



FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Relación estructura-estabilidad
en la disociación de la TIM
de *Entamoeba histolytica***

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA

LUIS ALBERTO TELLEZ LIMA

ASESOR: D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO.

México, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Luis A. Tellez

**Relación estructura-estabilidad en la
disociación de la TIM de *Entamoeba
histolytica***



**Relación estructura-estabilidad en la disociación de la TIM de
*Entamoeba histolytica***

Esta tesis fue revisada y defendida ante un jurado conformado por los doctores Armando Gómez Puyou, Andrés Hernández Arana, Arturo Rojo Domínguez, Juan Pablo Pardo Vázquez y Miguel Costas Basín.

El proyecto se realizó en la *comuna* de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas bajo la dirección del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (43592, 41328, 61044-M y 18487) y PAPIIT (IN218707-2 e IN220707). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT y de la beca complemento de la DEGEP-UNAM.

**A los malagradecidos que –como yo–
siempre olvidan dar las gracias.**

Los límites de mi lenguaje significan los límites de mi mundo.

WITTGENSTEIN,
Tractatus logico-philosophicus.

No es la necesidad, sino su contrario, el “lujo”, que plantea a la materia viva y al hombre sus problemas fundamentales.

BATAILLE,
La Part Maudite.

No hay fin de hacer muchos libros; y el mucho estudio es fatiga de la carne.

SALOMÓN,
Eclesiastés.

ÍNDICE

ABSTRACT	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
Plegamiento y asociación	1
La triosafosfato isomerasa: estructura y función	2
El plegamiento del barril (β/α) ₈	3
Vía de plegamiento de la TIM	6
Los intermediarios monoméricos	8
Los intermediarios diméricos	8
Nuestro modelo de estudio: la TIM de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
OBJETIVO	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Ensayos de actividad catalítica	11
Mediciones espectroscópicas	12
Calorimetría diferencial de barrido	13
Cinética de proteólisis	13
Radio de Stokes	14
Análisis y ajuste de los datos	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Caracterización espectroscópica	17
Estado de asociación y cambios conformacionales del intermediario	21
Calorimetría diferencial de barrido	25
Reversibilidad y equilibrio del sistema	25
Efecto de la concentración de proteína	27
Desplegamiento de los monómeros	28
Cálculos para la entalpía	29
Parametrizaciones empíricas	31
CONCLUSIONES	33
Vía de desplegado de la <i>Eh</i> TIM	33
El intermediario monomérico y la asociación	34
El plegamiento modular y la <i>Eh</i> TIM	36
Asociación y flexibilidad conformacional en la TIM	37
REFERENCIAS	39

ABSTRACT.

Triosephosphate isomerase (TIM) is a key glycolytic enzyme. TIM is an obligated homodimer. Intermonomeric contacts contribute to only 15% of the overall change in accessible surface area of the folding/association process; however, monomer association provides 75% of the overall conformational stability. In order to study the conformational and thermodynamic consequences of dissociation, in this work we used calorimetric, spectroscopic, hydrodynamic and functional methodologies to characterize the thermal unfolding of the TIM from *Entamoeba histolytica* (EhTIM) and a monomeric variant obtained by chemical derivatization (mEhTIM). We found that EhTIM unfolding is a sequential multi-state process, where dissociation leads to a compact and inactive monomeric intermediate followed by unfolding and further aggregation of this intermediate. In the case of mEhTIM, a single transition, equivalent to the unfolding of the EhTIM monomeric intermediate, was observed. Spectroscopic data show that dissociation is linked to substantial unfolding, whereas differential scanning calorimetry experiments indicate that this step represents 55% of the total enthalpy change ($266 \text{ kcal mol}^{-1}$). These results indicate that, rather than a rigid body process, subunit assembly is best represented by a fly-casting mechanism. We propose that TIM follows a modular folding pathway, where the interface is a final nucleation motif that directs assembly, folding and function.

RESUMEN.

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima clave en la glicólisis. La TIM es un homodímero obligado. Pese a que los contactos intercatenarios representan tan sólo el 15% del cambio total del proceso de plegamiento-ensamble, la asociación de los monómeros proporciona alrededor del 75% de la estabilidad conformacional. En el presente trabajo se caracterizó el desplegamiento inducido por temperatura de la TIM de *Entamoeba histolytica* (EhTIM), y el de una variante monomérica obtenida mediante derivatización química (mEhTIM). El uso de técnicas calorimétricas, espectroscópicas e hidrodinámicas permitió determinar las consecuencias estructurales y termodinámicas de la disociación. Los resultados obtenidos muestran que el desplegamiento de la EhTIM sigue un mecanismo secuencial multiestados, donde, como resultado de la disociación se forma un intermediario monomérico compacto e inactivo; seguido del desplegamiento y la agregación de los monómeros. En el caso de la mEhTIM se observó una sola transición, equivalente al desplegamiento del intermediario monomérico. Los datos espectroscópicos muestran que la disociación involucra cierto grado de desplegamiento. La caracterización calorimétrica indica que la entalpía de disociación representa el 55% de la entalpía total ($266 \text{ kcal mol}^{-1}$). En su conjunto, los resultados revelan que, más que una asociación de cuerpo rígido, el ensamble de la TIM se representa mejor por un mecanismo de plegamiento inducido por contacto (fly-casting). Finalmente, proponemos que la TIM sigue un proceso modular de plegamiento, en el que la interfase juega un papel central como un sitio de nucleación que dirige el ensamble, el plegamiento y la función.

INTRODUCCIÓN

Plegamiento y asociación

El plegamiento es el proceso mediante el cual las cadenas polipeptídicas adquieren su estructura nativa o conformación de mínima energía. En muchos casos este proceso ocurre, *in vitro*, sin la ayuda de otro componente en el sistema, lo que reduce al plegamiento a un problema fisicoquímico, gobernado por las diferencias en energía y las barreras cinéticas de los estados conformacionales que adopta la cadena en su camino hacia el estado nativo, que dependen, en esencia, de la secuencia de aminoácidos y del contexto (o ambiente) en que se encuentran las cadenas polipeptídicas.

Por otra parte, la forma funcional de muchas proteínas está constituida por más de una cadena polipeptídica. Alrededor del 15% de las estructuras en las bases de datos corresponden a proteínas oligoméricas, siendo uno de los estados más representados el homodimérico¹. En esos casos el plegamiento involucra también al reconocimiento y la asociación de cadenas polipeptídicas. La oligomerización provee de un nivel adicional de complejidad que se traduce en la formación de estructuras más estables² y que genera ventajas importantes tales como la adquisición de propiedades funcionales y/o regulatorias³.

El plegamiento sigue siendo un problema abierto. El modelo más comúnmente usado para analizar este proceso es el que postula únicamente dos estados (nativo y desnaturalizado); sin embargo, la descripción completa de este mecanismo involucra no sólo el estudio de los estados inicial y final, sino también el de los estados intermedios que los conectan. Bajo ciertas condiciones es posible observar conformaciones intermedias parcialmente estructuradas. La caracterización de estas especies proporciona valiosa información acerca de las vías y los mecanismos que dirigen a este proceso.

El plegamiento-ensamble de las proteínas oligoméricas puede ocurrir por diferentes rutas: desde el modelo más sencillo, donde el plegamiento y la asociación ocurre de manera concertada, hasta mecanismos que involucran la participación de conformaciones intermedias con estructuración y/o asociación más bajas (i.e. estados monoméricos u oligoméricos parcialmente plegados). Es más o menos claro que el ensamblaje de cadenas está dirigido por las mismas fuerzas responsables del plegamiento^{3;4}, sin embargo, la formación de interacciones intermoleculares involucra algunos eventos adicionales, por ejemplo, la asociación introduce un costo entrópico y está limitada por el reconocimiento entre las subunidades⁵. En los oligómeros donde se observan intermediarios en la vía de plegamiento es posible estimar por separado la contribución del plegamiento intramolecular, de la asociación y de los cambios cuaternarios, a la estabilidad, la estructura y la función de las proteínas^{2;3}.

Estudiar el plegamiento de oligómeros tiene una gran relevancia biológica y nos permite entender las bases moleculares y estructurales del reconocimiento y la regulación de los sistemas biológicos.

La triosafosfato isomerasa: estructura y función

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima ubicua cuya estructura representa al prototipo de barril (β/α)₈: patrón de plegamiento que sirve como base estructural para una gran diversidad de funciones enzimáticas y que cuenta con una amplia representación en la base de datos estructurales. Si bien la identidad en la secuencia de aminoácidos varía entre especies, la estructura tridimensional de la TIM tiene un alto grado de conservación. A la fecha, se conocen 19 estructuras cristalográficas de la TIM de diferentes especies⁶. Todas las formas silvestres de esta enzima son oligómeros (dímeros en los organismos mesófilos, tetrameros para algunos hipertermófilos^{7; 8; 9; 10; 11}), formados por subunidades idénticas de aproximadamente 250 residuos, cada una plegadas como barriles (β/α)₈. En los dímeros (la forma más abundante de esta enzima) la interfase está formada primordialmente por las asas 1, 2 y 3, siendo esta última la que provee el mayor componente de interacción entre las subunidades (~40% de los aminoácidos de interfase se encuentran en el asa 3)^{8; 12}. Es importante

recaltar que, aunque cada subunidad cuenta con un sitio activo, la TIM es un oligómero obligado, y sólo las formas oligoméricas de esta enzima son activas. Algunas evidencias sugieren cierto nivel de cooperatividad entre las subunidades^{13; 14}.

Biológicamente la TIM es una enzima de gran relevancia, que participa tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis, la síntesis de triglicéridos y el ciclo de Calvin⁶. Esta enzima, considerada un catalizador perfecto, cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato siguiendo una cinética hiperbólica o de tipo Michaelis-Menten.

Los residuos importantes para la actividad catalítica se encuentran principalmente en las asas 1, 5, 6 y 7, las cuales forman un compartimento que alberga al sitio activo ubicado en uno de los extremos del barril. Los residuos considerados críticos para la catálisis son: Lys13, His102 y Glu174 (de acuerdo con la secuencia de la *Eh*TIM, ver más adelante)^{15; 16}. El asa 3 de una de las subunidades tiene contacto con el sitio activo de la otra, y el asa 6, denominada asa catalítica, experimenta grandes cambios conformacionales como resultado de la unión del ligando^{17; 18}.

El plegamiento del barril (β/α)₈

Aunque existió controversia respecto al origen evolutivo del plegamiento (β/α)₈¹⁹, análisis estructurales y filogenéticos indican evolución divergente²⁰. Es un hecho innegable que éste es uno de los andamiajes estructurales más representados (~ 10% de las enzimas con estructura resuelta tienen este patrón de plegamiento) y con mayor versatilidad funcional (contiene representantes de 5 de las 6 clases de enzimas)²¹. Los barriles (β/α)₈ se forman por la sucesión de unidades β/α , formadas por el motivo estructural asa–hebra β –asa–hélice α . El sitio activo se encuentra siempre localizado en las asas que unen a las hebras con las hélices α y en el extremo C-terminal de las hebras β ; se sugiere que la estabilidad depende de la cara opuesta del barril. Este tipo de arreglo concedería independencia estructural a los grupos funcionales, haciendo posible la modificación de las funciones catalíticas sin comprometer demasiado a la estabilidad²². En lo que se refiere al plegamiento, se ha propuesto que la estructura nativa de los barriles (β/α)₈ se adquiere a través de un mecanismo modular en el que

el plegamiento y ensamble de las unidades β/α contiguas forma subdominios estables²³.

En la TIM, experimentos de proteólisis y complementación de fragmentos apoyan la hipótesis del plegamiento modular. En estudios de proteólisis, realizados en las TIMs de diferentes organismos, se encontró que para las enzimas de levadura (*ScTIM*)²⁴, de conejo (*OcTIM*)²⁵, de *P. falciparum* (*PfTIM*)²⁶ y de *T. brucei* (*TbTIM*)²⁷, los fragmentos permanecen unidos no-covalentemente, mantienen la estructura nativa y la actividad catalítica. Más aún, los fragmentos de *ScTIM* y *PfTIM* fueron capaces de realizar un ciclo completo de desplegamiento/replegamiento correctamente^{24; 26}. En otro estudio, el gen de la TIM de pollo (*GgTIM*) se partió en dos fragmentos, los cuales se expresaron de forma independiente. Al mezclarse, los fragmentos purificados fueron capaces de recuperar la estructura y la actividad catalítica de la TIM tras su replegamiento²⁸.

El mecanismo de ensamblaje de las subunidades β/α se ha estudiado utilizando el intercambio de hidrógenos en amidas acoplado a espectroscopía de masas (HXMS)²⁹ y mediante el análisis de la susceptibilidad a la derivatización durante el desplegamiento de cisteínas incorporadas aleatoriamente en la secuencia (MPAX)³⁰. Los estudios de HXMS para el replegamiento de la *OcTIM* reportan la existencia de un intermediario cinético en el que la mitad C-terminal del barril, constituida por las unidades (β/α) 4-8, se pliega más rápido que la mitad N-terminal, lo que sugiere que la *OcTIM* sigue un mecanismo 4+4 (Figura 1), semejante al de HisF, un barril (β/α)₈ marcadamente simétrico^{29; 31}.

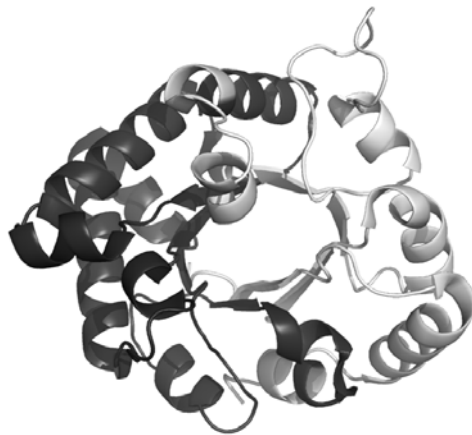


FIGURA 1. Modelo de plegamiento modular 4+4 propuesto para la OcTIM. El panel A (tomado de Pan et. al.²⁹) muestra la estructura primaria y secundaria de las unidades β/α. Las secuencias corresponden a la OcTIM (superior) y la HsTIM (inferior). Los fragmentos de los dominios de plegamiento rápido y lento se muestran en barras oscuras y claras, respectivamente. El Panel B muestra la ubicación de estos dominios en la estructura tridimensional.

En contraste, usando MPAX para caracterizar la vía de desplegamiento de la ScTIM, se logró identificar tres subdominios de plegamiento y dos intermediarios monoméricos parcialmente desplegados. En este estudio se encontró que el desplegamiento de

ScTIM inicia por el C-terminal, conformado por las unidades (β/α) 7 y 8, seguido de las regiones (β/α) 1, 5 y 6, finalizando con el desplegamiento del dominio formado por las unidades (β/α) 2, 3 y 4. Los resultados de este estudio siguen un mecanismo secuencial 3+3+2³⁰.

