



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA**  
**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**POSGRADO EN BIOMEDICINA MOLECULAR**



**Caracterización del desplegamiento  
químico por urea de la Enolasa de  
*Saccharomyces cerevisiae***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**Maestra en Ciencias en Biomedicina  
Molecular**

P R E S E N T A

**L.E.O. DENISON SELENE SÁNCHEZ  
MIGUEL**

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENÍTEZ CARDOZA  
DR. CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ

**MÉXICO D.F. DICIEMBRE 2007**



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 16 horas del día 24 del mes de agosto del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH-IPN para examinar la tesis de grado titulada:  
**Caracterización del desplegamiento químico por urea de la Enolasa de *Saccharomyces cerevisiae***

Presentada por el alumno:

Sánchez  
 Apellido paterno

Miguel  
 materno

Denison Selene  
 nombre(s)

Con registro: 

B	0	4	9	4	4
---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza  
 Director de Tesis

Dr. César Augusto Sandino Reyes López  
 Codirector de Tesis

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dra Laurence Marchat. Marchau

Dra. Paula Figueroa Arredondo

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
 SECRETARÍA DE  
 EDUCACIÓN PÚBLICA  
 INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
 ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
 Y HOMEOPATÍA  
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
 INVESTIGACION  
 EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día **24** del mes **agosto** del año **2007**, la que suscribe **Denison Selene Sánchez Miguel** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular** con número de registro **B04944**, adscrito a **Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza** y **Dr. César Augusto Sandino Reyes López** y cede los derechos del trabajo intitulado, **Caracterización del desplegamiento químico por urea de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [amurusk@hotmail.com](mailto:amurusk@hotmail.com) o [beni1972uk@yahoo.com.mx](mailto:beni1972uk@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Denison Selene Sánchez Miguel**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Bioquímica de la Sección de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía bajo la dirección de la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y el Dr. César Augusto Sandino Reyes López, ambos profesor investigador titular del Programa de Maestría En Biomedicina Molecular de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH del IPN.

**Gracias:**

**Dra. Claudia Benítez: Paciente y astuto  
contra maestre en este viaje.**

**Dr. César Reyes: Experimentado y sagaz lobo de  
mar.**

**Papá y mamá: Capitanes que flotan o se hunden  
con este buque.**

**Carlitos y Bollito: Oficiales de cubierta en mi  
navío.**

**Edgar, Fabi, Paty, Fer, Nelly, Jorge: Por remar  
conmigo hasta llegar a puerto.**

**A todos quienes no menciono y que forman parte  
de este esfuerzo.**

## GLOSARIO

<b>Conformación:</b>	Disposición espacial de los átomos en una molécula.
<b>Desnaturalizante:</b>	Sustancia, agente o condición que desestabiliza la estructura nativa de una proteína.
<b>Desnaturalización:</b>	Pérdida de la estructura nativa de una proteína.
<b>Equilibrio:</b>	Es la condición en la que en una reacción química reversible la formación de reactivos y productos ocurren a la misma velocidad, de forma en que no se aprecian cambios macroscópicos en el tiempo.
<b>Energía libre de Gibbs:</b>	Es la cantidad de energía disponible en un sistema termodinámico. Es una función de estado extensiva con unidades de energía, que da la condición de equilibrio y de espontaneidad para una reacción química (a presión y temperatura constantes).
<b>Fluorescencia:</b>	Propiedad de determinadas sustancias de emitir luz cuando reciben ciertas radiaciones.
<b>Hélice-<math>\alpha</math>:</b>	Estructura helicoidal estabilizada por puentes de hidrogeno, encontrada frecuentemente en una proteína.
<b>Hidrofílico:</b>	Soluble en disolventes acuosos o polares.
<b>Hidrofóbico:</b>	Soluble en disolventes orgánicos o no polares.
<b>Inhibidor catalítico:</b>	Molécula que disminuye la actividad de una enzima.
<b>Sitio activo:</b>	Conjunto de residuos de aminoácidos que participan directamente en la actividad biológica de una proteína.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	6
<b>Abstract</b>	8
<b>Capítulo 1.</b>	
<b>Introducción y antecedentes</b>	10
<b>1.1</b> Introducción	10
<b>1.2</b> Generalidades	12
<b>1.2.1</b> Estructura de proteínas	12
<b>1.3</b> Enolasa	18
<b>1.4</b> Enolasa de <i>S. cerevisiae</i>	19
<b>1.5</b> Estudios previos de desplegamiento de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> .	23
<b>Justificación</b>	26
<b>Objetivo General</b>	27
<b>Objetivos Específicos</b>	27
<b>Capítulo 2.</b>	
<b>Materiales y métodos.</b>	28
<b>2.1</b> Proteína enolasa de <i>S. cerevisiae</i> .	28
<b>2.2</b> Reactivos empleados.	28
<b>2.3</b> Técnicas experimentales	28
<b>2.3.1</b> Determinación de la concentración de proteína.	28
<b>2.3.2</b> Preparación de las muestras.	29
<b>2.4</b> Obtención y análisis de los espectros de emisión de fluorescencia.	29
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>Tratamiento de los datos.</b>	31
<b>Capítulo 4.</b>	
<b>Resultados y discusión.</b>	44
<b>4.1</b> Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia inducidos por urea.	44
<b>4.2</b> Curvas de transición de desplegamiento en amortiguador de fosfatos de potasio.	47
<b>4.3</b> Curva de transición de desplegamiento en amortiguador de TRIS-HCl	51
<b>4.4</b> Posible mecanismo de desplegamiento de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> causado	54

	por urea	
	<b>4.5</b> Efecto del grupo fosfato en el despliegamiento causado por urea de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> .	70
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones</b>	73
<b>Capítulo 6.</b>	<b>Perspectivas</b>	75
<b>Referencias bibliográficas.</b>		77

## Lista de figuras y tablas

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1</b>	Representación gráfica de una hélice- $\alpha$ . 14
<b>Figura 1.2</b>	Representación gráfica de una hebra- $\beta$ . 15
<b>Figura 1.3</b>	Representación gráfica en listones de la estructura terciaria de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> . 16
<b>Figura 1.4</b>	Representación gráfica de la estructura cuaternaria de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> . 17
<b>Figura 1.5</b>	Representación esquemática de la reacción catalizada por la enolasa. 18
<b>Figura 1.6</b>	Representación gráfica de un monómero de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> . 20
<b>Figura 1.7</b>	Representación gráfica del dominio menor de un monómero de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> . 22
<b>Figura 1.8</b>	Representación gráfica de un monómero de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> . 25
<b>Figura 4.1</b>	Espectros de emisión de fluorescencia de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> en distintas concentraciones de urea. 45
<b>Figura 4.2</b>	Curvas de transición de desplegamiento de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> inducido por urea. 48
<b>Figura 4.3</b>	Curvas de transición de desplegamiento de la enolasa de <i>S. cerevisiae</i> inducido por urea en amortiguador de TRIS-HCl 52
<b>Figura 4.4</b>	Ajuste de los datos experimentales de la curva de 164 hrs en fosfato de potasio a un modelo de dos estados. 56
<b>Figura 4.5</b>	Ajuste de los datos experimentales de la curva de 164 hrs en TRIS-HCl a un modelo de dos estados. 57
<b>Figura 4.6</b>	Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados con 59

	intermediario monomérico en amortiguador de fosfato de potasio.	
<b>Figura 4.7</b>	Ajuste de los datos a un modelo de tres estados con intermediario monomérico en amortiguador de TRIS-HCl.	60
<b>Figura 4.8</b>	Ajuste de los datos a un modelo de tres estados, con intermediario dimérico y un estado desplegado monomérico en amortiguador de fosfato de potasio.	62
<b>Figura 4.9</b>	Ajuste de los datos a un modelo de tres estados, con intermediario dimérico y un estado desplegado monomérico en amortiguador de TRIS-HCl.	63
<b>Figura 4.10</b>	Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados en amortiguador de fosfato de potasio.	65
<b>Figura 4.11</b>	Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados en amortiguador de TRIS-HCl.	66
<b>Tabla 1</b>	Valores de los parámetros termodinámicos en amortiguador de fosfato de potasio.	67
<b>Tabla 2</b>	Valores de los parámetros termodinámicos en amortiguador de TRIS-HCl.	68
<b>Tabla 3</b>	Valores de los cambios ocurridos en la enzima.	70
<b>Tabla 4</b>	Parámetros termodinámicos obtenidos en ambas condiciones experimentales.	71

## Resumen

### **Caracterización del desplegamiento por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*.**

En la actualidad se sabe poco acerca del mecanismo de plegamiento que siguen las proteínas para adquirir su estructura funcional. La enolasa es un sistema interesante de estudio tanto por su estructura como por su actividad catalítica en la vía de la glucólisis. La enolasa es una enzima que cataliza la deshidratación reversible del 2-D-fosfoglicerato a fosfoenol piruvato. Se trata de una molécula homodimérica que requiere del ión  $Mg^{2+}$  para llevar a cabo su actividad catalítica. Cada monómero tiene un peso molecular de 46.7 kDa con un sitio activo completo y tres sitios de unión para cationes divalentes.

En este trabajo se estudió la reacción de desplegamiento de la enolasa inducida por la urea. Los cambios conformacionales debidos al desplegamiento se registraron por espectroscopia de fluorescencia. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron obtenidos de la enolasa después de incubarse con distintas concentraciones de desnaturizante. A partir de cada uno de los espectros se calcularon los valores del Centro de Masas Espectral y con ellos se construyeron curvas de transición. Las curvas de transición se analizaron mediante el ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones que describen un modelo de desplegamiento de dos estados, así como a ecuaciones que describen modelos de tres o mas estados con intermediarios monoméricos o diméricos. El modelo que describió mejor los datos experimentales fue el que considera un intermediario en

la ruta de desplegamiento, pero que no involucra la disociación del dímero en ninguna de las etapas de desplegamiento. El ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones que describen este modelo permitió el cálculo de parámetros termodinámicos que están asociados a la reacción de desplegamiento. Además, se analizó el efecto de la presencia del grupo fosfato en la reacción de desplegamiento inducida por urea. Los resultados de esta tesis indican que el grupo fosfato le confiere estabilidad a la enolasa de *S. cerevisiae*, tanto al estado nativo como al estado intermediario. Sin embargo, el mecanismo de desplegamiento es similar en ambas condiciones experimentales.

## Abstract

### **Urea-induced denaturation of enolase from *S. cerevisiae*.**

Protein folding raises some of biology's greatest theoretical challenges. Enolase is an interesting model for folding/unfolding studies, because of its structure and its involvement in the glycolytic pathway. Enolase is an enzyme that catalyzes the dehydration of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate. This homodimeric protein requires  $Mg^{2+}$  for its catalytic reaction. Each monomer of enolase have a molecular mass of 46.7 kDa, with a full active site, and three divalent-metal binding sites.

In this work, the urea-induced unfolding of enolase from *S. cerevisiae* was studied. The conformational changes derived from the unfolding reaction were monitored by fluorescence spectroscopy. Enolase was incubated at several urea concentrations and fluorescence-emission spectra were recorded. Values of the spectral centre of mass were calculated from each spectra. Spectral Center of Mass values were used to obtain transition curves. These curves were analysed by fitting the experimental data to equations that describe diverse mechanisms of folding/unfolding, such as two-state model, and three-state models with and without dissociation of the dimer. It was found that the best model that described the experimental data was a three-state mechanism that involves the presence of one intermediate, but does not engage dissociation of the dimer into monomers. Fitting of the experimental data to equations that describe this pathway, allowed us to calculate the thermodynamic parameters associated to the unfolding

reaction. Furthermore, the effect of phosphate group in the unfolding reaction of enolase from *S. cerevisiae* was analysed. It was observed that the phosphate group stabilizes the native and intermediate forms of the enzyme without changing the unfolding mechanism.

## Capítulo 1. Introducción y antecedentes.

### 1.1 Introducción.

En prácticamente todos los procesos biológicos de un ser vivo están involucradas las proteínas (Dobson 2003). Estas macromoléculas necesitan adquirir una estructura específica y única que les permite tener una actividad biológica determinada. La conformación que adopta una proteína en condiciones fisiológicas es conocida como estructura **nativa** y el proceso mediante el cual una proteína adquiere esta conformación se conoce como **plegamiento** (Dobson 2002). La actividad biológica de las proteínas puede perderse a través de un proceso al que se le ha llamado **desnaturalización**, que puede ser consecuencia de cambios pequeños en su estructura global. Cuando existen cambios generalizados en la estructura de las proteínas, inducidos por cambios en el pH, temperatura, presión, fuerza iónica o la presencia de agentes caotrópicos, como la urea o el cloruro de guanidinio, el proceso es denominado **desplegamiento**. Generalmente, en el desplegamiento de una proteína existe pérdida total o parcial de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria (Lesk 2000).

Para comprender el proceso de desplegamiento, en la mayoría de los estudios se parte del estado nativo de la molécula y se despliega perturbando química o físicamente el medio en que se encuentra. Los cambios ocurridos durante el proceso de desnaturalización pueden evidenciarse mediante el uso de diversas técnicas espectroscópicas. La información obtenida en estos ensayos nos permite obtener parámetros termodinámicos y/o cinéticos de este proceso.

Los estudios de desplegamiento de proteínas son importantes no solo por evidenciar factores que afectan o desestabilizan la estructura funcional de estas moléculas, sino que también permiten conocer los pasos necesarios para el ensamble de estas estructuras, a partir de la información contenida en las cadenas polipeptídicas. Esto último, permitirá sentar las bases para comprender la formación de la estructura nativa de las proteínas. Descubrir como ocurre este proceso es uno de los grandes retos de la biología estructural moderna (Dobson 2002). Una vez establecidos estos principios será posible el diseño de enzimas sintéticas y/o la modificación de macromoléculas naturales, optimizando o modificando sus funciones (Rojo-Domínguez 1988); lo que a su vez permitirá el diseño racional de fármacos para proyectar nuevos tratamientos que provoquen menos efectos secundarios contra agentes infecciosos o el cáncer.

Por otro lado, se ha reportado que algunas patologías se asocian al plegamiento incorrecto de algunas proteínas, originando la pérdida de sus funciones. En algunos casos, la actividad catalítica puede estar alterada originando que las vías metabólicas se perturben. Un ejemplo de patologías originadas por el mal plegamiento de proteínas es el caso de las enfermedades con el nombre genérico de "amiloidosis", en las cuales, algunas proteínas gradualmente se estructuran en largas cadenas de hojas- $\beta$  polimerizadas que se precipitan en forma de fibras, implicando la pérdida de la función biológica, así como la formación de agregados que producen daño a los tejidos (Buxbaum y Tagle 2000). Otro caso son las encefalopatías espongiiformes, que son un grupo de enfermedades que

causan degeneración en el sistema nervioso central de humanos y animales caracterizadas por la muerte celular. La causa de estas enfermedades parece ser el resultado de la acumulación de proteínas con una conformación aberrante (Lesk 2000).

Durante este trabajo se estudió el mecanismo de desplegamiento que sigue la enzima enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), para ello se incubó a la enzima con urea como agente desnaturalizante y se evaluó el efecto de la presencia y ausencia del grupo fosfato. Para lograr lo anterior, se realizaron ensayos en una solución amortiguadora de fosfato de potasio a pH 7.4 y en una solución amortiguadora de TRIS-HCl al mismo pH. Las muestras se incubaron a 25 °C durante aproximadamente nueve días y se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia a las 18, 24, 48, 72, 96, 164 y 212 horas. A partir de estos espectros se calcularon los valores de Centro de Masas Espectral (CME). Los valores de CME se emplearon para elaborar las curvas de transición de desplegamiento para cada una de las condiciones experimentales. A partir de estas curvas de transición se obtuvieron los parámetros termodinámicos asociados a la reacción de desplegamiento.

