas formado por fosfolípidos, a una concentración de agua de 0.3 % (v/v), la citocromo oxidasa se reduce por ascorbato y por citocromo *c* reducido (Escamilla *et al.*, 1989). Sin embargo, el ciclo de la enzima no se completa, ya que la citocromo oxidasa reducida no es capaz de oxidarse. La enzima reducida por ascorbato en las micelas de fosfolípidos no forma un

complejo con el CO, inhibidor competitivo del oxígeno, pero forma un complejo con el cianuro. Estos resultados indican que el flujo de electrones a través de los centros redox de la citocromo oxidasa se "congela" antes de que pasen al citocromo a_3 . Al disminuir la cantidad de agua que rodea a la citocromo oxidasa se estabiliza una forma intermediaria del ciclo catalítico, en el cual el citocromo a está reducido pero no el citocromo a_3 . Estos datos sugieren que puede haber diferentes requerimientos de agua en los distintos pasos de un ciclo catalítico.

En otro trabajo se estudió a la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico (Barrabin *et al.*, 1993) transferida en forma activa a un sistema compuesto por tolueno, fosfolípidos y Tritón X-100 (TPT). Barrabin y cols., plantearon lo siguiente: si el agua es necesaria para que se den los cambios conformacionales de una proteína ¿ es posible estabilizar una conformación particular variando la cantidad de agua en contacto con la enzima ?

La ATPasa de Ca^{2+} transporta calcio acoplado a la hidrólisis del ATP. Durante el ciclo catalítico la enzima forma un intermediario acilfosfato a partir de ATP cuando la enzima esta en la conformación E_1 o por fosfato inorgánico en su conformación E_2 . Se ha propuesto que la enzima sufre una transición hidrofóbica/hidrofílica durante el ciclo de la reacción y se ha encontrado que la forma activa más hidrofílica está en la conformación E_1 . En el sistema del TPT, la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico se fosforila por ATP. Las velocidades tanto de fosforilación como de defosforilación aumentan con el contenido de agua en el sistema. La enzima en el TPT, también se fosforila por P_i ; sin embargo, la fosforilación por fosfato se lleva a cabo a concentraciones de agua mucho menores en comparación con las que se necesitan para la fosforilación por ATP. A 2 % de agua en presencia de P_i , la enzima está prácticamente en la forma fosforilada; a esta concentración de agua no hay fosforilación por ATP. Las restricciones conformacionales en el sitio catalítico del conformero E_2 se liberan a concentraciones de agua mucho menores que las que se necesitan para la expresión de la actividad catalítica del conformero E_1 .

ESTUDIO DEL PAPEL DEL AGUA EN LA DESNATURALIZACION Y RENATURALIZACION DE LAS PROTEINAS.

Es claro que el sistema de micelas invertidas permite estudiar el papel del agua y/o del solvente en la catálisis enzimática y en la estabilidad funcional y estructural de varias enzimas. La posibilidad de estabilizar estados catalíticos y/o conformacionales particulares de una enzima ajustando la cantidad o las propiedades del solvente que la rodea, proporciona información acerca de las interacciones solvente-proteína que se necesitan durante la catálisis. Pero también es posible que estos sistemas permitan diseccionar y monitorear algunos eventos específicos relacionados con los procesos de desnaturalización y renaturalización de las proteínas, que en un sistema completamente acuoso no son fáciles de estudiar.

Aprovechando las ventajas que ofrece el sistema de micelas invertidas, se estudió el efecto del agua, vista como un modulador de las interacciones proteína-solvente; en dos procesos biológicos fundamentales:

- La desamidación específica de proteínas. Reacción en la cual las moléculas de agua participan de manera directa, produciendo modificaciones covalentes que conducen a la disociación, desnaturalización y degradación de las enzimas.
- El plegamiento y asociación de proteínas oligoméricas. Procesos que dependen fuertemente de las interacciones con el solvente.

En este estudio se utilizó como modelo de experimentación la enzima triosafosfato isomerasa.

TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

PROPIEDADES CATALITICAS Y ESTRUCTURALES

La enzima triosafosfato isomerasa (TPI, EC 5.3.1.1) cataliza la conversión reversible del gliceraldehido 3-fosfato (G3P), una aldosa, en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), una cetosa. Esta reacción está presente en todos los organismos y constituye una de las etapas enzimáticas individuales de la glucólisis. La TPI es un dímero de subunidades idénticas de 27 a 28 kDa y no se conoce que requiera de cofactores o reguladores alostéricos para su actividad. Solo la forma dimérica es activa (Waley, 1973; Casal *et al.*, 1987).

El mecanismo de la reacción de isomerización catalizada por la TPI se ha estudiado ampliamente. La enzima es uno de los catalizadores más eficientes que se conocen. Aumenta la velocidad de la reacción 10^9 veces (Richard, 1984). Su velocidad catalítica está limitada por la difusión (la velocidad de la reacción no se modifica si se acelera alguna de las reacciones intermedias), por lo que se le ha definido como un "catalizador perfecto" (Albery y Knowles, 1976; Knowles y Albery, 1977; Knowles, 1991). La reacción procede a través de la formación de un intermediario cis-enediol (Rose y O'Connell, 1961; Fersht, 1985) (Fig. 6A). Además, la TPI puede catalizar la degradación de los sustratos para dar metilglioxal y fosfato inorgánico (Webb *et al.*, 1977; Richard, 1984; Richard, 1991) (Fig. 6B). Esta reacción de eliminación es lenta comparada con la reacción de isomerización (Webb *et al.*, 1977; Richard, 1984). Los valores de la relación K_{cat}/K_m obtenidos son de 10^8 a 10^9 $M^{-1} s^{-1}$ y 14 $M^{-1}s^{-1}$ para las reacciones de isomerización y eliminación respectivamente (Richard, 1991; Komives *et al.*, 1991). El metilglioxal es un compuesto altamente reactivo; se desconoce su función biológica, aunque se considera como un compuesto tóxico (Carrington y Douglas, 1986).

En el sitio activo de la enzima se han identificado dos residuos, el ácido glutámico-165 (E165) y la histidina-95 (H95), que participan directamente en la reacción (Fersht, 1985; Lolis *et al.*, 1990; Knowles, 1991). El carboxilato del E165 actúa como base, sustrae y transfiere un protón del intermediario (Hartman, 1971; Lolis *et al.*, 1990; Knowles, 1991). El anillo imidazol de la H95 es un catalizador electrofílico que polariza el grupo carbonilo del sustrato, permitiendo su

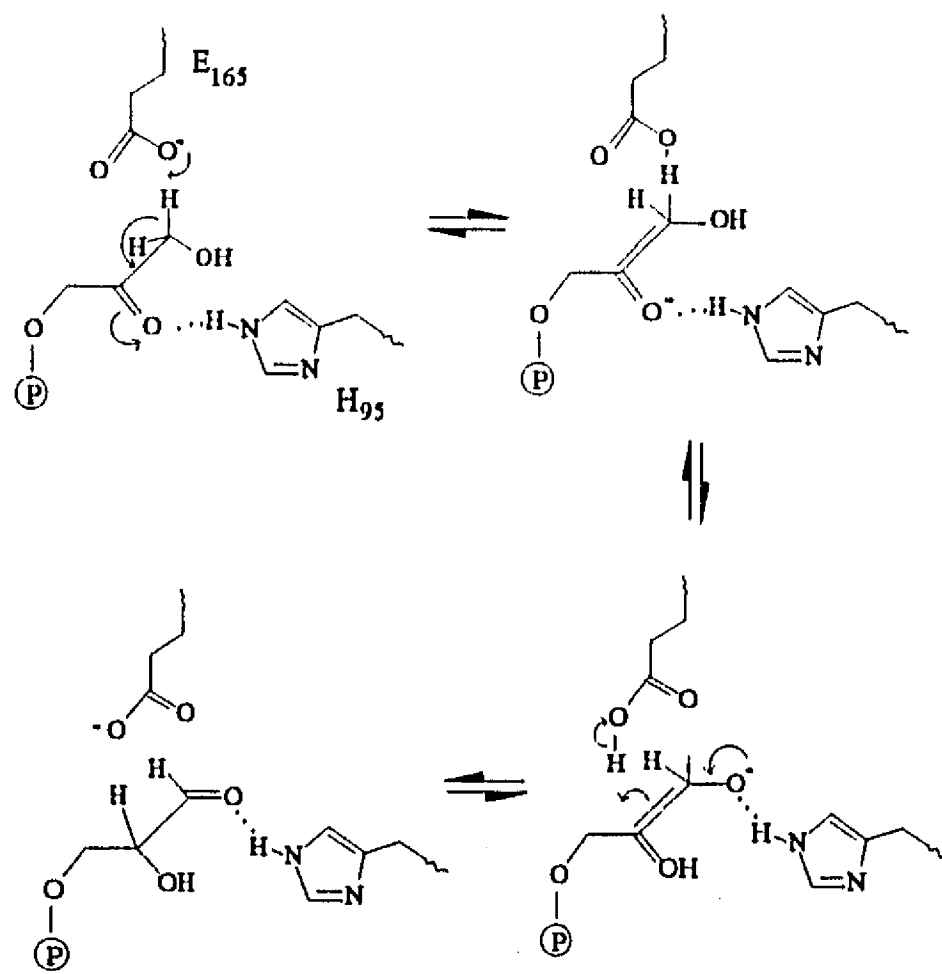
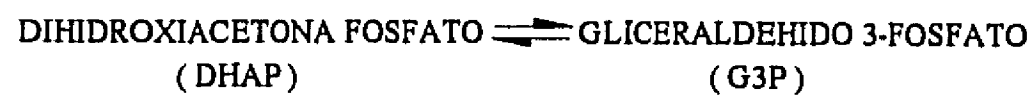
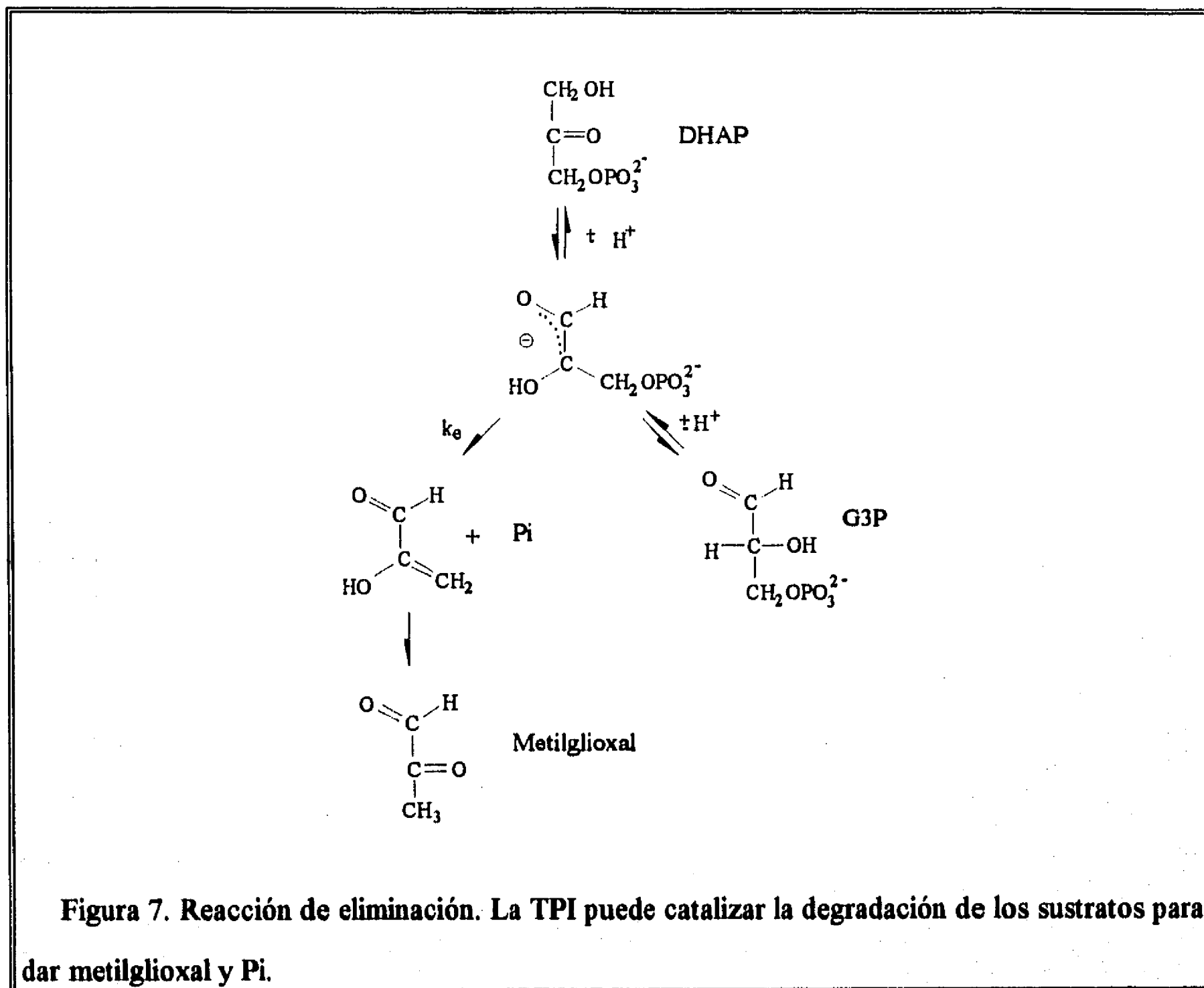


Figura 6. Mecanismo de la reacción de isomerización catalizada por la triosafosfato isomerasa. Los grupos catalíticos de la enzima son el glutámico165 (E165) y la histidina95 (H95).

enolización (Knowles, 1991; Komives *et al.*, 1991). Recientemente se ha sugerido que la H95 cataliza la transferencia de un protón durante la interconversión de los dos intermediarios enediol, por lo que funciona también como un catalizador ácido-base (Komives *et al.*, 1991).

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la TPI difieren de especie a especie; sin embargo, sus características cinéticas son muy similares (Richard, 1991; Putman *et al.*, 1972; Ahern *et al.*, 1987; Lambeir *et al.*, 1987). Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la TPI de *Trypanosoma brucei* y de pollo tienen 48.2 % de similitud, mientras que sus parámetros



cinéticos son prácticamente idénticos (Tabla III). La identidad entre secuencias primarias varía desde 36 % entre la TPI de *Bacillus stearothermophilus* y la de levadura (Lolis *et al.*, 1990), hasta 100 % entre la del chimpancé y el humano (Craig *et al.*, 1979). Estas diferencias se reflejan en sus propiedades moleculares: los puntos isoeléctricos pueden variar desde valores de pH de 4.4 a 10. Los pHs óptimos y las termoestabilidades son diferentes para cada especie.

Estructura y función de la TPI

La triosafosfato isomerasa se considera una enzima modelo en el estudio de las relaciones estructura/función. Su mecanismo de acción se conoce con detalle. Se han identificado los residuos del sitio activo y se conocen las secuencias primarias de un gran número de especies.

TABLA III
Parámetros Cinéticos de la Triosafosfato isomerasa

	Km (G3P) (mM)	Km (DHAP) (mM)	Kcat (G3P) min ⁻¹	Kcat (DHAP) min ⁻¹	Referencias
Pollo	0.47	0.97	2.6 x 10 ⁵	2.6 x 10 ⁴	Putman et al., 1972
T. brucei	0.25	1.2	3.7 x 10 ⁵	6.5 x 10 ⁴	Lambeir et al., 1987
Levadura	0.56	3.6	1.7 x 10 ⁵	6.6 x 10 ⁴	Komives et al., 1991
Conejo	0.39	0.62		5.4 x 10 ⁴	Richard, 1991
		0.98			Sawyer y Gracy, 1975
Humano	0.43	0.82			Sawyer y Gracy, 1975

Existen las estructuras cristalográficas de la TPI de pollo (Banner *et al.*, 1975), levadura (Alber *et al.*, 1981; Lolis *et al.*, 1990) y *Trypanosoma brucei* (Wierenga *et al.*, 1987). La proteína es un homodímero en el cual cada subunidad globular presenta una estructura típica de barril (α/β)₈ (Fig. 7) (Farber y Petsko, 1990). A pesar de las diferencias en la secuencia primaria entre las tres enzimas, su estructura tridimensional está altamente conservada (Alber *et al.*, 1981; Nickbarg y Knowles, 1988)

La TPI posee un asa o cerca del sitio activo (Fig. 8). El asa formada por 10-11 aminoácidos se localiza entre los residuos 166 a 176, el cual en presencia de un ligando específico se mueve 7 Å desde una posición "abierta" hacia una "cerrada" (Banner *et al.*, 1975; Alber *et al.*, 1981; Lolis *et al.*, 1990; Joseph *et al.*, 1990; Wierenga *et al.*, 1991). Este movimiento aísla al sitio activo del solvente que rodea a la enzima, estableciendo un puente de hidrógeno entre un residuo de glicina del asa y el grupo fosfato del sustrato que estabiliza al intermediario enediol de la reacción. En esta interacción se asegura la transformación eficiente del sustrato y se inhibe la reacción de eliminación del grupo fosfato del intermediario, por lo que se previene la formación de metilglioxal (Pompliano *et al.*, 1990; Joseph *et al.*, 1990; Richard, 1991; Knowles, 1991).