Vía de plegamiento de la TIM

Se ha propuesto que a estructuras semejantes corresponden vías de plegamiento semejantes³². Las TIMs presentan un alto grado de conservación estructural; sin embargo, existen numerosos estudios en los que se han reportado distintas vías de desnaturalización para la TIM de diferentes especies. Por ejemplo: (i) dos estados para las TIM de *B. stearothermophilus* (BsTIM) y OcTIM; (ii) tres estados con un intermediario monomérico para ScTIM y la TIM de *E. histolytica* (EhTIM); y (iii) cuatro estados para la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) y PfTIM.

Enzima	Vía de desnaturalización	Agente desnaturalizante	Referencia
BsTIM	$N_2 \Rightarrow 2D$	GdnHCl	33
ScTIM	$N_2 \leftrightarrow 2D$	Temperatura	34
OcTIM	$N_2 \leftrightarrow 2D$	GdnHCl	35
GgTIM	$N_2 \Rightarrow 2D$	Temperatura	36
LmTIM	$N_2 \leftrightarrow 2D$	GdnHCl	37
HsTIM	$N_2 \leftrightarrow 2D$	Urea	38
ScTIM	$N_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2D$	GdnHCl	39; 40
EhTIM	$N_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2D$	GdnHCl	41
TbTIM	$N_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2D$	GdnHCl	**
TmTIM	$N_2 \Rightarrow A \Rightarrow 2D$	GdnHCl	42
PfTIM	$N_2 \Rightarrow N_2^* \Rightarrow A \Rightarrow 2D$	GdnHCl	43
TbTIM	$\begin{array}{ccc} & A & A \\ & \uparrow & \uparrow \\ N_2 & \leftrightarrow & N_2^* \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2D \end{array}$	GdnHCl	44
TcTIM	$N_2 \leftrightarrow N_2^* \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2D$	GdnHCl	45

Tabla 1. Vías de plegamiento reportadas para la TIM de diferentes especies. Donde N2 es el dímero nativo, N2* intermediario dímérico, M intermediario monomérico, D el estado desnaturalizado y A estados agregados. **Proyecto de doctorado de Valeria Guzmán Luna.

Una característica común a todos estos esquemas es que la oligomerización juega un papel central en la función (se inactivan al disociarse) y en la estructura (alrededor del 70% del ΔG° de plegamiento de la TIM está dado por la asociación de los monómeros (Figura 2).

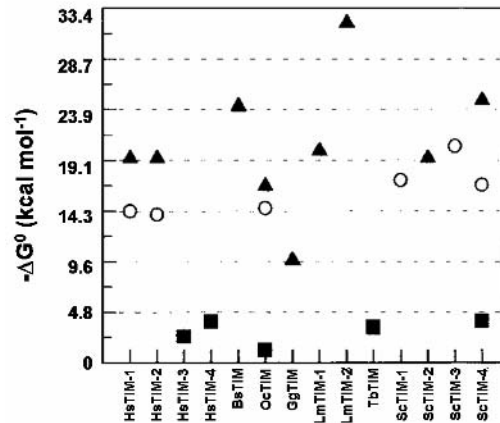


FIGURA 2. Estabilidad de la TIM de diferentes especies. ΔG° de asociación (○), ΔG° de plegamiento (■), ΔG° total (▲). Tomada de Najera et. al. ³⁹

Esta relación entre la estructura y la estabilidad no ha sido completamente explicada. El análisis de la estructura cristalográfica muestra que los contactos intercatenarios representan tan sólo el 5% del cambio total del área accesible al solvente, y las propiedades estructurales y termodinámicas de los intermediarios monoméricos reportados son poco conocidas. En la mayoría de estos estudios se encontró que la desnaturalización de la TIM es un proceso irreversible ^{43; 44; 46; 47} y/o se encuentra bajo un fuerte control cinético ^{34; 48}, lo que ha limitado tanto la caracterización termodinámica de los intermediarios como del mecanismo de plegamiento. Es importante señalar que la mayor parte de estos reportes se realizaron usando agentes caotrópicos. Debido a la histéresis y al alto grado de irreversibilidad del proceso, el uso de la temperatura como desnaturalizante se ha limitado más bien a la estimación de la estabilidad aparente (T_m) de algunas TIMs y sus mutantes ^{37; 49; 50; 51; 52; 53}. No obstante, aún en esas condiciones, ha sido posible extraer parámetros termodinámicos o cinéticos confiables de estos experimentos. Por ejemplo, estudios realizados con la TIM de levadura mostraron que la dimerización está acoplada a la consolidación de la

estructura y que las tasas de desplegamiento y replegamiento tienen grandes entalpías de activación que podrían explicar la histéresis observada³⁴.

Los intermediarios monoméricos

La primera etapa del plegamiento de la TIM involucra la formación de intermediarios monoméricos. Se han reportado este tipo de intermediarios para la desnaturalización con GdnHCl de *TcTIM*⁴⁵, *TbTIM*⁴⁴, *ScTIM*^{39; 40} y *EhTIM*⁴¹. Algunas de las características comunes a todos ellos son que conservan estructura residual, son inactivos y expandidos (con R_s cercanos a los dímeros nativos). El intermediario monomérico de *TcTIM* conserva parte de la señal de fluorescencia y dicroísmo, y expone regiones hidrofóbicas considerables⁴⁵. Estudios de desplegamiento inducidos por presión muestran que los intermediarios de *ScTIM* y *EhTIM* se encuentran más hidratados que las proteínas monoméricas de tamaños semejantes⁴¹.

Los intermediarios diméricos

Posterior a la formación de los monómeros ocurre la asociación y los rearrreglos estructurales necesarios para la consolidación del estado nativo. La presencia de intermediarios diméricos ha sido reportada para la desnaturalización de *PfTIM*⁴³, *TbTIM*⁴⁴ y *TcTIM*⁴⁵. En *PfTIM* el intermediario se forma a bajas concentraciones de GdnHCl (0.8-1.2 M), tiene un ligero incremento en la señales de fluorescencia, una pérdida de ~ 20 % en la señal de dicroísmo y tiende a agregarse⁴³. El intermediario dimérico de *TbTIM* que se observa entre 0 y 1.8 M de GdnHCl es inactivo, se encuentra ligeramente expandido (presenta un incremento de ~7.5% en el R_s), expone regiones hidrofóbicas y pierde alrededor del 50% de estructura secundaria⁴⁴. En *TcTIM*, el intermediario se observa a concentraciones menores a 1 M de GdnHCl. Este intermediario se caracteriza por un aumento en la intensidad de fluorescencia, en la señal de dicroísmo y en la actividad catalítica con respecto al dímero nativo⁴⁵.

Nuestro modelo de estudio: la TIM de *Entamoeba histolytica*

La triosafosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica* (*EhTIM*) es una proteína de 261 aminoácidos⁵⁴. Al compararla con *ScTIM*, la cara del barril opuesta al sitio activo de la *EhTIM* presenta 14 residuos adicionales distribuidos en las asas 1, 2, 3, 6 y 8¹⁶. Al igual que la TIM de otros parásitos, la *EhTIM* posee una cisteína en la interfase (Cys14). Este residuo forma un puente de hidrógeno con la His86 de la otra subunidad y su integridad es fundamental para mantener la estructura y la actividad de la enzima. Una característica relevante de la *EhTIM* es que la derivatización de la Cys14 con metilmetano tiosulfonato (MMTS) genera un monómero estable y compacto con poca pérdida de estructura (Figura 5)¹⁶. Otros residuos de interés en la *EhTIM* son el glutámico 72 (Glu72) y el triptófano 75 (Trp75), ambos localizados en la interfase (asa 3). El primero es importante para la asociación, ya que participa en una red de puentes de hidrógeno importantes para la estabilidad de la enzima³⁷; el segundo, como se verá más adelante, permite monitorear cambios estructurales en la interfase. La presencia de ambos residuos en la TIM de otras especies es poco frecuente.

En estudios previos realizados en este laboratorio se encontró que a valores de pH alcalino, la desnaturalización térmica de la *EhTIM* presenta un intermediario presuntamente monomérico⁵⁵. Por esta razón la *EhTIM* es un excelente modelo para estudiar el mecanismo de plegamiento de la TIM.

En el presente trabajo se estudió la desnaturalización inducida por temperatura de la TIM de *Entamoeba histolytica* (*EhTIM*). El uso de diversas técnicas hizo posible la caracterización estructural y termodinámica de un intermediario monomérico. Adicionalmente, la caracterización del desplegamiento de una forma monomérica de esta enzima (*mEhTIM*) permitió la estimación del plegamiento previo y posterior a la asociación. Hasta la fecha este es el único intermediario estable de la TIM obtenido por temperatura.

OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es estudiar la relación entre la estabilidad y la estructura de la *EhTIM* en la desnaturalización inducida por temperatura; caracterizar los cambios estructurales del proceso de disociación-desplegamiento; obtener parámetros termodinámicos concernientes a cada proceso; y evaluar la contribución de la dimerización a la estabilidad de la proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) se obtuvo de Böheringer-Mannheim. Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma. Se utilizaron reactivos grado analítico y agua destilada-desionizada.

La producción, expresión y purificación de la *EhTIM* recombinante se realizó de acuerdo con el método descrito por Landa et. al.⁵⁴. El amortiguador de trabajo para la *EhTIM* fue tetraborato de potasio 20 mM, 1 mM de ditioneitol (DTT) pH 8.5

La especie monomérica *mEhTIM* se obtuvo mediante la derivatización de la *EhTIM* con metil-metano tiosulfonato (MMTS), la cual se realizó de acuerdo con el método descrito por Rodríguez-Romero et. al.¹⁶. A continuación se describe brevemente el procedimiento: La *EhTIM* se incubó en 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA y 1 mM de MMTS (pH 7.4) a 25 °C durante 2 hrs. Después, la muestra se dializó intensivamente contra el amortiguador de trabajo. Todos los experimentos con la *mEhTIM* se realizaron en amortiguador de boratos 20 mM, pH 8.5, en ausencia de DTT.

La concentración de ambas proteínas se determinó espectrofotométricamente usando una absorptividad molar (ϵ_{280}) de $36440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^{54; 56}

Ensayos de actividad catalítica

La actividad de la *EhTIM* se midió en celdas de 1 mL, en una mezcla de reacción con trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM (pH 8.5), que contenía 3.0 mM de D-gliceraldehído-3-fosfato, 0.2 μM de NADH y 20 μg de α -glicerolfosfato deshidrogenasa. Los ensayos de actividad se iniciaron agregando 2 ng de *EhTIM* a la

celda de reacción. La velocidad de la reacción se determinó siguiendo el cambio en la absorbancia del NADH a 340 mM como función del tiempo⁵⁷. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU7500 termorregulado. Este método se utilizó tanto para determinar la recuperación de la actividad en las muestras renaturalizadas como para seguir el curso temporal de inactivación de la enzima a 42.5 °C (Figura 8).

Mediciones espectroscópicas

Dicroísmo circular. Los ensayos de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-750 acoplado a un sistema Peltier. Las transiciones de la desnaturalización/renaturalización térmica se siguieron midiendo el cambio en la señal de elipticidad a 220 nm como función de la temperatura. La velocidad de calentamiento/enfriamiento fue de 1 °C min⁻¹. La concentración de proteína fue de 0.1 mg mL⁻¹ y se utilizaron celdas con un paso de luz de 1.0 cm. Durante las mediciones las muestras se mantuvieron en agitación.

Fluorescencia. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluórometro PCI ISS acoplado a un sistema Peltier para controlar la temperatura. La concentración de proteína usada en estos experimentos fue de 0.1 mg mL⁻¹ en celdas de 1.0 cm de paso de luz. La velocidad de calentamiento fue de 1 °C min⁻¹. Durante las mediciones las muestras se mantuvieron en agitación. Las transiciones térmicas se siguieron midiendo el cambio en la señal de fluorescencia como función de la temperatura. En los experimentos de fluorescencia intrínseca se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm (2 nm de ancho de banda) y una de emisión de 333 nm (4 nm de ancho de banda), siguiendo de manera constante el cambio en la intensidad de fluorescencia. Los espectros se obtuvieron mediante un método automatizado que colectaba un espectro por cada grado centígrado de incremento en la temperatura. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, el espectro de emisión comprendió el intervalo 310-419 nm. El centro de masa espectral (CME) se calculó mediante: $CME = \frac{\sum \lambda I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$, donde I_{λ} es la intensidad de fluorescencia para cada longitud de onda (λ). Los ensayos de unión a ANS se realizaron usando 100 μ M del colorante. La longitud de onda de excitación fue de 360 nm (4 nm de ancho de banda), y la emisión se colectó en el intervalo 400-600 nm (8 nm de ancho de banda).

Previo al inicio de los experimentos, las muestras fueron se incubaron a 20 °C durante 15 minutos en presencia del ANS. Al igual que con la fluorescencia intrínseca, en estos experimentos se utilizó un método automatizado que colectaba un espectro de emisión cada por grado centígrado.

Calorimetría diferencial de barrido

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizaron en un calorímetro VP-DSC y en un calorímetro capilar VP-DSC, ambos de MicroCal. Las mediciones se realizaron a diferentes velocidades de calentamiento entre los 0.5 y los 2.5 °C min⁻¹. Las concentraciones de proteína son las que se indican en cada experimento. Las muestras se prepararon mediante diálisis exhaustivas contra el amortiguador de trabajo, y se desgasificaron a temperatura ambiente antes de cada experimento. El amortiguador de la última diálisis se usó en la celda de referencia. Para asegurar una adecuada equilibración del equipo, se corrieron suficientes líneas base de amortiguador contra amortiguador antes de cada experimento, y la última de estas líneas base se restó al trazo calorimétrico correspondiente. En algunos casos se realizó una segunda corrida calorimétrica de la muestra para evaluar la reversibilidad del proceso. El análisis y procesamiento de los datos se realizó con el programa Origin (MicroCal).

Cinética de proteólisis

Las muestras (1 mg mL⁻¹) se incubaron a 42.5 °C con subtilisina Carlsberg en una relación molar 1:2000 (subtilisina:TIM). En los experimentos con *Eh*TIM en presencia de 10 mM de ácido fosfoglicólico (PGA) se probaron distintas relaciones molares en el intervalo de 1:50 a 1:2000. Los tiempos utilizados fueron: 0, 15, 30, 45 y 60 min. En todos los casos la proteólisis se detuvo adicionando fluoruro de sulfonil fenilmetano, a una concentración final de 3mM). Las muestras se analizaron por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en geles de poli(acrilamida al 16% con 0.1% de SDS, siguiendo el método Schagger & von Jagow^{58; 59}. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R. Los fragmentos de *Eh*TIM y *mEh*TIM obtenidos después de 30 minutos de digestión con subtilisina fueron transferidos (electroblotted) de los geles a membranas de fluoruro de polivinilideno. La transferencia se realizó a

temperatura ambiente durante dos horas en una cámara semi-seca, usando como amortiguador con carga negativa 39.4 mg mL^{-1} de ácido aminocapróico (pH 8.5) con 0.05% de SDS, y como amortiguador con carga positiva 8.2 mg mL^{-1} de Tris, 9 mg mL^{-1} de Tricina y 20% de metanol. Los fragmentos transferidos se tiñeron con una solución que contenía azul de Coomassie G en 50% de metanol. La secuenciación de los fragmentos se realizó mediante una degradación de Edman automatizada en un secuenciador de proteínas de fase gaseosa Beckman LF300 equipado con un sistema HPLC Beckman Gold. Se utilizó una columna de HPLC Beckman Spherogel Micro PTH, y los feniltioidantoin-aminoácidos se detectaron usando un espectrofotómetro con arreglo de diodos a 268 nm para la señal y 293 nm para la referencia. Cada fragmento se sometió al menos a 10 ciclos de degradación de Edman. En los casos en los que se identificó a más de un aminoácido, el rendimiento de cada aminoácido se consideró para la determinación de la secuencia de cada fragmento.