## **1.2 Generalidades.**

### **1.2.1 Estructura de proteínas.**

Las proteínas son polímeros de L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Cada proteína tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxilo terminal (C-terminal). La secuencia de aminoácidos esta dada siempre en

el orden del N-terminal al C-terminal. Este también es el orden en que los ribosomas sintetizan a las proteínas (Lesk 2000). La secuencia de una proteína junto con algún cambio postraducciona (si está presente) se conoce como ***estructura primaria***.

La conformación nativa de una proteína se mantiene debido a que ciertas regiones de la secuencia de aminoácidos adoptan conformaciones regulares y repetitivas formando interacciones no covalentes. Las cadenas laterales hidrofóbicas tienden a acoplarse unas con otras promoviendo la formación de puentes de hidrógeno entre átomos de la cadena principal. La energía de cada interacción puede ser relativamente pequeña, sin embargo su importancia radica en el número de interacciones que juntas pueden sumar y con ello dar paso a lo que en su conjunto se conoce como ***estructura secundaria***. Los tipos de estructuras secundarias más frecuentemente encontradas en una proteína son las llamadas hélices- $\alpha$  (figura 1.1) y hebras- $\beta$  (figura 1.2) (Mathews *et al.* 2003).

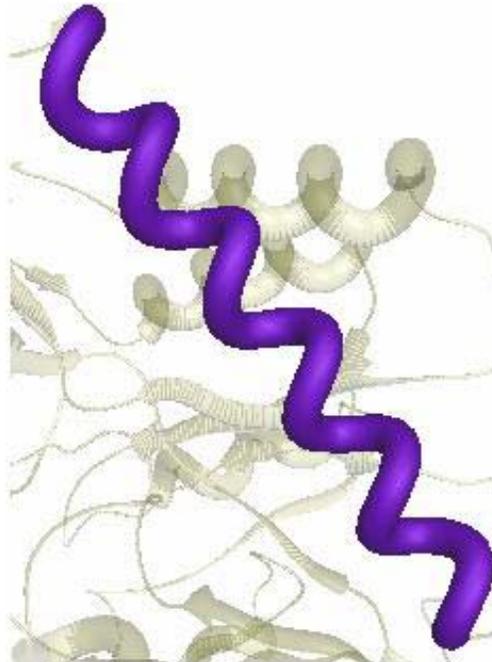


Figura 1.1. Representación gráfica de una hélice- $\alpha$ . En color morado se destaca la hélice- $\alpha$  #4 (representada como una espiral) de uno de los monómeros de la enolasa de *S. cerevisiae* (código PDB: 1ONE).

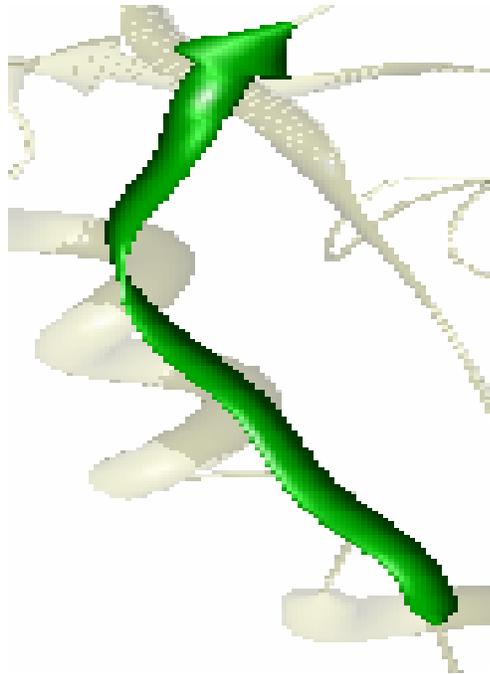


Figura 1.2 Representación gráfica de una hebra- $\beta$ . En color verde y representada como una flecha se destaca la hebra- $\beta$  #2 de la enolasa de *S. cerevisiae* (código PDB: 1ONE).

Los segmentos de estructura secundaria interactúan entre si formando una estructura compacta que dan origen a diferentes arreglos espaciales en la cadena polipeptídica y a diferentes patrones de interacción entre las hélices- $\alpha$  y las hebras- $\beta$  (Mathews *et al.* 2003, Lesk 2000). A este conjunto de interacciones en las proteínas se les conoce como **estructura terciaria** (figura 1.3) (Mathews *et al.* 2003).

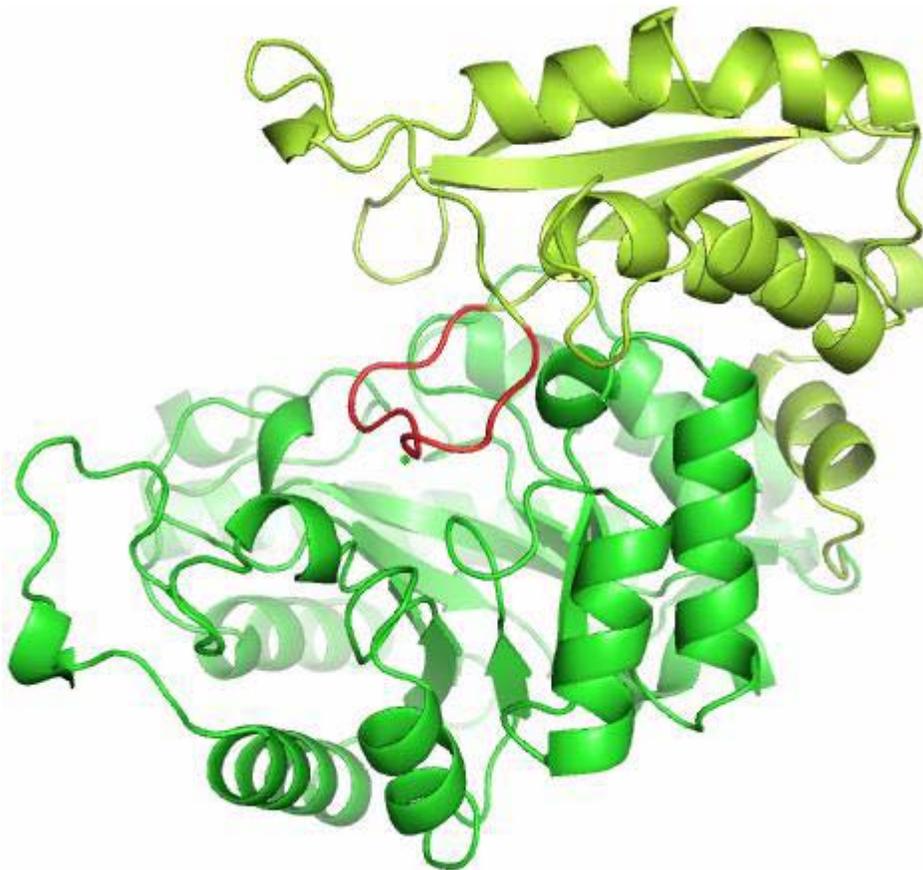


Figura 1.3 *Representación gráfica en listones de la estructura terciaria de la enolasa de S. cerevisiae. La imagen muestra a un monómero de la enzima. (código PDB: 1ONE).*

Algunas proteínas requieren de más de una cadena polipeptídica para adquirir su conformación nativa, conocidas como monómeros o subunidades. Dichos monómeros o subunidades pueden ser múltiples copias de la misma cadena polipeptídica o una combinación de diferentes cadenas. El ensamble de estas subunidades es llamado **estructura cuaternaria** (figura 1.4) (Mathews *et al.* 2003, Lesk 2000).

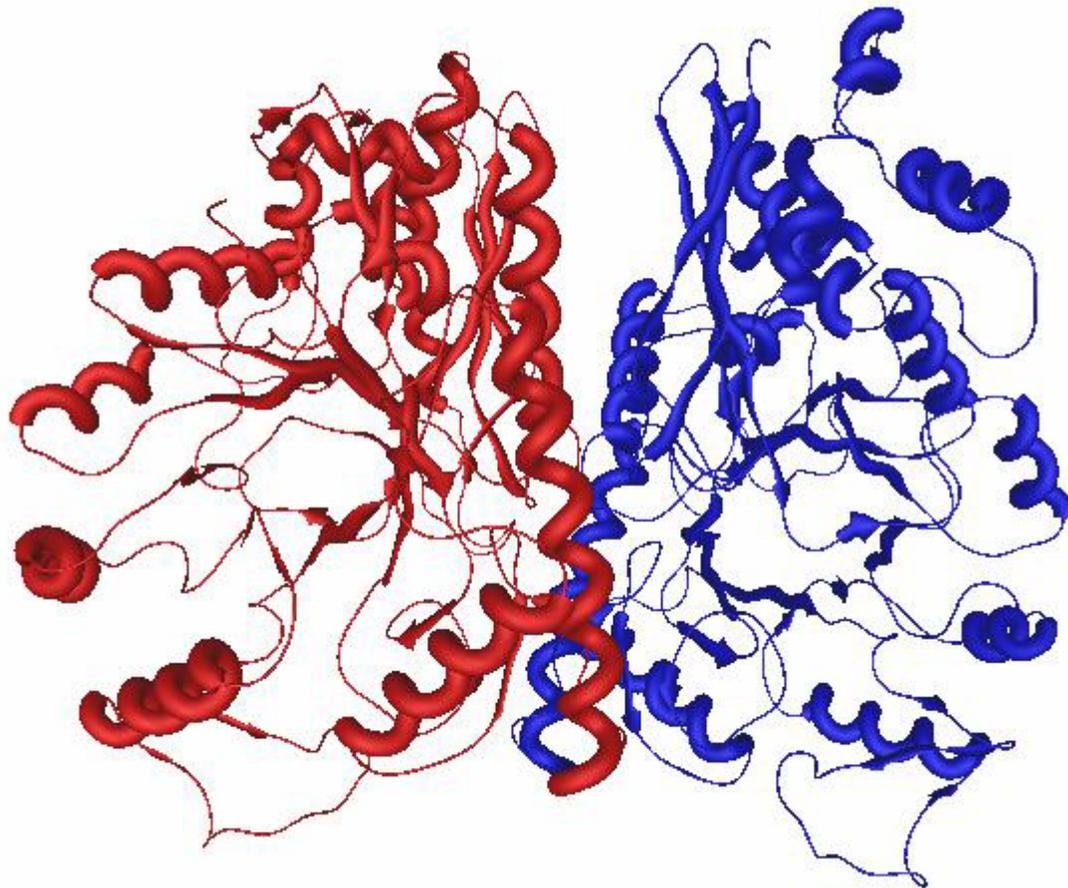


Figura 1.4 *Representación gráfica de la estructura cuaternaria de la enolasa de S. cerevisiae. Cada monómero se muestra en diferente color. (código PDB: 1ONE).*

Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, durante el proceso de desplegamiento pueden perderse parte o la totalidad de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. Estas observaciones se han descrito ya en algunas proteínas monoméricas (Kellermayer *et al.* 2005, Rief y Gautel 1997) y en algunas dimericas (Morgan y Dobson 2000, Najera *et al.* 2003) pero no en proteínas dimericas de estructura de barril  $\beta\beta\alpha\alpha$  ( $\beta/\alpha_6$ ) con un subdominio

adicional en su estructura, como el que se presenta en la enolasa. Estas características y algunas otras que se describirán en los siguientes apartados, la hacen un modelo de estudio muy interesante.

### 1.3 Enolasa.

La enolasa es una enzima que participa en la vía de la glucólisis, catalizando la deshidratación del 2-fosfo-D-glicerato para producir fosfoenolpiruvato (figura 1.5) en presencia de  $Mg^{2+}$ .

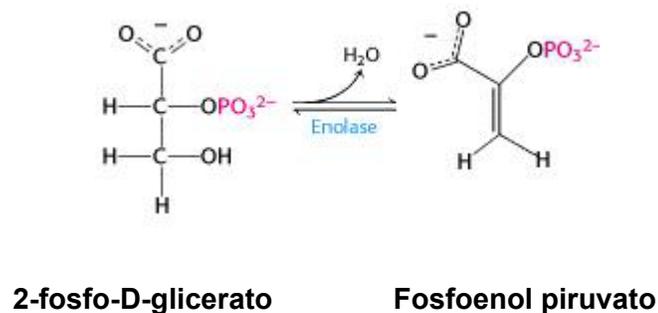


Figura 1.5 Representación esquemática de la reacción catalizada por la enolasa (Berg *et al.* 2002).

Es muy probable que esta enzima se encuentre presente en todos los organismos que metabolizan azúcares (Wold y Hargrave 1971). En mamíferos existen tres isoformas llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  enolasa (Kornblatt 2005). A la fecha, se conocen las estructuras cristalográficas de seis especies: *S. cerevisiae* (Zhang *et al.* 1997), *Escherichia coli* (Kühnel y Luisi 2001), *Trypanosoma brucei* (Da Silva Giotto *et al.* 2003), *Homarus vulgaris* (Duquerroy *et al.* 1995), *Homo sapiens* (Wang y Pang 2005) y *Enterococcus hirae* (Hosaka 2003). En la mayoría de los organismos la

enzima funcional es dimérica, con la excepción de algunas bacterias termófilas como el *Bacillus subtilis* en la que es un octámero (Brown y Kuhlman 1998). Es importante señalar que en algunas de estas estructuras se encontró la presencia de iones sulfato en el sitio de unión al fosfato perteneciente al sustrato.

Para este trabajo se eligió a la enolasa de *S. cerevisiae* como modelo de estudio por ser una enzima con estructura tridimensional resuelta experimentalmente. Además se ha visto que posee una estructura altamente conservada en la escala filogenética. En particular se observó que de los tres tipos de enolasa de *Homo sapiens* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) resueltas experimentalmente,  $\alpha$  y  $\beta$  enolasa mantienen un 63% de identidad con la enolasa de *S. cerevisiae* y un 61% de identidad entre la  $\gamma$  enolasa de *H. sapiens* y la enzima de levadura. Lo cual hace a la enolasa de *S. cerevisiae* un modelo de estudio cuyos resultados experimentales podrían extrapolarse al humano en un momento dado.

#### **1.4 Enolasa de *S. cerevisiae***

La enolasa de *S. cerevisiae* es un homodímero de aproximadamente 93.4 kDa. Cada monómero tiene dos dominios: uno presente en el extremo C-terminal que constituye al dominio mayor. Este dominio tiene un plegamiento conocido como de barril  $(\beta/\alpha)_8$  (Lolis y Davenport 1990). Sin embargo, a diferencia de los barriles  $(\beta/\alpha)_8$  típicos, el barril de la enolasa tiene una topología  $\beta\beta\alpha\alpha$   $(\beta/\alpha)_6$  y el interior del barril- $\beta$  no es completamente paralelo (figura 1.6). La segunda hebra es antiparalela a las otras hebras, y la dirección de la primera hélice- $\alpha$  es también contraria con respecto a las otras hélices (Brewer y Lebioda 1989).