Los contactos entre las dos subunidades de la TPI se establecen a través de un asa formada por los residuos 71 al 78. Estos se extienden desde una subunidad hacia una hendidura localizada cerca del sitio activo de la otra subunidad (Lolis *et al.*, 1990). De esta manera los dos sitios

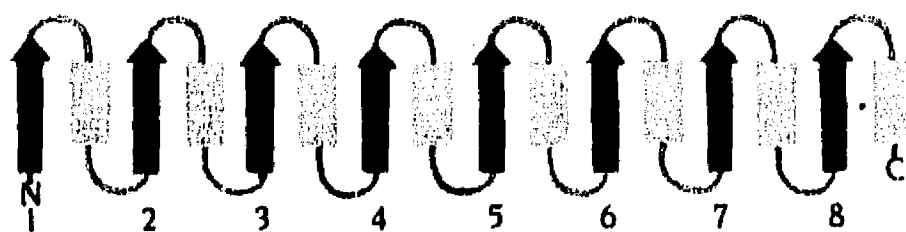
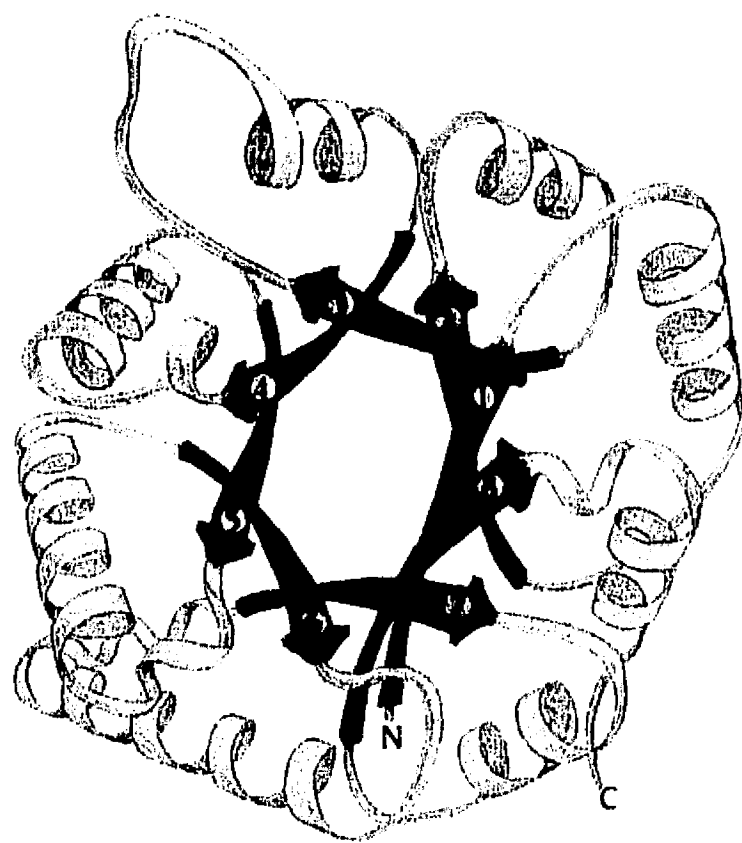
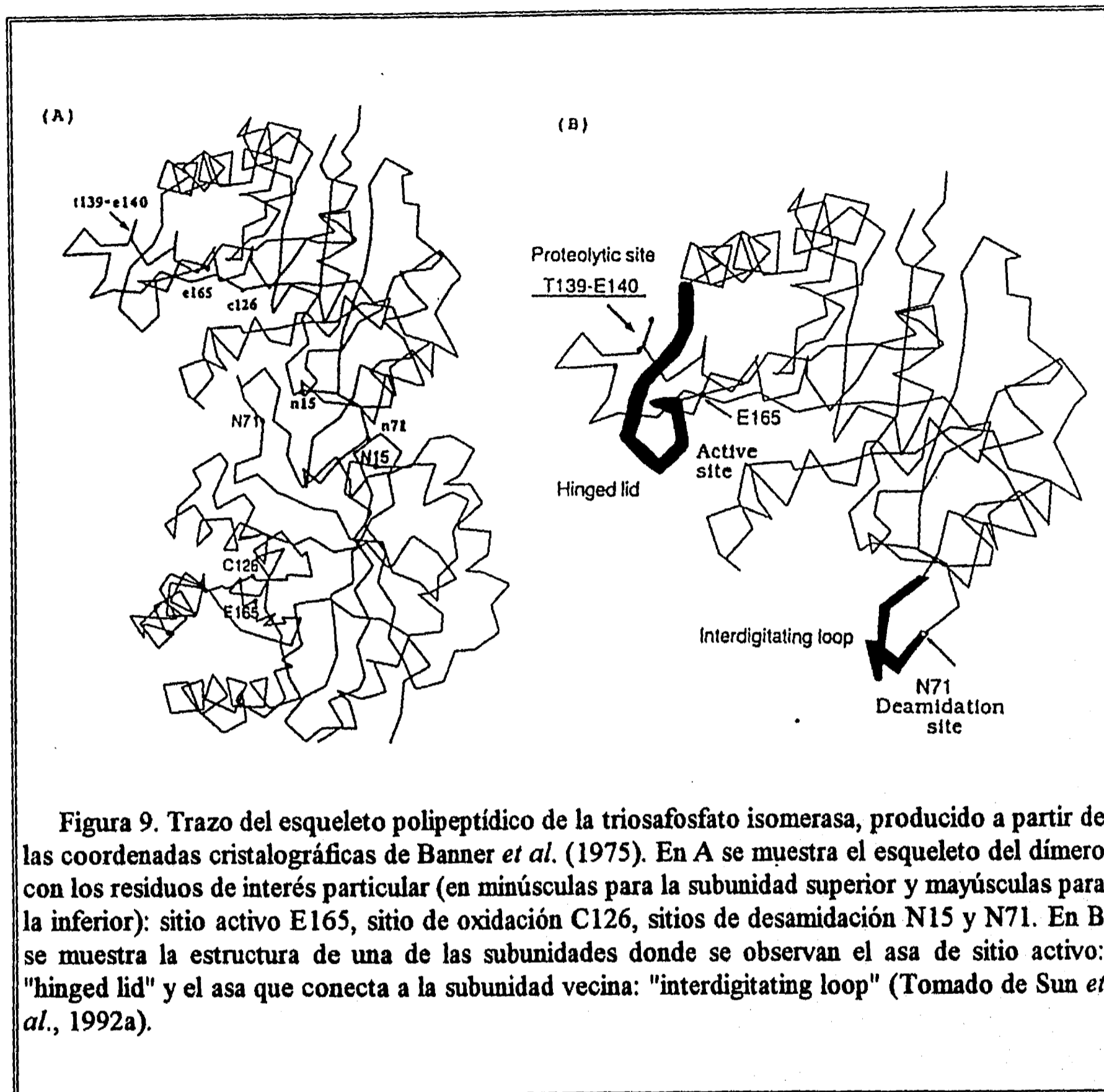


Figura 8. Diagrama esquemático y topológico que muestra la estructura de la triosafosfato isomerasa. La estructura característica de barril α/β está formada por 8 hojas β (flechas) paralelas, rodeadas por 8 α -hélices (rectángulos). (Tomado de Branden y Tooze, 1991)

activos y las interfases entre las subunidades se mantienen estrechamente relacionadas (Fig. 8). De hecho, se sabe que el glutámico-97 que forma parte del sitio activo establece un puente de hidrógeno con la amida de la treonina-75 de la subunidad vecina (Schnackerz y Gracy, 1991). Se ha propuesto que la especificidad entre las subunidades está dada por las interacciones polares en la interfase. De hecho, a excepción del asa, hay muy pocos residuos conservados en esa zona. Algunos datos obtenidos por mutagénesis dirigida han demostrado la importancia del asa de la interfase en la estabilidad y actividad de la enzima. Se reemplazó la asparagina-78 por un residuo



de ácido aspártico en la interfase de la TPI de levadura (Ahern *et al.*, 1987). Esta mutación incrementa la velocidad de inactivación térmica, disminuye considerablemente la constante catalítica y la estabilidad del dímero a la disociación inducida por dilución.

Plegamiento y asociación de la triosafosfato isomerasa

La integridad estructural de las proteínas en solución depende de los parámetros del solvente, por lo tanto el plegamiento de una proteína se debe afectar por el ambiente en el que se encuentra.

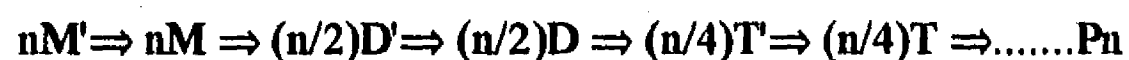
En la actualidad se acepta que la estructura tridimensional de una proteína esta determinada por su secuencia de aminoácidos y el ambiente que la rodea (Jaenicke, 1991).

En el caso de las proteínas pequeñas y monoméricas, la renaturalización vista como la transición de un estado desnaturalizado polimórfico a una conformación única y definida requiere de la formación de intermediarios parcialmente plegados:



N = proteína nativa, I = intermediario y D = estado desnaturalizado (Jaenicke, 1987). Ya que los intermediarios por definición son estructuras inestables, las formas intermediarias que definen el camino del plegamiento de una proteína no se pueden aislar o estudiar por métodos convencionales (Englander, 1993). Para algunas proteínas como la α -lactoalbúmina (Dolgikh *et al.*, 1985), la mioglobina (Hughson *et al.*, 1990) y el citocromo *c* (Ohgushi y Wada, 1983) se ha demostrado la existencia de un intermediario compacto que se define como "globo fundido" (en ingles "molten globule"), el cual es estable en condiciones moderadas de desnaturalización.

La renaturalización de las proteínas oligoméricas implica un mecanismo en el cual se dan los pasos de plegamiento que generan a los monómeros estructurados y subsecuentemente la asociación entre subunidades. El mecanismo consecutivo de plegamiento/asociación propuesto para la reconstitución de proteínas oligoméricas es el siguiente (Jaenicke, 1987):



donde: n= número de subunidades, M',M, D',D, T',T = monómeros, dímeros o tetrámeros en diferentes estados conformacionales. En este esquema el mecanismo está simplificado (las flechas apuntan en una sola dirección) ya que durante el plegamiento y asociación de los oligómeros se pueden formar agregados de subunidades parcialmente plegadas (Zettlmeissl *et al.*, 1979; Rudolph *et al.*, 1979). Con frecuencia esta reacción compite fuertemente con las reacciones que conducen a la formación de la estructura oligomérica nativa por lo que la reactivación, renaturalización y asociación de tales proteínas se estudia en condiciones irreversibles.

En el caso de proteínas diméricas como la triosafosfato isomerasa, su reconstitución sigue un

mecanismo secuencial uni-bimolecular (Jaenicke, 1987):

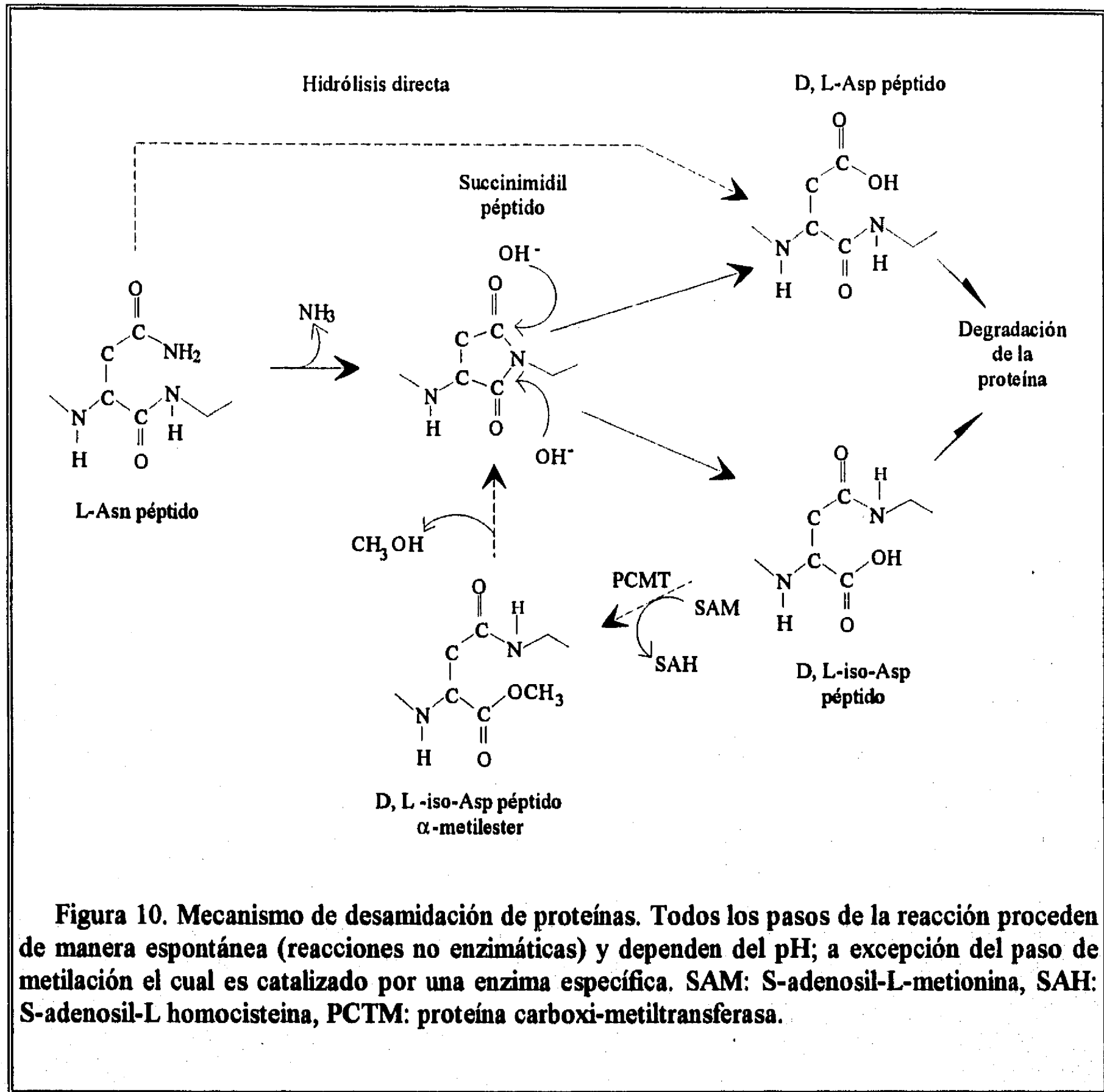


Este proceso implica dos reacciones de plegamiento a nivel del monómero y del dímero ($M' \Rightarrow M$ y $D' \Rightarrow D$), además de un paso de asociación entre los monómeros ($2M \Rightarrow D'$).

Waley (Waley, 1973) y Jaenicke y cols. (Zabori *et al.*, 1980) estudiaron el plegamiento y la reactivación de la triosafosfato isomerasa del músculo de conejo. La incubación de la enzima en una solución que contiene 1 M GdnHCl produce su disociación. Entre 3-5 M GdnHCl la enzima se desnaturaliza completamente. La proteína desnaturalizada recupera rápidamente su actividad después de diluir el desnaturalizante. Waley demostró que a bajas concentraciones de proteína, la velocidad de reactivación es inversamente proporcional a la concentración de proteína. Cuando se trabaja a concentraciones elevadas de proteína la reacción es de primer orden. Estos resultados sugieren que a bajas concentraciones de proteína, la dimerización es el paso limitante en la reactivación de la TPI. A concentraciones altas de proteína la dimerización se acelera y la velocidad de renaturalización está determinada por la velocidad de plegamiento unimolecular (reacción de primer orden).

Desamidación de la Triosafosfato Isomerasa

La desamidación de las proteínas representa un ejemplo de modificaciones postraduccionales asociadas al envejecimiento celular; en este proceso se libera amonio de las cadenas laterales de una asparagina o glutamina (Geiger y Clark, 1987; Wright, 1991) (Fig. 9). La desamidación es una reacción hidrolítica, en la cual una molécula de agua genera los productos: el ácido aspártico o el ácido glutámico y amonio. Se han realizado un gran cantidad de estudios *in vivo* e *in vitro*, que demuestran que en la TPI de mamíferos, la desamidación específica de la Asn71 a ácido aspártico es el evento que desencadena la degradación de la enzima (Yuan *et al.*, 1981a). La Asn71 forma parte del asa que conecta a las dos subunidades (Fig. 8), al desamidarse se introducen cargas negativas en la interfase entre subunidades, que llevan a un aumento de la disociación y desnaturalización de las mismas. Los cambios conformacionales que se generan como producto de la desamidación aumentan la susceptibilidad de la enzima a la proteólisis



específica (Sun *et al.*, 1992a)

En las células o tejidos envejecidos se acumulan isoformas desamidadas de la TPI, electroforéticamente más negativas e inestables (Yuan *et al.*, 1981a). Los resultados sugieren que la acumulación de las isoenzimas está relacionada con la eficiencia de recambio de la proteína. En células jóvenes las isoformas desamidadas de la TPI se degradan rápidamente, mientras que en las más viejas, estas isoformas no son reconocidas por las enzimas proteolíticas, por lo tanto tienden

a acumularse (Gracy *et al.*, 1985).

Estudios *in vitro*, demostraron que la TPI al incubarse en un medio alcalino a 37°C produce las mismas isoformas desamidadas que se obtienen de células envejecidas (Sawyer *et al.*, 1972). Después de aislar y secuenciar las isoformas, se encontró que las más básicas contenían asparaginas en las posiciones 15 y 71, mientras que en las isoformas más ácidas, estas posiciones estaban ocupadas por aspárticos (Yuan *et al.*, 1979; 1981a; 1981b). Las formas electroforéticas intermedias presentaron niveles intermedios de desamidación. La TPI de humano contiene 8 residuos de asparagina y 13 de glutamina; sin embargo, sólo la Asn71 y la Asn15 se desamidan. Estos dos sitios presentan características estructurales únicas: ambas tienen una secuencia Asn-Gli (Robinson *et al.*, 1970). Esta secuencia se ha identificado como el sitio de desamidación de otras enzimas como el citocromo *c* y la aldolasa (Flatmark y Sletten, 1968; Robinson y Rudd, 1974). Los estudios con péptidos sintéticos mostraron que las secuencias de aminoácidos adyacentes al par Asn-Gli afectan la desamidación (Gracy *et al.*, 1993).

Por otro lado, se sabe que de las dos asparaginas que se desamidan en la TPI de mamíferos, la Asn71-Gli se desamida con más frecuencia que la Asn15-Gli. Debido a que no se tienen las estructuras cristalográficas de las TPI de mamíferos, se hicieron análisis de los perfiles teóricos de hidrofobicidad, hidrofiliidad, flexibilidad y probabilidad de superficie para tratar de determinar la influencia de las estructuras secundarias y terciarias en la desamidación. Los datos sugieren que la desamidación no solo está controlada por una secuencia primaria específica (Gracy *et al.*, 1993); la configuración espacial, flexibilidad y la accesibilidad al solvente (Fig. 8) son factores que pueden contribuir a la formación de sitios específicos de Asn susceptibles a la desamidación (*vide infra*).

Gracy y cols. demostraron que la unión de los substratos incrementa drásticamente la desamidación de la TPI (Yuan *et al.*, 1981a; Yüksel y Gracy, 1986). De manera similar la unión covalente de un análogo del sustrato, el 3-cloroacetol fosfato (CAP) al sitio catalítico de la enzima estimula su desamidación (Sun *et al.*, 1992b). Se hicieron heterodímeros en los cuales una subunidad estaba marcada con el CAP y la otra tenía el sitio activo libre y se exploró la relación

entre los sitios catalíticos y el sitio de desamidación. Estos heterodímeros (TPI-TPI^{CAP}) muestran el 50 % de la actividad del homodímero; también se observó que la unión de los ligandos a la subunidad libre no se modifica (Schnackerz y Gracy, 1991). Sin embargo, el heterodímero es más susceptible a desamidarse e incrementa su disociación con respecto al dímero nativo (Sun *et al.*, 1992b,c). Estos datos, aunados a estudios estructurales indican que la unión del sustrato produce cambios conformacionales que se transmiten a otros sitios de la proteína, se debilitan los contactos entre subunidades y se incrementa la desamidación.

OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar la desnaturalización y renaturalización de la triosa fosfato isomerasa (TPI) en un sistema de micelas invertidas. El trabajo se puede dividir en dos partes:

I) La renaturalización de la TPI. Proyecto en el que se pretende estudiar los factores que modifican la velocidad de reactivación y dimerización de la enzima; en particular, el efecto de la concentración de la proteína y del contenido de agua. Ya que en el sistema de micelas invertidas ha sido posible separar y estudiar de manera individual las subunidades de algunas enzimas multiméricas, en este trabajo se plantearon las siguientes preguntas: ¿Los monómeros de la TPI son catalíticamente activos? ¿Cómo se comparan las características de la reactivación en medios en que el agua está en exceso o es limitante?

II) La desamidación de la TPI. Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto del agua en los cambios postraduccionales de las enzimas; cuantificar el grado de desamidación de la enzima en función del contenido de agua en el sistema de micelas invertidas y correlacionar la cantidad de proteína desamida con la velocidad de recambio de la TPI. Así como, explorar el efecto del agua en la desamidación de la enzima por altas temperaturas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

RESULTADOS

D) EFECTO DEL AGUA EN LA REACTIVACION Y ASOCIACION ENTRE SUBUNIDADES DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA.

En este trabajo se caracterizó la reactivación y dimerización de la triosafosfato isomerasa en micelas invertidas formadas por el detergente catiónico CTAB, hexanol y octano. La enzima desnaturizada en un solución de GdnHCl 5 M se transfirió al sistema de micelas invertidas. En este paso de transferencia, los monómeros desnaturizados de la TPI se distribuyen individualmente en una micela y se diluye hasta 100 veces al desnaturizante.