Radio de Stokes

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se realizaron en una columna Superdex 75 HR 10/30 acoplada a un sistema FPLC. La temperatura de trabajo (25 ó 42.5 °C) se controló usando un baño circulador de agua conectado mediante una modificación a la chaqueta externa de la columna. La elución de las muestras se siguió con un detector de UV ($\lambda 280$) y un detector de fluorescencia Waters 474, usando una longitud de onda de 295 nm para la excitación y 333 nm para la emisión. La columna fue previamente equilibrada con el amortiguador correspondiente antes de cada corrida cromatográfica. Los radios de Stokes (R_s) se calcularon por la interpolación de los volúmenes de elución a una curva de calibración realizada con 8 proteínas con R_s conocidos⁶⁰ (Figura 7A) . La concentración de proteína en estos experimentos fue de 0.1 mg mL^{-1} .

Análisis y ajuste de los datos

Dicroísmo circular. La señal de dicroísmo circular para la primera transición térmica se ajustó al modelo de disociación $N_2 \leftrightarrow 2M$, donde N_2 representa al dímero nativo y M al intermediario monomérico. Para calcular la entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH}), los datos se normalizaron por medio de la ecuación

$$X_M(T) = \frac{y(T) - y_N}{y_M - y_N}$$

donde X_M es la fracción molar de monómero, $y(T)$ es la señal de dicroísmo a una temperatura dada, y_N y y_M son las señales del dímero nativo y del intermediario monomérico, respectivamente. A continuación se construyó el regráfico $\ln(k_{dis})$ vs. $1/T$. La constante de disociación (k_{dis}) se calculó como

$$k_{dis} = \frac{2X_M^2 Pt}{1 - X_M}$$

donde Pt es la concentración de proteína total expresada en moles de monómero.

Calorimetría diferencial de barrido. A temperaturas elevadas, los trazos calorimétricos se ven distorsionados por la agregación. Por esta razón, el análisis cuantitativo de las curvas calorimétricas de la *EhTIM* se limitó a la primera transición. Los datos de DSC correspondientes a esta etapa se normalizaron por la concentración de proteína, y fueron cortados antes del final de la primera transición⁶¹. Se utilizaron los datos obtenidos a una velocidad de calentamiento de $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ para las distintas concentraciones de proteína empleadas (0.2 a 6.4 mg mL^{-1}). Este conjunto de datos se analizó utilizando distintas estrategias:

i) Análisis de las áreas. Del área bajo la curva de los termogramas obtenidos a distintas concentraciones de proteína se obtuvo el valor del ΔH calorimétrico promedio (ΔH_{cal})

ii) Modelo al equilibrio de dos Estados con disociación (ΔH_{2E}):

$$Cp^{ex} = B_0 + B_1T + \frac{\Delta H}{RT_m^2} \left(\frac{1-f}{-1+\frac{2}{f}} \right)$$

donde B_0 es la intercepción de la pre-transición en el eje y , B_1 es la pendiente de la pre-transición, ΔH es el cambio en la entalpía del proceso y f es el cambio en la fracción molar de dímeros como función de la temperatura. Esta ecuación es parte del programa de análisis y ajuste del MicroCal Origin 5.0.

iii) Modelo de Lumry-Eyring con disociación (ΔH_{LE})⁶²:

$$Cp^{ex} = \frac{\Delta H E_{app}}{RT_m^2} \exp\left(\frac{E_{app} \Delta T}{RT_m^2}\right) \times \left\{ 1 - \frac{1}{2} \exp\left(\frac{E_{app} \Delta T}{RT_m^2}\right) \right\}$$

donde E_{app} es la energía de activación aparente, $\Delta T = T_0 - T_m$ y T_0 es la temperatura de referencia.

iv) usando la relación de Takahashi-Sturtevant (ΔH_{TS})⁶³:

$$\ln Pt = b - \frac{\Delta H}{RT_m}$$

donde Pt es la concentración de proteína total, b es una constante y T_m es la temperatura donde el Cp^{ex} es máximo. Se construyó el regráfico $\ln(Pt)$ vs. $1/T_m$ y los datos se ajustaron a una recta con pendiente $-\Delta H/R$

Debido a la fuerte distorsión cinética que presentaron las endotermas para el desplegamiento de la *mEhTIM*, como una primera aproximación el valor de la entalpía para este proceso se calculó usando el área bajo la curva de las endotermas. El valor que se reporta (ΔH_{Des}) es la extrapolación del área bajo la curva a velocidad infinita.

Cálculos del área accesible al solvente. Los cambios en el área accesible al solvente (ΔASA) para la disociación se realizaron suponiendo una disociación de cuerpo rígido. Para ello se usaron las coordenadas cristalográficas del dímero nativo y de los monómeros en el dímero (PDB: 1M6J). El ΔASA para el desplegamiento de los monómeros se estimó como la diferencia en ASA entre los monómeros y el estado desplegado. El estado desplegado se simuló usando el método de Creamer-Rose

(<http://roslab.jhu.edu7utils7unfolded.html>). Los cálculos de ASA se realizaron con ayuda del programa NACCESS utilizando el método de Lee y Richards con un radio de prueba de 1.4 Å y un ancho de rebanada de 0.05 Å⁶⁴.

Parametrizaciones empíricas. El cambio en la entalpía para la disociación y el desplegamiento de los monómeros se estimó usando las siguientes relaciones⁶⁵:

$$\Delta H_{(60\text{ }^{\circ}\text{C})} = -8.44 \text{ cal } \Delta \text{ASA}_{\text{ap}} (\text{mol } \text{Å}^2)^{-1} + 31.3 \text{ cal } \Delta \text{ASA}_{\text{pol}} (\text{mol } \text{Å}^2)^{-1}$$

$$\Delta H_{(60\text{ }^{\circ}\text{C})} = N_{\text{res}} 0.69 \text{ kcal } (\text{mol res})^{-1}$$

donde $\Delta \text{ASA}_{\text{ap}}$ y $\Delta \text{ASA}_{\text{pol}}$ son el ΔASA apolar y polar, respectivamente; y N_{res} es el número de residuos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización espectroscópica

Los cambios estructurales producidos por la desnaturalización térmica de la *EhTIM* se midieron usando dicroísmo circular (DC) y fluorescencia intrínseca (FI).

El cambio en la señal de elipticidad a 220 nm mostró dos transiciones, indicando la presencia de un intermediario. Los puntos medios (T_m) para las transiciones fueron de $T_{m1} = 41.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $T_{m2} = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hacia el final de la segunda transición ($\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) se observó un cambio negativo en la señal de DC (Figura 3A), que se relacionó con la agregación irreversible de la proteína, la cual era visible en las muestras a estas temperaturas. Sin embargo, ciclos de calentamiento-enfriamiento realizados sólo hasta el final de la primera transición ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) mostraron muy poca histéresis y un alto grado de reversibilidad (Figura 3B). Las muestras sometidas a un ciclo de calentamiento-enfriamiento mostraron espectros de dicroísmo circular prácticamente indistinguibles de los espectros iniciales (recuadro, Figura 3B) y recuperaron alrededor del 89% de la actividad catalítica. Aunque ocurren cambios considerables en la estructura secundaria durante la primera transición, el intermediario observado se encuentra todavía estructurado (conserva $\sim 60\%$ de la señal con respecto a la proteína nativa).

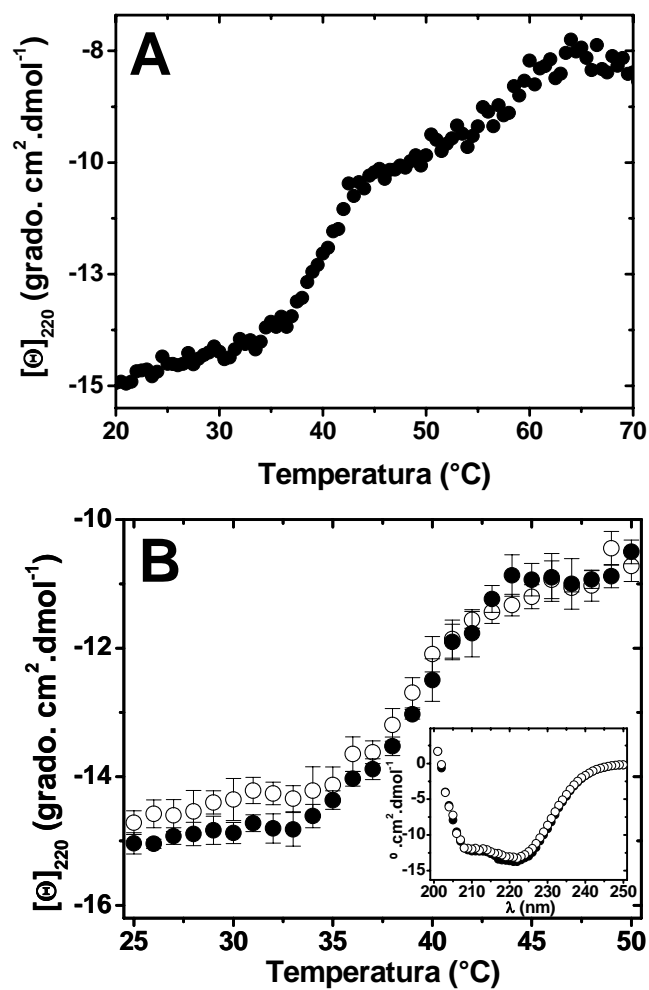


FIGURA 3. Desnaturalización térmica de la *EhtTIM* seguida por dicroísmo circular. El Panel A muestra las dos transiciones. El panel B muestra las curvas de desplegamiento (●) y replegamiento (○) para la primera transición. El recuadro en la figura B muestra los espectros de la proteína nativa (●) y renaturalizada (○).

En el mismo intervalo de temperaturas en el que se observó el intermediario por DC, la intensidad de fluorescencia (IF) a 330 nm mostró una disminución monofásica de la intensidad (Figura 4A). El CME presentó dos transiciones: un corrimiento inicial hacia el azul de ~ 1 nm que ocurrió entre los 25 y 38 °C, seguido de un corrimiento hacia el rojo (Figura 4B).

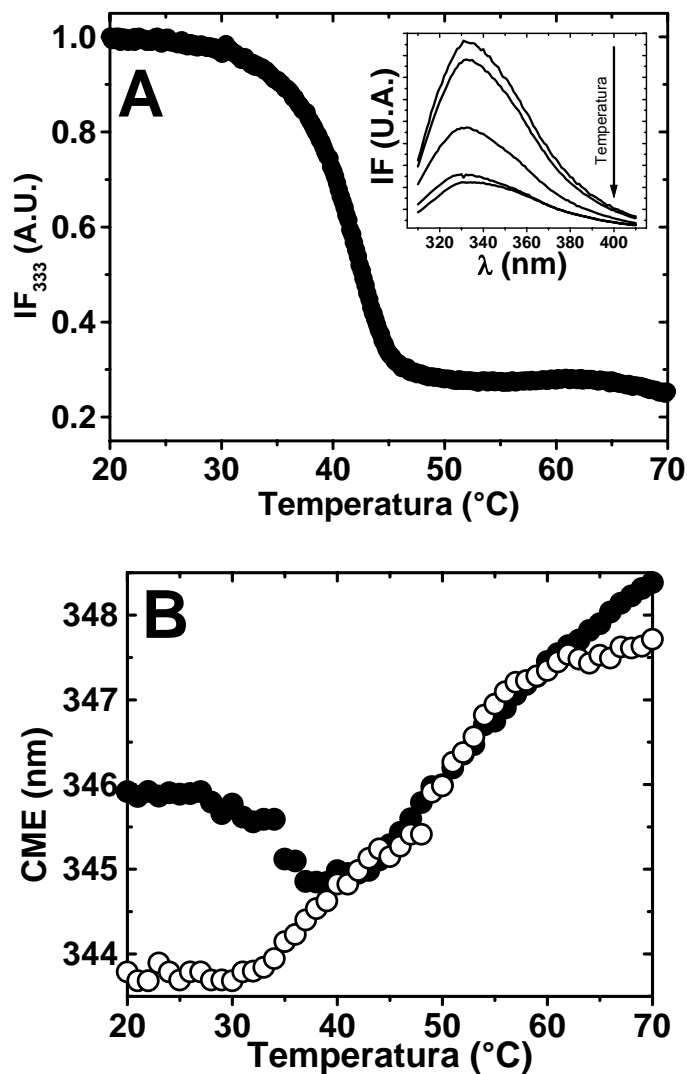


FIGURA 4. Desnaturalización térmica de la *EhTIM* y la *mEhTIM* seguida por Fluorescencia. Panel A: Fluorescencia Intrínseca de la *EhTIM* ($\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{emm} = 333$ nm), el recuadro muestra los espectros de la *EhTIM* a 20, 30, 40, 50 y 70 °C, la flecha indica la dirección el incremento de la temperatura. Panel B: Cambio en el CME como función de la temperatura para la *EhTIM* (●) y la *mEhTIM* (○).

La disminución en la señal de dicroísmo y el corrimiento al azul del CME se observan también en una forma monomérica de esta proteína (*mEhTIM*) obtenida por derivatización con MMTS (Figura 5). El corrimiento del CME se atribuye al ocultamiento de un triptófano de la interfase (Trp75) que en la forma nativa se encuentra parcialmente expuesto¹⁶. A partir de la T_{m1} el comportamiento del CME en la *EhTIM* y en la *mEhTIM* es muy parecido (Figura 4B). Es importante señalar que esta

modificación química es de carácter irreversible, i.e. el uso de agentes reductores como el DTT no regenera la forma dimérica de la enzima.

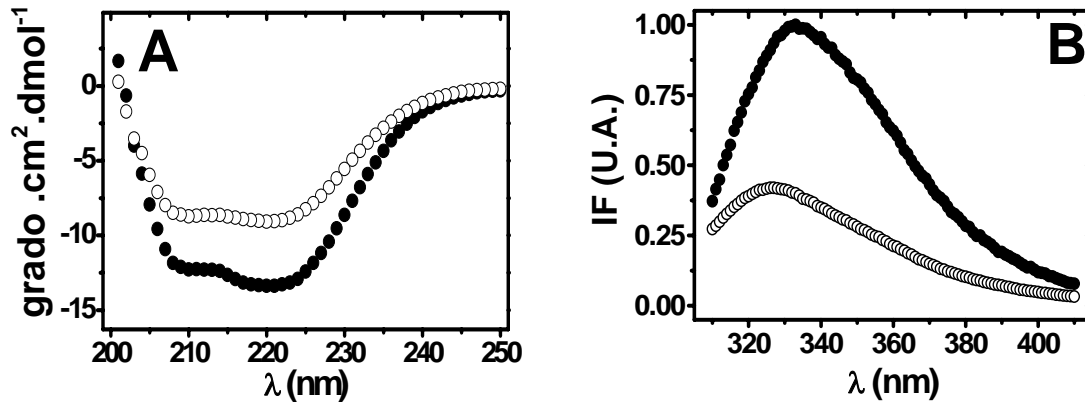


FIGURA 5. Espectros comparativos de Dicroísmo Circular (Panel A) y Fluorescencia Intrínseca (Panel B) para la *EhTIM* (●) y la *mEhTIM* (○). La señal de fluorescencia se encuentra normalizada respecto a la *EhTIM*.