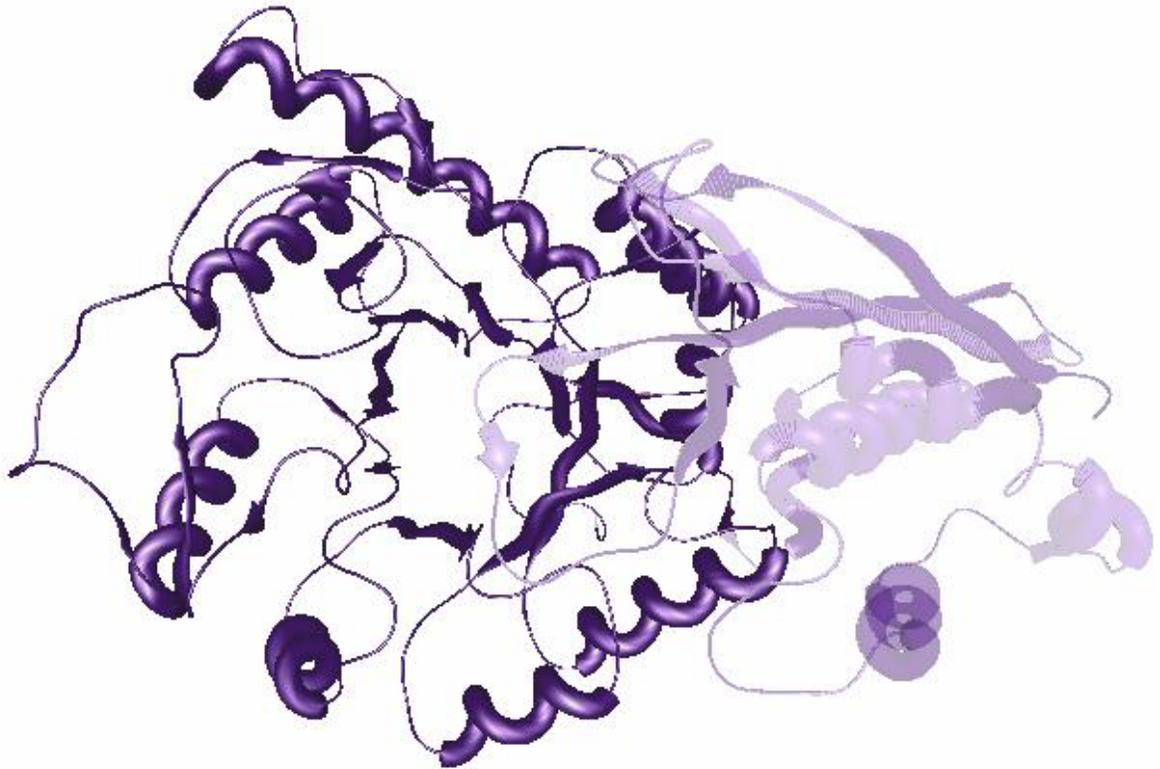


Figura 1.6 Representación gráfica de un monómero de la enzima *S. cerevisiae*. En color morado se muestra al barril  $\beta\beta\alpha\alpha$  ( $\beta/\alpha$ )<sub>6</sub> de uno de los monómeros de la enolasa. En color más claro se muestra el extremo N-terminal. (código PDB: 1ONE).

El sitio activo de la enolasa esta localizado en el extremo carboxilo terminal de este barril. En la figura 1.7 se puede apreciar que el extremo N-terminal de la enolasa lo constituye el dominio menor que se pliega fuera del dominio principal (Hannaert y Michels 2003). Este dominio está constituido por tres hebras- $\beta$ , las cuales incluyen un asa que se pliega por encima del sitio activo cuando el sustrato se encuentra unido. La mayoría de los contactos entre las subunidades se

encuentran entre el dominio pequeño de un monómero y el dominio mayor del otro monómero (Kornblatt *et al.* 2002).

Para llevar a cabo su actividad catalítica la enolasa requiere de cationes divalentes. El cofactor natural es el ión  $Mg^{+2}$ , en presencia del cual, la enzima presenta la mayor actividad catalítica (Kornblatt 2005, Chai *et al.* 2004). La proteína posee tres sitios de unión para cationes divalentes. El sitio I, tradicionalmente llamado sitio "conformacional" induce un cambio conformacional en la enzima que permite la unión del sustrato o de análogos de sustrato en el sitio catalítico. Una vez ocurrido este cambio se une el segundo ión al sitio II, también llamado "catalítico" y entonces sobreviene la reacción de catálisis (Chai *et al.* 2004). Sin embargo, se ha observado que la actividad de la enolasa se inhibe con altas concentraciones de iones metálicos (Chai *et al.* 2004) ya que existe un tercer sitio de unión que es inhibidor de la catálisis (Kornblatt y Tong 2000)

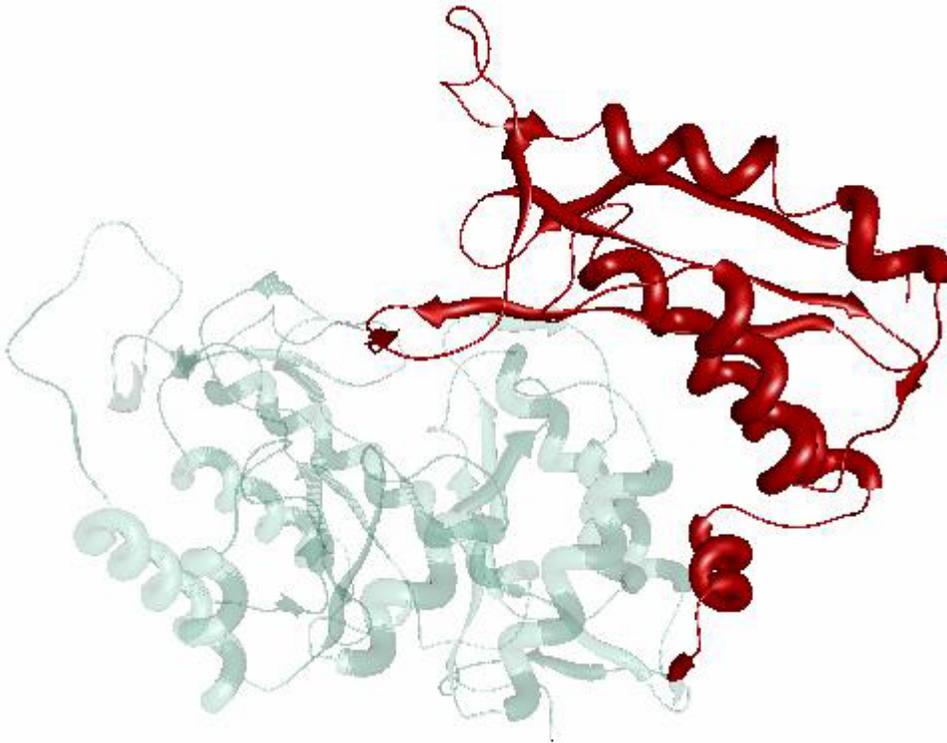


Figura 1.7. Representación gráfica del dominio menor de un monómero de la enolasa de *S. cerevisiae*. En color rojo se resalta el dominio N-terminal. (código PDB: 1 ONE)

### **1.5 Estudios previos de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae*.**

Luego de una cuidadosa investigación bibliográfica, no se han encontrado reportes del desplegamiento químico de la enolasa. Se ha reportado el comportamiento estructural de la enzima en función del aumento de la presión hidrostática (Kornblatt y Bakny 2004), de la concentración del ión  $Mn^{2+}$  (Marchal y Balny 2005) y por el incremento de la temperatura en presencia de cloruro de guanidinio (Ping y Aichun 2003).

Resultados obtenidos por el grupo de Kornblatt y colaboradores muestran que la presión (240MPa) no produce la inactivación de la enzima mientras esta no se disocie, y se ha sugerido que esto puede deberse a que el  $Mn^{2+}$  permanece unido a ella. Sin embargo, en ausencia de este ión la enzima se disocia por presión (5-15MPa) a juzgar por los espectros de U.V (Kornblatt y Balny 2004). En otro trabajo se muestra la aparición de monómeros inactivos después de someter a la enolasa a presión alta (100-200 MPa). En este trabajo se propone que podrían existir tres procesos involucrados en la disociación de la enolasa por presión: pérdida del ión magnesio, desestabilización de las interacciones electrostáticas de la estructura secundaria y por último la desnaturalización de la proteína (Marchal y Balny 2005).

En estudios de desnaturalización térmica realizados por Brewer y colaboradores mostraron que la presencia de un ión metálico divalente incrementa la estabilidad de la enolasa de *S. cerevisiae* al disminuir la tendencia en la disociación de las subunidades. Esto último determinado por Calorimetría Diferencial de Barrido (Brewer y Wampler 2001).

Por otro lado, se ha reportado que la desnaturalización de la enolasa de *S. cerevisiae* por temperatura ocurre entre los 55 y 65° C, con un punto medio de la transición de 58° C. La transición observada fue altamente cooperativa y sin intermediarios aparentes. En el mismo estudio se reportó que la presencia de Cloruro de Guanidinio (0.4 M) provoca una disminución sensible en la temperatura a la cual la proteína se desnaturaliza (Ping y Aichun 2003). Desafortunadamente, en este reporte no se describe si existe reversibilidad en el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo este proceso.

En la actualidad existen diversos estudios del mecanismo de desplegamiento de proteínas con estructura de barril  $(\beta/\alpha)_8$ , sin embargo, son escasos los reportes de proteínas con una topología de barril  $\beta\beta\alpha\alpha$   $(\beta/\alpha)_6$  con un dominio adicional, lo que le confiere un interés adicional al estudio de la enolasa (Figura 1.8)



Figura 1.8 Representación gráfica de un monómero de la enolasa de *S. cerevisiae* donde se muestra, en color claro y al fondo el Barril TIM, mientras que en color rojo y al frente se muestra la estructura del subdominio que se encuentra plegado fuera del dominio principal (código PDB: 1ONE).

### ***Justificación***

La ruta del plegamiento que siguen algunas proteínas se ha convertido en uno de los temas de impacto en la investigación científica ya que sus resultados contribuirían a una mejor comprensión de su estructura y función. Eventualmente este conocimiento permitirá el entendimiento básico de diversos procesos patológicos relacionados con el plegamiento incorrecto observado en varias proteínas. Asimismo, una vez sentadas las bases que dictan los pasos que ha de seguir una cadena polipeptídica para formar una proteína con estructura nativa, se podrá realizar el diseño de nuevas proteínas con un plegamiento mucho más específico que le confiera mayor actividad catalítica en el caso de enzimas así como el diseño de fármacos contra diversas patologías o bien para la prevención de otras. La mayoría de los estudios de plegamiento de proteínas se ha realizado en monómeros de estas moléculas y muy pocos son los estudios realizados en proteínas multiméricas. Es interesante resaltar que el 10% de las proteínas de las que se conoce su estructura poseen un plegamiento con estructura de barril  $(\beta/\alpha)_8$  multiméricas (comúnmente diméricas) convirtiendo esto en un campo muy interesante de estudio.

En este caso, la enolasa pertenece a la familia de proteínas con plegamiento  $\beta\beta\alpha\alpha(\beta/\alpha)_6$  además de un segundo dominio y de estar presente en la ruta glucolítica.

El objetivo de estudiar la forma en como se pliega esta enzima en diversos parásitos que tienen la habilidad de vivir en la sangre (Michels y Moyersoén 2004), como tripanosoma (enfermedad del sueño) y plasmodium (Mande *et al.* 1994,

Garza-Ramos 1992), está dirigido a complementar la información acerca de cómo inactivar la enolasa específicamente mediante el uso de fármacos de nuevo diseño con la finalidad de controlar la enfermedad. Adicionalmente es importante destacar que la enolasa presenta un subdominio adicional por monómero, lo cual nos permitirá determinar la función de estos dominios en esta familia de enzimas.

### **Objetivo general**

Caracterizar la reacción de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* causada por la adición de urea

### **Objetivos específicos**

1. Estudiar la transición de desplegamiento químico de la enolasa de *S. cerevisiae*.
2. Determinar los probables intermediarios en la ruta de desplegamiento y describirlos.
3. Obtener parámetros termodinámicos que caractericen la reacción de desplegamiento.
4. Describir el mecanismo de desplegamiento.
5. Evaluar el efecto de la presencia del grupo fosfato en el proceso de desplegamiento.

## Capítulo 2. Materiales y métodos

### 2.1 Proteína enolasa de *S. cerevisiae*.

Este trabajo se realizó con la enolasa de *S. cerevisiae* de la marca Sigma con número de catálogo E-6126. Los ensayos se realizaron empleando la enzima sin purificación adicional.

### 2.2 Reactivos empleados

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico de las siguientes marcas: Urea de la marca Fluka Biochemika, fosfato de potasio dibásico de la marca J.T Baker, fosfato de potasio monobásico US Biologics, TRIS-base marca US Biologic, y HCl marca Química Meyer. El agua que se utilizó fue bidestilada.

En este trabajo se evaluó la presencia del ión fosfato debido a que es un grupo con el que trabaja la enzima durante su actividad catalítica, para ello fue necesario la elaboración de soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio 50mM y TRIS-HCl 50mM ambos a pH 7.4.

### 2.3 Técnicas experimentales.

#### 2.3.1 Determinación de concentración de proteína

La concentración de proteína para los ensayos se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm en un equipo de la marca Beckman modelo DU 650, empleando un coeficiente de extinción  $\epsilon_{1cm}^{0.1\%} = 0.879 \text{ mg mL}^{-1}$ , calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la enolasa de *S. cerevisiae* (<http://www.expasy.ch/tools>).

### **2.3.2 Preparación de las muestras.**

Se prepararon 76 alícuotas con una concentración final de  $10\mu\text{g mL}^{-1}$  de enolasa de *S. cerevisiae*. Las concentraciones de urea estuvieron dentro de un intervalo de 0 a 7.6 M con incrementos de 0.1 M en cada alícuota. Después de homogenizarse las muestras fueron incubadas en un baño de temperatura controlada a  $25^{\circ}\text{C}$  y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia a las 18, 24, 48, 68, 96, 164 y 212 horas. Durante la adquisición de los espectros se mantuvo la temperatura constante a  $25^{\circ}\text{C}$  mediante un sistema de recirculación de agua en el portaceldas del equipo.

### **2.4 Obtención y análisis de los espectros de emisión de fluorescencia.**

Los cambios conformacionales de la enolasa de *S. cerevisiae* debidos al incremento en la concentración de urea fueron registrados por la emisión de fluorescencia de sus residuos triptófano. Para ello se obtuvieron espectros de fluorescencia, empleando un espectrofluorómetro de la marca Perkin Elmer modelo Luminescence Spectrometer LS 55 equipado con un portaceldas con camisa de recirculación de agua. Se obtuvieron los espectros de emisión de las muestras que se prepararon como se describió anteriormente (sección 2.3.2). La celda empleada para el presente trabajo fue de cuarzo de 1.0 cm de recorrido óptico. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron excitando las muestras a una longitud de onda de 280 nm y registrando la emisión de fluorescencia de 300 nm a 400 nm.

Para el análisis de los espectros de emisión de fluorescencia se utilizó la ecuación 2.1 con la que se calculó el Centro de Masas Espectral (CME) (Bustos-Jaimes *et al.* 2005, Nájera *et al.* 2003, Chanez-Cárdenas *et al.* 2002)

$$\text{CME} = \frac{\sum \lambda \cdot I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}} \quad (2.1)$$

Donde  $I_{\lambda}$  es la intensidad de fluorescencia registrada a una longitud de onda dada y  $\lambda$  es la longitud de onda en nm.