En un medio acuoso la formación de agregados incorrectos a partir de subunidades parcialmente plegadas es una reacción que compite fuertemente con las reacciones consecutivas de plegamiento y asociación entre las subunidades, que llevan a las proteínas oligoméricas a su estado nativo. Las micelas invertidas mantienen aisladas a las moléculas de proteína durante el proceso de plegamiento, disminuyendo las interacciones moleculares que conducen a la agregación. Si cada monómero puede localizarse en una micela individual será posible estudiar sus características antes de que se lleve a cabo la dimerización. Además, el sistema de micelas invertidas permite estudiar el efecto del agua sobre el plegamiento de la TPI, y cuantificar cuanta agua se necesita para plegar de manera correcta a la enzima.

La TPI desnaturizada se transfiere a las micelas, diluyendo al desnaturizante 100 veces. En condiciones óptimas se recupera el 100 % de la actividad enzimática. La velocidad de reactivación aumenta con la concentración de proteína, lo cual indica que la catálisis depende de la formación del dímero. Se encontró que la reactivación depende del contenido de agua en la micela. A concentraciones de agua menores a 3.5 % (v/v) se recupera menos del 20 % de la actividad, debido a la formación inmediata de estructuras inactivas estables.

Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles

Georgina GARZA-RAMOS¹, Marietta TUENA DE GÓMEZ-PUYOU¹, Armando GÓMEZ-PUYOU¹ and Robert W. GRACY²

¹ Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Texas College of Osteopathic Medicine, Texas, USA

(Received April 13/June 1, 1992) – EJB 92 0514

The reactivation of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase (TPI) was studied in reverse micelles. The enzyme was denatured in conventional aqueous mixtures with guanidine hydrochloride and transferred to reverse micelles formed with cetyltrimethylammonium bromide, hexanol, *n*-octane and water. In the transfer step, denatured TPI monomers distributed in single micelles, and guanidine hydrochloride was diluted more than 100 times. Under optimal reactivation conditions, 100% of the enzyme activity could be recovered. The rate of appearance of the catalytic activity increased with the concentration of protein, which indicated that catalysis required the formation of the dimer. The rate of TPI reactivation also increased with increasing protein concentration in the system with denatured TPI covalently derivatized at the catalytic site with the substrate analogue 3-chloroacetol phosphate. Thus, reactivation could take place via the formation of dimers composed of an inactive and an active subunit. Reactivation critically depended on the amount of water in the reverse micelles. The plot of the extent of reactivation versus the amount of water (2.5–7.0%) was markedly sigmoidal. Less than 20% reactivation took place with water concentrations below 3.5%, due to the formation (in less than 30 s) of stable inactive structures. The results indicate that reverse micelles provide a useful system to probe the events involved in the transformation of unfolded monomers to polymeric enzymes.

In the last few years, it has been extensively documented that enzymes and other biomolecules may be entrapped in the internal water space of reverse micelles [1, 2]. Due to their unique characteristics, reverse micelles provide a useful system to circumvent fundamental problems of enzymology that, in conventional water systems, are difficult to approach. For instance, the problem of protein aggregation that often occurs during protein renaturation in standard aqueous solutions may be largely overcome using reverse micelles systems [3, 4]. It has also been reported that, in reverse micelles, it is possible to separate and study the individual subunits of multimeric enzymes [5, 6].

Another attractive feature of reverse micelles is that the dimensions of the water pool may be varied by adjusting the amount of water introduced into the system, i.e. the higher the amount of water, the higher the water content of the micelles [1, 2, 7]. Hence, in reverse micelles which contain an unfolded protein, it should be possible to explore how the amount of water in contact with the protein affects its refolding and to quantitate how much water is needed for correct folding.

In the present study, we utilized reverse micelles, formed with cetyltrimethylammonium bromide, hexanol and *n*-octane [8, 9], to characterize the reactivation of dimeric triosephos-

phate isomerase (TPI) that had been denatured by guanidine hydrochloride (Gdn/HCl) in standard water mixtures. It was rationalized that, upon transfer of the denatured enzyme to reverse micelles, a single monomer would be localized in individual micelles. Therefore, if the rational is correct, in reverse micelles it would be possible to probe the characteristics of the monomer, provided that the dimerization of the enzyme occurred on a large time scale. In addition, we explored whether the amount of water in the interior of reverse micelles affected the reactivation of TPI.

In the studies, we utilized the well-characterized, homodimeric enzyme TPI. The enzyme is one of the most effective catalysts known [10–12]; it is a dimer formed by two 26000 Da identical subunits with a high association constant [13]. Its structure at high resolution [13–15], and its kinetic and thermodynamic parameters have been extensively explored [10, 16, 17]. The denaturation of the enzyme by high temperatures [18] and Gdn/HCl [19, 20], and the reactivation of the Gdn/HCl-treated enzyme [21, 22] have been studied; it is also known that, during catalysis, the enzyme undergoes specific covalent modifications (deamidation and oxidation) that lead to its catabolism [23–25]. In addition (and of particular importance in this work), TPI can be specifically covalently derivatized [26, 27] at the catalytic site (Glu165) with 3-chloroacetol phosphate (CAP). The CAP-derivatized TPI (CAP-TPI) can be denatured and renatured [20, 28], and by mixing denatured CAP derivatives with denatured nonmodified TPI, it is possible to form hybrid dimers containing a catalytically active subunit and a derivatized subunit with a blocked catalytic center [20, 28].

Correspondence to R. W. Gracy, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Texas College of Osteopathic Medicine, 3500 Camp Bowie Boulevard, Fort Worth, TX 76107-2690, USA

Abbreviations. CAP, 3-chloroacetol phosphate; CAP-TPI, triosephosphate isomerase that had been derivatized with chloroacetol phosphate at Glu165 of its catalytic center; Gdn/HCl, guanidine hydrochloride; TPI, triosephosphate isomerase.

In this work, we show that denatured TPI can undergo reactivation when transferred to reverse micelles. The appearance of activity depends on the formation of the dimer, including that formed with one CAP-derivatized monomer. Also, it is shown that the amount of water in contact with the enzyme is critical for the formation of catalytically competent structures.

MATERIALS AND METHODS

Rabbit muscle TPI (type X, lyophilized), α -glycerol phosphate dehydrogenase, *n*-octane, hexanol and DL-glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal were obtained from Sigma. For the assay of activity in reverse micelles, ammonium sulfate in the α -glycerophosphate dehydrogenase solution was removed by the centrifugation/filtration technique [29]. Aliquots of the enzyme suspension were dissolved in an equal volume of 40 mM triethanolamine, 10 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4 (buffer A) and centrifuged through columns of Sephadex G-50 previously equilibrated with buffer A. The filtrate had protein concentrations over 0.5–0.7 mg/ml. For the assay of activity in all water media, the ammonium sulfate suspension of the commercial enzyme was diluted in water. Glyceraldehyde 3-phosphate was prepared by hydrolysis of glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal. The concentration of TPI was calculated from its absorbance at 280 nm [30].

Preparation of TPI derivatized with CAP

Reaction of CAP with Glu165 at the catalytic center of TPI was carried out as described by Sun et al. [25]; the ester bond was stabilized by reduction with sodium borohydride. The derivatized preparation was concentrated by filtration through Centricon filters to a concentration of 42 mg/ml. It was kept at 4°C until the time of the experiments. In all water media the derivatized CAP-TPI exhibited less than 0.01% of the activity of the starting enzyme. Electrophoretic analysis of CAP-TPI under nondenaturing conditions [31] indicated the presence of a single band, when stained with Coomassie blue, that migrated as a more negative component with respect to the native enzyme.

Reverse micelles

The system of reverse micelles used was that described by Hilhorst et al. [8, 9]. It is composed of a mixture of 200 mM cetyltrimethylammonium bromide in octane and hexanol in a ratio of 8.7 (by vol.; solution B); reverse micelles were formed by adding aqueous buffer A. The phase diagrams of the system with [32] and without Gdn/HCl [8] have been described.

Enzyme activity

In all cases, TPI was dissolved in buffer A. In all water media, it exhibited an activity 3500–4000 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ as assayed with glyceraldehyde-3-phosphate as substrate and α -glycerol phosphate dehydrogenase and NADH to trap dihydroxyacetone phosphate formed [33].

For the assay of TPI activity in reverse micelles, the following protocol was followed. Native or denatured TPI was transferred to reverse micelles which contained the desired water concentration (as buffer A). Aliquots of this mixture were added to 1.0 ml reverse micelle mixture that, in all experiments

(except that described in Fig. 1B), was formed with 6.0% aqueous buffer A containing 6.6 mM glyceraldehyde 3-phosphate, 3.3 mM NADH (200 nmol/ml total mixture) and 5–7 μg α -glycerophosphate dehydrogenase. It is assumed that the latter components distributed exclusively in the water phase of the system; accordingly, the aforementioned concentrations refer to those in the water phase. In all cases, the reaction was initiated by the addition of aliquots of reverse micelles that contained TPI and the reaction was measured spectrophotometrically by following the oxidation of NADH at 340 nm. It was verified that the activity of the trapping enzyme (α -glycerol phosphate dehydrogenase) was not limiting and that the substrate was present at saturating concentrations (e.g. doubling their concentration did not increase the activity). The activity of TPI in reverse micelles formed with 6.0% water was $298 \pm 63 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Denaturation of TPI in standard water media

TPI was denatured in all water media by incubation for 50–75 min in 10 μl that contained 40 mM TEA, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.4, and the indicated concentrations of Gdn/HCl. The concentration of protein was 0.5–3.0 mg/ml.

Reactivation of TPI in reverse micelles

In all cases (unless otherwise stated), 1 μl of the aforementioned mixture was transferred to 3.0 ml reverse micelle system that contained 6.0% water (buffer A). Only in the experiments in which the effect of the water concentration on the reactivation was examined was the concentration of water varied. At the indicated times, aliquots were withdrawn and TPI activity determined in systems that contained 6.0% water. It is stressed that in the reactivation experiments, the activity of the samples was always assayed in a system of reverse micelles that contained 6.0% water.

Transfer of TPI from reverse micelles to water

By centrifugation at $105000 \times g$ for 45 min of 50 μl reverse micelles containing TPI layered on top of 1.0 ml 20 mM TEA, 5 mM EDTA and 0.5 mM dithiothreitol, pH 7.4, it was possible to recover, in the water phase, 80–100% of the enzyme catalytic activity (100% refers to the activity of the starting TPI preparation in all water media).

RESULTS

The activity of TPI was measured in low-water-containing systems with glyceraldehyde 3-phosphate as substrate and NADH and α -glycerophosphate dehydrogenase to trap dihydroxyacetone phosphate formed. The activity of the latter enzyme was at least ten-times that of TPI. Up to a concentration of 50 ng of organic solvent, the activity was directly proportional to the amount of the enzyme present (Fig. 1A). The activity was not modified by raising the amount of the trapping enzyme; thus α -glycerophosphate dehydrogenase activity was not limiting in the measurements of TPI activity. In addition, it is noted that the activity was measured at saturating substrate concentrations; it did not increase by doubling the substrate concentration. Once transferred to the organic solvent system, TPI was markedly stable, i.e. its activity did not show significant changes in 48 h (Fig. 1A). Moreover,

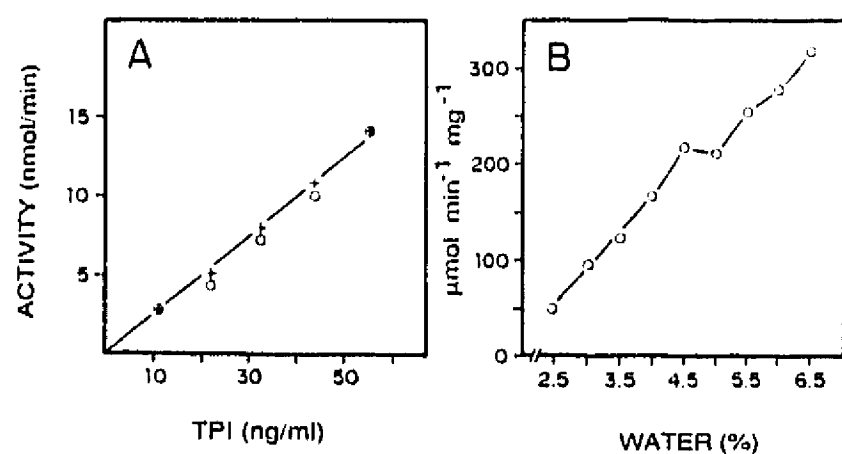


Fig. 1. TPI activity in the organic-solvent system at various concentration of TPI (A) and water (B). (A) TPI dissolved in buffer A was transferred to solution B that contained 6.0% (final water concentration) aqueous buffer. Equal aliquots of the latter mixture were used for the measurements of enzyme activity in 1 ml solution B that contained 6.0% water with the composition described in Materials and Methods. (○) Activity of the samples within 1 h transfer; (+) after 40 h of transfer. (B) Same protocol was used, except that the organic-solvent mixture in which activity was determined had the indicated concentration of water.

after five days in the organic solvent, the enzyme showed less than a 10% decrease in activity (not shown).

Under the assay conditions, the activity increased as the amount of water in the system was raised over 3.0%–6.5% water (Fig. 1B). Similar findings have been observed with other enzymes [1, 2, 32, 34, 35]. However, even at the highest concentration of water, the activity was several-fold lower than in all water media. With 3.0% and 6.0% water, it was about 40-times and 15-times lower, respectively, than in all water media, which was around $4000 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. The enzyme in reverse micelles could be transferred back to water (see Materials and Methods); 80–100% of the activity could be recovered. Therefore, irreversible inactivation was not the cause of the low activity. It has been proposed that the low activity that enzymes exhibit in organic solvents with low amounts of water is due to a restriction in the flexibility of the enzyme [34–37]. In the reactivation experiments that are described below, the activity of the enzyme was assayed in 6.0% water as this allowed near maximal expression of catalytic activity in the organic solvent.

Experimental conditions for TPI reactivation

It has been reported that the incubation of TPI in conventional water systems that contain 1.0 M Gdn/HCl brings about monomerization of the enzyme [19]. Also it is known that the denatured protein can rapidly recover its activity upon dilution of the denaturant [20–22].

As noted under Materials and Methods, the protocol for measuring reactivation involved the denaturation of TPI in conventional water systems, followed by transfer of the denatured protein into the reverse micelles system. This was followed by measurements of TPI activity in organic-solvent systems. In the experiment of Fig. 2A, TPI was incubated in conventional water mixtures that contained 1.0–5.0 M Gdn/HCl. 1- μl aliquots of the mixtures were transferred to 3.0 ml of an organic-solvent system that contained 6.0% water. Thus, on the assumption that Gdn/HCl distributed exclusively in the water phase of the reverse micelles during the transfer of the denatured enzyme, Gdn/HCl was diluted 180 times. Immediately after transfer, activity was observed in TPI that had been incubated in 1.0 M Gdn/HCl, whereas no activity

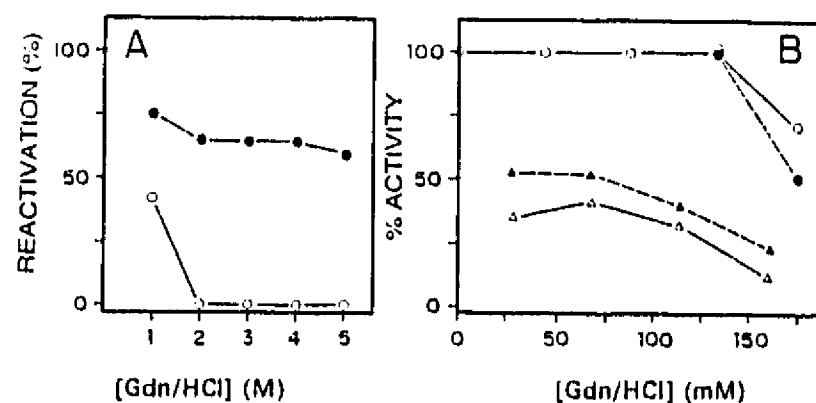


Fig. 2. Reactivation of TPI after denaturation with various concentrations of Gdn/HCl (A) and effect of Gdn/HCl on reactivation (B). (A) TPI (3.1 mg/ml) was denatured as described under Materials and Methods with the indicated concentrations of Gdn/HCl. 1 μl mixture was transferred to 3.0 ml solution B containing 6.0% water; this yielded a concentration of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ solution B. Activity was measured immediately after transfer to solution B (○), or after 15 h (●). (B) (0.5 μg protein/ml solution B) The same protocol was used, except that either the control (○, ●) or TPI that had been denatured in 5.0 M Gdn/HCl $\delta\delta\delta$ s was transferred to reverse micelles that had the indicated concentrations of Gdn/HCl. After 9 h (○, Δ) or 24 h (●, \blacktriangle) incubation, activity was determined. 100% activity corresponds to the activity of TPI that had not been exposed to Gdn/HCl.

was detected in TPI denatured in Gdn/HCl at concentrations higher than 2.0 M. However, after 15 h incubation, all the samples had regained activity. This was about 60% of that observed in TPI that had not been exposed to Gdn/HCl. As shown below, both the rate and extent of reactivation depended on the concentration of TPI transferred to the organic-solvent system.

As the transfer of denatured TPI into the organic solvent also involved the transfer of Gdn/HCl into the water phase of reverse micelles, it was necessary to ascertain to what extent the concentration of Gdn/HCl affected reactivation. For this purpose, TPI was exposed to 5.0 M Gdn/HCl and thereafter transferred to the organic-solvent system that contained 6.0% water and various concentrations of Gdn/HCl. After 24 h, activity was nearly the same in systems that contained 0.025–0.075 M Gdn/HCl (Fig. 2B); with 0.118 M Gdn/HCl the activity was lower. It is also noted that the activity of TPI that had not been denatured was not affected by concentrations of Gdn/HCl lower than 0.125 M; therefore, in all subsequent experiments, the concentration of Gdn/HCl in the reactivation step was kept below 0.075 M.

Rate of reactivation of TPI as a function of time and monomer concentration

Under various conditions, the time course of reactivation of denatured TPI that had been transferred to the low-water system was determined (Fig. 3). As compared to reactivation in all water media in which the times for half-maximal reactivation are of the order of seconds [21, 22], reactivation of TPI in reverse micelles was several orders of magnitude slower.

One of the questions we wished to address using the reverse micelles systems was 'are monomers of TPI catalytically active?'. At the concentrations of denatured TPI that were used, on a statistical basis, one unfolded monomer was transferred to a single micelle. Hence, it was rationalized that, if transfer of large molecules (unfolded TPI monomers) between reverse micelles did not take place, or if the process was slower than monomer folding, possible activity of the monomer could be detected. In this case, there should be a period during which the appearance of activity would be independent of protein

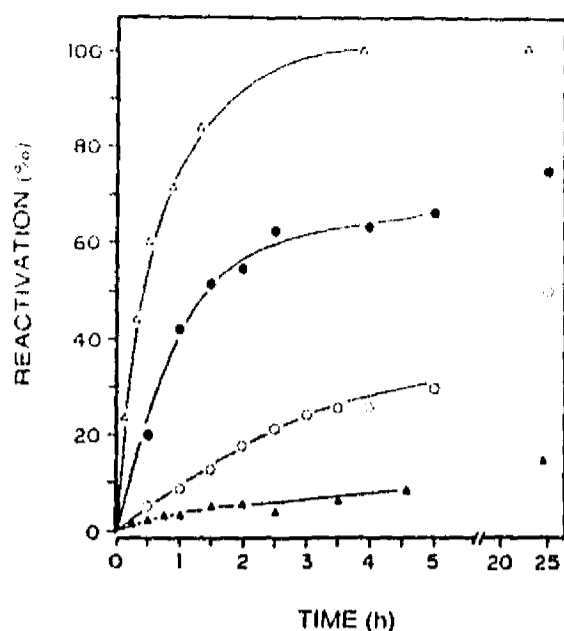


Fig. 3. Time course for TPI reactivation and effect of denatured TPI and CAP-TPI concentrations. Native TPI at various concentrations or CAP derivatized TPI ($16 \times \text{g/ml}$) were denatured with 5.0 M Gdn/HCl in standard water media. In the traces depicted with closed triangles and open circles, denatured TPI was transferred to 15 ml solution B, yielding protein concentrations of 0.1 μg protein/ml and 0.4 mg protein/ml, respectively. (●) Denatured TPI transferred to 1.5 ml solution B, yielding a protein concentration of 4.0 $\mu\text{g/ml}$ solution B. (Δ) Activity of denatured TPI that had been transferred to 3.0 ml solution B, yielding a concentration of 0.23 $\mu\text{g/ml}$, but that in addition contained 5.3 μg of denatured CAP-TPI/ml solution B. The activity of the various samples was determined at the times indicated.

concentration. Accordingly, the effect of protein concentration on the rate of reactivation was measured under three different experimental conditions.