El cambio en la superficie hidrofóbica como función del desplegamiento de la *EhTIM* se siguió mediante la unión del ANS (Figura 6). La *mEhTIM*, a 25 °C, presenta una señal cinco veces mayor que la *EhTIM* nativa, indicando que el monómero derivatizado expone una cantidad considerable de área hidrofóbica que se encuentra oculta en la forma dimérica nativa de la enzima. En la *mEhTIM* la unión del ANS decrece como función de la temperatura. En la *EhTIM* la unión del ANS se incrementa de forma bifásica (con un perfil semejante al observado por DC). A temperaturas mayores a 55 °C ocurre una disminución en la unión del ANS, posiblemente debido a la agregación de la enzima. Estos resultados muestran que en la formación del intermediario se exponen regiones hidrofóbicas, mientras que en la desnaturalización de la *mEhTIM* no involucra la exposición de áreas hidrofóbicas adicionales.

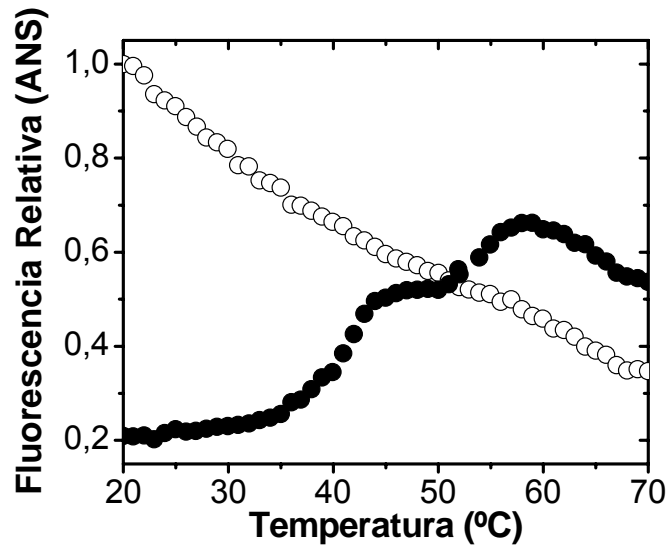


FIGURA 6. Desnaturalización térmica de la *EhtTIM* (●) y la *mEhtTIM* (○) seguida por la unión a ANS. Las señales se encuentran normalizadas respecto a la *mEhtTIM* a 20 °C.

En resumen, en la vía de desnaturalización de la *EhtTIM* se forma un intermediario con estructura secundaria residual, señal de fluorescencia apagada, CME corrido hacia el azul y que expone regiones hidrofóbicas. En su conjunto, los datos espectroscópicos sugieren que el intermediario y el monómero derivatizado comparten características estructurales, y que los rearrreglos estructurales observados en el desplegamiento de ambos podrían ser semejantes.

Estado de asociación y cambios conformacionales del intermediario

El grado de asociación y el estado conformacional del intermediario se caracterizaron mediante el uso de cromatografía y proteólisis a 42.5 °C. Esta temperatura se eligió por estar cercana a la T_{m1} y ser el límite de estabilidad de la matriz de la columna.

Para la cromatografía se usaron los perfiles de elución de *EhtTIM* ($R_s = 31.2 \text{ \AA}$) y *mEhtTIM* ($R_s = 26.3 \text{ \AA}$) a 25 °C como estados de referencia (Figura 7A). En las corridas realizadas a 42.5 °C se detectó una especie con el radio de Stokes esperado para un monómero compacto ($R_s = 26.7 \text{ \AA}$) y señal de fluorescencia disminuida. Adicionalmente se realizaron experimentos en presencia de 10 mM de ácido fosfoglicólico (PGA), un inhibidor competitivo de la TIM. En estas condiciones el perfil de elución del estado

nativo se recupera, indicando la estabilización de la forma dimérica debida a la unión del ligando (Figura 7B). Estos resultados señalan que durante la primera transición ocurre la disociación de la proteína dando como resultado un intermediario monomérico compacto.

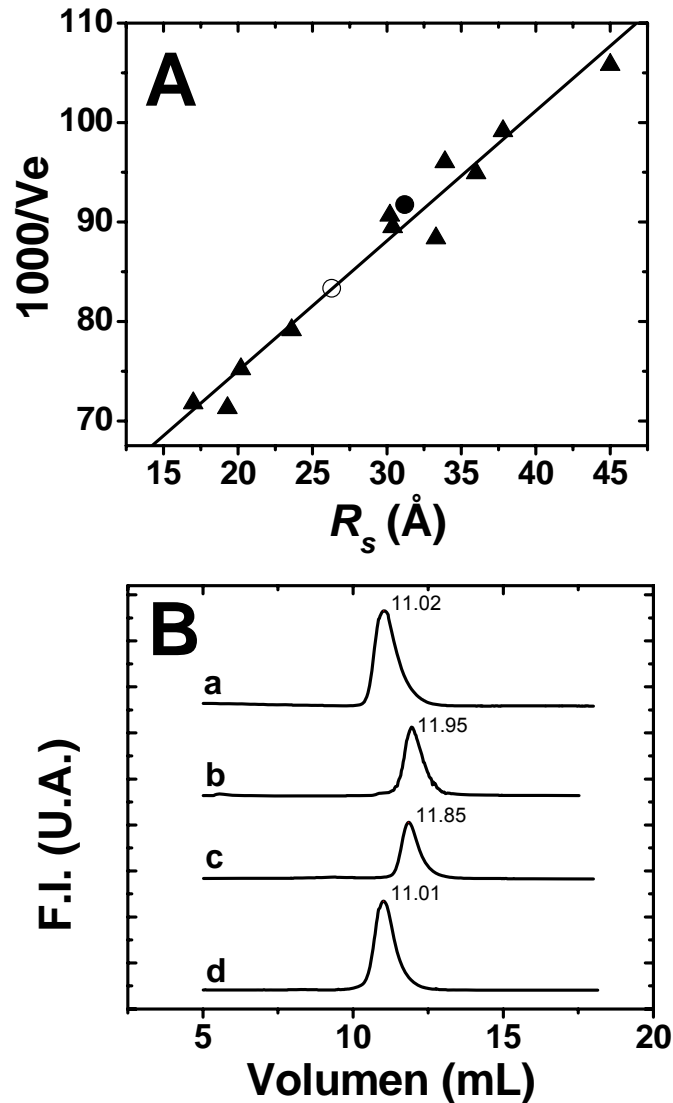


FIGURA 7. Cromatografía de exclusión molecular. El panel A muestra la curva de calibración de la columna superdex 75. Se muestran los valores para la *EhTIM* (●) y la *mEhTIM* (○). El panel B muestra los perfiles de elución de la *EhTIM* y la *mEhTIM* seguidos por fluorescencia ($\lambda_{Exc} = 295$ nm, $\lambda_{Emm} = 333$ nm). Las condiciones son: a) *EhTIM* a 25 °C, b) *mEhTIM* a 25 °C, c) *EhTIM* a 42.5 °C y d) *EhTIM* + 10 mM PGA a 42.5 °C. Los números en los perfiles indican el volumen de elución en mL para el máximo cada pico.

Los cambios conformacionales generados durante la formación del intermediario a 42.5 °C se siguieron mediante cinéticas de proteólisis con subtilisina (Figura 8). La

subtilisina es una proteasa inespecífica que corta enlaces peptídicos en regiones sin estructura y preferentemente no-polares. Como referencia se usó la proteólisis de la *mEhTIM* en estas mismas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron que, aun cuando la *mEhTIM* es más susceptible a la proteólisis, los patrones de corte para ambas proteínas son muy similares. Ensayos realizados en presencia de PGA previnieron la proteólisis de la *EhTIM*, señalando que la forma dimérica es muy poco susceptible a la acción de la subtilisina y confirmando la naturaleza monomérica del intermediario.

Al secuenciar los fragmentos obtenidos con el método de Edman, se encontraron los mismos sitios de corte para ambas proteínas: Val69 y Val91. Ambos residuos se encuentran ocultos en el dímero y forman parte de la unidad β_3/α_3 . Estos resultados apoyan la idea de una semejanza estructural entre el intermediario monomérico y el monómero compacto (*mEhTIM*).

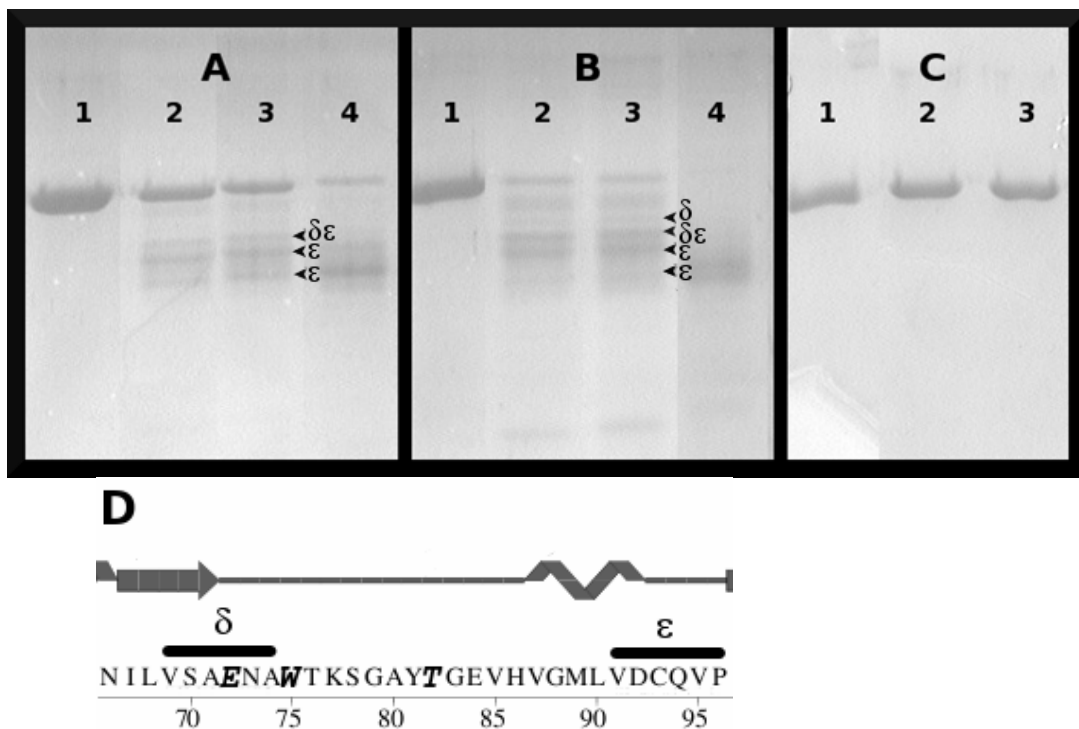


FIGURA 8. Proteólisis de *EhTIM* y *mEhTIM* a 42.5 °C. Curso temporal de la *EhTIM* (Panel A) y la *mEhTIM* (Panel B). Relación subtilisina:TIM = 1:2000. Carril 1) Control. Carril 2) 10 min. Carril 3) 30 min. Carril 4) 45 min. Panel C. Efecto del PGA en la proteólisis de la *EhTIM*. Carril 1) Control. Carril 2) *EhTIM*:subtilisina 1:50, Carril 3) *EhTIM*:subtilisina 1:200. El tiempo de incubación para estas muestras fue de una hora. Panel D Muestra la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de la unidad β_3/α_3 . Las líneas muestran la secuencia de los fragmentos δ y ϵ señalados en los paneles A y B.

Adicionalmente se estimó la formación del intermediario monomérico siguiendo la pérdida de la actividad a 42.5 °C como función del tiempo. Las cinéticas se realizaron a dos concentraciones de proteína: 100 y 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como era de esperarse, las cinéticas de inactivación mostraron dependencia con la concentración de proteína. La figura 9 resume los resultados de las cinéticas de proteólisis e inactivación para la *EhTIM*.

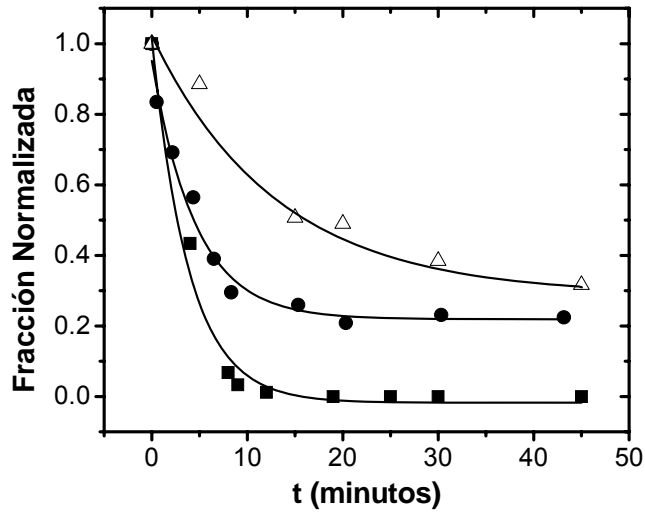


FIGURA 9. Cursos temporales de inactivación y proteólisis a 42.5 °C. Proteólisis (Δ); concentración de proteína: 1 mg mL^{-1} . Actividad residual de la *EhTIM*.; concentración de proteína = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\bullet) y 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\blacksquare).

Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es el método más efectivo y comúnmente usado para estudiar el desplegamiento inducido por temperatura. A partir de estudios calorimétricos es posible obtener información termodinámica acerca de los dominios estructurales de las proteínas, así como de las interacciones entre las subunidades. La estabilidad térmica de la *EhTIM* y la *mEhTIM* se estudió por DSC.

Los resultados obtenidos por DSC para la *EhTIM* muestran dos transiciones y un evento exotérmico (asociado a la agregación irreversible de la proteína) que ocurre hacia el final de la segunda transición (Figura 10). La T_m para la primera transición se encontró alrededor de los 40 °C, mientras que para la segunda se encontró alrededor de los 54 °C y fue muy cercana a la T_m (53 °C) obtenida para la *mEhTIM* (Figura 11). Ambos valores están en concordancia con lo reportado para una mutante monomérica de *TbTIM* que tiene una T_m de 55 °C⁵³. Este resultado corrobora que en la segunda transición ocurre el desplegamiento de los monómeros.