Los valores de CME arrojados por la ecuación anterior, se graficaron contra la concentración de urea. De esta manera se obtuvieron las curvas de transición de desplegamiento.

### Capítulo 3. Tratamiento de los datos

La estructura nativa de las proteínas puede perderse por variaciones en la temperatura o por altas concentraciones de ciertos agentes químicos, a este fenómeno se le llama desnaturalización de la proteína. Cuando se induce el desplegamiento por la adición de un agente desnaturalizante, la conformación nativa en concentraciones bajas de desnaturalizante cambia muy poco, es decir, puede haber cambios locales, pero la estructura global se conserva. Al incrementar las concentraciones de desnaturalizante, generalmente se observa una transición abrupta en un intervalo relativamente estrecho de condiciones del medio. Cuando el grado de desplegamiento se mide por diferentes técnicas y no se observa la presencia de especies distintas al estado nativo y al estado desplegado, se puede proponer que el desplegamiento es un fenómeno de dos estados, donde sólo el estado nativo ( $N$ ) y el desplegado ( $U$ ) existen en equilibrio. En otras palabras, la estabilidad de cada parte de la estructura es dependiente de las otras partes, y por lo tanto, las estructuras parcialmente plegadas son inestables con respecto a las estructuras nativa y completamente desplegada. En este caso el proceso se puede describir mediante el modelo más sencillo, que es el modelo de dos estados.



(3.1)

Donde  $K_{N-U}$  representa la constante de equilibrio del proceso y se puede obtener de la relación del cociente de las concentraciones molares de las especies químicas involucradas.

$$K_{N-U} = \frac{[U]}{[N]}$$

(3.2)

La concentración de proteína tanto en su conformación nativa como en su conformación desnaturalizada se puede determinar mediante señales observables biofísicas o espectroscópicas (como la elipticidad o la intensidad de fluorescencia). Si se define al parámetro “ $y$ ” como la observable utilizada para seguir el comportamiento de la desnaturalización, el valor de ese parámetro debe modificarse conforme ocurran los cambios en la conformación molecular, y de esta manera es posible medir indirectamente la transición. Las proteínas en estado nativo, así como en estado desplegado poseen sus propios valores del parámetro observable “ $y$ ”, siendo “ $y_N$ ” y “ $y_U$ ” respectivamente. Los valores “ $y_N$ ” y “ $y_U$ ” en cualquier punto de la transición se pueden obtener mediante la extrapolación lineal ya que ambos dependen de la concentración de agente desnaturalizante. Así mismo se definen  $f_N$  y  $f_U$ , como las fracciones de proteína nativa y desnaturalizada respectivamente.

La concentración total de la proteína esta dada por la suma de las fracciones  $f_N$  y  $f_U$

$$f_N + f_U = 1 \tag{3.3}$$

De ahí se parte para obtener que

$$y = y_N f_N + y_U f_U \tag{3.4}$$

Siendo la fracción nativa

$$f_N = \frac{[N]}{[U] + [N]} \tag{3.5}$$

y la fracción desplegada

$$f_U = \frac{[U]}{[U] + [N]} \tag{3.6}$$

Para el modelo de dos estados, en el cual el punto de inicio es el estado nativo es necesario obtener  $f_U$ , por lo tanto

$$f_U = \frac{y - y_N}{y_U - y_N} \quad (3.7)$$

por lo tanto la constante de equilibrio para este modelo es

$$K_{N-U} = \frac{f_U}{1 - f_U} \quad (3.8)$$

Conociendo  $K_{N-U}$  es posible conocer el cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{N-U}$ ) que describe el proceso del estado nativo al desplegado, mediante la relación:

$$\Delta G_{N-U} = -RT \ln K_{N-U} \quad (3.9)$$

donde  $R$  es la constante de los gases y  $T$  la temperatura absoluta. Y  $\Delta G$  es el cambio de energía libre de Gibbs asociada a un proceso, en este caso al proceso de desplegamiento.

Por estudios realizados previamente se sabe que el cambio de energía libre de Gibbs en el proceso de desplegamiento varía aproximadamente de forma lineal con la concentración de desnaturizante ( $[d]$ ).

$$\Delta G_{N-U} = \Delta G_{N-U}^{H_2O} - m_{N-U} [d] \quad (3.10)$$

donde  $\Delta G_{N-U}^{H_2O}$  sería el  $\Delta G_{N-U}$  en ausencia del agente desnaturizante.

A su vez  $m_{N-U}$  representa la dependencia de la constante de equilibrio asociada al proceso de desnaturización (y por lo tanto de la energía libre que caracteriza a la reacción del proceso de desplegamiento) con respecto a la concentración de desnaturizante por lo que éste dato aporta información sobre el cambio conformacional en relación con el grado de exposición al solvente de los grupos tanto polares como apolares que conforman la proteína cuando esta pasa del estado nativo al desplegado, y se define como:

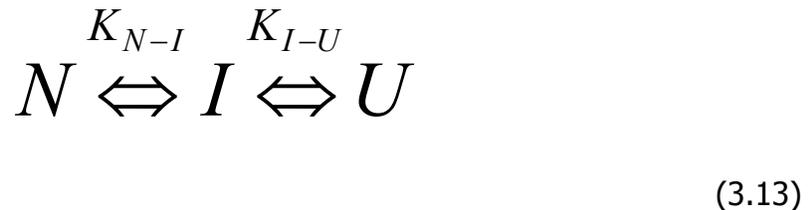
$$m_{N-U} = \sum \alpha_i \delta g_i \quad (3.11)$$

Donde  $\alpha_i$  representa el cambio de área expuesta al solvente de cada uno de los aminoácidos debido al proceso de desnaturización y  $\delta g_i$  es el cambio de energía que ocurre debido a esa exposición.

En la práctica, los datos experimentales se ajustan a la siguiente ecuación

$$y = \frac{y_N + y_U e^{\left[ \frac{-\Delta G_{N-U}^{H_2O} - m_{N-U}[d]}{RT} \right]}}{1 + e^{\left[ \frac{-\Delta G_{N-U}^{H_2O} - m_{N-U}[d]}{RT} \right]}} \quad (3.12)$$

Sin embargo, no todos los mecanismos de desplegamiento ocurren en un proceso de dos estados, ya que en algunas proteínas se han determinado intermediarios en la ruta de desplegamiento. A este mecanismo se le ha llamado como proceso de tres o más estados. Análogamente, a la reacción de dos estados este proceso puede esquematizarse de la siguiente manera.



donde  $I$  representa al estado intermediario y  $K_{N-I}$  y  $K_{I-U}$  son las constantes de equilibrio que describen las reacciones de  $N$  a  $I$  y de  $I$  a  $U$  respectivamente.

Mientras que la proteína total está dada por la sumatoria de la fracción de proteína nativa ( $f_N$ ), desnaturalizada ( $f_U$ ), y del o los intermediarios ( $f_I$ ), que por conservación de masas para el caso de un solo intermediario se define de la siguiente forma:

$$f_N + f_I + f_U = 1$$

(3.14)

Y en el caso de dos o más estados intermediarios, se define como:

$$f_N + f_U + \sum_{i=1}^n f_I = 1$$

(3.15)

En este caso, la observable corresponde a la suma de las contribuciones de cada una de las especies involucradas:

$$y = y_N f_N + y_I f_I + y_U f_U$$

(3.16)

Si asumimos que la reacción se encuentra en el equilibrio, los términos  $f_N$ ,  $f_I$  y  $f_U$  están relacionados con  $K_{N-I}$  y  $K_{I-U}$  que a su vez se relacionan para los correspondientes cambios de energía libre,  $\Delta G_{N-I}$  y  $\Delta G_{N-U}$  como:

$$\begin{aligned}
 f_N &= \frac{1}{(1 + K_{N-I} + K_{N-U})} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{-\Delta G_{N-I}}{RT}\right) + \left(\frac{-\Delta G_{N-U}}{RT}\right)\right]} \\
 f_I &= \frac{K_{N-I}}{(1 + K_{N-I} + K_{N-U})} = \frac{\left(\frac{-\Delta G_{N-I}}{RT}\right)}{\left[1 + \exp\left(\frac{-\Delta G_{N-I}}{RT}\right) + \left(\frac{-\Delta G_{N-U}}{RT}\right)\right]} \\
 f_U &= \frac{K_{N-U}}{(1 + K_{N-I} + K_{N-U})} = \frac{\left(\frac{-\Delta G_{N-U}}{RT}\right)}{\left[1 + \exp\left(\frac{-\Delta G_{N-I}}{RT}\right) + \left(\frac{-\Delta G_{N-U}}{RT}\right)\right]}
 \end{aligned}
 \tag{3.17}$$

En este caso  $K_{N-U}$  se define como la constante de equilibrio del proceso total desde el estado nativo hasta el desplegado considerando la presencia de la especie  $I$ . Por lo tanto el  $\Delta G$  global del proceso se representa como  $\Delta G_{N-U}$  y contempla la aparición de un intermediario. Por lo tanto  $\Delta G_{N-U}^{H_2O}$  es el cambio libre de energía necesario estimado requerido en ausencia de urea para pasar del  $N$  a  $U$  considerando a  $I$ . De igual manera  $\Delta G_{N-I}$  representa el cambio de energía libre entre las especies  $N$  a  $I$ .

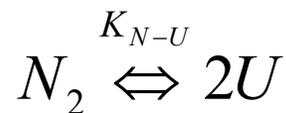
$$\Delta G_{N-I} = \Delta G_{N-I}^{H_2O} - m_{N-I} [d]
 \tag{3.18}$$

donde  $\Delta G_{N-I}^{H_2O}$  es el  $\Delta G_{N-I}$  estimado en ausencia de urea; y  $m_{N-I}$  que indica cual es el cambio del grado de exposición al solvente de los grupos de la proteína cuando pasa del estado nativo al intermediario.

Conjuntando las ecuaciones 3.14 a 3.16 se obtiene que el observable  $y$  está dado por:

$$y = \frac{y_N + y_I e^{\left[ \frac{-\Delta G_{N-I}^{H_2O} - m_{N-I}[d]}{RT} \right]} + y_U e^{\left[ \frac{-\Delta G_{N-U}^{H_2O} - m_{N-U}[d]}{RT} \right]}}{1 + e^{\left[ \frac{-\Delta G_{N-I}^{H_2O} - m_{N-I}[d]}{RT} \right]} + e^{\left[ \frac{-\Delta G_{N-U}^{H_2O} - m_{N-U}[d]}{RT} \right]}} \quad (3.19)$$

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

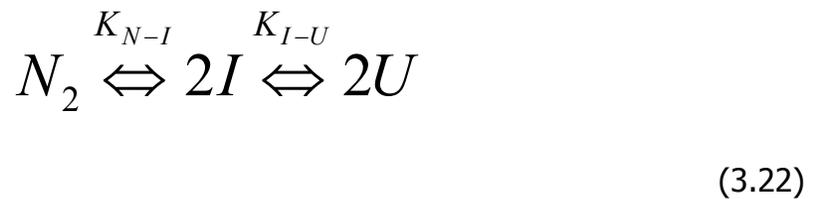


(3.20)

En este modelo, los dos estados en equilibrio son el dímero nativo  $N$  y el monómero desplegado  $U$  y la constante de equilibrio ( $K_{N-U}$ ) puede calcularse de la relación:

$$K_{N-U} = \frac{2[U]^2}{[N]} \quad (3.21)$$

En el caso de que una proteína dimérica se despliegue poblando una especie que se describa como intermediario monomérico, el mecanismo se representaría (Sánchez del Pino *et al.* 2002):



donde  $K_{N-I}$  y  $K_{I-U}$  son las constantes asociadas a la formación del intermediario monomérico y del estado desplegado. Si las especies nuevamente son expresadas en fracciones:

$$f_I = \frac{K_{N-I}(1+K_{I-U})}{4P} \left[ -1 + \sqrt{1 + \frac{8P}{K_{N-I}(1+K_{I-U})^2}} \right] \quad (3.23)$$

donde  $P$  es la concentración de proteína expresada en monómero.

Por lo tanto  $f_N$ :

$$f_N = 1 - f_I(1 + K_{I-N}) \quad (3.24)$$

y  $f_U$ :

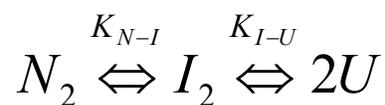
$$f_U = f_I K_{I-U} \quad (3.25)$$

Entonces las constantes de equilibrio pueden ser expresadas como sigue:

$$K_{N-I} = \frac{2f_I^2 P}{f_N} \quad (3.26)$$

$$K_{I-U} = \frac{f_U}{f_I} \quad (3.27)$$

Otro mecanismo propuesto; es el que considera la disociación durante la segunda reacción, es decir:



(3.28)

y las constantes de equilibrio ( $K_{N-I}$  y  $K_{I-U}$ ) se definen de la siguiente forma

$$K_{N-I} = \frac{f_I}{f_N}; K_{I-U} = \frac{2f_U^2 P}{f_I}$$

(3.29)

Si expresamos nuevamente las especies en fracciones entonces:

$$f_N = \frac{f_I}{K_{N-I}}$$

(3.30)

$\gamma f_U :$

$$f_U = \sqrt{\frac{f_I K_{I-U}}{2P}}$$

(3.31)

Por lo tanto

$$f_I = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{N-I}}} + \frac{K_{I-U}}{4P \left(1 + \frac{1}{K_{N-I}}\right)^2} \pm \sqrt{\frac{2 \frac{K_{I-U}}{P} \left(1 + \frac{1}{K_{N-I}} + \frac{K_{I-U}}{8P}\right)}{2 \left(1 + \frac{1}{K_{N-I}}\right)^2}}$$

(3.32)

## **Capítulo 4. Resultados y discusión.**

### **4.1 Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia inducidos por la urea.**

Para evaluar los cambios conformacionales inducidos a la enolasa de *S. cerevisiae* por la adición de urea se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones del agente desnaturizante. Esta técnica espectroscópica da información del grado de exposición de los tres fluoróforos naturales de las proteínas: fenilalanina, tirosina y triptófano. Sin embargo, al ser excitadas las proteínas a una longitud de onda de 280 nm el aminoácido con mayor emisión de fluorescencia es el triptófano. Cuando los residuos de triptófano se encuentran en el interior de la proteína plegada se hallan totalmente ocultos al solvente, por lo tanto, la longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia es de aproximadamente 320 nm. Cuando se encuentran totalmente expuestos a disolventes acuosos su emisión de fluorescencia se desplaza hacia longitudes de onda mayores y su emisión de fluorescencia se lee alrededor de los 355 nm.

Estas propiedades de fluorescencia del triptófano y su baja abundancia en las proteínas permiten registrar cambios conformacionales globales de las mismas, incluyendo las generadas durante la desnaturización de estas moléculas. Los espectros de fluorescencia obtenidos en presencia de altas concentraciones de urea mostraron un desplazamiento hacia una mayor longitud de onda de máxima

de emisión comparados con aquellos que se obtuvieron en bajas concentraciones o en ausencia de urea (figura 4.1).