In one approach, two different amounts of denatured TPI were transferred to equal volumes of organic-solvent systems that contained 6.0% water (Fig. 3). In this case, different amounts of protein distributed in the same number of micelles. The rate of activation was clearly dependent on the protein concentration, i.e. the higher the amount of protein, the faster the rate of reactivation.

In a second approach, the same amount of denatured TPI in water was transferred to different volumes of the organic-solvent system. In this case, the same amount of protein was transferred to systems that contained a tenfold difference in the overall amount of micelles (Fig. 3). Under these conditions, it was also observed that reactivation was faster at the higher protein concentration.

It has been shown that hybrids of TPI may be formed from monomers of different species [38]. It is also possible to construct dimers with an active monomer and a monomer with CAP covalently bound to the catalytic site; the hybrids exhibit half the catalytic activity of the nonderivatized dimers [20, 27, 28]. Therefore, in a third approach to explore if the appearance of enzyme activity was related to dimerization, the rate of reactivation of denatured TPI was measured in the presence of denatured TPI that had been previously derivatized with CAP (Fig. 3). The extent of CAP derivatization was established from measurements of catalytic activity and gel electrophoresis under nondenaturing conditions. The former was about 0.01% that of the native enzyme and electrophoretic analysis revealed a single band with the characteristics of a more negative protein, compared to native TPI. The band showed no activity when stained for catalytic activity (not shown).

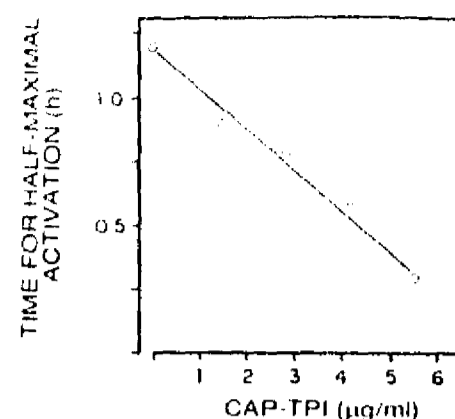


Fig. 4. Effect of denatured CAP-TPI concentrations on the reactivation of TPI. The protocol was as described in Fig. 3 for the reactivation of TPI (0.47 $\mu\text{g/ml}$ solution B) with the indicated concentrations of denatured CAP-TPI/ml solution B. From log plots of activity (100% activity being the maximal activity reached) against time, the half-time for reactivation was calculated.

When denatured CAP-TPI was added to reverse micelles that contained denatured TPI (ratio of CAP-TPI/TPI was 23), the rate of reactivation was clearly increased (Fig. 3). Similar experiments were carried out at various concentrations of denatured CAP-TPI and a single concentration of TPI. From log plots of the appearance of activity at various times in reference to the maximal activity observed, the time for half-maximal activation was calculated (Fig. 4). This diminished as the concentration of CAP-TPI was increased. The finding that the rate of appearance of activity diminished as the number of derivatized monomers was increased implies that the appearance of activity depended on the formation of the dimer. Also, the data strongly suggest that the majority of the dimers with catalytic activity were composed of a non-derivatized and a CAP-derivatized monomer. Furthermore, and in confirmation with previous data [20, 27, 28], the results show that a monomer bound to an inactive monomer is fully active. In fact, the activity reached with the mixture of denatured derivatized and nonderivatized TPI was higher than with only nonderivatized TPI (see below).

Effect of protein concentration on the extent of reactivation

Regarding the mechanisms involved in the reactivation of denatured TPI in reverse micelles formed, it was of interest to determine if the protein concentration affected the extent of reactivation. Indeed, it was observed that the extent of reactivation was affected by the amount of denatured TPI that was introduced into the organic-solvent system (e.g. see Fig. 3). The results of Table 1 show that the extent of reactivation increased with increasing protein concentration, and this was more evident at concentrations below 0.1 μg protein/ml organic-solvent system. At concentrations over 0.1–0.4 $\mu\text{g/ml}$ organic-solvent system, the activity reached a plateau that, in different experiments, varied over 55–80%. It is also of interest that the measurements of the extent of reactivation showed that it was higher with CAP-TPI than with equivalent concentrations of TPI; the reason for this has not been ascertained.

The finding that, in the organic-solvent system employed, enzyme reactivation was better at high protein concentration is somewhat in contrast to previous reports for enzyme reactivity in conventional water systems, which indicate that the extent of reactivation and renaturation are adversely affected by high protein concentrations [39–41]. In standard water systems, the phenomenon has been extensively studied (for reviews see [42, 43]), and one of the main problems is that,

Table 1. Effect of protein concentration on the reactivation of TPI. TPI of different concentrations were denatured with 5.0 M Gdn/HCl in all water mixtures. 1- μ l aliquots were transferred to 3.0 ml reverse micelles, formed with 6.0% water. These yielded the indicated enzyme concentrations. In experiment A, the mixtures were incubated for 96 h, after which time TPI activity was measured. In experiment B, TPI and CAP-TPI (at different concentrations) were denatured and transferred to 3.0 ml reverse micelles, yielding the indicated protein concentrations; after 48 h incubation, activity was measured.

Experiment	Denatured TPI (+ CAP-TPI)	Reactivation
	μ g/ml solution B (μ g)	%
A	0.014	14
	0.025	28
	0.05	46
	0.1	59
	0.3	72
	0.36	84
B	0.06	51
	0.06 (+0.23)	94
	0.06 (+0.46)	92
	0.06 (+0.92)	100

at high protein concentrations, aggregation may occur upon removal of the denaturant. In reverse micelles, a single polypeptide localizes in an individual micelles; thus, it would seem that in these systems, the problem of protein aggregation upon dilution or removal of the denaturant is largely circumvented. This possibility has been previously suggested and experimentally demonstrated with ribonuclease [3, 4].

Effect of water on enzyme reactivation

The classical work of Kauzman [44] showed that water was critical for the formation of the three-dimensional structure of proteins. In the study of the effect of water on the characteristics of proteins, one of the attractive features of reverse micelles is that the size of the water pool in which the enzyme localizes can be controlled by the amount of water introduced. Therefore, it is possible to study protein renaturation and enzyme reactivation in water spaces of different dimensions.

Fig. 5 shows the effect of water concentration on the reactivation of TPI that had been denatured in 3.0 M and 5.0 M Gdn/HCl. The results are also expressed as a function of W_0 (the ratio of water molecules/surfactant molecules). The curves of reactivation of TPI, denatured with either of two Gdn/HCl concentrations versus the amount of water, were markedly sigmoidal. A sharp rise in reactivation took place over 3.0–4.0% water; at water concentrations higher than 4.5%, the extent of reactivation showed only a moderate increase.

The low reactivation observed at water concentrations below 3.5% can have various explanations. One is that, in micelles with a small water pool, transfer of monomers between micelles does not take place, and hence the formation of the active dimer would be prevented. However, it has been shown that in the transfer of proteins between micelles with a small water pool, mainly the rate of transfer is affected [45]. In contrast, we observed that even after four days incubation in 3.0% water (data not shown), reactivation was nearly the same as after 16 h (Table 2).

Another explanation for the low level of reactivation in 3.0% water could be that, in a restricted water space, protein

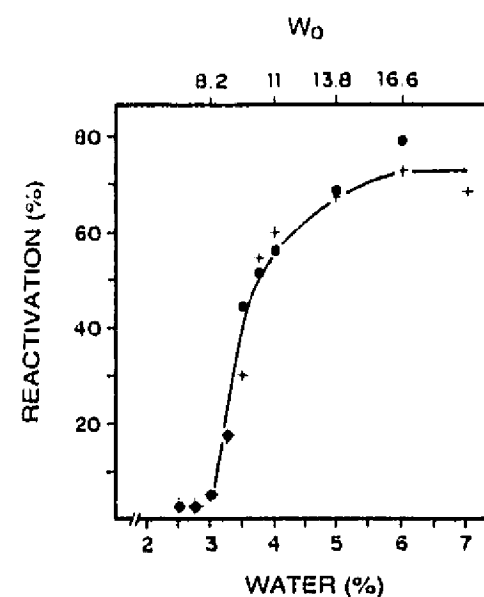


Fig. 5. Effect of water concentration on TPI reactivation. TPI was denatured in all water media with 3.0 M (O) and 5.0 M (+) Gdn/HCl and transferred to solution B (0.9 μ g protein/ml) that contained the indicated water concentrations. The activity reached after 17 h is shown.

folding does not take place or gives rise to incorrectly folded monomers. This possibility was explored, taking advantage of the fact that TPI can be transferred back to all water media (see Materials and Methods). Control and denatured TPI were transferred to the organic-solvent system that contained 3.0% or 6.0% water. After 16 h, the activity of the various samples was measured (Table 2), and the enzymes were transferred back to water; TPI activities in the water phase were also determined (Table 2). The activity recovered in the water phase of TPI that had not been denatured, was considered to be 100% (see legend to Table 2); the activity of denatured TPI that had been incubated with 6.0% water was about 70%. The latter value correlated with the activity detected in the low-water system. In contrast, hardly any activity was detected in the water phase that was obtained from reverse micelles formed with 3.0% water which contained denatured TPI. The findings suggest that the denatured enzyme that had been incubated in 3.0% water acquired a structure that did not allow the formation of the active dimer, even when transferred to all water media.

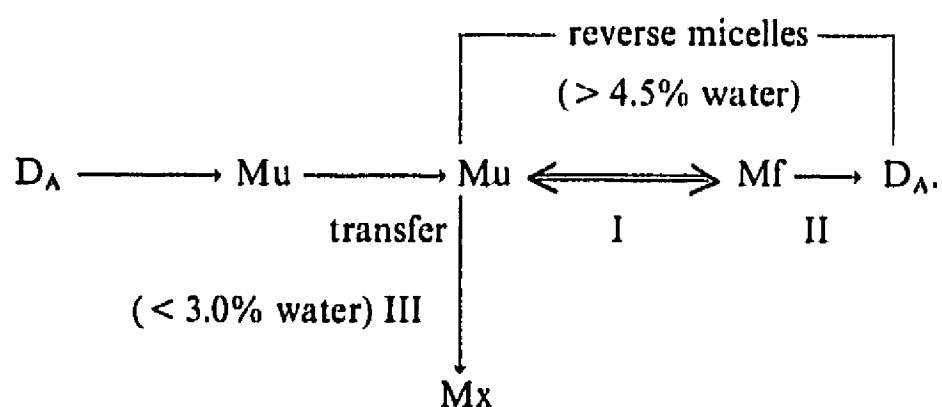
An attempt was made to determine the time of formation of incorrect structures in 3.0% water (Table 2). TPI was denatured in all water media and transferred to the organic-solvent system which contained 3.0% water. At various times, the water content of the system was raised to 6.0%, and thereafter allowed to reactivate for 17 h; after that time, activity was determined. The shortest time at which transfer and dilution to 6.0% water could be carried out was 12 s. 30 s incubation of denatured TPI in 3.0% water sufficed to produce about a 90% loss in its capacity to reactivate.

DISCUSSION

It has been previously shown that ribonuclease which has been denatured in all water media by Gdn/HCl can renature in reverse micelles formed with Aerosol OT [sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate] [3, 4]. In agreement with these findings, we observed that dimeric TPI that had undergone denaturation in all water media could also be reactivated in reverse micelles. The process of reactivation of TPI in reverse micelles can be rationalized according to the following sequence of reactions.

Table 2. Formation of inactive conformations in organic-solvent systems with 3.0% water. //, Transfer to solution B or an increase in the concentration of water. (A) 1 μ l of either control TPI or TPI that had been denatured in 5.0 M Gdn/HCl in standard water mixtures was transferred to 3.0 ml solution B (0.8 μ g protein/ml) containing either 3.0% or 6.0% water (as indicated) and allowed to react for 16 h. After this time, the activity of the samples was measured in solution B with 6.0% water (100% corresponds to the activity of native TPI transferred to solution B). Also after 16 h incubation in solution B, the enzymes were transferred back to the water media (see Materials and Methods). The activities of the resulting water phases were determined. The activity of the starting TPI was 3750 μ mol min^{-1} mg^{-1} ; after its transfer to solution B and back to water, the recovered activity was 3140 μ mol min^{-1} mg^{-1} (84%). This value was taken as 100%. (B) Same protocol as for (A) was used (0.6 μ g protein/ml solution B), except that the water content of samples originally in 3% water was raised to 6% at the times indicated by the addition of aqueous buffer A. Time zero was the time at which the denatured enzyme was transferred to solution B; this was followed by mixing and the addition of water to 6%. The time indicated corresponds to the latter step. The samples were allowed to react for 17 h, then activity was measured.

Condition	Activity	
	solution B	water
	%	
(A) TPI//solution B (3.0% water)	100	100
TPI + Gdn/HCl//solution B (6.0% water)	69	71
TPI + Gdn/HCl//solution B (3.0% water)	8	2
(B) TPI//solution B (3.0% water)	100	
TPI + Gdn/HCl//solution B (6.0% water)	63	
TPI + Gdn/HCl//solution B (3.0% water, 12 s)//6.0% water	33	
TPI + Gdn/HCl//solution B (3.0% water, 30 s)//6.0% water	12	
TPI + Gdn/HCl//solution B (3.0% water, 1 min)//6.0% water	16	
TPI + Gdn/HCl//solution B (3.0% water, 3 min)//6.0% water	14	



Incubation of the native dimeric active enzyme (D_A) with high concentrations of Gdn/HCl in standard water systems leads to the formation of denatured monomers (Mu). In the overall sequence of reactions in reverse micelles, the unfolded monomer transferred to the organic solvent system that contains more than 4.5% water forms an active dimer (D_A). It is visualized that in reverse micelles, prior to the formation of the dimer, there is a folding of the monomer which results in the structure Mf (reaction I). Mx corresponds to the inactive form of the protein that is formed in 3.0% water over a time range of less than 30 s; its formation occurs through reaction III. The scheme does not outline other possible intermediate steps, such as the formation of an inactive dimer that subsequently acquires the active conformation. Nevertheless, the simplified scheme is derived from the following observations and allows the formulation of several conclusions.

(a) The time for reactivation diminishes with protein concentration (Figs 3 and 4). Therefore, the rate-limiting step of the overall sequence of TPI reactivation in reverse micelles appears to be the formation of the dimer. Similar results and conclusions have been obtained in conventional water systems [21, 22].

(b) The results also show that the extent of reactivation is higher as the concentration of protein is increased (Figs 3 and Table 1). This indicates that there is an inverse relationship between the rate of step II and the number of monomers capable of forming the dimer. This can be rationalized by assuming that reaction I is reversible and that, with time and

at low-protein concentrations (low rate of step II), there is a gradual leakage of Mu to Mx, thereby decreasing the number of monomers capable of undergoing dimerization. However, it is also possible that Mf could give rise directly to incorrectly folded monomers or dimers.

(c) The active dimer is highly stable in reverse micelles, i.e. the enzyme loses less than 10% of its activity over five days (data not shown). Therefore, the process of protein reactivation can be considered as essentially irreversible. As step I is reversible (or if there is a leak from Mf to incorrect structures), it follows that step II corresponds to the irreversible step of the overall sequence. Indeed, the association constant of dimer formation is strikingly high [13].

(d) The amount of water in the micelles is critical for the production of catalytically active TPI. In the scheme, the amount of water would mostly affect the pathway which Mu would follow. When the amount of water is below 3.0%, reaction III would predominate over reaction I; conversely at concentrations of water above 4.5%, the predominant pathway would be reaction I. The marked reduction in the formation of active dimers at low-water concentrations is difficult to unambiguously explain. There are at least two possibilities. First, the folding pathway for correct structure formation requires a given amount of water. The other is that, in micelles of low-water content, the unfolded protein interacts with the charged micellar wall, leading to the formation of incorrect structures. Indeed, the work of Desfosses et al. [46] shows that the structure of proteins in the interior of reverse micelles may be significantly affected. This may represent a drawback in the use of reverse micelles for following protein changes.

Finally, we would like to note that although we have been unable to observe the activity of single monomers, the findings do not discard the possibility that isolated subunits of TPI may be catalytically active. Also, we want to stress that, in this work, we have limited our experiments to measurements of catalytic activity. Hence, the arrangements that monomers undergo to produce a catalytically competent TPI remain to be established.

The authors are indebted to Dr. Ömit Yüksel and Dr. An-Qiang Sun for many helpful and stimulating discussions during the course of this work and for careful revision of the manuscript. This work was supported by a MERIT Award from the National Institute on Aging (NIH AG01274), the R. A. Welch Foundation (B0502), the Texas Advanced Technology Research Program, the Alexander von Humboldt Foundation and the *Dirrección General de Apoyo a Personal Académico* of the *Universidad Nacional Autónoma de México*.

REFERENCES

1. Luisi, P. L. & Magid, L. J. (1986) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20, 409–474.
2. Martinek, K., Levashov, A. V., Lyachko, N., Khmelnisty, Y. & Berezin, I. V. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155, 453–468.
3. Hagen, A. J., Hatton, T. A. & Wang, D. I. C. (1990) *Biotech. Bioeng.* 35, 955–965.
4. Hagen, A. J., Hatton, T. A. & Wang, D. I. C. (1990) *Biotech. Bioeng.* 35, 966–975.
5. Kabanov, A. V., Nametkin, S. N., Evtushenko, G. N., Chernov, N. N., Klyachko, N. L., Levashov, A. V. & Martinek, K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 996, 147–152.
6. Kavanov, A. V., Nametkin, S. N., Chernov, N. N., Klyachko, N. L. & Levashov, A. V. (1991) *FEBS Lett.* 295, 73–76.
7. Maitra, A. (1984) *J. Phys. Chem.* 88, 5122–5125.
8. Hilhorst, R., Spruijt, T., Laane, C. & Veeger, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 459–466.
9. Tyrakowska, B., Verhaert, R. M. D., Hilhorst, R. & Veeger, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 81–88.
10. Albery, W. J. & Knowles, J. R. (1976) *Biochemistry* 15, 5631–5640.
11. Blacklow, S. C., Raines, T. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. & Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry* 27, 1158–1167.
12. Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350, 121–124.
13. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. & Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609–6618.
14. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I. & Wilson, I. A. (1975) *Nature* 255, 609–614.
15. Wierenga, R. K., Noble, N. E. M., Postma, J. P. M., Groendijk, H., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. & Oppendoes, F. R. (1991) *Proteins* 10, 33–49.
16. Albery, W. J. & Knowles, J. R. (1977) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16, 285–293.
17. Richard, J. P. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 4926–4936.
18. Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A. & Klibanov, A. M. (1987) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 675–679.
19. Sawyer, T. H. & Gracy, R. W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 51–57.
20. Schnackerz, K. D. & Gracy, R. W. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 731–738.
21. Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* 135, 165–172.
22. Zabori, S., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* 35, 999–1004.
23. Yuan, R. M., Talent, J. M. & Gracy, R. W. (1981) *Mech. Ageing Dev.* 17, 151–162.
24. Tang, C. Y., Yüksel, K. Ö., Jacobson, T. M. & Gracy, R. W. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 12–19.
25. Sun, A. Q., Yüksel, K. Ö. & Gracy, R. W. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 382–390.
26. Hartman, F. C. (1971) *Biochemistry* 10, 146–154.
27. Norton, I. L. & Hartman, F. C. (1972) *Biochemistry* 11, 4435–4441.
28. Sun, A. Q., Yüksel, K. Ö., Rao, G. S. J. & Gracy, R. W. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, in the press.
29. Kasahara, M. & Penefsky, H. S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4180–4187.
30. Lu, H. S., Yuan, P. M. & Gracy, R. W. (1984) *J. Biol. Chem.* 264, 59–64.
31. Maizel, J. V. (1971) *Methods Virol.* 5, 180–246.
32. Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Ramirez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205, 509–512.
33. Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A. & Gracy, R. W. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 312–320.
34. Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28, 3177–3182.
35. Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (1990) *Biochemistry* 29, 751–757.
36. Zaks, A. & Klibanov, A. M. (1984) *Science* 224, 1249–1251.
37. Zaks, A. & Klibanov, A. M. (1985) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82, 3194–3196.
38. Sun, A.-Q. (1991) Ph. D. Thesis, North Texas State University, Denton, USA.
39. Zettlmeissl, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1979) *Biochemistry* 18, 5567–5571.
40. Rudolph, R., Zettlmeissl, G. & Jaenicke, R. (1979) *Biochemistry* 18, 5572–5575.
41. Mitraki, A., Betton, J. M., Desmadril, M. & Yon, J. M. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 29–34.
42. Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117–237.
43. Mitraki, A. & King, J. (1989) *Bio/Tech.* 7, 690–697.
44. Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14, 1–63.
45. Bru, R. & García-Carmona, F. (1991) *FEBS Lett.* 282, 170–174.
46. Desfosses, B., Cittanova, N., Urbach, W. & Waks, M. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 79–87.