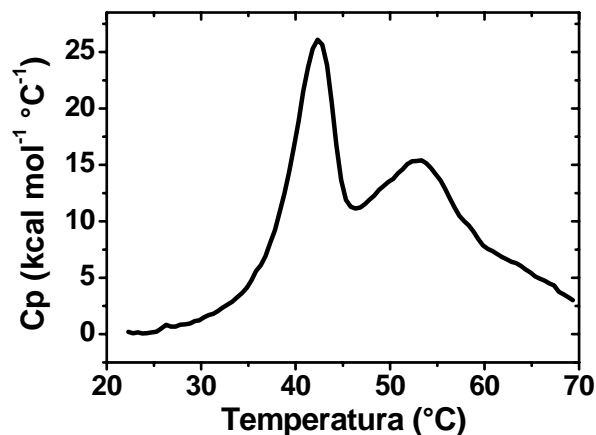


Figura 10. Curva calorimétrica del desplegamiento de la *EhTIM*. Velocidad de barrido: 1 °C min⁻¹.

Reversibilidad y equilibrio del sistema

Dos condiciones necesarias para la caracterización termodinámica del desplegamiento de las proteínas son: la reversibilidad del proceso y que el sistema se encuentre en equilibrio. Aunque el proceso completo de desnaturalización por temperatura de la

EhTIM está contaminado por la agregación y es irreversible, los estudios realizados con dicroísmo circular mostraron que la primera transición presenta un grado considerable de reversibilidad. En DSC, la reversibilidad de la primera transición se evaluó probando diferentes concentraciones de proteína y haciendo dos barridos consecutivos de la misma muestra. Al igual que en dicroísmo circular, el primer barrido se realizó hasta el final de la primera transición. Posteriormente la muestra se enfrió hasta que alcanzó la temperatura de inicio. El segundo barrido se realizó hasta el final de la segunda transición (Figura 11). La primera transición mostró un grado de reversibilidad considerable (~70% del área con respecto al primer trazo). Dicha reversibilidad disminuye al aumentar la concentración de la enzima y depende de la velocidad de barrido, indicando que la agregación irreversible depende, entre otras cosas, del tiempo de residencia a temperaturas elevadas.

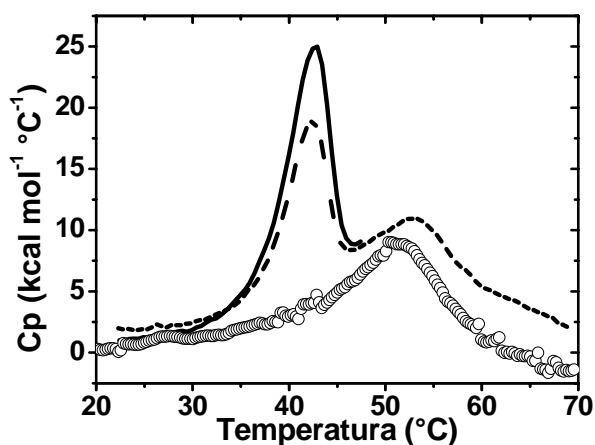


Figura 11. Curvas calorimétricas del desplegamiento de la *EhTIM* (líneas) y la *mEhTIM* (○). Experimento de reversibilidad: La línea continua muestra el primer barrido, la línea discontinua el segundo barrido. Velocidad de barrido: $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

El equilibrio del sistema se evaluó manteniendo fija la concentración de proteína y variando la velocidad de barrido. El valor para la T_m de ambas transiciones varió en función de la velocidad de calentamiento, aumentando con el incremento de la velocidad (Figura 12). La T_{m2} mostró menos dependencia con la velocidad de barrido. Este resultado sugiere que la desnaturalización térmica de la *EhTIM* podría estar bajo control cinético, regulado por la agregación de la proteína.

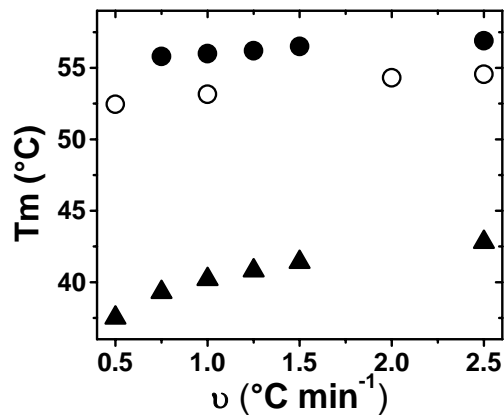


FIGURA 12. Efecto de la velocidad de barrido (v) en la desnaturalización de la *EhTIM* (T_{m1} : ▲; T_{m2} : ●) y la *mEhTIM* (○). Concentración de proteína = 0.4 mg mL^{-1}

Efecto de la concentración de proteína

Una característica de los procesos bimoleculares (e.g. asociación/disociación) es su dependencia con la concentración de proteína. El valor de la T_m para las dos transiciones de la *EhTIM* varió con la concentración de proteína (Figura 13). Como era de esperarse para la disociación, el valor de la T_{m1} aumentó con el incremento de la concentración. En cambio, la T_{m2} disminuyó al aumentar la concentración de proteína. El comportamiento de la segunda transición puede ser explicado como resultado de la agregación, el cual es un fenómeno exotérmico que distorsiona la forma de la endoterma y es más significativo a concentraciones mayores de proteína.

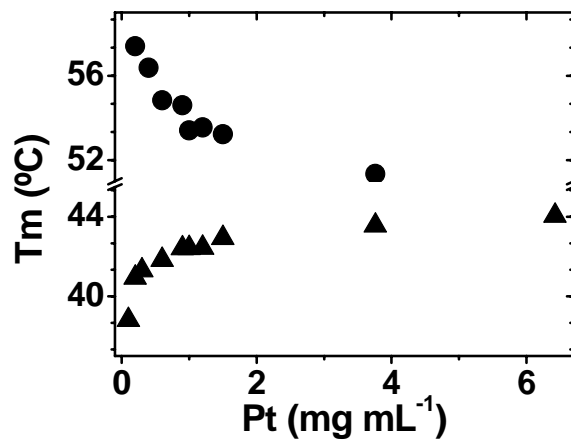


FIGURA 13. Efecto de la concentración de proteína (Pt) en las temperaturas de transición. T_{m1} (▲), T_{m2} (●). Velocidad de barrido: 1 °C min^{-1} .

Desplegamiento de los monómeros

En nuestras condiciones de trabajo la desnaturalización inducida por temperatura es un proceso irreversible; el despliegamiento de los monómeros de la *EhTIM* se encuentra contaminado por la agregación. Esto dificulta tanto el análisis como la extracción de los parámetros termodinámicos de esta parte del proceso. Por esta razón, y ya que la *mEhTIM* comparte características estructurales con el intermediario monomérico obtenido por temperatura, se utilizó a la *mEhTIM* para caracterizar el despliegamiento de los monómeros.

Los datos calorimétricos mostraron que el sistema no se encuentra en equilibrio. Al probar distintas velocidades de barrido la T_m varió de 52.5 a 54.6 °C entre la velocidad más lenta (0.5 °C/min) y la más rápida (2.5 °C/min), respectivamente. Por otra parte, los trazos calorimétricos muestran una gran distorsión con la velocidad de barrido. Esta distorsión se vio reflejada en el área debajo de las curvas (Figura 14). Estos resultados evidencian que el despliegamiento de la *mEhTIM* está bajo control cinético.

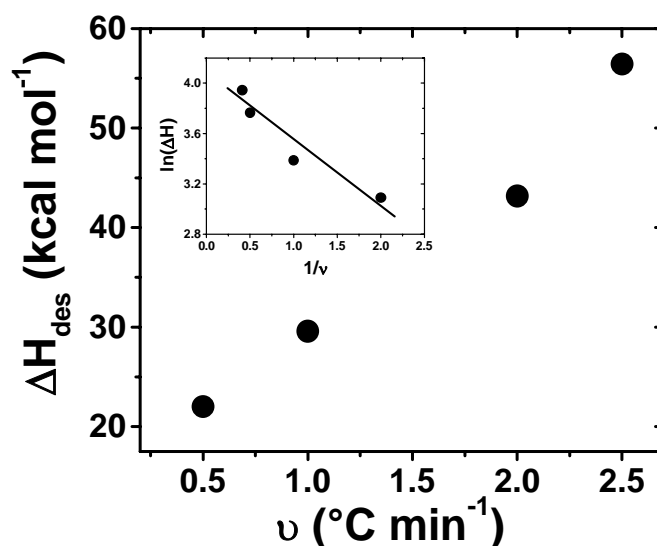


FIGURA 14. Efecto de la velocidad de barrido (v) en la entalpía de la *mEhTIM*. El recuadro muestra el regráfico realizado para extrapolar el valor de la entalpía a velocidad de barrido infinita.

Cálculos para la entalpía

La entalpía de disociación se calculó utilizando los datos calorimétricos obtenidos de experimentos realizados con distintas concentraciones de proteína; las endotermas se cortaron hacia el final de la primer transición (Figura 15) y se analizaron utilizando distintas estrategias: i) análisis de áreas (ΔH_{cal}); ii) usando un modelo al equilibrio de dos estados con disociación (ΔH_{2E}); iii) usando un modelo de Lumry-Eyring (ΔH_{LE})⁶²; y iv) con el regráfico de Takahashi-Sturtevant: $\ln(Pt)$ vs $1/T_{m,app}$ (ΔH_{TS})⁶³.

Debido a que no es posible obtener una línea base confiable, en todos los casos se supuso un valor de $\Delta C_p = 0$ para los ajustes.

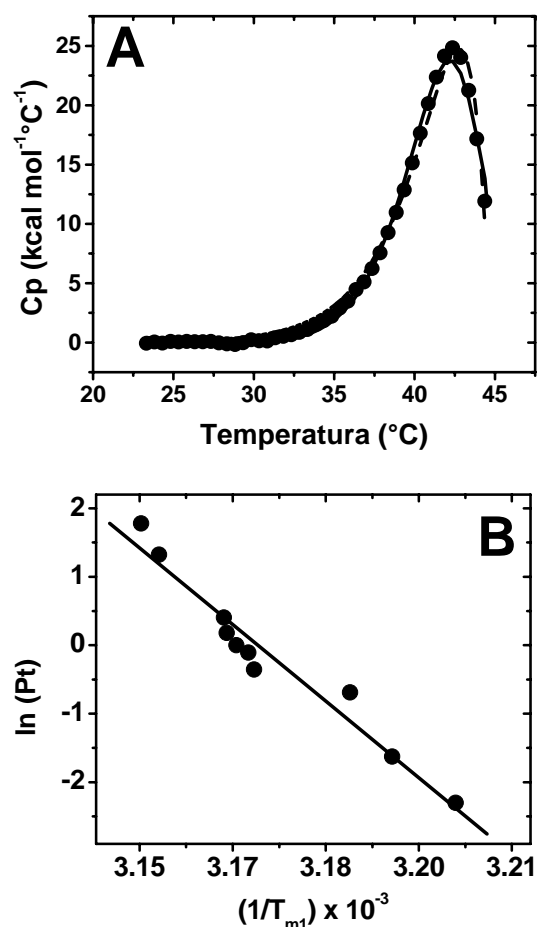


FIGURA 15. Ajuste de los datos de DSC para la primera transición de la *EhtIM*. Panel A) Ajuste representativo: Datos experimentales (●); $\Delta H_{\text{cal}} = 133$ kcal mol⁻¹; $\Delta H_{2E} = 165 \pm 1$ kcal mol⁻¹ (línea continua); $\Delta H_{LE} = 141 \pm 3$ kcal mol⁻¹, $E_{\text{app}} = 70 \pm 1$ kcal mol⁻¹ (línea discontinua). Panel C) Relación de Takahashi-Sturtevant $\Delta H_{TS} = 148 \pm 20$ kcal mol⁻¹.

Adicionalmente, usando los datos de dicroísmo circular, se construyó el regráfico $\ln(K_D)$ vs $1/T$ para obtener el valor de la entalpía de van't Hoff para la disociación.

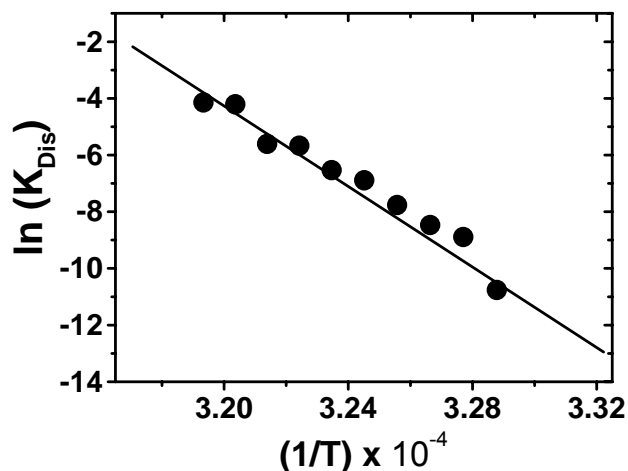


FIGURA 16. Gráfico de van't Hoff de los datos obtenidos por dicroísmo circular para la primera transición.

La tabla 2 resume los valores de la entalpía obtenidos con las distintas aproximaciones.

MODELO	ΔH_{Dis} kcal mol ⁻¹
ΔH_{cal}	137 ± 49
ΔH_{2E}	163 ± 19
ΔH_{LE}	146 ± 53
ΔH_{TS}	148 ± 20
ΔH_{vH}	140 ± 20
\bar{X}	146.8 ± 17

TABLA 2. Valores para las entalpías estimadas por las distintas aproximaciones.

El valor promedio de todos los ajustes se utilizó como estimado de la ΔH_{Dis} , el cual resultó de 146.8 ± 17 kcal mol⁻¹. La cercanía de los valores mostrados en la tabla 2 sugiere que este estimado es una buena aproximación para la entalpía de disociación.

La estimación del cambio de entalpía para el desplegamiento de los monómeros se realizó utilizando los datos calorimétricos para el desplegamiento de los monómeros derivatizados. Debido a la fuerte distorsión cinética, no fue posible obtener un buen ajuste de los datos, por lo que, como una primera aproximación, el valor de la entalpía que se reporta ($\Delta H_{Des} = 59.6 \pm 4.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) es el que se obtiene al extrapolar el área bajo la curva a velocidad infinita (recuadro, Figura 14).

Parametrizaciones empíricas

Mediante parametrizaciones empíricas es posible estimar algunos valores termodinámicos como ΔH y ΔC_p a partir de estructuras cristalográficas. Para realizar estos cálculos sólo es necesario conocer el número de residuos involucrados y/o el cambio en el área accesible al solvente (ΔASA) del proceso en cuestión⁶⁵.

El ΔH_{Dis} se calculó usando la estructura cristalográfica del monómero en el dímero y suponiendo una disociación de cuerpo rígido. Como resultado de esta disociación ocurre un ΔASA de 1585 \AA^2 debido a la exposición de 37 residuos de interfase por monómero (74 residuos totales). De acuerdo con estas parametrizaciones el ΔH_{Dis} se encuentra en el intervalo de 11 a 51 kcal mol^{-1}

El ΔH_{Des} se estimó usando el número de residuos (261 aminoácidos) y la accesibilidad al solvente del confórmero desplegado mediante el método de Cramer-Rose (ver materiales y métodos). El ΔH_{Des} estimado con las parametrizaciones se encuentra en el intervalo de 110-180 kcal mol^{-1} .