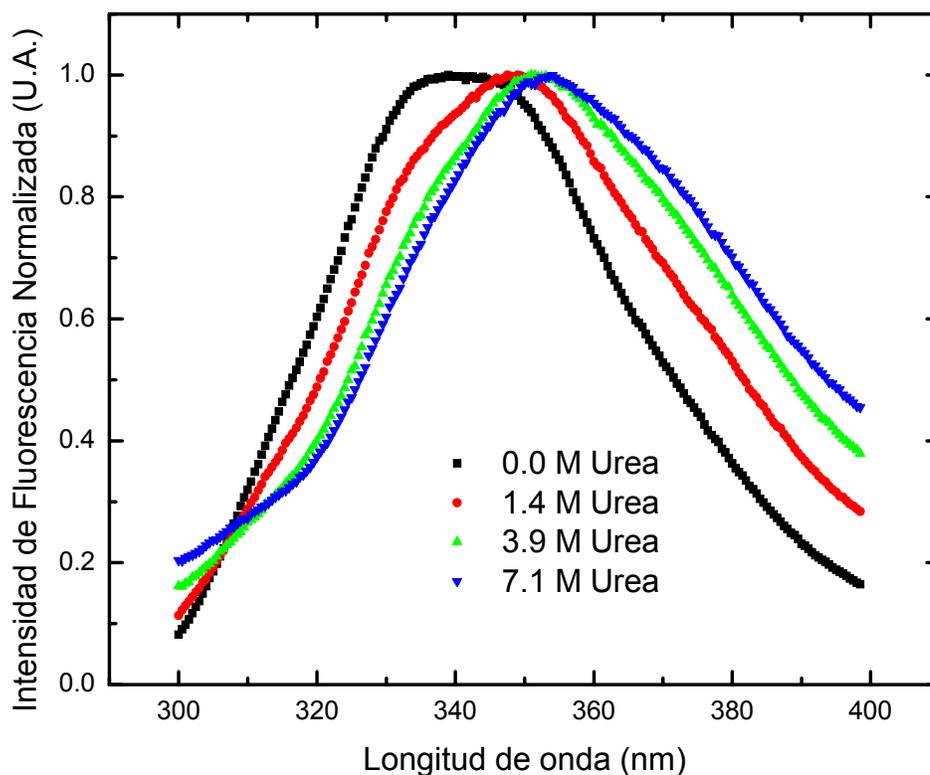


Figura 4.1 Espectros de emisión de fluorescencia de la enolasa de *S. cerevisiae* en distintas concentraciones de urea. Todos los espectros se obtuvieron a una concentración de proteína de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, a  $25^\circ\text{C}$ .

Este comportamiento es observado típicamente en los ensayos de desnaturalización con agentes químicos. El desplazamiento en el espectro de emisión de fluorescencia puede ser expresado en términos de su CME (ecuación 2.1), que es la longitud de onda a la cual se encuentra el 50% del área bajo la

curva del espectro. Los cambios en el CME registrados durante la desnaturalización de la enolasa fueron de casi 8 nm (de 351.03 a 358.76 nm).

#### **4.2 Curvas de transición de desplegamiento en amortiguador de fosfato de potasio.**

El perfil de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* en solución amortiguadora de fosfatos con pH 7.4 e incubada a 25° C se muestra en la figura 4.2. En dicha figura se observan dos etapas de transición, la primera etapa de transición conlleva cambios importantes en la señal observada (CME) y una segunda etapa de transición con cambios menores en comparación con la primera fase (figura 4.2).

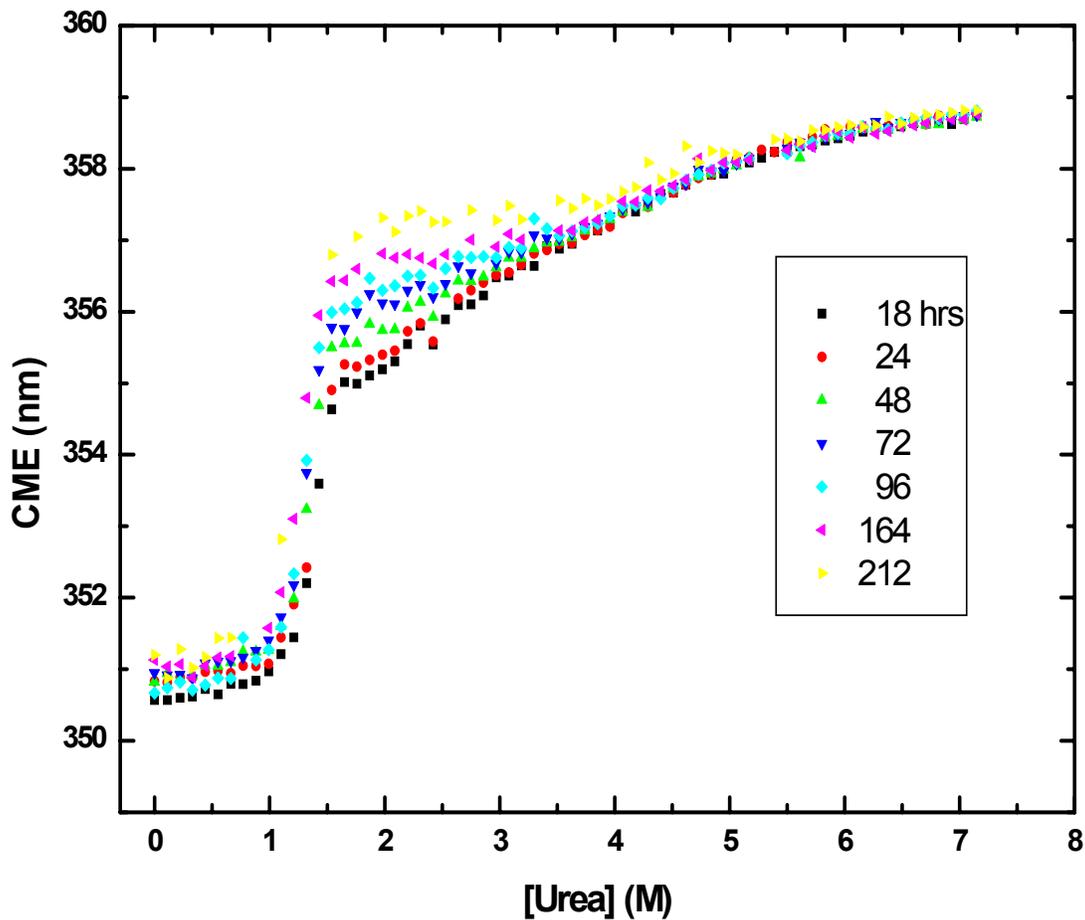


Figura 4.2 Curvas de transición de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* inducido por urea. Las curvas se obtuvieron registrando los cambios de CME del espectro de emisión de fluorescencia en distintas concentraciones de urea a los tiempos de incubación que se indican en el recuadro. En todos los experimentos se utilizó una concentración de proteína de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, a  $25^\circ\text{C}$ .

Esto podría indicar que en el proceso de desplegamiento existe al menos una especie estructural distinta al estado nativo y al desnaturalizado, es decir un estado intermedio en la ruta del desplegamiento.

Se observó que para todos los tiempos de incubación, existe una fase de pretransición, poblada mayoritariamente por la estructura nativa que está presente

entre las concentraciones de 0.0 a 0.9 M de urea. En la fase de pretransición se aprecia un ligero desplazamiento de CME hacia longitudes de onda mayores (0.5 nm) al aumentar el tiempo de incubación; lo que puede atribuirse a cambios sutiles en la exposición al solvente de los triptófanos. La primera etapa evidente en los valores de CME se observó en un intervalo de concentraciones de urea de 1.0 M y hasta 1.5 M. Es importante resaltar que al incrementarse los tiempos de incubación, el inicio de la transición se desplaza a concentraciones menores de urea, lo que indica que la reacción no ha llegado al equilibrio. La segunda transición apareció en concentraciones de entre 3.0 y 4.0. M de urea. Entre ambas transiciones se puede apreciar que existe un intervalo de concentraciones de urea, en que el CME tiene una dependencia menor con la concentración del desnaturizante. Esto podría considerarse como la fase de postransición de la primera reacción y como pretransición de la segunda. Estos resultados permiten suponer que en estas condiciones existe la formación de un intermediario en la ruta del desplegamiento. Adicionalmente, observamos que el CME de la enzima se desplaza aproximadamente 2 nm a las 212 horas de incubación en relación a las 18 horas, en un intervalo de concentraciones entre 1.5 y 2.0 M de urea. Por otro lado, el desplazamiento de CME en un intervalo de 2.0 a 2.5 es de aproximadamente 1.2 nm, para los mismos tiempos de incubación. Es decir, a menor concentración de urea los cambios conformacionales observados para la enolasa son mayores que a concentraciones de urea más altas (figura 4.2). También se puede apreciar que al incrementar el tiempo de incubación disminuye

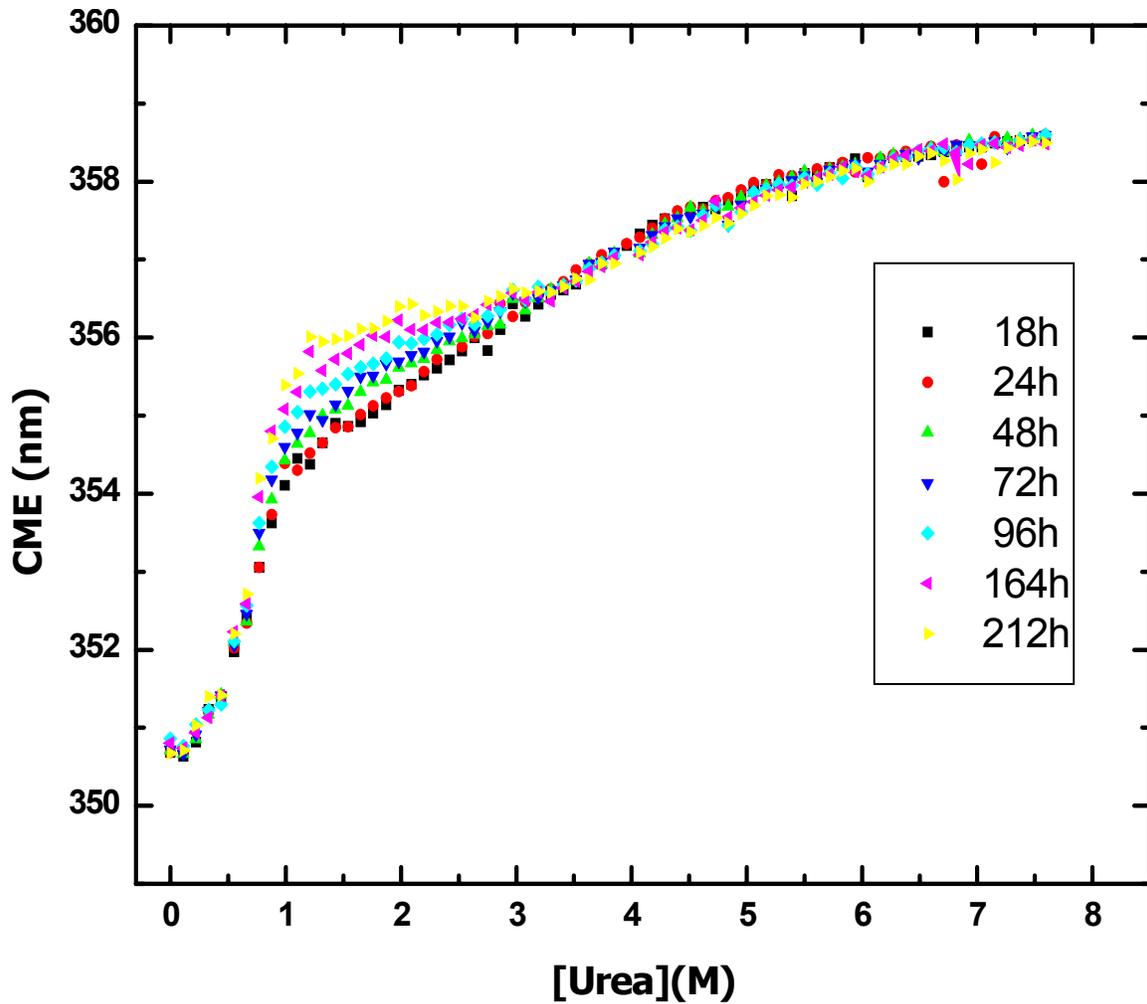
la diferencia de valores de CME entre las curvas de desplegamiento en el intervalo de concentración de urea entre 1.5 y 2.5, lo que nos podría indicar que el proceso esta próximo al equilibrio.

No obstante observamos un desplazamiento en el CME en cada medición dentro de las condiciones de concentración del desnaturalizante que se mencionó anteriormente, estos cambios fueron menores entre cada medición.

Es importante señalar que en el tiempo de incubación mayor a 164 horas la curva de transición mostró variaciones significativas en el CME entre un punto y otro de la gráfica. Proponemos que este comportamiento puede deberse a la degradación del desnaturalizante, aunque se hizo evidente la formación de material precipitado en estas muestras, sin embargo, se desconoce la naturaleza de este material.

### **4.3 Curva de transición de desplegamiento en amortiguador TRIS-HCl.**

El desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* en amortiguador de TRIS-HCl, se evaluó a una temperatura de 25°C y pH 7.4, con una concentración de proteína de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A diferencia de lo observado en la curva de transición en amortiguador de fosfatos, en esta condición prácticamente no se aprecia una pretransición evidente (figura 4.3). No obstante, los cambios en el CME provocados por el desnaturalizante muestran que en la transición del desplegamiento de la enolasa se presenta un intermediario en el proceso, coincidente con lo observado en amortiguador de fosfatos. Lo cual sugiere que el proceso de desplegamiento involucra al menos dos reacciones, con la aparición de un posible estado intermediario.



La figura 4.3 Curvas de transición de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* inducido por urea en amortiguador de TRIS-HCl. Las curvas se obtuvieron registrando los cambios de CME del espectro de emisión de fluorescencia con distintas concentraciones de urea a los tiempos de incubación que se indican en el recuadro. En todos los experimentos se utilizó una concentración de proteína de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  en un amortiguador de TRIS-HCl 50 mM, pH 7.4, a  $25^\circ\text{C}$ .

Al igual que lo observado con el amortiguador de fosfatos, el valor de CME del posible intermediario presenta variaciones en cada uno de los tiempos en que se realizaron las mediciones. Es interesante resaltar que el comportamiento del CME

observado en esta región de la curva de transición fue similar al observado en amortiguador de fosfatos.

La principal diferencia encontrada entre las curvas de transición obtenidas en TRIS-HCl y las obtenidas en amortiguador de fosfatos, es la concentración de urea a la que ocurre cada una de las transiciones. La concentración de urea requerida para inducir el desplegamiento en TRIS-HCl es menor que la necesaria cuando se usa el amortiguador de fosfatos.

De igual forma se puede apreciar en la figura 4.3, que la señal de fluorescencia de la fase de pretransición se superponen en todos los tiempos experimentales.

#### 4.4 Posible mecanismo de desplegamiento de la enolasa de *S.*

##### *cerevisiae* causado por urea.

Los estudios de plegamiento/desplegamiento generalmente se llevan a cabo con la finalidad de describir este proceso, es decir, determinar un posible mecanismo a través del cual ocurre dicha reacción. Adicionalmente con estos estudios se pueden describir parámetros cinéticos y/o termodinámicos asociados a los cambios conformacionales, así como detectar si existen intermediarios estables o cinéticos en el proceso y describirlos tanto estructural como energéticamente.