II) DESAMIDACION DE LA TPI EN SISTEMAS DE BAJO CONTENIDO DE AGUA

La desamidación específica de la Asn71 en la triosafosfato isomerasa se estimula por la unión del sustrato y la catálisis. La desamidación de esta asparagina localizada en la interfase del dímero es uno de los primeros eventos en la disociación de subunidades, la desnaturalización y la degradación de la proteína. En este trabajo se estudió la relación entre la velocidad de recambio de la TPI de conejo y su desamidación. La enzima se transfirió al sistema de micelas invertidas con diferentes cantidades de agua para regular su velocidad catalítica y se cuantificó el grado de desamidación.

La TPI se transfirió al sistema de micelas invertidas formado por el detergente catiónico CTAB, hexanol y octano. A 3.0 % de agua, la enzima convierte el gliceraldehido 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato a una velocidad aproximada de 150 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, mientras que a 6.0 % de agua la velocidad de isomerización fué de 500 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$. Estos valores corresponden al 3 y 10 % de la actividad catalítica en 100 % de agua. Tanto en el medio acuoso como en las micelas con 3 y 6 % de agua el sustrato estimula la desamidación. Los resultados demuestran que la desamidación fué mayor en la enzima con un menor número de recambio catalítico (3.0 %). Esto implica que todos o algunos pasos del ciclo catalítico tiene un tiempo de vida más grande. Por tanto, la velocidad de desamidación no solo depende del número de ciclos catalíticos, sino que también se relaciona con el tiempo en el cual la Asn71 se encuentra en una conformación o en un ambiente más favorable para desamidarse. Si se reduce la cantidad de agua a 0.2-0.3 % (v/v), condiciones en las cuales la velocidad catalítica de la enzima es del orden de minutos o más, no se observa desamidación de la TPI. La enzima modificada covalentemente en el sitio catalítico con el análogo del sustrato CAP e incubada hasta por diez días, muestra cierto grado de desamidación. En estas condiciones se disminuye la flexibilidad conformacional de la enzima. Esta incrementa su termoestabilidad y su resistencia a la hidrólisis de los enlaces amida por altas temperaturas.

Deamidation of Triosephosphate Isomerase In Reverse Micelles: Effects of Water on Catalysis and Molecular Wear and Tear.[†]

[†]This work was supported by a grant from the Direccion General de Apoyo a Personal Academico, Universidad Nacional Autonoma de Mexico to AGP, a MERIT Award to RWG from the National Institute on Aging (AG01274), the R. A. Welch Foundation (B0502) and The Texas Advanced Technology and Research Program (009768-008).

Authors: [‡]Georgina Garza-Ramos, [‡]M. Tuena de Gomez-Puyou, [‡]A. Gomez-Puyou, [§]K. Ümit Yüksel, and [§]Robert W. Gracy*

[‡]Instituto de Fisiologia Celular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Apartado Postal 70-600, Mexico D. F., Mexico and [§]University of North Texas Health Science Center at Fort Worth, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, Texas 76107-2699, U.S.A.

***To whom correspondence should be addressed:**

R. W. Gracy, Ph.D., Professor and Chairman, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, 3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, Texas 76107-2699, U.S.A.

Telephone: (817) 735-2141 Fax: (817) 735-2133.

Running Title: Deamidation of Triosephosphate Isomerase

Key Words: Deamidation, triosephosphate isomerase, reverse micelles, low water systems, molecular wear and tear.

Abbreviations: CAP, 3-Chloroacetylphosphate; TPI, Triosephosphate isomerase; W_o , ratio of water molecules to surfactant molecules; TPT, toluene/phospholipid/Triton X-100.

ABSTRACT

The specific deamidation of asparagine-71 of triosephosphate isomerase increases upon substrate binding and catalysis. This deamidation at the dimer interface initiates subunit dissociation, unfolding and protein degradation. The apparent connection between catalysis and terminal marking supports the concept of "molecular wear and tear," and raises questions related to the molecular events that lead to deamidation. In order to explore this interaction, triosephosphate isomerase was entrapped in reverse micelles with different water contents that support different catalytic rates. Deamidation was quantified for the free enzyme, the enzyme in the presence of substrates and the enzyme which had been covalently modified at the catalytic center with the substrate analogue 3-chloroacetol phosphate (CAP). Both in water and reverse micelles of cetyltrimethylammonium with 3% and 6% water, substrate binding enhanced deamidation. Studies of the extent of substrate induced deamidation at various water concentrations showed that deamidation per catalytic turnover was greater in 3% than in 6% water, which in turn was higher than in 100% water. The enzyme was also entrapped in micelles formed with toluene, phospholipids and Triton X-100 to explore the process at much lower water concentrations (e.g., 0.3 %). Under these conditions, catalysis was very low and hardly any deamidation took place. Deamidation of the CAP-labeled enzyme was also markedly diminished. At these low-water conditions, the enzyme exhibited markedly increased thermostability and resistance to hydrolysis of the amide bonds. The data suggest that the rate of deamidation is not only dependent on the number of catalytic events, but is also related to the time that asparagine-71 exist in a conformation or solvent environment more favorable for deamidation.

Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1, TPI) is a homodimeric enzyme catalyzing the interconversion of *D*-glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. Its thermodynamics, kinetics and structural changes which occur during catalysis have been studied in great detail (Albery & Knowles, 1976; Banner et al., 1975; Blacklow et al., 1988; Lolis et al., 1990; Lolis & Petsko, 1990; Knowles, 1991; Sampson & Knowles, 1992; Wierenga et al., 1991; 1992). Upon ligand binding at the catalytic center, a hinged lid [residues 168-177] closes over the catalytic center. This conformational change anchors the substrate into the correct steric position and expels water from the catalytic center, thereby preventing hydrolysis of the reaction intermediate to methylglyoxal and inorganic phosphate (Pompliano et al., 1990). In addition, ligand binding enhances the specific deamidation of Asn71 (Sun et al., 1992a; Yüksel & Gracy, 1986) on each subunit which appears to be the terminal marking event in the degradation of the enzyme (Yuan et al., 1981). This deamidation is followed by a subsequent deamidation of the juxtaposed Asn15 (<0.5 nm away on the neighboring subunit). The introduction of four new negative charges at the subunit interface leads to dissociation, unfolding and proteolytic degradation (Ahern et al., 1987; Casal et al., 1987; Sun et al., 1992a; Yuan et al., 1981). Hence, studies on the mechanisms involved in deamidation, and the factors which affect the protein stability, should shed light on the initial steps of degradation of TPI and other proteins.

The original observations that the rate of deamidation increases as a function of the number of catalytic turnovers (Yüksel & Gracy, 1986) led to the proposal that deamidation may be a consequence of the number of times that the substrate-induced conformational change causes the critical Asn71 to be exposed to the solvent or assume a conformation more likely to deamidate [i.e., "Molecular Wear and Tear" (Sun et al., 1992a; Yüksel & Gracy, 1986)]. Asparagines of certain configurations are especially prone to deamidation (Kossiakoff, 1988). The present study explores the question of whether deamidation depends on the time that the critical Asn71 is exposed to the solvent, or exists in a deamidation-favored conformation [i.e., the cumulative effects of the opening and closing of the hinged lid as the odometer of deamidation]. To this

purpose, deamidation of TPI entrapped in reverse micelles with different water contents was quantified and correlated with the catalytic turnover.

The low water system was chosen since many studies have shown that the catalytic activity of enzymes (Garza-Ramos et al., 1992a; Luisi & Magid, 1986; Martinek et al., 1986), including TPI (Garza-Ramos et al., 1992b), is markedly influenced by the amount of water in the system. In general, as the water content is decreased, catalytic activity decreases, and this has been ascribed to hindrances in the requisite conformational changes of the protein [including the solvent] during a catalytic cycle (Garza-Ramos et al., 1992a; Zaks & Klibanov, 1984). Moreover, the steps of a catalytic cycle have a distinct water requirement (Barrabin et al., 1993) which suggests that by varying the amount of water in contact with the enzyme, it is possible to trap catalytic cycle intermediates (Escamilla et al., 1989). With respect to TPI it was reasoned, that if at relatively low water concentrations the catalytic cycle could be induced to function in "slow motion," there would be a longer dwell time for Asn71 in the deamidation-favorable conformation [or exposure to the solvent] and an opportunity to examine the relationship between catalysis and deamidation.

The studies described here show that as the rate of catalysis is diminished by low water, deamidation ^{Per catalytic cycle} is increased. However, at very low water concentrations in which catalysis is hardly detectable, deamidation is largely prevented. At these low water concentrations, TPI exhibits a high thermostability due to a decrease in protein flexibility (Garza-Ramos et al., 1989; Garza-Ramos et al., 1990) and resistance to covalent modification.

MATERIALS AND METHODS

TPI [5.3.1.1] from rabbit muscle [lyophilized powder], as well as cetyltrimethylammonium, n-octane, hexanol, soybean phospholipids [asolectin], and Triton X-100 were obtained from Sigma; toluene was from Merck.

Deamidation of Triosephosphate Isomerase in Reverse Micelles

TPI dissolved in 50 mM triethanolamine pH 9.6 was entrapped in either of two types of micelles. One type was composed of a mixture of 200 mM cetyltrimethylammonium bromide in n-octane to hexanol in a ratio of 8.7:1 [by vol.] (Hilhorst et al., 1984; Tyrakowska et al., 1990). Reverse micelles were formed by adding aqueous 50 mM triethanolamine pH 9.6 with or without 2.0 mM glyceraldehyde 3-phosphate. After micelles were formed, TPI at the desired concentration was introduced. Depending on the experiment, the final concentration of water was either 3 or 6 % by volume; these correspond to W_o [ratio of water to surfactant molecules] of 8.2 and 16.5 respectively. TPI was also transferred to reverse micelles formed with toluene/Triton X-100 [85:15 by vol.] that contained 10 mg soybean phospholipids per ml (Garza-Ramos et al., 1990). The amount of water in this system was either 0.3 or 3.8 % [by vol.]; these values correspond to W_o [ratio of water molecules to molecules of Triton X-100 + phospholipids] of 0.7 and 8.9, respectively. At the lower water concentrations, micelles were formed by injection of a water solution [50 mM triethanolamine pH 9.6 with or without 2.0 mM glyceraldehyde 3-phosphate adjusted to pH 9.6] that contained TPI. In some cases, TPI entrapped in TPT type of reverse micelles was incubated for up to ten days; the reverse micelle system was stable for this length of time. The water solubility diagrams of the two types of micelles have been previously described (Garza-Ramos et al, 1992c).

The transfer of TPI to reverse micelles was made at room temperature. Prior to its transfer, the freshly dissolved enzyme was maintained in an ice bath [not more than 15 min]. After transfer, the enzyme was incubated at the temperatures and for the times indicated in the *Results* section. At different times of incubation, TPI entrapped in reverse micelles was transferred back to water. When the enzyme was entrapped in micelles of the cetyltrimethylammonium bromide type, the enzyme was recovered by carefully layering 50 μ l of reverse micelles over 1 ml of 40 mM triethanolamine, 10 mM ethylenediamine tetraacetate, and 1 mM dithiothreitol, pH 7.4 and centrifuged at 105,000 x g for 60 min at 20 °C. Afterwards, the water phase was collected. The

same procedure was followed to recover TPI from reverse micelles formed with phospholipids and Triton X-100, except that centrifugation was carried out at 15,000 x g. Generally, the water phase from four to eight identical tubes was collected. The water phases were pooled, and remaining surfactant that remained in the mixture was extracted with isoamyl alcohol (Ramirez et al., 1983). The water extracts were kept at 4 °C. As calculated from the total TPI activity in the water phase, between 70 and 90 % of the enzyme was recovered.

The water extracts were concentrated in Centricon filters by centrifugation at 5-10 °C to volumes of 30 to 50 µl. These were assayed for the presence of deamidated isoforms by analytical gel electrophoresis under nondenaturing conditions as described by Maizel Maizel, 1971. The gels were stained for both TPI activity (Snapka et al., 1974) and protein [Coomassie blue]. In some experiments, the Coomassie blue stained gels were quantified by scanning densitometry on a LKB Ultrascan XL densitometer using the software integrated into the instrument.

Activity of TPI in all water mixtures or in reverse micelles was measured as described previously (Garza-Ramos et al., 1992b) in the presence of glyceraldehyde 3-phosphate, NADH and α -glycerophosphate dehydrogenase. The concentration of TPI was calculated from its absorbance at 280 nm (Lu et al., 1984).

Circular Dichroism Spectroscopy

Circular dichroic analyses of TPI in 100 % water or when entrapped in reverse micelles of the cetyltrimethylammonium type were carried out with an Aviv model 62 HDS spectropolarimeter in 0.1 cm quartz cuvettes at 25 °C. In these studies, TPI was at a concentration of 0.052 mg/ml per ml of either 100 % water or reverse micelles of 3 or 6 % water. The samples were scanned from 300 to 215 nm. Due to the high background of reverse micelles [without protein], it was not possible to carry out analysis at lower wavelengths. The ellipticity data at 222 nm were obtained by graphic interpolation, and the mean residue ellipticity (Sun et al., 1992b) was calculated from: $(\theta) = (\theta_{\text{obs}}) / (10 (\text{MRC})l)$, where: (MRC) = (496 amino acid residues) (0.981×10^{-6} M) and $l = 0.1$ cm.

Fluorescence Spectroscopy

The fluorescence emission spectra of TPI excited at 295 nm were recorded between 305 and 450 nm on a Shimadzu RF 5000U spectrofluorometer. The band widths of excitation and emission wavelengths were set at 5 nm. The enzyme concentration was 0.2 mg / 3.0 ml of either 50 mM triethanolamine, pH 9.6, or of reverse micelles of the cetyltrimethylammonium type formed with the same buffer at a concentration of 3% or 6% water (by volume). The fluorescence spectra of the blanks (identical samples, except for the enzyme) were subtracted from those that contained the enzyme.

RESULTS

Enzyme Turnover and Deamidation in Low Water Systems

Ligand-induced deamidation of mammalian TPI readily occurs at 37 °C at mildly alkaline pH (Sun et al., 1992a; Yuan et al., 1981; Yüksel & Gracy, 1986) and, thus, deamidation studies in low water were also carried out at pH 9.6 and at 37 °C. In order to determine if deamidation of TPI in reverse micelles was related to catalytic turnover, experiments were conducted in reverse micelles formed with cetyltrimethylammonium bromide, n-octane, hexanol, and 3 % or 6 % water. We have recently demonstrated that the catalytic activity of TPI is significantly different in 3, 6 and 100 % water (Garza-Ramos et al., 1992b). Here, TPI was incubated with and without substrate in all aqueous media, and in reverse micelles containing 3 % and 6 % water. After 3 and 6 hours of incubation, the enzymes were recovered into all aqueous media and analyzed. Native gel electrophoresis showed that in the absence of substrate and independent of water concentration, the amount of native TPI remained constant, indicating no deamidation was taking place (Fig. 1). The presence of glyceraldehyde-3-phosphate, however, induced a time dependent decrease in the amount of the native enzyme band with the simultaneous formation of acidic deamidated isoforms (Fig. 1). Table I shows the extent of substrate-induced deamidation as the loss of native protein. The catalytic activity of these samples assayed under the same conditions they were incubated are

also shown (Table I). At any given time, the decrease in the area of the native protein was about 20 % higher in 100 % water than in 3.0 % or 6.0 % water. However, the activity of TPI in 3 % and 6 % water was about 25-fold and 9-fold lower than in 100 % water, respectively. Since the extent of deamidation depends on the number of catalytic cycles that the enzyme undergoes, the data indicate that deamidation per catalytic turnover increased as the rate of catalysis diminished by limiting the amount of water in contact with the enzyme. This in turn suggests that the extent of deamidation is not solely dependent on the number of catalytic turnovers.

To eliminate the possibility of gross structural changes of TPI in reverse micelles, CD and fluorescence spectra of the enzyme were recorded under these conditions (Fig. 2). Either spectra recorded at the three water concentrations were superimposable. Quantitatively, the minor differences in molar ellipticity at 222 nm were not significant (Fig. 2A). The intrinsic tryptophan fluorescence of TPI recorded at the three water concentrations peaked at 330 nm, and the magnitude of fluorescence was also markedly similar (Fig. 2B). Hence, it is obvious that there are no gross changes in the structure of TPI at the three water concentration in which substrate induced deamidation was studied.

Very Low Water Systems

After it was found that TPI entrapped in two different types of low water micelles underwent substrate-induced deamidation, studies were conducted to explore if the process was modified by further decreasing the water concentration to much lower levels. Thus, the phospholipid/Triton X-100 type [TPT] micelles were used whereby enzymes can be transferred to reverse micelles with water concentrations as low as 0.3 %; this corresponds to a W_o = of 0.7 (Garza-Ramos, et al., 1990). Moreover, this system is stable at temperatures greater than 90 °C, and allows thermostability studies at much higher temperatures. With TPI entrapped in micelles with 0.3 % water, with or without substrate, there was no deamidation. It is important to note that the catalytic activity of enzymes placed in reverse micelles of the TPT type [$H_2O < 0.5$ %] is extremely low

(Garza-Ramos et al., 1990).