Aunque el valor experimental de la entalpía total ($\Delta H_{Tot} = \Delta H_{Dis} + 2\Delta H_{Des}$) se encuentra dentro del intervalo estimado por las parametrizaciones empíricas, los datos experimentales muestran que $\Delta H_{Dis} \gg \Delta H_{Des}$, mientras que en el estimado teórico $\Delta H_{Dis} \ll \Delta H_{Des}$ (Tabla 3).

	Experimental (kcal mol ⁻¹)	Teórica (kcal mol ⁻¹)
ΔH_{Dis}	146.8 ± 17	11-51
ΔH_{Des}	59.6 ± 4.5	110-180
ΔH_{Tot}	266	220-360

TABLA 3. Comparación entre los valores experimentales y los teóricos para las entalpías de disociación y desplegamiento de la *EhTIM*.

Estos resultados confirman que la disociación de la *EhTIM* no es de cuerpo rígido, y que aún cuando el intermediario monomérico que se forma es compacto y conserva buena parte de la estructura secundaria, expone más aminoácidos que el monómero en el cristal.

CONCLUSIONES

Vía de desplegamiento de la *EhTIM*

En términos generales, el plegamiento de la TIM se propone como un mecanismo secuencial en el que el plegamiento de los monómeros precede a la asociación de los mismos. Se han encontrado algunos intermediarios monoméricos de la TIM en estudios cinéticos y al equilibrio en el desplegamiento inducido por agentes caotrópicos. Sin embargo, poco se sabe acerca del grado de estructuración de estos intermediarios, de sus características termodinámicas y su ubicuidad ante diferentes agentes perturbantes⁶.

En este trabajo se encontró que la desnaturalización inducida por temperatura de la *EhTIM* es un proceso multiestados con al menos dos transiciones: la primera, correspondiente a la disociación reversible de los monómeros; la segunda, irreversible y relacionada con el desplegamiento de los monómeros. Estos procesos ocurren de manera secuencial y están bajo control cinético, probablemente regulados por la agregación irreversible de la proteína. En la desnaturalización de la *EhTIM* inducida por GdnHCl también se observó un intermediario monomérico⁴¹, lo cual sugiere que, al menos en la TIM amibiana, este tipo de intermediario es ubicuo.

Una característica inusual de la *EhTIM* es la presencia del Glu72, localizado en el asa 3. Con excepción de la *EhTIM*⁵⁴ y la *LmTIM*⁶⁶, el resto de las TIMs tienen una Gln en la posición equivalente. Esta variación Glu/Gln podría estar relacionada con la vía de plegamiento. Se sabe que la Gln es muy importante para la asociación de la TIM, ya que participa en una red de puentes de hidrógenos relevantes para la estabilidad de la enzima. Se demostró que la estabilidad de la *LmTIM* tiene una fuerte dependencia con el pH, debida a la ionización del Glu³⁷. En la desnaturalización con GdnHCl de la *LmTIM* en condiciones de pH extremo (3.5 o 8.8) se observan curvas bifásicas con un intermediario monomérico; y la sola sustitución de este residuo por Gln tiene efectos estabilizadores (aumenta 26 °C la T_m) y cambia su perfil de desplegamiento⁶⁶. La estabilidad de la *EhTIM* también tiene dependencia con el pH. Estudios previos realizados en la *EhTIM* a pH 7.4 muestran transiciones monofásicas con una T_m cercana

a los 60 °C⁵⁴; mientras que en este trabajo realizado a pH alcalino se observan dos transiciones con valores de T_m por debajo de 60 °C.

Otra característica relevante de la *EhTIM* es su capacidad para formar monómeros compactos (*mEhTIM*) relativamente estables mediante la derivatización con MMTS de la Cys14, localizada en el asa 1¹⁶. Este residuo forma parte de la interfase y se encuentra conservado en las TIMs de otros parásitos⁶⁷. Sin embargo, la derivatización de esta cisteína de interfase en otras especies provoca la agregación irreversible de la proteína⁶⁸. Los datos aquí presentados muestran que el intermediario monomérico de la *EhTIM* comparte características estructurales, espectroscópicas, hidrodinámicas y termodinámicas con el monómero derivatizado, lo que permitió usar al *mEhTIM* como modelo para estimar la entalpía de desplegamiento de los monómeros.

El intermediario monomérico y la asociación

Se ha descrito la presencia de intermediarios monoméricos en la vía de plegamiento de otras TIMs. Todos los intermediarios descritos hasta ahora se habían obtenido usando agentes caotrópicos; todos ellos son inactivos, parcialmente estructurados y con estabilidad marginal⁶. Este es el primer trabajo en el que se encuentra y caracteriza un intermediario monomérico en el desplegamiento térmico de la TIM. El uso de distintas técnicas permitió demostrar que este es un intermediario monomérico compacto ($R_s = 26.7 \text{ \AA}$) e inactivo, con estructura secundaria residual (conserva ~60% de la señal de dicroísmo), señal de fluorescencia apagada y CME corrido hacia el azul. Los experimentos de unión a ANS muestran que el intermediario monomérico expone regiones hidrofóbicas que se ocultan durante la formación del dímero nativo, lo que explicaría la contribución tan grande de la disociación a la entalpía total (~ 55% de la ΔH_{Tot}). En este sentido, estudios previos de desnaturalización por presión indican que el intermediario monomérico de la *EhTIM* se encuentra más hidratado que lo esperado para monómeros plegados del mismo tamaño⁴¹. El valor de ΔH_{Dis} indica que la asociación involucra grandes rearrreglos estructurales. De igual forma, la entalpía de desplegamiento confirma que antes de la asociación, los monómeros de la TIM están sólo parcialmente plegados. En su conjunto, los resultados sugieren que los intermediarios monoméricos tienen cierto grado de flexibilidad estructural,

posiblemente necesaria para la asociación, y que gran parte de la estructura nativa se forma después de la oligomerización. Este comportamiento se ha observado en simulaciones minimalistas usando el modelo Gō para el plegamiento de γ TIM⁶⁹.

El valor experimental de la entalpía de disociación y las parametrizaciones empíricas permiten correlacionar cambios energéticos con alteraciones estructurales; en nuestro caso, estimamos que alrededor de 106 residuos por monómero se encuentran expuestos en el intermediario. Si consideramos que la interfase de la *Eh*TIM está compuesta por cerca de 37 residuos, esto implica que aproximadamente 69 residuos adicionales se ocultan como resultado de la asociación. En apoyo a los datos calorimétricos, los experimentos de fluorescencia indican que ocurren rearrreglos en la vecindad de la interfase (Trp75: asa 3); los datos de proteólisis señalan que estos cambios se extienden a toda la unidad (β_3/α_3). Esta unidad (β/α) contribuye con una tercera parte de los residuos de interfase y contiene grupos de gran importancia estructural y funcional, por ejemplo el Glu72 (relevante para la asociación) y la Thr82 (relacionada con el alineamiento adecuado de los residuos catalíticos), ambos localizados en el asa 3 (Figura 17)

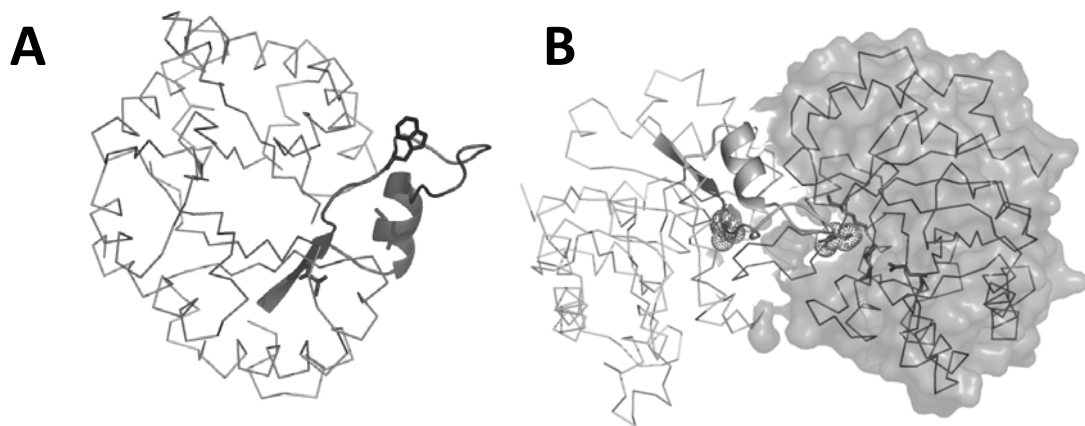


FIGURA 17. Estructura de la *Eh*TIM (PDB:1M6J). Panel A: Monómero de *Eh*TIM. En listones se muestra la unidad (β_3/α_3); se resaltan las cadenas laterales de los residuos V69, W75 y V91. Panel B: Dímero de la *Eh*TIM. Se muestran los radios de Van der Waals de los residuos E72 y T82 de la unidad (β_3/α_3) del monómero A; el monómero B muestra la superficie y las cadenas laterales de los residuos catalíticos K13, H102 y E174.

El plegamiento modular y la *Eh*TIM

Las características estructurales y de estabilidad de los intermediarios monoméricos de la TIM podrían estar relacionadas con la naturaleza modular del plegamiento de los barriles (β/α)₈. El mecanismo de plegamiento más aceptado para estas estructuras se basa en la formación de un módulo de plegamiento inicial, constituido por algunas de las unidades β/α , que sirve como núcleo para el plegamiento de los módulos no estructurados²³. En la TIM, esta modularidad se ha observado mediante metodologías muy diversas como MPAX³⁰, permutaciones de unidades β/α ⁷⁰, y complementación de fragmentos²⁸.

Los datos obtenidos señalan que el intermediario monomérico de la *Eh*TIM tiene alrededor del 60% de la estructura consolidada y que ~106 residuos se rearreglan durante la asociación. Dentro de estos residuos se encuentran los pertenecientes a la unidad β_3/α_3 . La pérdida de actividad catalítica y la semejanza estructural del intermediario monomérico con la *mEh*TIM sugieren que las asas de interfase 1 (Lys13 y Cys14) y 4 (His102) podrían carecer de estructura en el intermediario monomérico. En términos generales, se puede proponer que en la *Eh*TIM la mitad C-terminal del barril se encuentra plegada en el intermediario monomérico, semejante lo reportado para *Sc*TIM⁷¹ y *Oc*TIM²⁹. El reconocimiento de las interfases podría dirigir el plegamiento de la porción N-terminal del barril.

La estrecha relación entre la asociación y la consolidación del plegamiento en la TIM sugiere que la interfase juega un papel central en la estabilidad y en la función. Algunas mutaciones en la interfase afectan no sólo el ensamble y la estabilidad de la TIM sino también la vía de plegamiento y las propiedades catalíticas de la enzima⁴⁹. El hecho de que la estabilidad, la estructura y la función están fuertemente ligadas a la asociación en la TIM sitúa a la interfase como un posible sitio de nucleación/plegamiento que dirige tanto la formación de la estructura nativa como la construcción y estabilización de la geometría del sitio activo.

Asociación y flexibilidad conformacional en la TIM

Toda la información concerniente al plegamiento de la TIM señala que la asociación no es de cuerpo rígido, sino que esta etapa se representa mejor por un mecanismo “fly-casting”, donde las regiones desestructuradas de la proteína se reconocen y unen, inicialmente de forma débil e inespecífica, y proveen el punto de partida para la formación de las interacciones necesarias para la consolidación de la estructura⁷². Bajo este esquema la flexibilidad es un componente inevitable en el reconocimiento. Es posible que las características estructurales y energéticas de los intermediarios monoméricos de la TIM faciliten la asociación. Estudios cinéticos de plegamiento variando la viscosidad del solvente han demostrado que la asociación de la TIM es un proceso con una alta eficiencia, limitado únicamente por la difusión de los monómeros⁷³. La estabilidad marginal de estos intermediarios los convierte en estados transitorios forzados a buscar la asociación; la naturaleza parcialmente plegada de estos conformeros incrementa tanto la flexibilidad como el radio de captura, aumentando con ello la probabilidad de encuentros productivos y la velocidad de asociación.

Por otra parte, existe un alto grado de heterogeneidad en las vías de plegamiento reportadas para la TIM de diferentes especies (Tabla 1). Es difícil saber si esta diversidad se debe a las distintas condiciones o técnicas empleadas o a propiedades intrínsecas a la secuencia de cada TIM. Se ha visto que pueden existir múltiples vías de plegamiento para una misma proteína. El uso de herramientas computacionales y técnicas más sensibles a cambios estructurales (e.g. NMR y HXMS) han mostrado que el plegamiento puede ocurrir por diferentes rutas⁷⁴. La teoría del paisaje energético, embudo o “funnel” (pre)supone que el plegamiento ocurre a través de una multitud de rutas que atraviesan un espacio energético multidimensional en busca de la conformación de mínima energía (estado nativo).

En el caso de la *EhTIM*, el hecho de que diferentes modelos para el cálculo de la entalpía de disociación describan adecuadamente el proceso (Tabla 3), indica que los datos experimentales son compatibles con más de un mecanismo, los cuales podrían coexistir. La heterogeneidad conformacional y la existencia de múltiples vías genera un

plegamiento robusto y aumenta las probabilidades de que la proteína alcance el estado nativo bajo distintas condiciones. La estructura tridimensional de la TIM presenta un alto grado de conservación, sin embargo, pequeñas diferencias en la secuencia privilegian ciertas rutas conformacionales sobre otras⁴⁹, generando la multitud de patrones de plegamiento descritos para diferentes especies (Tabla 1). Quedan por determinar con una mayor resolución las características del paisaje conformacional de la triosafosfato isomerasa.

REFERENCIAS

1. Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2000). Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 105-53.
2. Neet, K. E. & Timm, D. E. (1994). Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci* **3**, 2167-74.
3. Jaenicke, R. & Lilie, H. (2000). Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv Protein Chem* **53**, 329-401.
4. Jaenicke, R. (1991). Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* **30**, 3147-61.
5. Levy, Y., Wolynes, P. G. & Onuchic, J. N. (2004). Protein topology determines binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 511-16.
6. Peimbert M, Dominguez-Ramirez L, Tellez L.A., Blancas L.M., Fernandez-Velasco, D.A. (2008). Triosephosphate isomerase. In *Advances in Protein Physical Chemistry* (Garcia-Hernandez E, F.-V. D., ed.), pp. 193-217. Transworld Research Network, Kerala, India.
7. Kohlhoff, M., Dahm, A. & Hensel, R. (1996). Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett* **383**, 245-50.
8. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* **37**, 441-53.
9. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. & Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **306**, 745-57.
10. Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjaden, B. & Hensel, R. (2004). Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J Mol Biol* **342**, 861-75.
11. Reyes-Vivas, H., Diaz, A., Peon, J., Mendoza-Hernandez, G., Hernandez-Alcantara, G., De la Mora-De la Mora, I., Enriquez-Flores, S., Dominguez-Ramirez, L. & Lopez-Velazquez, G. (2007). Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol* **365**, 752-63.
12. Wierenga, R. K., Noble, M. E. & Davenport, R. C. (1992). Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **224**, 1115-26.
13. Harris, T. K., Cole, R. N., Comer, F. I. & Mildvan, A. S. (1998). Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **37**, 16828-38.
14. Zomosa-Signoret, V., Aguirre-Lopez, B., Hernandez-Alcantara, G., Perez-Montfort, R., de Gomez-Puyou, M. T. & Gomez-Puyou, A. (2007). Crosstalk between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *Proteins* **67**, 75-83.
15. Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**, 121-4.
16. Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. & Fernandez-Velasco, D. A. (2002). Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* **322**, 669-75.
17. Wierenga, R. K., Noble, M. E., Postma, J. P., Groendijk, H., Kalk, K. H., Hol, W. G. & Opperdoes, F. R. (1991). The crystal structure of the "open" and the "closed" conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins* **10**, 33-49.
18. Rozovsky, S. & McDermott, A. E. (2001). The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **310**, 259-70.