En el capítulo 3 "Tratamiento de los datos" se ha descrito como obtener las constantes de equilibrio y los parámetros asociados a dichas constantes a partir de los datos de una transición de desplegamiento para los posibles mecanismos que describan la reacción de desnaturalización. Estos parámetros son válidos cuando la reacción se encuentra al equilibrio, sin embargo, en este estudio, a pesar de los tiempos de incubación tan extensos, los resultados seguían mostrando cambios entre los diferentes tiempos en que fueron tomadas las lecturas de emisión de fluorescencia, lo que nos hace pensar que la reacción no ha llegado o está próxima al equilibrio, aunado a ello en este estudio no se evaluó la reacción de replegamiento (el proceso inverso al descrito en esta tesis) de la reacción es por ello que todos los parámetros obtenidos son denominados *aparentes* ( $\Delta G_{N-I\ ap}$ ,  $m_{N-I\ ap}$ ,  $\Delta G_{N-U\ ap}$ ,  $m_{N-U\ ap}$ ). Se analizaron los datos obtenidos después de 164 hrs. de

incubación con la finalidad de determinar cual podría ser el mecanismo a través del cual ocurre la reacción de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* y con ello calcular los parámetros termodinámicos aparentes que describan dicha reacción. Se decidió utilizar los valores de 164 hrs. debido a que son los que llevan mayor tiempo de incubación sin presentar el ruido en la señal de fluorescencia que se observó para los datos de 212 hrs. de incubación.

El primer mecanismo descrito en el Capítulo 3 es el más sencillo y corresponde a una reacción de desnaturalización que ocurre en un solo paso sin intermediarios detectables.



Como se presentó en las figuras de la sección de resultados de esta tesis, los perfiles de desplegamiento de la enolasa de levadura por urea, presentan un comportamiento que muestra dos transiciones evidentes.

En las figuras 4.4 y 4.5 se presentan los perfiles de desnaturalización de la enolasa en cada uno de los amortiguadores empleados en este trabajo, después de incubarse por 164 hrs. en urea y se muestra el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 3.12 que describe una transición de dos estados.

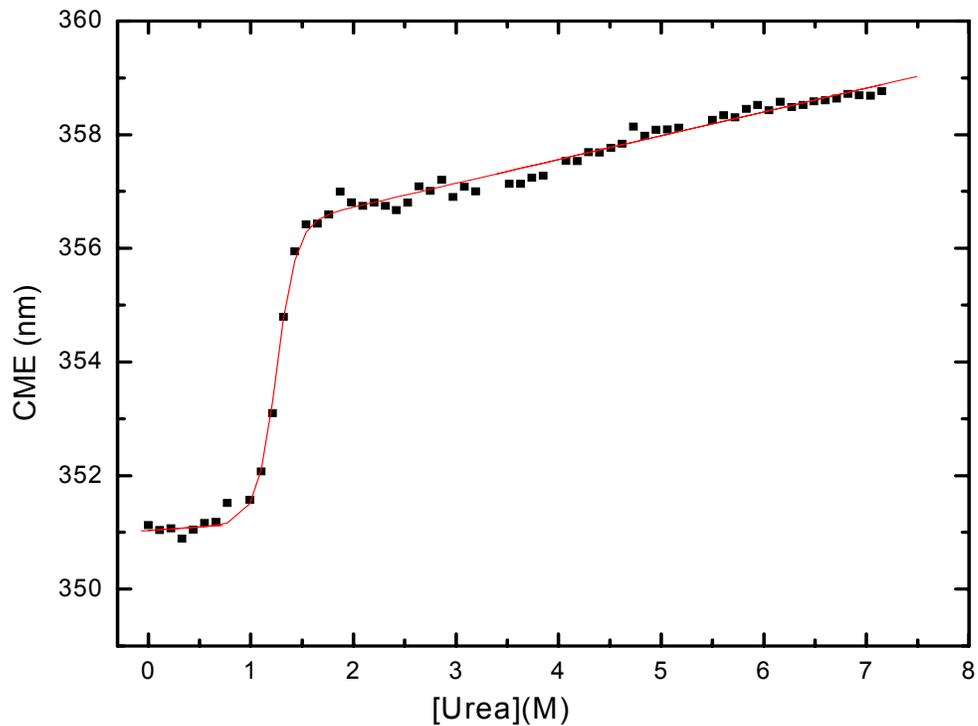


Figura 4.4 Ajuste de los datos experimentales de la curva de 164 hrs en fosfato de potasio a un modelo de dos estados. La imagen muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos a la ecuación 3.12 descrita en la sección 3 que describe el modelo de dos estados  $N \Leftrightarrow U$ .

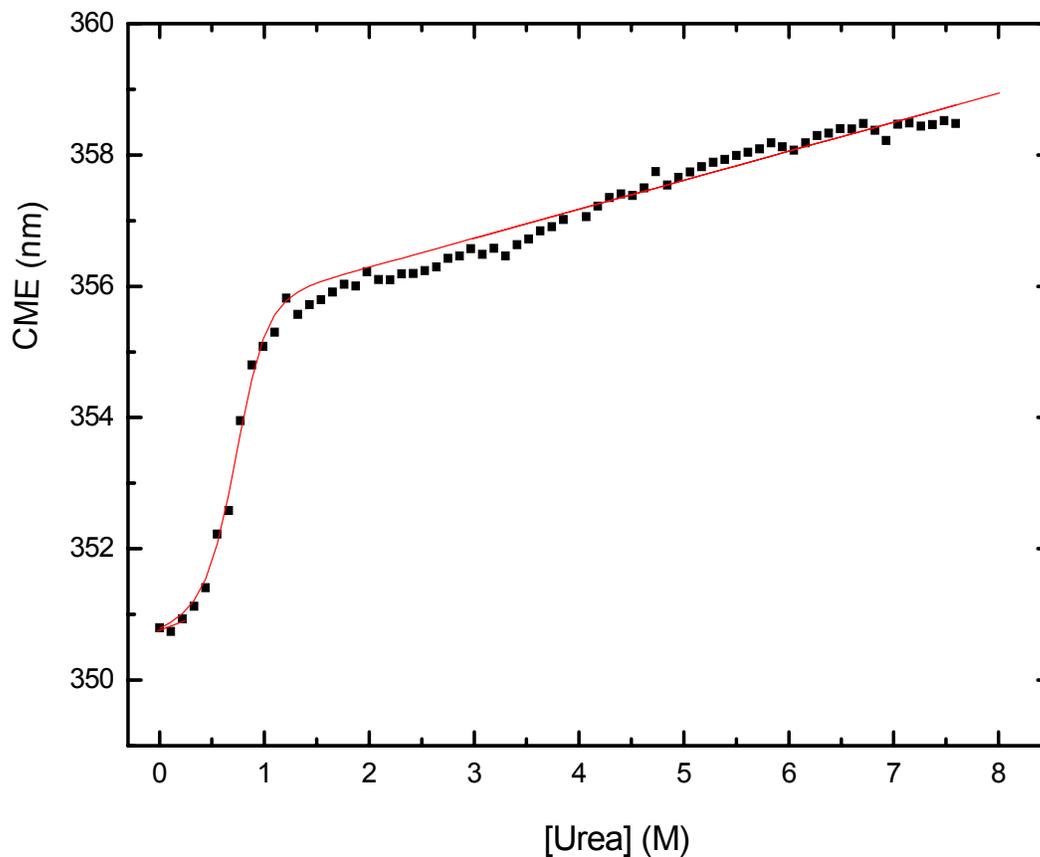


Figura 4.5 Ajuste de los datos experimentales de la curva de 164 hrs en TRIS-HCl a un modelo de dos estados. La imagen muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de TRIS 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos a la ecuación 3.12 descrita en la sección 3 que describe el modelo de dos estados  $N \rightleftharpoons U$ .

Como se puede observar este ajuste no describe adecuadamente los datos experimentales, esto se deduce ya que la línea continua producto de la ecuación no describe la misma trayectoria que los datos del ensayo, por lo que este mecanismo debe descartarse.

Otro posible mecanismo es el que considera la disociación del dímero durante la primera reacción (Sánchez del Pino *et al.* 2002), por lo tanto el estado intermediario, así como el desplegado, se presentan como monoméricos. Las figuras 4.6 y 4.7 muestra las transiciones de desnaturalización de la enolasa en cada uno de los amortiguadores empleados y se muestra el ajuste de los datos experimentales de acuerdo al modelo que involucra un intermediario monomérico.



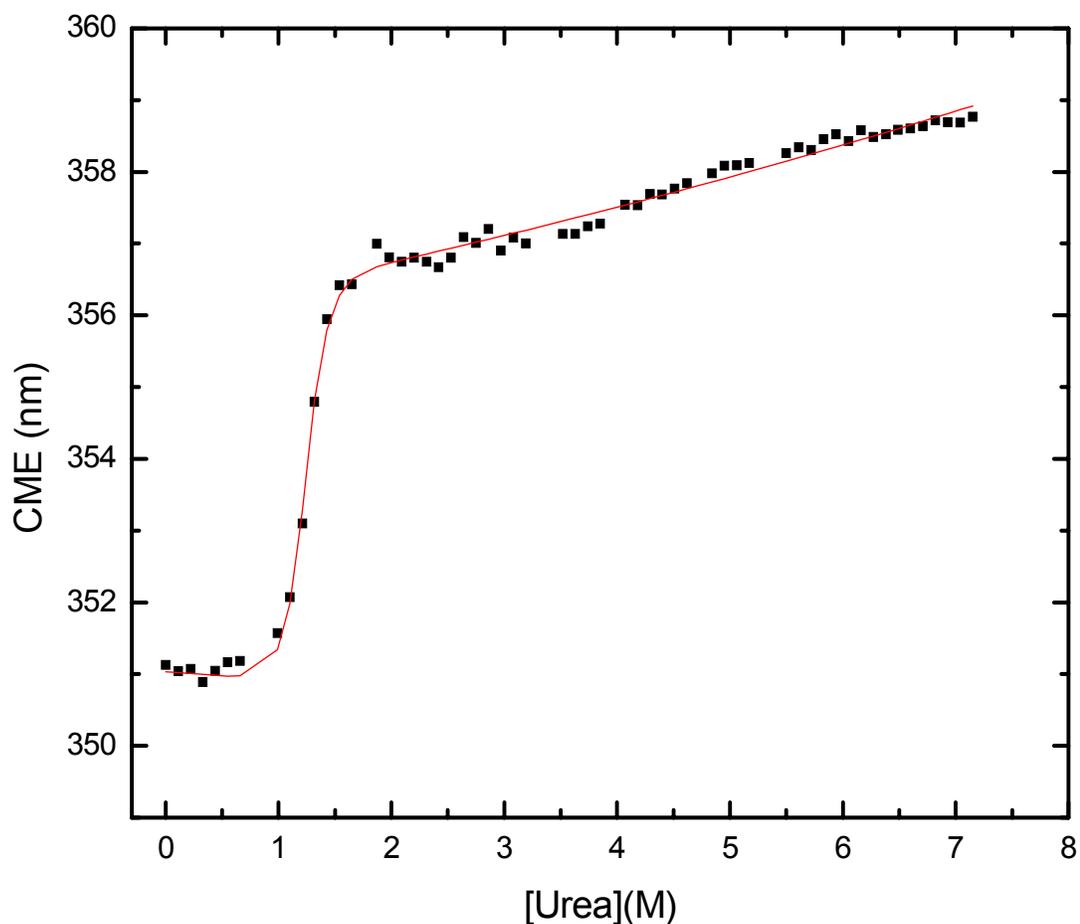


Figura 4.6 Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados con intermediario monomérico en amortiguador de fosfato de potasio. En el gráfico se muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos que describe un modelo de tres estados con un intermediario monomérico  $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$ .

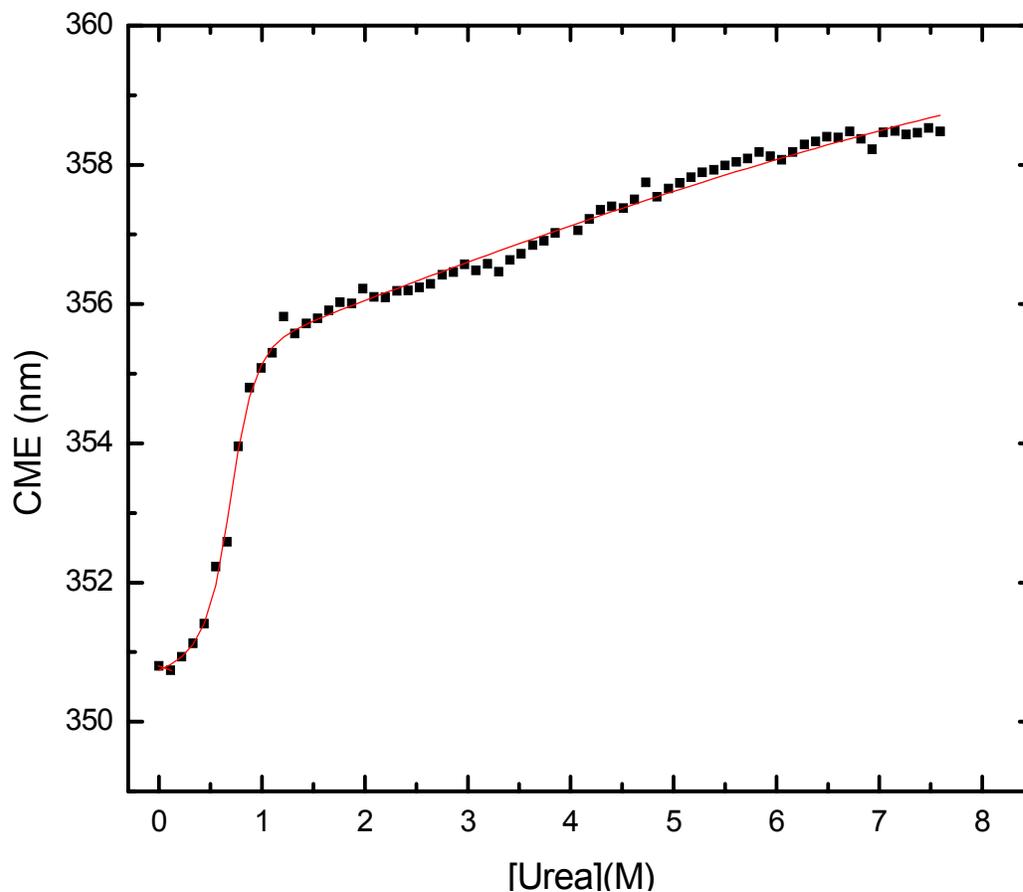
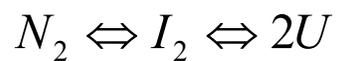


Figura 4.7 Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados con intermediario monomérico en amortiguador de TRIS-HCl. La imagen muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae* después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de TRIS-HCl 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continúa corresponde al ajuste de los datos que describe el modelo de tres estados con un intermediario monomérico  $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$ .

Los resultados de este trabajo también fueron analizados aplicando un modelo que considera la disociación durante la segunda reacción en la ruta de desplegamiento, el cual está descrito en la sección tres por la ecuación 3.32.



Como se puede ver en los gráficos, este mecanismo no describe adecuadamente los resultados obtenidos en ninguna de las condiciones experimentales, por lo que los valores obtenidos en esta curva fueron descartados (figuras 4.8 y 4.9).