Since deamidation of TPI is enhanced by catalysis and/or substrate or analog binding (Sun et al., 1992a; Yüksel & Gracy, 1986), it was necessary to determine if the absence of deamidation in 0.3 % water was due to lack of catalysis or substrate binding. In this respect, the use of chloroacetylphosphate [CAP] instead of natural substrates presented two advantages: (a) it binds covalently to the catalytic site of the enzyme (Hartman, 1971; Norton & Hartman, 1972) and thereby induces deamidation (Sun et al., 1992a), and (b) CAP-TPI can be easily identified by native gel electrophoresis because of the shift in mobility toward the anode [Sun et al., 1992a, and see Fig. 3, lanes 1 and 2]. The enzyme was first transferred to the TPT system at pH 7.4, followed by the introduction of CAP at ratios of 1.6 and 10 CAP per monomer (the final water concentration was 0.3 %). After 24 hours, the enzyme was transferred back to water, concentrated and analyzed by native gel electrophoresis. Two protein bands with a mobility faster than that of native TPI were clearly evident [Fig. 3]. The isoform with intermediate migration was more clearly observed in samples that had the lower CAP:TPI ratio, and represents dimeric TPI derivatized at only one catalytic site. Similar to all water media, after prolonged incubation, the derivatized enzyme "lost" a fraction of bound CAP [Lane 7 and 8, Fig. 3]. This has been observed previously and shown to be due to progressive hydrolysis of the CAP Glu165 ester (Sun et al., 1992a). The faster migrating band [observed with highest CAP:TPI ratio] corresponded to that of dimeric TPI derivatized at both of the catalytic sites. Thus, it is evident that the entire population of TPI entrapped in reverse micelles formed with 0.3 % water has the capacity to bind CAP. Moreover, depending on the ratio of CAP:TPI, it is possible to derivatize one or two of the catalytic sites of dimeric TPI.

In a second experiment, TPI derivatized in all water media with two CAP per dimer was transferred to reverse micelles at pH 9.6 incubated for up to 10 days and analyzed for deamidation [Fig. 3, lanes 6 and 9, respectively]. After 10 days of incubation, only slight deamidation of the CAP-TPI complex was observed [Fig. 3, lane 9, and compare to the pattern at pH 7.4]. These

data indicate that ligand-induced deamidation of TPI is markedly decreased when the enzyme is entrapped in reverse micelles with 0.3 % water, but not with 3 % or higher water concentrations [see above].

Stability in Low Water

In light of the preceding data, it became of interest to determine if at low water concentrations, impairments in the hydrolysis of side chain amide bonds of Asn were accompanied by an increase in resistance of the enzyme to thermal denaturation. The incubation of TPI in all-water mixtures at temperatures of 57 °C and 75 °C brought about its rapid irreversible inactivation, and the inactivation rate was increased by substrate [Fig. 4]. The time for half-maximal inactivation at 57 °C was approximately 5 and 10 min with and without substrate, respectively. At 75 °C, with or without substrate, most of the activity was lost within 5 min of incubation [* and + in Fig. 4, respectively]. TPI entrapped in reverse micelles with 0.3 % water was much more stable than in all water media. For example, after 2 hours at 75 °C, only 30 % of the activity was lost and at 57 °C, 50 % of the activity remained after 24 hours of incubation [data not shown]. Analysis by native gel electrophoresis showed, that during the incubation at the elevated temperatures, the enzyme in all water media underwent drastic changes [Fig. 5A]. In addition, it is apparent that in the presence of substrate, these changes occurred more readily. On the other hand, notwithstanding the presence of substrate, essentially no changes were observed in TPI that had been incubated in 0.3 % water reverse micelles for extended periods [7 and 24 hours] at the elevated temperatures [Fig. 5B]. These findings indicate, that when placed in a low water environment, the catalytic capacity and structure of TPI are largely preserved even at elevated temperatures. It should also be noted that, under these conditions, no deamidated isoforms were detected.

Taken together, the results in water and in reverse micelles show, that by diminishing the amount of water, it is possible to achieve conditions in which the probability of deamidation per turnover number is higher. However, if water is further decreased, deamidation is prevented. The latter probably reflects the water requirements of the deamidation reaction per se.

DISCUSSION

Crystallographic data of TPI from chicken, yeast and trypanosomes indicate that substrate binding and catalysis result in the movement of the hinged lid over the active site (Lolis & Petsko, 1990; Wierenga et al., 1991; 1992). As evidenced by the enhanced rate of deamidation of Asn71 in the presence of substrate or covalently bound substrate analogues [e.g., CAP], this conformational change must be transmitted to the "interdigitating loop" at the subunit interface (Sun et al., 1992a; Yuan et al., 1981; Yüksel & Gracy, 1986). Regarding the mechanism(s) of this ligand-induced deamidation, it has been instructive to compare the process in water and in low water environments. In all-water media, it is well documented that as the number of catalytic turnovers is increased, the rate of deamidation is increased (Sun et al., 1992a; Yüksel & Gracy, 1986). However, as water concentrations are decreased and catalysis slowed down, a different picture emerges (Table I). For example, deamidation of the enzyme in reverse micelles with 3 % water was greater than at 6 % water where rates of catalysis were three times higher (Fig. 1). Since the circular dichroism and fluorescence spectra of the enzyme were similar in micelles with 3 %, 6 % water and in 100 % water, the differences in rates of deamidation do not seem to be due to grossly different conformations. Hence, with respect to the relationship between catalytic rates and deamidation, there are clear differences between all-water and low water systems. These observations point out the advantage of utilizing low water model systems to explore reaction mechanisms in which water is clearly a participant.

The catalytic activity of enzymes entrapped in reverse micelles decreases as the amount of water is diminished (Garza-Ramos et al., 1990, 1992a, b, c; Luisi & Magid, 1986; Martinek et al., 1986). This is thought to be due to impairments in the interactions between the solvent and protein that are necessary for catalysis (Garza-Ramos et al., 1989, 1990, 1992a, b, c). Thus, under conditions of limited water, the steps of the catalytic cycles that involve water-protein interactions

are slower than in all water media. As the rate of catalysis is diminished, the time in which the critical asparagines are prone to deamidation would be longer. As a consequence, there would be a higher probability of deamidation per catalytic turnover number. It is clear [Fig. 1] that deamidation per enzyme turnover is higher in the micellar system. After 7 hours of incubation, similar deamidation levels were observed in 100 % water and in 6 % water, albeit the catalytic activity was about 10 times higher in all water media.

Altogether, the data suggest that in all-water media, deamidation is a statistical event that depends on the number of times that TPI acquires "the conformation" in which the Asn side chain amide bond is cleaved. The data in reverse micelles illustrate that the time that TPI remains in this conformation is also a factor [i.e., the longer the time of exposure to the solvent, the greater the probability of deamidation].

Ahern et al. (1987) and Casal et al. (1987) showed that TPI undergoes deamidation at high temperatures and concluded that the specific asparagine residues at the subunit interface constitute the "weak links" in the maintenance of the native structure. Asparagines have also been shown as weak points in the thermal denaturation of other enzymes. At 37 °C in 100 % water or in reverse micelles with water concentrations above 3 %, substrate induced deamidation of TPI was observed prior to the appearance of changes in the structure of TPI [e.g., as evidenced by inactivation and smearing of the protein in gels] and corroborates previous studies (Sun et al., 1992a; Yuan et al., 1981; Yüksel & Gracy, 1986). These findings further indicate, that at physiological temperature and in the presence of substrate, the initial event of degradation is deamidation of Asn71. However, are these asparagines the weakest points in thermal inactivation of TPI, and are they affected by the amount of water? In all water media and at a temperature of 57 °C, changes that lead to irreversible thermal inactivation of TPI take place. In the presence of glyceraldehyde 3-phosphate, inactivation and multiple alterations of TPI occurred more readily than in the absence of substrate [Fig. 5A]. In aqueous media substrate-induced deamidation of Asn71, or the overall conformation that the enzyme acquires in the presence of substrate, confer to TPI an increased

sensitivity to thermal inactivation. Various groups have observed that in a restricted water environment, enzymes exhibit increased thermostability, and this has been ascribed to the greater rigidity that proteins acquire in such conditions (Barrabin et al., 1993; Escamilla et al., 1989; Zaks & Klibanov, 1984). However, we have now shown that, notwithstanding the presence of substrate, cleavage of protein covalent bonds [deamidation] is also reduced when the enzyme is placed in a limited water space. Hence, it would appear that both the increased rigidity of the enzyme and the resistance to hydrolysis of covalent bonds, account for the increased thermal resistance of protein stability in low water conditions.

REFERENCES

- Albery, W. J., and Knowles, J. R. (1976) *Biochemistry* 15, 5631-5640.
- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A., and Klibanov, A. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 675-679.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) *Nature* 255, 609-614.
- Barrabin, H., Scofano, H.M., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 757-763.
- Blacklow, S. C., Raines, T. T., Lim, W. A., Zamore, P. D., and Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry* 27, 1158-1167.
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., and Klibanov, A. M. (1987) *Biochemistry* 26, 1258-1264.
- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gomez-Puyou, Gomez-Puyou, A., Millan, L., and Draszon, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 332-343.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28, 3177-3182.

Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A., (1990) *Biochemistry* 29, 751-757.

Garza-Ramos, G., Fernandez-Velasco, D. A., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1992a) in *Biomolecules in Organic Solvents* (Gomez-Puyou, A., ed.) pp. 113-131, CRC Press, Boca Raton.

Garza-Ramos, G., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., and Gracy, R. W. (1992b) *Eur. J. Biochem.* 208, 389-395.

Garza-Ramos, G., Fernandez-Velasco, A., Ramirez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1992c) *Eur. J. Biochem.* 205, 509-517.

Hartman, F. C. (1971) *Biochemistry* 10, 146-154.

Hilhorst, R., Spruijt, T., Lane, C., and Veeger, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 459-466.

Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350, 121-124.

Kossiakoff, A. A. (1988) *Science* 240, 191-194.

Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6609-6618.

Lolis, E., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* 29, 6619-6625.

- Lu, H. S., Yuan, P. M. and Gracy, R. W. (1984) *J. Biol. Chem.* 264, 59-64.
- Luisi, P. L. and Magid, L. J. (1986) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20, 409-474.
- Maizel, J. V. (1971) *Methods Virol.* 5, 180-246.
- Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N., Khmel'nitsk, Y. L., and Berezin, I. V. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155, 453-468.
- Norton, I. L., and Hartman, F. C. (1972) *Biochemistry* 11, 4435-4441.
- Pompliano, D. L., Peyman, A., and Knowles, J. R. (1990) *Biochemistry* 29, 3186-3194.
- Ramirez, S. J., Salcedo, H. R., and Celis, H. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 324-327.
- Sampson, S. N., and Knowles, J. R. (1992) *Biochemistry* 31, 8482-8487.
- Snapka, R. M., Sawyer, T. H., Barton, R. A., and Gracy, R. W. (1974) *Comp. Biochem. Physiol. B* 49, 733-741.
- Sun, A. Q., Yüksel, K. Ü., and Gracy, R. W. (1992a) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 382-390.
- Sun, A. Q., Yüksel, K. Ü., Rao, G. S. J., and Gracy, R. W. (1992b) *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 421-428.
- Tollefsbol, T. O., Zaun, M. R., and Gracy, R. W. (1982) *Mech. Ageing Dev.* 20, 93-101.

Tyrakowska, B., Verhaert, R. M. D., Hilhorst, R., and Veeger, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 81-88.

Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., and Hol, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 995-1015.

Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., and Davenport, R. C. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126.

Yuan, P. M., Talent, J. M., and Gracy, R. W. (1981) *Mech. Ageing Dev.* 17, 151-162.

Yüksel, K. Ü., and Gracy, R. W. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 452-459.

Zaks, A., and Klibanov, A. M. (1984) *Science* 224, 1249-1251.

Zale, S. E., and Klibanov, A. M. (1986) *Biochemistry* 25, 5432-5444.

Figure Legends:

Figure 1. Deamidation of TPI in Reverse Micelles. In all aqueous medium (100 % water), TPI (2.8 mg/ml) was incubated in 50 mM triethanolamine pH 9.6, with or without 2.0 mM glyceraldehyde 3-phosphate. For the experiments in 3 % and 6 % water, TPI dissolved in the same buffer was transferred to reverse micelles of the cetyltrimethylammonium bromide type yielding a final water concentration of 3 % and 6 %, with or without 2.0 mM glyceraldehyde 3-phosphate (as indicated). The final enzyme concentration was 68 $\mu\text{g/ml}$ of reverse micelle system. The samples were incubated at 37 °C. At the indicated times, aliquots were withdrawn and the enzyme was transferred back to water for electrophoretic analysis under non-denaturing conditions. Native TPI and its isoforms were visualized by Coomassie Blue (A) and activity staining (B).

Figure 2. Effect of water content on structure of TPI. To assess any structural changes of TPI upon entrapment in reverse micelles CD (A) and fluorescence (B) spectra were recorded as described under Methods in 3 % (\circ), 6 % (—) and 100 % water (\triangle). The insets show the averages \pm standard deviations of ellipticity at 222 nm, relative emission intensity and wavelength of maximal fluorescence.

Figure 3. Formation of CAP-TPI Complex in Reverse Micelles and Deamidation of the Complex in Reverse Micelles with 0.3 % Water. Micelles formed with toluene, phospholipids and Triton X-100 with a final concentration of 0.3 % water were used. The concentration of TPI or derivatized CAP-TPI was 48 $\mu\text{g/ml}$ of micelle system. Lane 1 shows the electrophoretic migration in native gels of native TPI, whereas lane 2 shows the migration of TPI derivatized with CAP in all-water media. Lane 3 shows TPI transferred to reverse micelles and back to water. In lanes 4 and 5, TPI dissolved at pH 7.4 in 50 mM triethanolamine was transferred to reverse micelles followed by the addition of CAP (ratios of 1.6

and 10 CAP per monomer respectively); after 24 hours of incubation at 37 °C, the enzyme was transferred back to water. Lanes 7 and 8 correspond to the same samples after 10 days of incubation. Lanes 6 and 9 correspond to TPI derivatized in water and transferred to reverse micelles at pH 9.6; after 24 hours and 10 days of incubation respectively, the enzymes were brought back to water. The figure shows Coomassie blue stain of the samples.

Figure 4. Inactivation of TPI in All-Water Media and in Reverse Micelles with 0.3 % Water. TPI was dissolved in 50 mM triethanolamine pH 9.6 with (●----●) or without (○—○) 2 mM glyceraldehyde 3-phosphate at a concentration of 0.83 mg per ml (100 % water). At time zero, the mixtures were placed in a water bath at 57 °C. (* and + indicate activity of TPI incubated at 75 °C with and without substrate, respectively). At the times shown, aliquots were withdrawn and placed in an ice-bath. TPI dissolved in 50 mM triethanolamine pH 9.6 with (■, ▲) or without (□, △) 2 mM glyceraldehyde 3-phosphate was transferred to reverse micelles of the toluene, phospholipid, Triton X-100 type yielding a final water concentration of 0.3 % (by vol.). At time zero, the tubes were placed in water baths at 57 °C (□, ■) and 75 °C (△, ▲). At different times, aliquots were cooled in an ice-bath and subsequently transferred to all-water media. The activity of the water phases gave the values indicated in % of the activity of TPI without thermal treatment (3,200 μmol/min/mg).

Figure 5. Native Gel Patterns of TPI incubated at 57 °C and 75 °C in All-Water Media (A) and in Reverse Micelles (B). The protocol was as in Figure 4, except that the samples were concentrated and applied to native gels and stained for protein. (A) 100% water without (lanes 1-4) and with (lanes 5-8) 2 mM glyceraldehyde 3-phosphate at 57 °C for 10, 20, 30 and 50 min., respectively. Lane 9 shows the gel pattern of native TPI. In (B), TPI was transferred to reverse micelles without (lanes 10, 12, and 14) and with substrate (lanes 11, 13, 15) and incubated at 57 °C for 7 h (lanes 10, 11) and 24 h (lanes 12, 13), or at 75 °C for 2 h (lanes 14, 15).

Table I: Activity, deamidation and stability of TPI as a function of water concentration ^a

Water Content (%)	Catalytic Activity (U/mg) ^b				Non-Deamidated Protein (%) ^c		
	- G 3 P		+ G 3 P		- G 3 P	+ G 3 P	
	3 h	6 h	3 h	6 h	6 h	3 h	6 h
100	4190±434	4030±541	3300±237	2380±346	85±3.5	39± 3	14± 5
6	478± 47	452± 54	408± 72	286± 80	8 ±1.5	54± 7	37±11
3	138± 18	143± 33	139± 53	113± 36	77±1.3	47±19	31± 8

^a The experiments were carried out as described in Fig. 1, except the TPI concentration varied between 50 and 70 µg/ml of reverse micelle system.

^b Activity of the enzyme incubated at 37 °C for the indicated time periods at the respective water concentrations. In all cases, the activity at time zero was virtually identical to the activity after 3 h incubation in the absence of substrate.

^c The relative area of the native protein band was calculated from densitometric scans of Coomassie blue stained gels as shown in Fig. 1. The disappearance of this band was taken as the extent of deamidation. Gel scans of stock TPI that had not undergone any treatment exhibited isoforms; these comprised 15 % of the total protein.

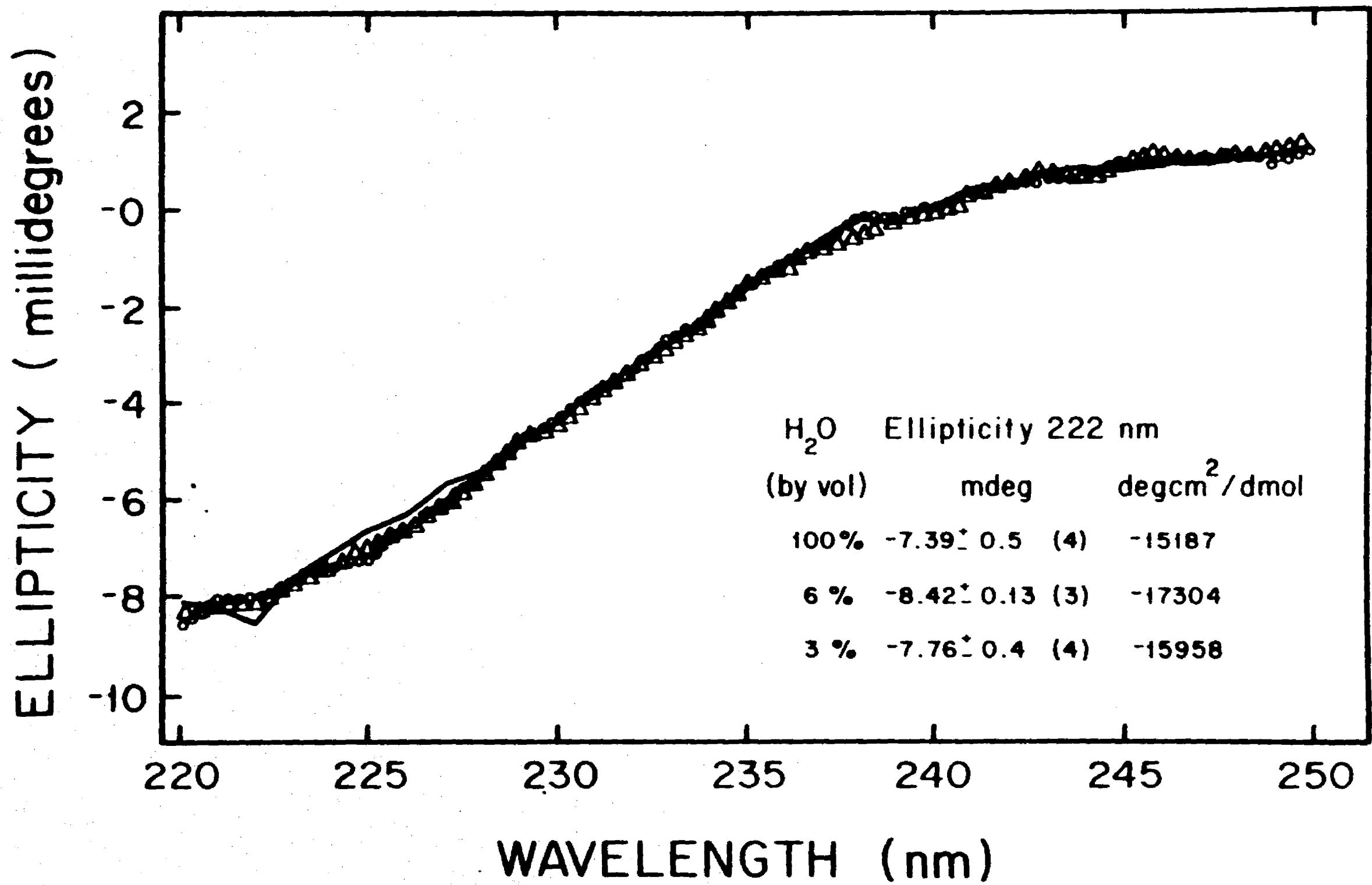
	-Substrate		+Substrate		-Substrate		+Substrate			
% Water	100	100	100	100	3.0	6.0	3.0	3.0	6.0	6.0
Incubation time (hours)	3	6	3	6	6	6	3	6	3	6