19. Farber, G. K. & Petsko, G. A. (1990). The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci* **15**, 228-34.
20. Copley, R. R. & Bork, P. (2000). Homology among (beta/alpha)₈ barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. *J Mol Biol* **303**, 627-41.
21. Brändén, C. I. (1991). The most frequently occurring folding motif in proteins - The TIM barrel. *Current Opinion in Structural Biology* **1**, 978-983.
22. Vega, M. C., Lorentzen, E., Linden, A. & Wilmanns, M. (2003). Evolutionary markers in the (beta/alpha)₈-barrel fold. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 694-701.
23. Zitzewitz, J. A. & Matthews, C. R. (1999). Molecular dissection of the folding mechanism of the alpha subunit of tryptophan synthase: an amino-terminal autonomous folding unit controls several rate-limiting steps in the folding of a single domain protein. *Biochemistry* **38**, 10205-14.
24. Sun, A. Q., Yuksel, K. U. & Gracy, R. W. (1993). Limited proteolysis of triosephosphate isomerase and characterization of the catalytically active peptide complex. *J Biol Chem* **268**, 26872-8.
25. Vogel, K. & Chmielewski, J. (1994). Rapid and efficient resynthesis of proteolyzed triosephosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11163-11164.
26. Ray, S. S., Balaram, H. & Balaram, P. (1999). Unusual stability of a multiply nicked form of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase. *Chem Biol* **6**, 625-37.
27. Reyes-Vivas, H., Martinez-Martinez, E., Mendoza-Hernandez, G., Lopez-Velazquez, G., Perez-Montfort, R., Tuena de Gomez-Puyou, M. & Gomez-Puyou, A. (2002). Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins* **48**, 580-90.
28. Bertolaet, B. L. & Knowles, J. R. (1995). Complementation of fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry* **34**, 5736-43.
29. Pan, H., Raza, A. S. & Smith, D. L. (2004). Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* **336**, 1251-63.
30. Silverman, J. A. & Harbury, P. B. (2002). The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha)₈ barrel. *J Mol Biol* **324**, 1031-40.
31. Hocker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., Lustig, A. & Sterner, R. (2001). Dissection of a (beta/alpha)₈ barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struct Biol* **8**, 32-36.
32. Clarke, J., Cota, E., Fowler, S. B. & Hamill, S. J. (1999). Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure* **7**, 1145-53.
33. Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. & Goraj, K. (1996). Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110-7.
34. Benitez-Cardoza, C. G., Rojo-Dominguez, A. & Hernandez-Arana, A. (2001). Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**, 9049-58.
35. Rietveld, A. W. & Ferreira, S. T. (1998). Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* **37**, 933-37.
36. Shi, Y., Liu, J. H., Zhang, H. J. & Ding, Y. (2008). Equilibrium unfolding mechanism of chicken muscle triose phosphate isomerase. *Protein Pept Lett* **15**, 365-70.
37. Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V. & Wierenga, R. K. (2000). The ionization of a buried glutamic acid is

- thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem* **267**, 2516-24.
38. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beaugerard, M., Frere, J. M., Mandé, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. & Goraj, K. (1996). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol Biol* **257**, 441-56.
 39. Najera, H., Costas, M. & Fernandez-Velasco, D.A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**, 785-92.
 40. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y. & Dobson, C. M. (2000). A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* **300**, 11-6.
 41. Vazquez-Perez, A. R. & Fernandez-Velasco, D. A. (2007). Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: the monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry* **46**, 8624-33.
 42. Beaucamp, N., Schurig, H. & Jaenicke, R. (1997). The PGK-TIM fusion protein from *Thermotoga maritima* and its constituent parts are intrinsically stable and fold independently. *Biol. Chem.* **378**, 679-85.
 43. Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H. & Balaram, P. (1999). Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* **38**, 423-31.
 44. Chanez-Cardenas, M. E., Fernandez-Velasco, D. A., Vazquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincon, G. & Perez-Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 117-29.
 45. Chanez-Cardenas, M. E., Perez-Hernandez, G., Sanchez-Rebollar, B. G., Costas, M. & Vazquez-Contreras, E. (2005). Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* **44**, 10883-92.
 46. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. & Maes, D. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J Biol Chem* **273**, 2199-206.
 47. Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B. & Jaenicke, R. (1997). Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Sci* **6**, 2159-65.
 48. Gonzalez-Mondragon, E., Zubillaga, R. A., Saavedra, E., Chanez-Cardenas, M. E., Perez-Montfort, R. & Hernandez-Arana, A. (2004). Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry* **43**, 3255-63.
 49. Peimbert, M., Dominguez-Ramirez, L. & Fernandez-Velasco, D. A. (2008). Hydrophobic repacking of the dimer interface of triosephosphate isomerase by in silico design and directed evolution. *Biochemistry* **47**, 5556-64.
 50. Cabrera, N., Hernandez-Alcantara, G., Mendoza-Hernandez, G., Gomez-Puyou, A. & Perez-Montfort, R. (2008). Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* **47**, 3499-506.
 51. Sun, J. & Sampson, N. S. (1999). Understanding protein lids: kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **38**, 11474-81.

52. Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R. & Wierenga, R. (1996). Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci* **5**, 229-39.
53. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**, 9655-62.
54. Landa, A., Rojo-Dominguez, A., Jimenez, L. & Fernandez-Velasco, D. A. (1997). Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* **247**, 348-55.
55. Cisneros, D. (2003). Termodinámica de la Disociación de la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica*, UNAM.
56. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23.
57. Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A. & Gracy, R. W. (1971). Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 312-20.
58. Schagger, H., Aquila, H. & Von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* **173**, 201-5.
59. Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-79.
60. Uversky, V. N. (1993). Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* **32**, 13288-98.
61. Thorolfsson, M., Ibarra-Molero, B., Fojan, P., Petersen, S. B., Sanchez-Ruiz, J. M. & Martinez, A. (2002). L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* **41**, 7573-85.
62. Sanchez-Ruiz, J. M. (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry *Biophys. J.* **61**, 921-35.
63. Takahashi, K. & Sturtevant, J. M. (1981). Thermal denaturation of streptomycetes subtilisin inhibitor, subtilisin BPN', and the inhibitor-subtilisin complex. *Biochemistry* **20**, 6185-90.
64. Lee, B. & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol* **55**, 379-400.
65. Robertson, A. D. & Murphy, K. P. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem Rev* **97**, 1251-1268.
66. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. & Wierenga, R. K. (1999). Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng* **12**, 243-50.
67. Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Dominguez, A. & Perez-Montfort, R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol* **2**, 847-55.
68. Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gomez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Perez-Montfort, R. & Gomez-Puyou, A. (1998). Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity--triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem* **253**, 684-91.

69. Patel, B. & Finke, J. M. (2007). Folding and unfolding of gammaTIM monomers and dimers. *Biophys. J.* **93**, 2457-71.
70. Shukla, A. & Guptasarma, P. (2004). Folding of beta/alpha-unit scrambled forms of *S. cerevisiae* triosephosphate isomerase: Evidence for autonomy of substructure formation and plasticity of hydrophobic and hydrogen bonding interactions in core of (beta/alpha)₈-barrel. *Proteins* **55**, 548-57.
71. Reyes-Lopez, C. A., Gonzalez-Mondragon, E., Benitez-Cardoza, C. G., Chanez-Cardenas, M. E., Cabrera, N., Perez-Montfort, R. & Hernandez-Arana, A. (2008). The conserved salt bridge linking two C-terminal beta/alpha units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins* **72**, 972-9.
72. Levy, Y., Cho, S. S., Onuchic, J. N. & Wolynes, P. G. (2005). A survey of flexible protein binding mechanisms and their transition states using native topology based energy landscapes. *J Mol Biol* **346**, 1121-45.
73. Najera, H., Dagdug, L. & Fernandez-Velasco, D. A. (2007). Thermodynamic and kinetic characterization of the association of triosephosphate isomerase: the role of diffusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 985-94.
74. Udgaonkar, J. B. (2008). Multiple routes and structural heterogeneity in protein folding. *Annu Rev Biophys* **37**, 489-510.

Thermal Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*: Dimer Dissociation Leads to Extensive Unfolding[†]

Luis A. Tellez,[‡] Luis M. Blancas-Mejía,[‡] Ernesto Carrillo-Nava,^{§,||} Guillermo Mendoza-Hernández,[‡] David A. Cisneros,^{‡,⊥} and D. Alejandro Fernández-Velasco^{*,‡}

Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-159, 04510 México, DF

Received July 19, 2008; Revised Manuscript Received September 4, 2008

ABSTRACT: In mesophiles, triosephosphate isomerase (TIM) is an obligated homodimer. We have previously shown that monomeric folding intermediates are common in the chemical unfolding of TIM, where dissociation provides 75% of the overall conformational stability of the dimer. However, analysis of the crystallographic structure shows that, during unfolding, intermonomeric contacts contribute to only 5% of the overall increase in accessible surface area. In this work several methodologies were used to characterize the thermal dissociation and unfolding of the TIM from *Entamoeba histolytica* (EhTIM) and a monomeric variant obtained by chemical derivatization (mEhTIM). During EhTIM unfolding, sequential transitions corresponding to dimer dissociation into a compact monomeric intermediate followed by unfolding and further aggregation of the intermediate occurred. In the case of mEhTIM, a single transition, analogous to the second transition of EhTIM, was observed. Calorimetric, spectroscopic, hydrodynamic, and functional evidence shows that dimer dissociation is not restricted to localized interface reorganization. Dissociation represents 55% ($\Delta H_{\text{Diss}} = 146.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) of the total enthalpy change ($\Delta H_{\text{Tot}} = 266 \text{ kcal mol}^{-1}$), indicating that this process is linked to substantial unfolding. We propose that, rather than a rigid body process, subunit assembly is best represented by a fly-casting mechanism. In TIM, catalysis is restricted to the dimer; therefore, the interface can be viewed as the final nucleation motif that directs assembly, folding, and function.

Triosephosphate isomerase (E.C. 5.3.1.1) (TIM) is a key glycolytic enzyme. In mesophiles, TIM is an obligated dimer made of identical subunits folded into $(\beta/\alpha)_8$ barrels (1). The three-dimensional structures and catalytic properties of TIM from different species are quite similar (2, 3). In contrast, the folding pathway of TIM from different organisms is rather diverse. Unfolding transitions have been described by models which increase in complexity from equilibrium (4–6) to kinetically controlled unfolding (7) and from two-state to multistate reactions that involve monomeric and/or dimeric intermediates (5, 8–17). The most common intermediates

are monomers, which have been observed when the protein is chemically unfolded. Analysis of the crystallographic structure of TIM shows that, in the transition from the native dimer to the unfolded monomers, intermonomeric contacts account for ~5% of the overall increase in accessible surface area. Nevertheless, the characterization of TIM unfolding from several organisms shows that the dissociation step accounts for ~75% of the overall conformational stability of the dimer (9, 10). The reasons for this behavior are not fully understood because the conformational and thermodynamic consequences of dissociation have not been described in detail. Monomeric intermediates from several sources observed in TIM unfolding induced by Gdn-HCl have been studied. For example, pulse-field gradient NMR measurements suggested a compact intermediate ($R_s = 24 \text{ \AA}$) for TIM from *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM)¹ (12). On the other hand, the Stokes radii obtained by size exclusion chromatography for the intermediate and the native dimer are indistinguishable ($R_s = 30 \text{ \AA}$) (10). Similar expanded

[†] This work was partially supported by CONACYT grants (43592, 41328, and 61044-M), PAPIIT (IN218707-2), and Junta de Andalucía and UAM Acuerdos 11 and 13/07 del Rector General. Part of this work was performed by D.A.F.-V. during a sabbatical stay at the Departamento de Ciencias Naturales and the Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, México, and the Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: fdaniel@servidor.unam.mx. Telephone: (5255) 56232259. Fax: (5255) 56162419.

[‡] Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

[§] Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química.

^{||} Current address: Institut für Physikalische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Corrensstrasse 30, 48149 Münster, Germany.

[⊥] Current address: Molecular Genetics Unit and CNRS URA2172, Institut Pasteur, 25, rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France.

¹ Abbreviations: ANS, 1-anilino-8-naphthalenesulfonate; CD, circular dichroism; DSC, differential scanning calorimetry; DTT, dithiothreitol; EhTIM, triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*; FI, fluorescence intensity; Gdn-HCl, guanidine hydrochloride; LmTIM, TIM from *Leishmania mexicana*; mEhTIM, monomeric EhTIM obtained by chemical derivatization; MMTS, methyl methanethiosulfonate; PGA, phosphoglycolic acid; R_s , Stokes radius; ScTIM, TIM from *Saccharomyces cerevisiae*; SCM, spectral center of mass.

monomeric intermediates have been reported for TIMs from *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Entamoeba histolytica* (EhTIM) (8, 9, 18). All of these conformers are inactive and present decreased secondary structure content. Likewise, pressure studies indicate that the monomeric intermediates of EhTIM and ScTIM are more hydrated than monomeric proteins of a similar size (18). Regarding the thermal unfolding of TIM, the presence of hysteresis and some degree of irreversible aggregation are common features. A detailed kinetic characterization of the two-state ScTIM unfolding illustrates that unfolding and refolding rates show large activation enthalpies that may explain the observed hysteresis (7). Temperature has been widely used to determine the apparent stability of several wild-type TIMs and their mutants (6, 7, 19–31). Interestingly, monophasic transitions were obtained in all of these cases. Temperature-induced unfolding intermediates have been observed only for unstable interface mutants (25). In this study, we characterized the thermal unfolding of EhTIM and that of a monomeric EhTIM obtained by chemical derivatization of an interface cysteine (mEhTIM) (32). We found that the thermal unfolding of EhTIM involves a multistate process with a compact monomeric intermediate. The information obtained from the unfolding of both proteins was used to assign the enthalpic and conformational contributions of dissociation and monomer unfolding.

MATERIALS AND METHODS

α -Glycerol-phosphate dehydrogenase (GDPH) was purchased from Boehringer-Mannheim. All other reagents were purchased from Sigma. All reactants were of analytical grade. The water used was distilled and deionized.