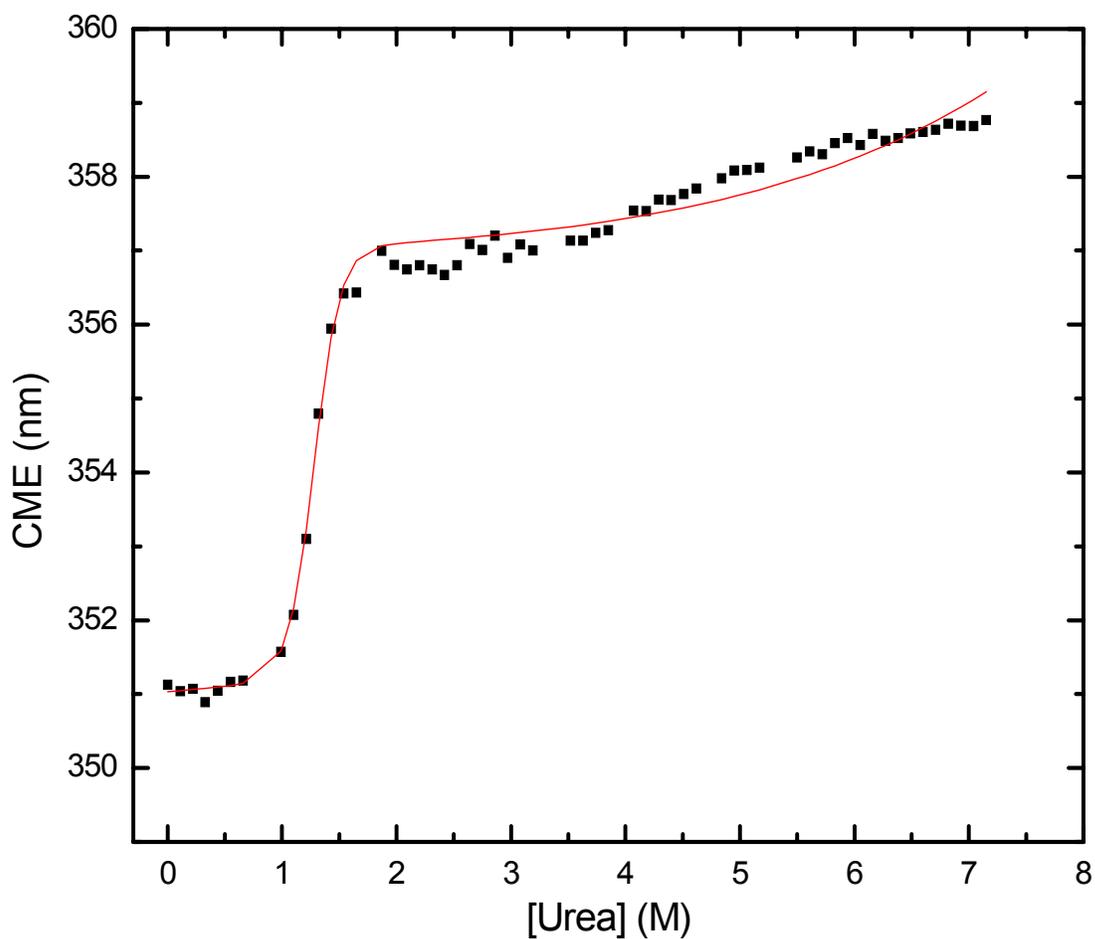


Figura 4.8 Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados con un intermediario dimerico y un estado desplegado monomérico. El gráfico muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos que describe el modelo tres estados con un intermediario dimerico, pero un estado desplegado monomérico.  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$ . (ecuación 3.32)

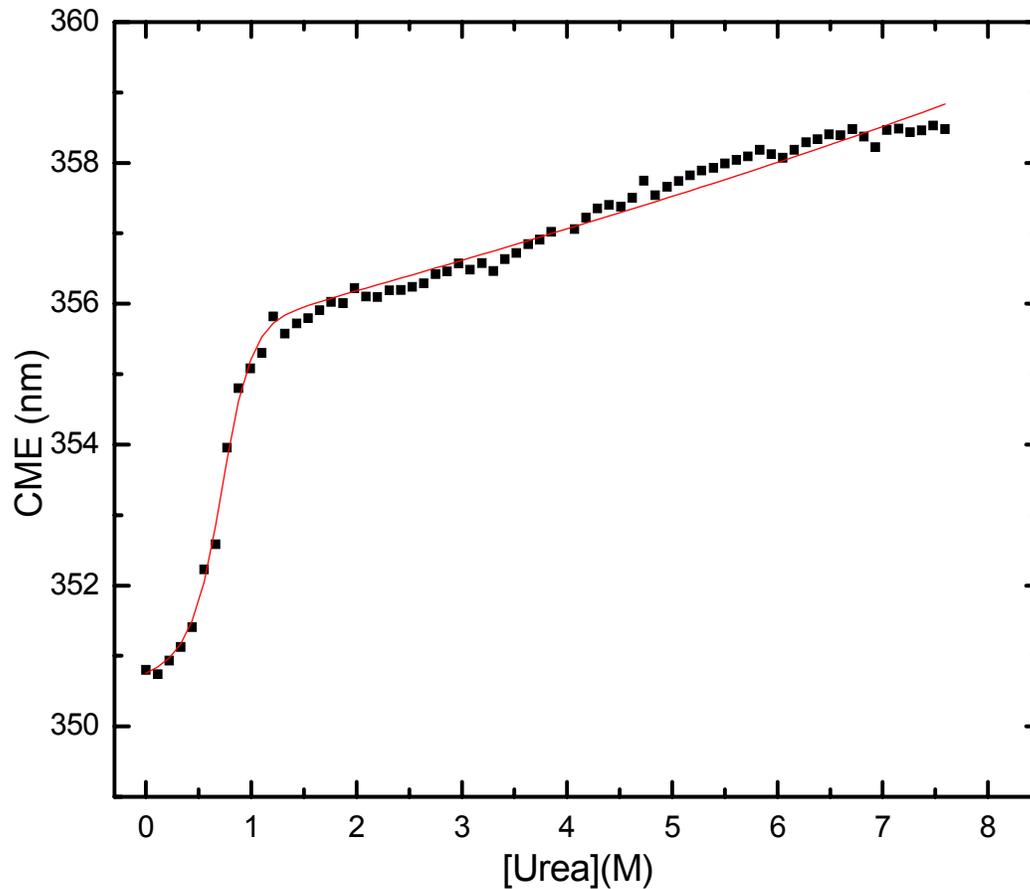
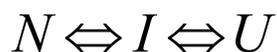


Figura 4.9 Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados con un intermediario dimerico y un estado desplegado monomérico en amortiguador de TRIS-HCl. El gráfico muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de TRIS-HCl 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos al modelo descrito por la ecuación 3.32 descrita en la sección 3 que describe el modelo tres estados con un intermediario dimerico, pero un estado desplegado monomérico:  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$ .

Otro de los mecanismos posibles es aquel que involucra la presencia de un intermediario en la ruta de desplegamiento, sin disociación en ninguna de las etapas.



En las figuras 4.10 y 4.11 se presentan las curvas de transición en ambas condiciones experimentales estudiadas después de 164 horas de incubación en presencia del agente desnaturizante. La línea continua corresponde al ajuste de los datos con la ecuación 3.19, que corresponde al mecanismo de desplegamiento que involucra un intermediario, como se puede apreciar en ambas figuras, la ecuación describe muy bien a los datos experimentales, por lo que es posible que la reacción de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* se lleve a cabo mediante este mecanismo. Cabe recalcar que la ecuación 3.19 no contempla la disociación del dímero en ninguna de las etapas del desplegamiento; debido a que la enolasa de *S. cerevisiae* se ha observado como un dímero, es de esperarse que en alguna de las etapas del desplegamiento pudiera ocurrir la disociación del mismo. No obstante nuestros resultados no nos permiten detectar la separación de los monómeros durante la desnaturalización.

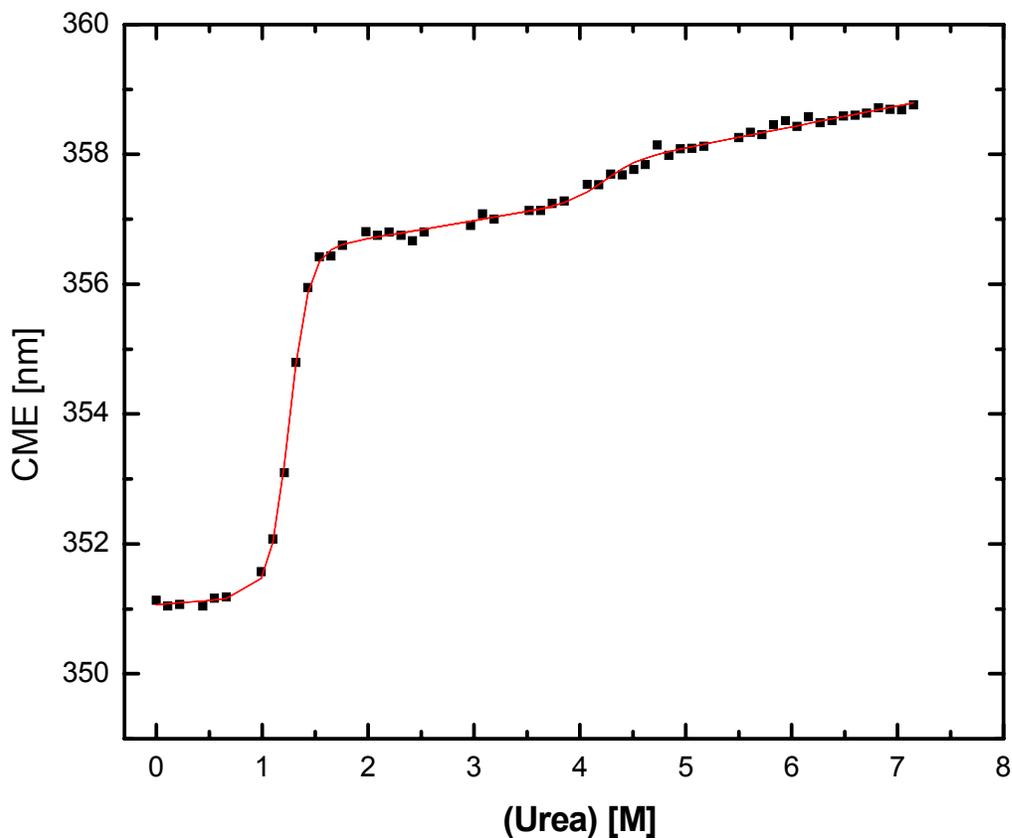


Figura 4.10 Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados en amortiguador de fosfato de potasio. El gráfico muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 horas de incubación con el agente desnaturalizante en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 a 25° C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos al modelo descrito por la ecuación 3.19 descrita en la sección 3 que describe el modelo tres estados:  $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$

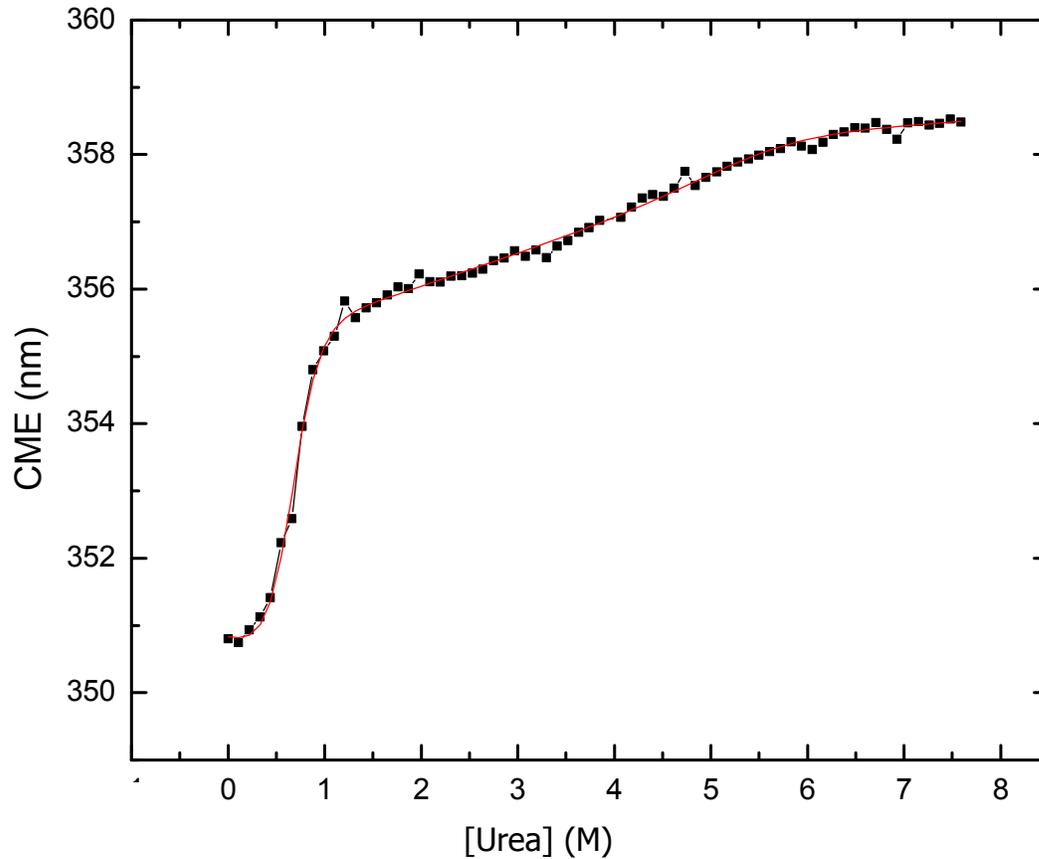


Figura 4.11 Ajuste de los resultados a un modelo de tres estados en amortiguador de TRIS-HCl. El gráfico muestra el perfil de desnaturalización por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*, después de 164 hrs. de incubación con el agente desnaturalizante, en amortiguador de TRIS-HCl 50mM, pH 7.4 a 25°C. Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos a la ecuación 3.19 descrita en la sección 3. que refiere al modelo  $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$  (Mizuguchi 1998).

El ajuste de los datos experimentales obtenidos para el desplegamiento de la enolasa en ambos amortiguadores empleados, después de 164 hrs de incubación a la ecuación 3.19 descrita previamente, permitió obtener los parámetros termodinámicos aparentes presentados en las tablas 1 y 2.

<b>Parámetro</b>	<b>Fosfato de potasio 164 horas</b>
$\Delta G_{N-I ap}$	$34.0 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$
$m_{N-I ap}$	$27.0 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$
$\Delta G_{N-U ap}$	$101.97 \pm 12 \text{ kJ mol}^{-1}$
$m_{N-U ap}$	$43.1 \pm 2.3 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$

Tabla 1. Valores de los parámetros termodinámicos determinados a partir del ajuste de los datos de la curva de desplegamiento obtenidos en amortiguador de fosfatos a la ecuación 3.19.

A partir del ajuste de estos datos se obtuvieron los parámetros termodinámicos del proceso que son resumidos en la siguiente tabla.

<b>Parámetros</b>	<b>TRIS-HCL 164 horas</b>
<b><math>\Delta G_{N-I ap}</math></b>	$12.0 \pm 0.45 \text{ kJ mol}^{-1}$
<b><math>m_{N-I ap}</math></b>	$18.0 \pm 0.65 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$
<b><math>\Delta G_{N-U ap}</math></b>	$36.4 \pm 7.27 \text{ kJ mol}^{-1}$
<b><math>m_{N-U ap}</math></b>	$22.6 \pm 1.72 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$

Tabla 2. Valores de los parámetros termodinámicos determinados a partir del ajuste de los datos obtenidos en amortiguador de TRIS-HCl.