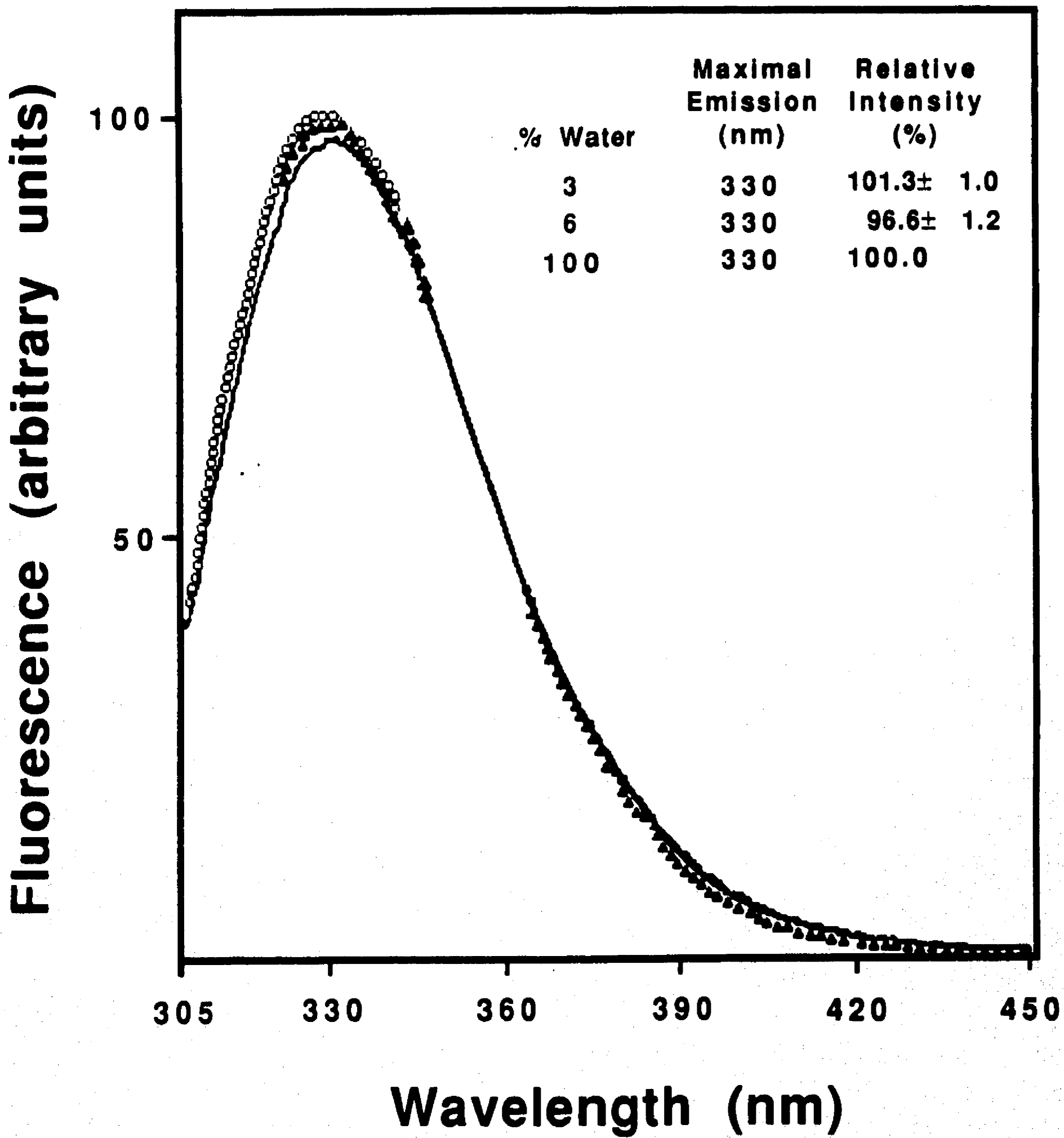
A



B

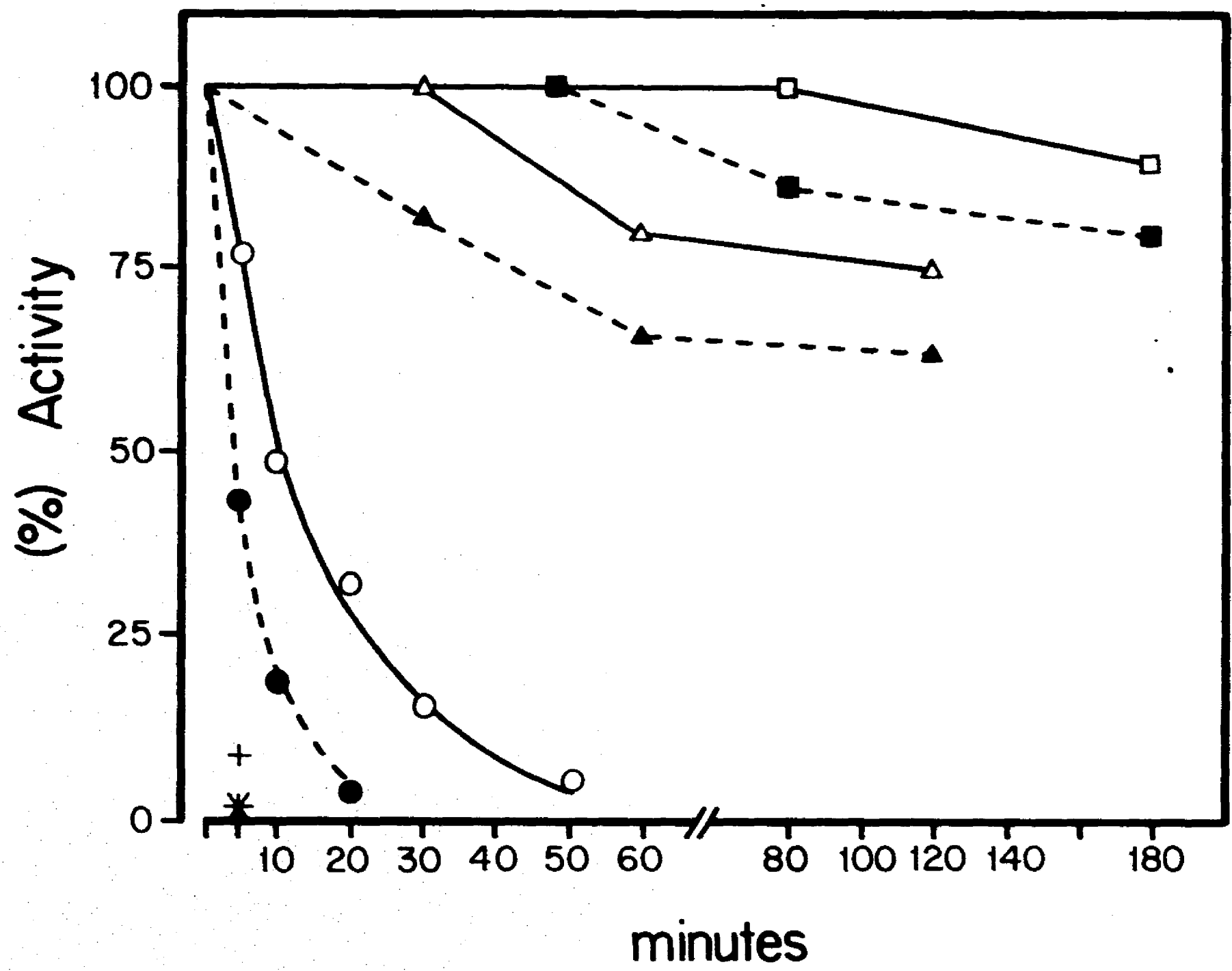




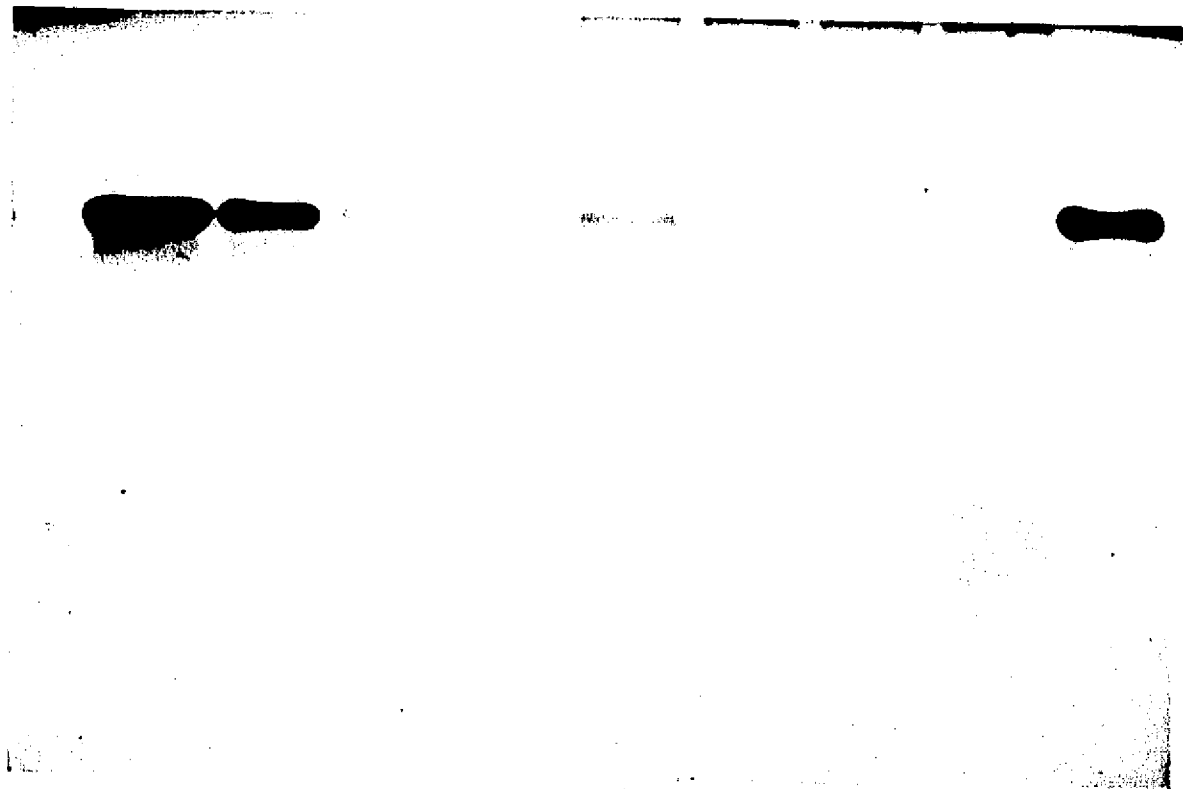


1 2 3 4 5 6 7 8 9

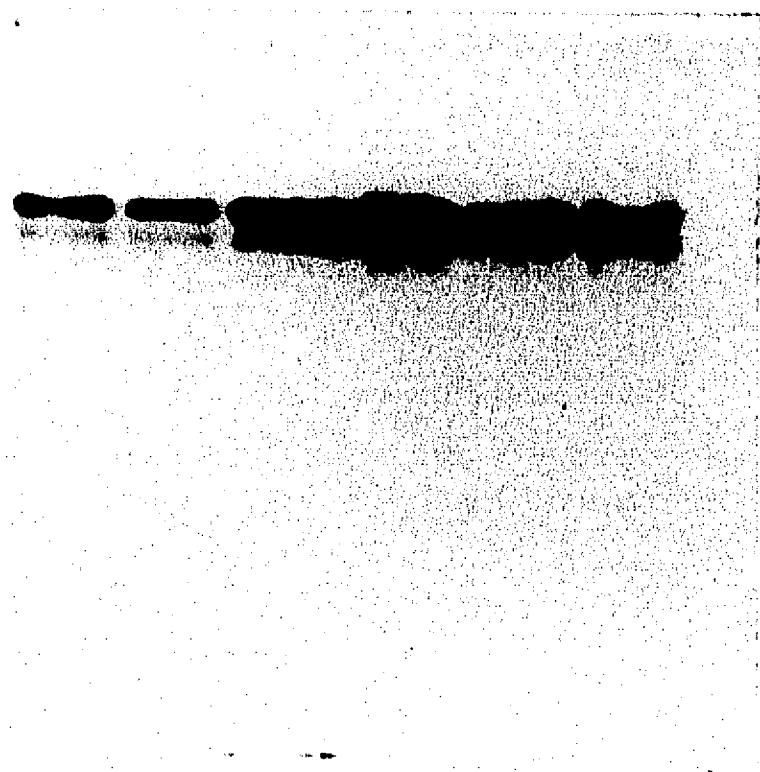




A 1 2 3 4 5 6 7 8 9



B 10 11 12 13 14 15



DISCUSION

D) Aspectos generales del sistema de micelas invertidas

En este trabajo se estudió la actividad y estabilidad de las enzimas en el sistema de micelas invertidas. A pesar de que son muchos los factores que pueden modificar las propiedades de una proteína, es claro que estos sistemas se pueden usar para estudiar el papel del agua en el mecanismo de la catálisis enzimática y en la resistencia de las enzimas a la desnaturalización.

Una consecuencia de la rigidez conformacional de las enzimas cuando se colocan en un sistema de bajo contenido de agua es su aumento en la termoestabilidad. Este fenómeno se ha observado para un gran número de enzimas que utilizan substratos no polares. Nosotros estudiamos la catálisis enzimática de la H⁺-ATPasa mitocondrial a altas temperaturas (Garza-Ramos *et al.*, 1990); la ATPasa cataliza la hidrólisis enzimática del ATP a temperaturas de 80° y 90°C. De acuerdo a Gupta (1992) y Zaks (1992) este trabajo abre la posibilidad de hacer catálisis enzimática en sistemas de bajo contenido de agua con substratos y productos solubles en agua, y demuestra que la estabilidad térmica de las enzimas en un sistema de micelas invertidas depende del contenido de agua que las rodea.

Cambiando la cantidad o las propiedades del agua en la que se coloca una enzima, hemos demostrado que se pueden modificar las propiedades catalíticas y estructurales de las enzimas. Para la mayoría de ellas, una reducción en el contenido de agua que las rodea produce una disminución en su V_{max}, sin que se modifique de manera significativa su K_m. Hasta ahora no se ha encontrado una correlación entre el tipo de enzima y/o función y la magnitud en la disminución de la actividad catalítica (ver Tabla II). Aún más, si se comparan las actividades de una misma enzima, en dos sistemas de micelas invertidas, formadas por surfactantes distintos encontramos que su velocidad es diferente. Por ejemplo la deshidrogenasa láctica de corazón de bovino tiene una actividad en el TPT a 6 % de agua (v/v) de 20 μmolas/min/mg; mientras que en el sistema micelar formado por el detergente catiónico CTAB, hexanol y octano, al mismo contenido de agua, la enzima tiene una actividad de 120 μmolas/min/mg (Garza Ramos *et al.*, 1992b). Se sabe que al variar el contenido de agua de la micela se modifican también sus propiedades como la

polaridad, la constante dieléctrica, la microviscosidad y la actividad. La diferencia en las actividades de la deshidrogenasa láctica puede ser un efecto de las diferentes propiedades del agua en ambos sistemas micelares. Sin embargo, también puede ser que estas diferencias se deban a que la enzima interactue de manera distinta con el solvente o con el surfactante. Hacen falta estudios que expliquen la relación entre la actividad enzimática y los parámetros que influyen en el estado micelar.

El efecto del ambiente micelar puede acentuar las características estructurales o cinéticas de enzimas relacionadas (Walde *et al.*, 1993). En el sistema de micelas invertidas (CTAB, hexanol y octano) se encontraron diferencias importantes en el comportamiento cinético de la deshidrogenasa láctica de corazón y de músculo, tanto en lo que respecta al efecto activador del Gdn/Cl como a sus requerimientos de agua (Fernández-Velasco *et al.*, 1992). A 9 % de agua (v/v) la isoenzima de corazón puede alcanzar el 70 % de la actividad en agua, mientras que la de músculo sólo alcanza el 30 %. Las diferencias en la respuesta al solvente de la enzima de corazón y de músculo se pueden deber a sus diferencias estructurales, particularmente en la región de la interfase entre subunidades.

Actualmente se está trabajando en determinar el papel que juega el agua y los desnaturalizantes en las interacciones entre subunidades de proteínas oligoméricas y cómo las modificaciones en estas interacciones se reflejan en la actividad de estas enzimas. Este estudio se está llevando a cabo con la ayuda de la ingeniería de proteínas. A partir del gen clonado de la deshidrogenasa láctica de *Bacillus stearothermophilus*, el cual se expresa bien en *E. coli*, se han diseñado y obtenido algunas mutantes en las que su estabilidad oligomérica pueda estar modificada. Apoyados en simulaciones en la computadora se han obtenido los análisis estructurales por dinámica molecular de las mutantes diseñadas. Está por hacerse la caracterización cinética y estructural de las mismas.

II) Reactivación y dimerización de la TPI en micelas invertidas

Este trabajo constituye la base para el estudio de la renaturalización de proteínas oligoméricas en un sistema de micelas invertidas. Hasta ahora los datos obtenidos con la TPI muestran que:

- En el sistema micelar, la TPI de músculo de conejo desnaturalizada con GdnHCl es capaz de reactivarse 100 %.
- El tiempo medio de reactivación (τ) en 100 % de agua es de segundos; en las micelas es ordenes de magnitud mayor.
- La velocidad de reactivación es función de la concentración de proteína; a mayor concentración de proteína, menor velocidad de reactivación. Estos resultados indican que al igual que en un medio totalmente acuoso, la dimerización es el paso limitante en la reactivación de la TPI.
- La magnitud de la reactivación depende de la cantidad de proteína. Al aumentar la concentración de proteína se aumenta la cantidad de enzima catalíticamente activa.
- La reactivación sigue un comportamiento de tipo sigmoidal en función del contenido de agua. Si se aumenta la cantidad de agua en la micela incrementa el grado de reactivación.

El hecho de que el proceso de renaturalización en las micelas se lleve a cabo en rangos de tiempos de minutos abre la posibilidad de caracterizar estructuralmente cada uno de los pasos intermedios en la formación del dímero catalíticamente activo. Manipulando las condiciones del medio: tiempo, contenido de agua y concentración de proteína, por medio de la fluorescencia intrínseca de la proteína y/o dicroísmo circular, tal vez se pueda obtener información sobre el arreglo estructural de los monómeros incorrectos (Mx), estructurados correctamente (Mf) y del dímero renaturalizado (Da). Los experimentos de renaturalización de la TPI de diferentes especies en 100 % de agua muestran que todas recuperan su actividad. Sin embargo, los espectros de dicroísmo circular muestran diferencias importantes en el arreglo estructural de la enzima nativa y la renaturalizada. Estos datos sugieren que la estructura nativa y la renaturalizada no son iguales.

Uno de los puntos en este trabajo pretendía revelar si los monómeros estructurados poseen actividad catalítica. Si los intermediarios monoméricos estructurados tuvieran actividad, la reactivación debería ser independiente de la reacción de asociación. El hecho de que la velocidad de reactivación incrementa con la concentración de proteína sugiere fuertemente que la catálisis depende de la formación del dímero. Estos resultados no descartan la posibilidad de que los monómeros de la TPI tengan una actividad catalíticamente muy baja. En agua se sabe que la

incubación de la enzima en una solución que contiene 1 M GdnHCl produce su disociación. Cuando se tomó una alícuota de la enzima en estas condiciones y se transfirió a las micelas, la reactivación fue inmediata (ver fig.2, trabajo I). A menos de que en esas condiciones la dimerización no sea limitante, estos resultados llevan a pensar que el monómero puede ser activo.

En la figura 3 del trabajo I, se observó que la reactivación de la TPI es mayor en presencia de la TPI derivatizada con CAP. Es muy posible que la presencia de monómeros de CAP-TPI atrapen los monómeros de la TPI nativa formando un heterodímero funcional. Hasta donde se sabe la formación de heterodímeros en 100% de agua, a partir de monómeros desplegados, es un proceso al azar. Si se tiene un exceso del monómero marcado con CAP (en una relación mínima de 3:1) la mayor parte de los monómeros con el sitio activo libre se atraparán como heterodímeros (Sun *et al.*, 1992b). En el experimento el exceso de CAP-TPI desplaza la reacción hacia la formación del heterodímero; éstos conservan el 50 % de la actividad del dímero nativo, mientras que la enzima derivatizada es inactiva (si se renaturaliza toda o solo una parte no lo podemos ver por actividad).

Otra posibilidad que no se puede descartar del experimento anterior, sería que la CAP-TPI se pliegue diferente a la TPI libre y se favorezca la interacción entre subunidades. En este mecanismo, el heterodímero debería presentar algunas diferencias estructurales o la cinética de renaturalización tendría que ser diferente en comparación con el homodímero libre. En 100 % de agua, se sabe que la enzima derivatizada tiene una conformación diferente de la libre (Schnackerz y Gracy, 1991). El asa del sitio activo se cierra cuando la enzima une al sustrato produciendo un cambio conformacional. También se ha demostrado que la estructura secundaria se modifica en presencia del CAP.

III) Desamidación de la TPI en micelas invertidas

Se ha documentado que la desamidación específica de la Asn71 en la interfase de la TPI se estimula por la unión del sustrato y la catálisis. La desamidación de esta asparagina promueve la disociación de subunidades, la desnaturalización y la degradación de la proteína. En el sistema de micelas invertidas se encontró que la relación desamidación/actividad catalítica es 6 y 17 veces

mayor en 6 y 3 % de agua respectivamente, en comparación con el medio acuoso. Tanto en el medio acuoso como en las micelas el sustrato estimula la desamidación; ésto implica que en ambos medios la unión del sustrato produce cambios conformacionales similares. En el medio acuoso la desamidación depende del número de veces que el cambio conformacional inducido por el sustrato permite a la Asn71 estar en contacto con el solvente. En las micelas se pudo observar que el proceso también depende del tiempo en el cual las asparaginas de la interfase están expuestas al solvente.

La actividad de la TPI a 3.0 % de agua representa el 3.4 % de la actividad en el medio acuoso. Sin embargo, la enzima da un número suficiente de vueltas para poder desamidarse. Cuando se reduce la cantidad de agua 10 veces la enzima se "congela" en una conformación no susceptible a desamidación. En estas condiciones la relación (menor actividad)/(mayor estabilidad) se cumple.

Actualmente se cuenta con una clona de la TPI de *Trypanosoma brucei*, la cual se expresa en *E. coli*. Esta es una herramienta fuerte que facilitará el estudio cinético y estructural de la TPI, ya que nos permite obtener la proteína en grandes cantidades. Con ayuda de las simulaciones en la computadora, se diseñarán mutantes específicas. Algunos ejemplos de ésto son mutantes con sondas de triptofanos únicos en diferentes posiciones, éstas permitirán el registro de los cambios en la asociación entre subunidades y el plegamiento de los monómeros.

REFERENCIAS

- Ahern, T. J., y Klibanov, A. M. (1985) *Science* 228:1280-1286.
- Ahern, T. J., Casal, J. I., Petsko, G. A. y Klibanov, A. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:675-679.
- Alber, T., Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Rivers, P. S. y Wilson, I. A. (1981) *Philos. Trans. R. Soc. London B* 293:159-171.
- Albery, W. J. y Knowles, J. R. (1976) *Biochemistry* 15:5631-5640.
- Arakawa, T. y Timasheff, S. N. (1984) *Biochemistry* 23:5924-5929.
- Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Darszon, A. (1986) *FEBS Lett.* 203:41-43.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D.C., Pogson, C. I. y Wilson, I. A. (1975) *Nature* 255:609-614.
- Barbaric, S. y Luisi, L. P. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:4239-4244.
- Barden, R. E. y Holt, L. S. *Solution Chemistry of Surfactants*. K. L. Mital (Ed) Plenum Press, New York, London (1978) pp 707-721.
- Barrabin, H., Scofano, H. M., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213:757-763.
- Bone, S., y Pethig, R. (1982) *J. Mol. Biol.* 157:571-575.
- Bone, S., y Pethig, R. (1985) *J. Mol. Biol.* 181:323-326.
- Branden, C. y Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, Inc., New York, London (1991).
- Brooks, C. L. III y Karplus, M. (1989) *J. Mol. Biol.* 208:159-181.
- Bru, R., Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F. (1989) *Biochem. J.* 259:355-361.
- Careri, G., Gratton, E., Yang, P. H. y Rupley, J. A. (1980) *Nature* 248:572-573.
- Carrington, S. J. y Douglas, K. T. (1986) *IRCS Med. Sci.* 14:763-768.
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A. y Klibanov, A. M. (1987) *Biochemistry* 26:1258-1264.

- Chatenay, D., Urbach, W., Nicot, C., Vacher, M. y Waks, M. (1987) *J. Phys. Chem.* 91:2198-2201.
- Craig, L. C., Pirtle, I. L., Gracy, R. W. y Pirtle, R. M. (1979) *J. Mol. Biol.* 129:235-264.
- Creighton, T. E. (1979) *J. Mol. Biol.* 129:235-264.
- Creighton, T. E. *Proteins. Structure and Molecular Properties.* W. H. Freeman and Co., New York (1984).
- Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* 29:7133-7155.
- Dolgikh, D. A. Abaturon, L. V., Bolotina, I. A., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Bushuev, V. N., Gilmanshin, R. I., Lebedev, YuO, Semisotnov, G. V., Tiktopulo, E. I. y Ptitsyn, O. B. (1985) *Eur. Biophys. J.* 13:109-121.
- Dordick, J. S. (1989) *Enzyme Microb. Technol.* 11:194-211.
- Douzou, P. (1980) *Adv. Enzymol.* 51:1-74.
- Eicke, H. F., Shepherd, J. C. W. y Steinemann, A. (1976) *J. Colloid. Interface Sci.* 56:168-176.
- Eicke, H. F. y Christen, H. (1978) *Helv. Chim. Acta.* 61:2258-2263.
- Ekwall, P., Mandell, L., y Fontell, K. (1970) *J. Colloid and Interface Sci.* 33:215-235.
- Englander, S. W. (1993) *Science* 262:848-849.
- Eromin, A. N., y Metelitsa, D. I. (1984) *Biokhimiya* 49:1947- 1954. (Traducción)
- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Millán, L. y Darszon, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272:332-343.
- Fabre, H., Kamenka, N. y Lindman, B. (1981) *J. Phys. Chem.* 85:3493-3501.
- Farber, G. K. y Petsko, G. A. (1990) *TIBS* 15:232-234.
- Fendler, J. H. *Membrane Mimetic Chemistry.* John Wiley & Sons, Inc. (1982).
- Fernández-Velasco, D. A., Garza-Ramos, G., Ramírez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205:501-508.
- Ferreira, S. T. y Verjovski-Almeida, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:15392-15397.
- Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism.* W. H. Freeman and Co. (1985).
- Finney, J. L. y Poole, P. L. (1984) *Comments Mol. Cell. Biophys.* 2:129-151.

- Flatmark, T. y Sletten, K. (1968) *J. Biol. Chem.* 243:1623-1629.
- Gallay, J., Vincent, M., Nicot, C. y Waks, M. (1987) *Biochemistry* 26:5738-5747.
- García-Carmona, F., Bru, R. y Sánchez-Ferrer, A. *Biomolecules in organic solvents*. A. Gómez-Puyou (Ed) CRC Press Inc. Boca Ratón (1992) pp 163-188.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28:3177-3182.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1990a) *Biochemistry* 29:751-757.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1990b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:830-834.
- Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Ramírez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205:509-517.
- Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. *Biomolecules in organic solvents*. A. Gómez-Puyou (Ed) CRC Press Inc. Boca Ratón (1992b) pp 114-131.
- Geiger, T. y Clarke, S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:785-794.
- Gracy, R. W., Chapman, M. L., Cini, J. K., Jahani, M., Tollefsbol, T. O. y Yüksel, K. Ü. *Molecular Biology of Aging*. A. D. Woodhead, A. D. Blanckett y A. Hollaender (Eds) Plenum Press, New York (1985) pp:427-442.
- Gracy, R. W., Yüksel, K. Ü. y Gómez-Puyou, A. *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*. D. Aswad (Ed) CRC Press Inc. Boca Raton (en prensa)
- Gruetter, M. G., Hawkes, R. B. y Matthews, B. W. (1979) *Nature* 277:667-669.
- Gupta, M. N. (1991) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14:1-11.
- Gupta, M. N. (1992) *Eur. J. Biochem.* 203:25-32.
- Hartman, F. C. (1971) *Biochemistry* 10:146-154.
- Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J. y Rossmann, M. G. *The Enzymes* P. D. Boyer (Ed) (Academic Press, New York, 1975) pp 191-292.

- Hughson, F. M., Wright, P. E. y Baldwin, R. L. (1990) *Science* 249:1544-1548.
- Hwang, J. Y. y Arnold, F. H. *Applied Biocatalysis* H. W. Blanch y Clark, D. S (Eds) Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1991) pp 53-86.
- Jaenicke, R. (1981) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 10:1-67.
- Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. molec. Biol.* 49:117-237.
- Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry* 30:3147-3161.
- Johnson, C. M. y Price, N. C. (1987) *Biochem. J.* 245: 525-530.
- Joseph, D., Petsko, G. A. y Karplus, M. (1990) *Science* 249:1425-1428.
- Kabanov, A. V., Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Nametkin, S. N., Pehezhetskii, A. V. y Martinek, K. L. (1988) *J. Theor. Biol.* 133, 327-333.
- Karplus, M., y McCammon, J. A. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 53:263-300.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Prot. Chem.* 14:1-63.
- Khmelnitski, Y. L., Hilhorst, R. y Veeger, C. (1988) *Eur. J. Biochem.* 176:265-271.
- Klibanov, A. M. (1986) *Chemtech.* 16:354-359.
- Knowles, J. R. y Albery, W. J. (1977) *Acc. Chem. Res.* 10:105-111.
- Knowles, J. R. (1991) *Nature* 350:121-124.
- Komives, E. A., Chang, L. C., Lolis, E., Tilton, R. F., Petsko, G. A. y Knowles, J. R. (1991) *Biochemistry* 30:3011-3019.
- Kumar, C. y Balasubramanian, D. (1980) *J. Colloid Interface Sci.* 74:64-70.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., y Veeger, C. (1987) *Biotech. Bioeng.* 30:81-87.
- Lambeir, A. M., Opperdoes, F. R. y Wierenga, R. K. (1987) *Eur. J. Biochem.* 168:69-74.
- Lee, J. C. y Timasheff, S. N. (1974) *Biochemistry* 13:257-265.
- Lee, K. M. y Biellmann, J. F. (1987) *FEBS Lett.* 223:33-36
- Levitt, M. y Chothia, C. (1976) *Nature* 261:552-558.
- Liang, S. -J., Lin, Y. -Z., Zhou, J. -M., Tsou, C. -L., Wu, P. y Zhou, Z. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1038:240-246.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. y Petsko, G. A. (1990)

- Biochemistry* 29:6609-6618.
- Luisi, P. L y Magid, L. J. (1986) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20, 409-474.
- Luisi, P. L., Giomini, M., Pileni, M. P. y Robinson, B. H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 947:209-246.
- MacKerell, A. D. Jr., Nilsson, L., Rigler, R. y Saenger, W. (1988) *Biochemistry* 27:4547-4556.
- Maitra, A. (1984) *J. Phys. Chem.* 88:5122-5125.
- Martinek, K. L., Levashov, V. A., Klyachko, L. N., Pantin, V. I. y Berezin, I. V. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* 657:277-294.
- Martinek, K., Levashov, A. V., Klyacho, N., Khmel'nitsky, Y. L. y Berezin, I. V. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155:453-468.
- Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Pantin, V. I. y Berezin, I. V. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 981:161-172.
- Menger, F. M., Donohue, J. A. y Williams, R. P. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95:286-289.
- Menger, F. M. y Yamada, K. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* 101:6731-6734.
- Mori, E., Mikami, B., Morita, Y. y Jirgensone, B. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 211:382-389.
- Nickbarg, E. B. y Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry* 27:5939-5947.
- Nicot, C., Vacher, M., Vincent, M., Gallay, J. y Waks, M. (1985) *Biochemistry* 24:7024-7032.
- Nozaki, Y. y Tanford, C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245:1648-1652.
- Ohgushi, M. y Wada, A. (1983) *FEBS Lett.* 164:21-24
- .Oldfield, C. (1990) *Biochem. J.* 272:15-22.
- Pace, C. N. (1975) *Crit. Rev. Biochem.* 3:1-43.
- Paudel, H. K. y Carlsson, G. M. (1990) *Biochem. J.* 268: 393- 399.
- Pompliano, D. L., Peyman, A. y Knowles, J. R. (1990) *Biochemistry* 29:3186-3194.
- Privalov, P. L. y Gill, S. J. (1988) *Adv. Protein. Chem.* 39:191-234.
- Putman, S. J., Coulson, A. F. W., Farley, T. R. T., Riddleston, B. y Knowles, J. R. (1972) *Biochem. J.* 129:301-310.
- Quiocho, F. A., Wilson, D. K. y Vyas, N. K. (1989) *Nature* 340:404-407.

- Ramakrishnan, V. R., Darszon, A. y Montal, M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:4857-4860.
- Ramírez-Silva, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1993) *Biochemistry* 32: 5332-5338.
- Rashin, A. A. y Honig, B. (1984) *J. Mol. Biol.* 173:515-521.
- Richard, J. P. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106:4926-4936.
- Richard, J. P. (1991) *Biochemistry* 30:4581-4585.
- Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A. P. G. y Klibanov, A. M. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:584-589.
- Robinson, A. B., McKerrow, J. H. y Cary, P. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66:753-757.
- Robinson, A. B. y Rudd, C. J. (1974) *Curr. Top. Cell. Regul.* 8:274-295.
- Rodríguez, R., Vargas, S. y Fernández-Velasco, D. A. (1993) Sometido a publicación
- Rose, I. A. y O'Connell, E. L. (1961) *J. Biol. Chem.* 236:3086-3092.
- Rudolph, R., Zettlmeissl, G. y Jaenicke, R. (1979) *Biochemistry* 18:5572-5575.
- Rupley, J. A., Gratton, E. y Careri, G. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8:18-22.
- Russell, A. J. y Klibanov, A. M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:54-57.
- Saenger, W. (1987) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 16:93-114.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. y García-Carmona, F. (1988) *FEBS Lett.* 233:363-366.
- Sawyer, T. H., Tilley, B. E. y Gracy, R. W. (1972) *J. Biol. Chem.* 247:6499-6505.
- Sawyer, T. H. y Gracy, R. W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169:51-57.
- Schinkel, J. E., Downer, N. W. y Rupley, J. A. (1985) *Biochemistry* 24:352-366.
- Schnackerz, K. D. y Gracy, R. W. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199:231-238.
- Sheibe, R. y Fickenschen, K. (1985) *FEBS Lett.* 180:317-320.
- Strambini, G. B. y Gonnelli, M. (1986) *Biochemistry* 25:2471- 2476.
- Sun, A. -Q., Yüksel, K. Ü. y Gracy, R. W. (1992a) *Arch. Biochem. Biophys.* 293:382-390.
- Sun, A. -Q., Yüksel, K. Ü. y Gracy, R. W. (1992b) *J. Biol. Chem.* 269:20168-20174.
- Sun, A. -Q., Yüksel, K. Ü. y Gracy, R. W. (1992c) *Arch. Biochem. Biophys.* 295:421-428.
- Swaminathan, S., Ichiye, T., van Gunsteren, W. F. y Karplus, M. (1983) *Biochemistry* 21:5230-

5241.

- Tabony, J. y Drifford, M. (1983) *Colloid. Polym. Sci.* 261: 355-362.
- Tanford, C. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86:2050-2059.
- Tanford, C., *The Hydrophobic Effect* John Wiley & Sons, Inc. (1980).
- Tsou, C. -L. (1986) *TIBS* 11:427-429.
- Tsujii, K., Sunamoto, J. y Fendler, J. H. (1983) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56:2889-2893.
- Verhaert, R. M. D., Hilhorst, R., Vermue, M., Schaafsma, T. J. y Veeger, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187:59-72.
- Verhaert, R. M. D., Hilhorst, R., Visser, A. J. W. G. y Veeger, C. *Biomolecules in organic solvents.* A. Gómez-Puyou (Ed) CRC Press Inc. Boca Ratón (1992) pp 133-162.
- Volkin, D. B. y Klivanov, A. M. (1991) *Biotech. Bioeng.* 37:843-853.
- Walde, P., Peng, Q., Fadnavis, N. W., Battistel, E. y Luisi, P. L. (1988) *Eur. J. Biochem.* 173: 401-409.
- Walde, P., Han, D. y Luisi, P. L. (1993) *Biochemistry* 32:4029-4034.
- Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* 135:165-172.
- Webb, M. R., Standing, D. N. y Knowles, J. R. (1977) *Biochemistry* 16:2738-2741.
- Wheeler, C. J. y Croteau, R. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248:429-434.
- Wierenga, R. K., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. (1987) *J. Mol. Biol.* 198:109-121.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Postma, J. P. M., Groendijk, H., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. y Opperdoes, F. R. (1991) *Proteins* 10:33-49.
- Wong, M., Thomas, J. K. y Nowak, T. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99:4730-4736.
- Wright, H. T. (1991) *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* 26(1):1-52.
- Yao, Q. -Z., Tian, M. y Tsou, C. -L. (1984) *Biochemistry* 23:2740-2744.
- Yuan, P. M., Dewan, R. N., Zaun, M., Thompson, R. E. y Gracy, R. W. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198:42-45.
- Yuan, P. M., Talent, J. M. y Gracy, R. W. (1981a) *Mech. Ageing Dev.* 17:151-162.
- Yuan, P. M., Talent, J. M. y Gracy, R. W. (1981b) *Biochim. Biophys. Acta* 671:211-218.

- Yüksel, K. Ü. y Gracy, R. W. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248:452-459.
- Zabori, S., Rudolph, R y Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* 35c:999-1004.
- Zaks, A. y Klibanov, A. M. (1984) *Science* 224:1249-1251.
- Zaks, A. y Klibanov, A. M. (1988a) *J. Biol. Chem.* 263:3194-3201.
- Zaks, A. y Klibanov, A. (1988b) *J. Biol. Chem.* 263:8017-8021.
- Zaks, A. *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation.* T. J. Ahem y M. C. Manning (Eds) Plenum Press, New York (1992) pp 249-271.
- Zale, S. E. y Klibanov, A. M. (1986) *Biochemistry* 25:5432-5444.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1979) *Biochemistry* 18:5567-5571.