Con los resultados de esta tesis, hasta el momento no es posible afirmar si la reacción de desplegamiento de la enolasa de levadura en presencia de urea presenta reversibilidad; sin embargo, de acuerdo a los resultados aun no publicados de nuestro laboratorio sobre el desplegamiento de la misma enzima, en presencia de cloruro de guanidinio sugiere que es muy probable que la reacción sea reversible. De hecho, los estudios de reversibilidad del proceso de desplegamiento en presencia de urea se plantean como una de las perspectivas de este trabajo.

#### **4.5 Efecto del grupo fosfato en el desplegamiento causado por urea de la enolasa de *S. cerevisiae*.**

En este trabajo se obtuvieron curvas de transición del desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* en dos condiciones experimentales: en presencia y ausencia del grupo fosfato (Figuras 4.2 y 4.3). El perfil de desplegamiento de la enolasa, en ambas condiciones experimentales, se compone de dos transiciones, con una meseta entre ellas. La primera transición implica cambios importantes en el CME (de aproximadamente 7 nm), mientras que la segunda transición los cambios de CME son menores (aproximadamente 1.5 nm). La meseta podría deberse a la presencia de un posible estado intermediario. Por lo anterior, puede inferirse que el mecanismo de desplegamiento en ambas condiciones experimentales es similar y las conformaciones que se observan a distintas concentraciones de agente desnaturizante podrían ser parecidas. Sin embargo, en presencia del grupo fosfato, se observó que la transición inicia a concentraciones de urea mayores en comparación con los resultados obtenidos en TRIS-HCl (Tabla 3).

<b>Parámetros</b>	<b>fosfato de potasio 164hrs</b>	<b>TRIS-HCL 164 horas</b>
<b>CME en ausencia de urea (nm)</b>	351.0	350.8
<b>Inicio de la transición [Urea] (M)</b>	1.0	0.2
<b>Valores en que se observa el intermediario. [Urea] (M)</b>	1.6 - 2.9	1.2 - 2.5
<b>Valores de las concentraciones para la segunda transición. [Urea](M)</b>	3.0 – 5.5	2.6 – 5.7

Tabla 3. La tabla muestra los valores a los que se registraron los cambios ocurridos en la enzima en ambas condiciones experimentales.

A partir de las curvas de transición y la tabla 3 podemos observar que el grupo fosfato le da mayor estabilidad a la enolasa de *S. cerevisiae* en la desnaturalización en presencia de urea. Además, esta observación es soportada por la diferencia en el  $\Delta G_{N-I \text{ ap}}$  y en el  $\Delta G_{N-U \text{ ap}}$  determinados para la desnaturalización por urea de esta enzima. Donde  $\Delta G_{N-I \text{ ap}}$  es el cambio de energía libre aparente necesario para pasar el estado nativo (N) al estado intermediario (I) y  $\Delta G_{N-U \text{ ap}}$  es el cambio de energía total aparente de la reacción de desplegamiento (Tabla 4). Para el caso del  $\Delta G_{N-I \text{ ap}}$  se observa que en fosfatos es casi el triple del

valor del  $\Delta G_{N-I ap}$  para TRIS-HCl (34.0 en fosfatos contra  $12.0 \text{ kJ mol}^{-1}$  en TRIS-HCl). Esta diferencia es la misma a la que se observó para la transición completa ( $\Delta G_{N-U ap}$  101.97 en fosfatos y  $\Delta G_{N-U ap}$   $36.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  en TRIS-HCl). En el caso del parámetro  $m$  (que nos proporciona una aproximación del cambio de área expuesta al solvente de cada uno de los grupos ocultos en el estado nativo y la energía necesaria para exponer dicha área al final del proceso de desplegamiento) se observa una diferencia de 1.5 veces mayor en presencia del grupo fosfato comparado con TRIS-HCl para el intermediario y de casi dos veces mayor para el proceso completo.

	<b>Fosfato de potasio 164 horas</b>	<b>TRIS-HCl 164 horas</b>
<b><math>\Delta G_{N-I ap}</math></b>	$34.0 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$	$12.0 \pm 0.45 \text{ kJ mol}^{-1}$
<b><math>m_{N-I ap}</math></b>	$27.0 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$	$18.0 \pm 0.65 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$
<b><math>\Delta G_{N-U ap}</math></b>	$101.97 \pm 12 \text{ kJ mol}^{-1}$	$36.4 \pm 7.27 \text{ kJ mol}^{-1}$
<b><math>m_{N-U ap}</math></b>	$43.1 \pm 2.3 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$	$22.6 \pm 1.72 \text{ kJ mol}^{-1} M^{-1}$

Tabla 4. Parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste a la ecuación 3.19 de los datos del desplegamiento en ambas condiciones experimentales

Adicionalmente, las transiciones obtenidas en amortiguador de TRIS-HCl a distintos tiempos de incubación prácticamente se superponen en concentraciones de 0.2 a 0.8 M urea; es decir que los primeros cambios conformacionales debidos a la urea, ocurren antes de pasadas las 18 horas de incubación.

En ambas condiciones experimentales los estados desplegados alcanzan aproximadamente la misma señal de CME al completarse la transición. Por lo que podríamos sugerir que el microambiente de los grupos triptófano durante los ensayos es similar al final de las transiciones.

Sin embargo, los valores de  $m$  calculados son mayores para la curva de desplegamiento obtenidos en presencia del grupo fosfato que en TRIS-HCl lo que significa, ya sea que el cambio de área expuesta es mayor en grupo fosfato, o bien que la energía necesaria para exponer los grupos originalmente ocultos es mayor, es decir que las interacciones no covalentes presentes en el estado nativo son mas fuertes o más numerosas en presencia del grupo fosfato.

## Capítulo 5. Conclusiones.

En este trabajo, fue posible estudiar la transición de desplegamiento de la enolasa de *S. cerevisiae* en dos condiciones experimentales, una en amortiguador de TRIS-HCl y la otra en amortiguador de fosfato de potasio. Los resultados revelan que el mecanismo presentado en este proceso muestra un intermediario cinético en ambas soluciones amortiguadoras. Con base en ello se ajustaron los datos experimentales de las curvas de transición a ecuaciones que describen las posibles rutas del desplegamiento de la enzima. Los mejores ajustes se obtuvieron con una ecuación que describe un modelo de tres estados en que no se contempla la disociación de la enzima durante el desplegamiento. A partir de estos ajustes se obtuvieron algunos parámetros termodinámicos asociados a la reacción. Estos parámetros son aparentes, ya que en este trabajo no se estudió la reversibilidad de la reacción. A partir del análisis de los resultados proponemos que el mecanismo de desplegamiento de esta enzima es de tres estados con la formación de un intermediario que se mantiene durante el tiempo de los ensayos en las condiciones descritas. Aunado a ello, los valores de  $\Delta G_{N-I\ ap}$  y  $\Delta G_{N-U\ ap}$  mostraron que la enzima de levadura es más resistente al proceso de desplegamiento en presencia del grupo fosfato que en ausencia de éste. De igual forma, los valores de  $m_{N-I\ ap}$  y  $m_{N-U\ ap}$  revelan que para alcanzar el estado desplegado de la enzima, en amortiguador de fosfatos, es posible que se requiera de mayor energía para exponer la superficie de sus grupos originalmente ocultos al solvente en comparación con la energía requerida en amortiguador de TRIS-HCl. Es posible

también, que prevalezca en presencia del grupo fosfato un estado desplegado con estructura ligeramente diferente en comparación al que se obtendría en ausencia de este ión.

## **Capítulo 6. Perspectivas.**

Con los resultados descritos en capítulos anteriores de esta tesis, se han planteado nuevas estrategias de estudio que permitan caracterizar de manera detallada el proceso de desnaturalización de la enolasa. Una de ellas es cambiar las condiciones del amortiguador TRIS-HCl a un amortiguador TRIS-acetato, ya que por resultados de nuestro laboratorio no publicados, la presencia de estos grupos químicos aparentemente le confiere mayor resistencia al proceso de desnaturalización a la enzima en estudio, lo siguiente sería emplear una nueva técnica espectroscópica diferente como lo es el dicroísmo circular para evaluar la pérdida de estructura nativa de esta misma proteína en tres condiciones experimentales: presencia del ión fosfato, ausencia del ión fosfato (TRIS-HCl) y ausencia del ión fosfato mas un complejo como son los acetatos (TRIS-acetatos). De los resultados que se obtengan nuevamente se habrán de obtener los valores termodinámicos ajustados a las respectivas ecuaciones para analizar el mecanismo de desplegamiento y establecer si sigue una misma ruta. Para lo anterior también habrá de evaluarse el replegamiento de la enzima en las mismas condiciones en las que se ha estudiado su desplegamiento.

Una vez caracterizado este mecanismo lo siguiente sería caracterizar esta misma enzima pero proveniente de diferentes especies biológicas y hacer un análisis comparativo de los resultados de su estabilidad y su mecanismo de plegamiento.

### ***Referencias bibliográficas***

1. Berg, J.M., Timoczko, J.L., Stryer, L. (2002) Bioquímica. 5 edición. Editorial Reverté.
2. Brewer, J., Wampler, J. (2001) A differential scanning calorimetric study of the effects of metal ions, substrate/product, substrate analogues and
3. Brewer, J., Lebioda, L. (1989) The structure of Yeast Enolase at 2.25-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. **254**. 3685-3693.
4. Brown C.K., Kuhlman, P. (1998) A model of the quaternary structure of enolase, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *J. Protein Chem.* **17**. 855-866.
5. Bustos Jaimes, I., Ramirez Costa, M., Calcagno, M. (2005) Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry*. **44**. 1127-1135.
6. Buxbaum J., Tagle N. (2000) A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*. **14**. 179 – 183.
7. Chai, G., Brewer, J., Lebioda, L. (2004) Expression, Purification and the 1.8 Å resolution Crystal structure of human Neuron specific Enolase. *Journal Molecular Biology*. **341**. 1015-1021.
8. Cháñez, Cárdenas, M., Vazquez, Contreras, E. (2002) Two notable similar proteins follow different unfolding pathways. *Journal of the Mexican Chemical Society*. **46**. 219-222.

9. Brewer J., Wampler J. (2001) A differential scanning calorimetric study of the effects of metal ions, substrate/product, substrate analogues and chaotropic anions on the thermal denaturation of yeast enolase 1. *International Journal of Biological Macromolecules*. **28**. 213-218.
10. Da Silva Giotto M., Hannaert V., Michels P., Vertommen, D. (2003) The crystal structure of *Trypanosoma brucei* enolase: visualization of the inhibitory metal binding site III and potential as target for selective, irreversible inhibition. *J. Mol. Biol.* **331**. 653-665.
11. Dobson C. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*. **426**. 884-890.
12. Dobson C. (2002) Long-range interactions within a nonnative protein. *Science*. **295**. 1719-22.
13. Duquerroy S., Camus C., Janin, J. (1995) X-ray structure and catalytic mechanism of lobster enolase. *Biochemistry*. **34**. 12513-12523.
14. Fersht A. (1999) *Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein Folding*.
15. Garza-Ramos G., Cabrera N., Tuena de Gómez Poyou, (1992) Enzyme activation by denaturants in organic solvent systems with a low water content. *Eur J Biochem*. **2**. 509-17.
16. Hannaert V., Michels P. (2003) Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase. *European Journal Biochemistry*. **270**. 3205-3213.

17. Hosaka T. (2003) Crystal structure of *Enterococcus hirae* enolase at 2.8 Å resolution. J. Biochemistry. **133**. 817-823.
18. Kellermayer M., Trombitás K., Greaser M., Granzier H. (2005) Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently unfolded molecular segments. Biophysical Journal. **88**. 2022-2029
19. Kornblatt J., Balny C. (2004) Use of hydrostatic pressure to produce 'native' monomers of yeast enolase. European Journal Biochemistry. **271**. 3897-3904.
20. Kornblatt J., Tong L. (2000) The binding of Na<sup>+</sup> to apo-enolase permits the binding of substrate. Biochimica et Biophysica Acta. **1476**. 279-286.
21. Kornblatt J. (2005) Changing the metal ion selectivity of rabbit muscle enolase by mutagenesis: effects of the G37A and G41A mutations. Biochimica et Biophysica Acta. **1748**. 20-25.
22. Kornblatt J., Zheng S., Lamandé N., Lazar M. (2002) Cloning expression and mutagenesis of a subunit contact of rabbit muscle-specific ( $\beta\beta$ ) enolase. Biochimica et Biophysica Acta. **1597**. 311-319.
23. Kühnel K., Luisi F. (2001) Crystal structure of the *Escherichia coli* RNA degradosome component enolase. J. Mol. Biol. **313**. 583-592.
24. Lehninger A. (1990) Bioquímica. Ediciones Omega Barcelona
25. Lesk A. (2000) Introduction to protein science. Architecture, function and Genomics.

26. Lolis E., Davenport R. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*. **29** 6609-18.
27. Lopaschuk D. (2001) Glycolysis regulation. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group.
28. Mande S., Mainfroid V., Hol W., (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Science*. **5** 810-21.
29. Marchal S., Balny C. (2005) The powerful high pressure tool for protein conformational studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **35**. 1175-1183.
30. Mathews C., van Holde. (2003) *Bioquímica*. Addison Wesley. España
31. Michels P., Moyersoer J. (2004) Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol Rev*. **28**. 603-43.
32. Mizuguchi M., Munehto A. (1998) Equilibrium and kinetics of the holding of equine Lysozyme studied by circular dichroism spectroscopy. *J. Mol. Biol*. **283**. 265-277.
33. Morgan C., Dobson C. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of Dimeric Triose Phosphate Isomerase. *J. Mol. Biol*. **300**. 11-16

34. Muñoz V., Sánchez-Ruíz J. (2004) Exploring protein-folding ensembles : A variable-barrier model for the analysis of equilibrium unfolding experiments. PNAS. **101**. 17646-17651.
35. Najera H., Costas M., Fernandez A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. Biochemistry Journal. **370**. 785-792.
36. Pain H. (2000) Mechanisms of protein folding
37. Pal-Bhowmick I., Jarori G. (2004) Cloning, over-expression, purification and characterization of Plasmodium falciparum enolasa. European Journal Biochemistry. **271**. 4845- 4854.
38. Ping H., Aichun D. (2003) Thermal, chemical and chemothermal denaturation of yeast enolasa. Spectroscopy. **17**. 453-476.
39. Qin J., Lebioda L. (2006) Fluoride inhibition of enolasa: Crystal Structure and thermodynamics. Biochemistry. **45**. 793-800.
40. Rief M., Gautel M. (1997) Reversible unfolding of individual Titin immunoglobulin domains by AFM. Science. **276**. 1109-1112.
41. Rojo-Domínguez A. (1988) Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Depto de Química.
42. Sanchez del Pino M., Pérez-Mato I., Corrales F. (2002) Folding of dimeric methionine adenosyltransferase III. The journal of biological chemistry. **14**. 12061-12066.

43. Wang H., Pang H., (2005) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human enolase-phosphatase E1. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **61**. 521-3.
44. Wold F., Holt A. (1961) The isolation and characterization of rabbit muscle enolase. *J.Biol.Chem.* **236**. 3227-31.
45. Wold F., Hargrave P. A, (1971) Studies on yeast enolase. Quantitative end group analyses and the effect of exopeptidase digestion. *J Biol Chem.* **246**. 2904-9
46. Zhan E., Lebioda L., Brewer J; (1997) Mechanism of enolase: The crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/Enolase-Phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry.* **36**. 12526-12534.