Production, expression, and purification of recombinant wild-type EhTIM were performed as previously described (20). Unless otherwise stated, all experiments were carried out in a buffer solution of 20 mM potassium tetraborate and 1 mM dithiothreitol (DTT), pH 8.5 (buffer B).

The derivatization of EhTIM with methyl methanethio-sulfonate (MMTS) to obtain a compact monomer (mEhTIM) was done as previously described (32). Briefly, EhTIM was incubated in 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, pH 7.4, and 1.0 mM MMTS at 25 °C for 2 h. Thereafter, the sample was exhaustively dialyzed against 20 mM borate, pH 8.5. All mEhTIM experiments were done in buffer solutions without DTT. Protein concentration was determined using the absorption coefficient calculated from the amino acid sequence $\epsilon_{280} = 36440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (20, 33).

Activity Assays. Catalytic activity was determined by a coupled enzyme assay. One milliliter of reaction cells was prepared in 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, and 1 mM DTT (pH 8.5) containing 3.0 mM D-glyceraldehyde 3-phosphate, 20 μg of GDPH, and 0.2 mM NADH. Catalytic assays started when 2 ng of EhTIM was added to the reaction cell. Reaction rates were determined following NADH absorbance changes at 340 nm as a function of time in a Beckman DU7500 spectrophotometer at 25 °C (34).

Spectroscopic Properties. Circular dichroism (CD) experiments were carried out in a JASCO J-715 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD) equipped with a Peltier and a water-jacketed cell holder for temperature control. Thermal transitions were followed by continuously monitoring ellip-

ticity changes at 220 nm as a function of temperature (from 25 to 70 °C). Experiments were done in both unfolding and refolding directions. Sample temperature was changed at a constant rate controlled through the Peltier. The heating/cooling rate was 1 °C min^{-1} . EhTIM solutions of 0.1 mg mL^{-1} and 1.0 cm path-length cells were used, and the samples were stirred. CD data corresponding to the first transition were fitted to the Van't Hoff equation.

Fluorescence measurements were made on a PC1 ISS spectrofluorometer (Champaign, IL) equipped with a Peltier and a water-jacketed cell holder for temperature control. TIM concentration was 0.1 mg mL^{-1} , and 1.0 cm cells, which were stirred, were used in all experiments. Thermal transitions were followed by constantly monitoring fluorescence intensity (FI) as a function of temperature. Intrinsic fluorescence measurements were carried out with excitation at 295 nm (2 nm bandwidth) and emission at 333 nm (4 nm bandwidth). Additionally, spectral recordings were made at different temperatures. An automatized protocol was used to obtain fluorescence spectra: samples were excited at 295 nm, and emission spectra (310–410 nm) were taken at every degree change while temperature was ramped from 25 to 90 °C with a 1 °C min^{-1} rate. The fluorescence spectral center of mass (SCM) was calculated from intensity data (I_λ) obtained at different wavelengths: $\text{SCM} = \sum \lambda I_\lambda / \sum I_\lambda$. 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) fluorescence was measured with an excitation wavelength of 360 nm (4 nm bandwidth), and emission was collected in the 400–600 nm range (8 nm bandwidth). Samples (0.1 mg mL^{-1}) were incubated at 20 °C in buffer B with 100 μM ANS for 15 min. Thermal transitions in the presence of the dye were followed using the same automatized protocol described for measuring intrinsic fluorescence spectra.

Calorimetric Experiments. Differential scanning calorimetry (DSC) experiments were done in a VP-DSC calorimeter or in a VP-Capillary DSC system (MicroCal, Northampton, MA). Measurements were carried out employing heating rates from 0.5 to 2.5 °C min^{-1} . Protein solutions for the calorimetric experiments were prepared by exhaustive dialysis against buffer B, and samples were degassed at room temperature before the calorimetric experiments. In all measurements, buffer from the last dialysis step was used in the reference cell of the calorimeter. In order to ascertain proper equilibration of the instrument, several buffer–buffer baselines were obtained before each run with a protein solution. The last buffer–buffer trace recorded was subtracted from sample endotherms. In some experiments a reheating run was carried out to determine the reversibility of the process. Experiments done with mEhTIM were carried out without DTT. The Origin software package (MicroCal) was used for data analysis, including baseline subtraction and calculation of unfolding enthalpies.

DSC Data Fitting. At high temperature endotherms were distorted by aggregation. Therefore, data fitting was restricted to a limited temperature range, a few degrees above the temperature of the maximum heat capacity of the first transition (35). Consequently, experimental data used do not contain information about denaturation heat capacity changes. Endotherms from EhTIM obtained in the 0.2–6.42 mg mL^{-1} range at a scanning rate of 1 °C min^{-1} were fitted to three different dissociation models.

(i) Equilibrium two-state model for dimer dissociation:

$$C_p^{\text{ex}} = B_0 + B_1 T + \frac{\Delta H}{RT_m^2} \left(\frac{1-f}{-1+\frac{2}{f}} \right) \quad (1)$$

where B_0 and B_1 are the y-intercept and the slope of the pretransition, respectively, ΔH is the dissociation enthalpy change, and f is the temperature-dependent fraction of EhTIM molecules in the dimeric state (Microcal Origin 5.0).

(ii) Lumry–Eyring model for dimer dissociation:

$$C_p^{\text{ex}} = \frac{\Delta H E_{\text{app}}}{RT_m^2} \exp\left(\frac{E_{\text{app}} \Delta T}{RT_m^2}\right) \left[1 - \frac{1}{2} \exp\left(\frac{E_{\text{app}} \Delta T}{RT_m^2}\right) \right] \quad (2)$$

where E_{app} is the apparent activation energy, $\Delta T = T_0 - T_m$, and T_0 is the reference temperature (36).

(iii) Takahashi–Sturtevant plot (37):

$$\ln C_t = b - \frac{\Delta H}{RT_m} \quad (3)$$

where C_t is the total protein concentration, b is a constant, and T_m is the temperature of the maximum C_p^{ex} . In C_t vs $1/T_m$ data were fitted to a straight line. ΔH for mEhTIM was obtained from the area endotherms.

Size Exclusion Chromatography. Chromatography experiments were performed at 25 or 42.5 °C on a Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia), which was properly thermostated with the use of a circulating water bath that was homemade connected to the column. The column was coupled to an FPLC system (Amersham Pharmacia), equipped with a UV detector ($\lambda = 280$ nm) and a Waters 474 fluorescence scanning detector ($\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 333$ nm). The column was previously equilibrated with the corresponding buffer before injections. Stokes radii (R_s) were calculated by interpolation from a calibration curve made using eight well-characterized proteins as standards (38). Protein concentration (0.1 mg mL⁻¹) was the same as was used in spectroscopic measurements.

Proteolytic Cleavage and NH₂-Terminal Analysis of Electroblotted Fragments. Protein samples were incubated at 1 mg mL⁻¹ and 42.5 °C with subtilisin Carlsberg at a 1:2000 (subtilisin:TIM) molar ratio. EhTIM samples with phosphoglycolic acid (PGA), 10 mM, were also incubated at different subtilisin:TIM molar ratios ranging from 1:50 to 1:2000. In all cases proteolysis was arrested by the addition of phenylmethanesulfonyl fluoride (3 mM final concentration). The digested proteins were analyzed via SDS–PAGE at an acrylamide concentration of 16% following the Schägger and von Jagow method (39). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R. Finally, fragments of EhTIM and mEhTIM obtained after 30 min of subtilisin digestion were electroblotted from the gels onto polyvinylidene fluoride membranes (Problott). Semidry transfer was then performed for 2 h at room temperature using as a negative buffer 39.4 mg mL⁻¹ aminocaproic acid (pH 8.5) with 0.05% SDS and as a positive buffer 8.2 mg mL⁻¹ Tris, 9 mg mL⁻¹ Tricine, and 20% methanol. The transferred fragments were stained with Coomassie Brilliant Blue G in 50% methanol. The N-terminal sequence was determined by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000 Beckman Instruments) equipped with an online Beckman Gold high-performance liquid chromatography (HPLC)

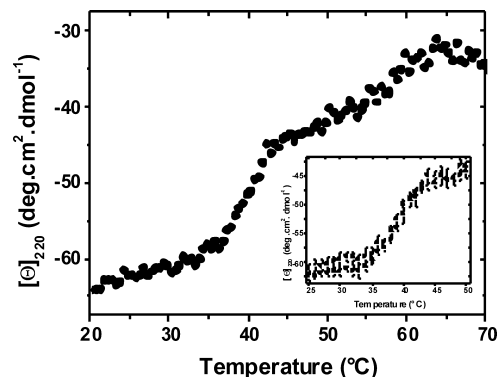


FIGURE 1: Thermal unfolding of EhTIM followed by CD at 220 nm. EhTIM samples (100 μg mL⁻¹) were heated at 1 °C min⁻¹. The inset shows unfolding/refolding data (closed and open symbols, respectively) for the first transition. Refolding data were obtained after heating to 50 °C, with a cooling rate of 1 °C min⁻¹.

system. The HPLC column was a Beckman Spherogel Micro PTH, and the phenylthiohydantoin amino acids were detected using a diode array detector set at 268 and 293 nm for signal and reference, respectively. Each band was submitted to at least 10 Edman degradation cycles. When more than one amino acid was observed, the yield of each identified amino acid was considered for the determination of the sequence of each fragment.

Calculations of Accessible Surface Area. Changes in accessible surface area upon dissociation ($\Delta \text{ASA}_{\text{Diss}}$) were calculated for a rigid body dissociation, i.e., as the difference in accessible area between the dimer and the individual monomers; crystallographic coordinates for both were obtained from the PDB file of the native dimer (1M6J). ΔASA for monomer unfolding was estimated by calculating the difference between the isolated monomer and the unfolded state, the latter of which was simulated using the Creamer–Rose method (<http://roselab.jhu.edu/utills/unfolded.html>) (40, 41). Area calculations were performed with the NACCESS program (Simon Hubbard, University College, United Kingdom), an implementation of the Lee and Richards algorithm (42), using a probe radius of 1.4 Å and a slab width of 0.05 Å.

The relation between enthalpy changes and apolar and polar ΔASA ($\Delta \text{ASA}_{\text{ap}}$ and $\Delta \text{ASA}_{\text{pol}}$, respectively) and/or number of residues (N_{res}) was estimated as follows (43):

$$\Delta H(60 \text{ } ^\circ\text{C}) = -8.44 \text{ cal } \Delta \text{ASA}_{\text{ap}} (\text{mol } \text{Å}^2)^{-1} + 31.3 \text{ cal } \Delta \text{ASA}_{\text{pol}} (\text{mol } \text{Å}^2)^{-1} \quad (4)$$

$$\Delta H(60 \text{ } ^\circ\text{C}) = N_{\text{res}} 0.69 \pm 0.02 \text{ kcal } (\text{mol res})^{-1} \quad (5)$$

RESULTS

Spectroscopic Characterization of EhTIM Unfolding. Changes in the structural properties of EhTIM induced by temperature were studied using circular dichroism (CD) and intrinsic fluorescence (IF). Thermal unfolding followed by CD showed two transitions indicating the presence of an intermediate (Figure 1). The midpoint of the first transition (T_{m1}) was 41.5 °C, whereas T_{m2} was close to 57 °C. When samples were heated to the end of the second transition (60 °C), protein aggregation was clearly evident. This led to complete irreversibility, as indicated by the lack of recovery of the CD signal when temperature was decreased (data not

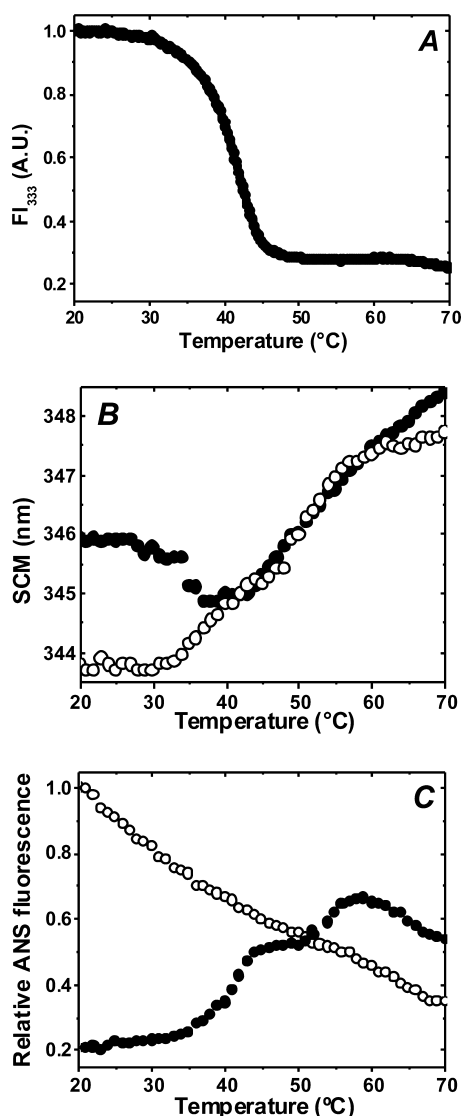


FIGURE 2: Thermal unfolding of EhTIM and mEhTIM followed by fluorescence. Samples ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were heated at 1°C min^{-1} . (A) EhTIM intrinsic fluorescence intensity ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 333 \text{ nm}$). (B) SCM of the intrinsic fluorescence spectra of EhTIM (closed symbols) and mEhTIM (open symbols). (C) Normalized ANS fluorescence intensity ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$) (symbols as in panel B).

shown). In contrast, when heating was carried out up to 50°C , i.e., until the end of the first transition, the CD signal was almost completely recovered after cooling the sample; moreover, the heating/cooling cycle showed almost no hysteresis (Figure 1 inset). Regarding functional properties, about 89% of the original catalytic activity was recovered after a first melt. These results indicate that the first transition is reversible and near equilibrium. Although important changes in secondary structure occurred during the first transition, the intermediate observed at 50°C retained a significant amount of secondary structure (almost 60% of the native signal at 220 nm).

The temperature-induced unfolding of EhTIM was then followed by fluorescence. The obtained spectra showed changes in both fluorescence intensity (FI) and in spectral center of mass (SCM). In the temperature range that corresponds to the first transition detected by CD, FI showed a marked monophasic decrease (Figure 2A). On the other hand, SCM data showed two transitions (Figure 2B, closed

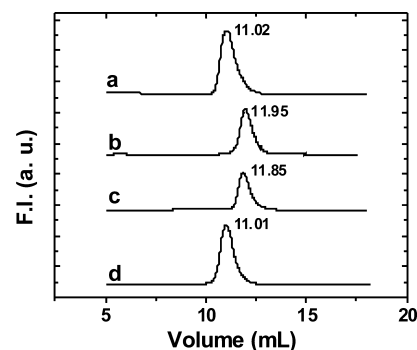


FIGURE 3: Elution profiles of EhTIM and mEhTIM. Proteins ($100 \mu\text{L}$ of $100 \mu\text{g}$ of TIM mL^{-1}) were injected into a Superdex 75 column, eluted at 1 mL min^{-1} , and detected by fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 333 \text{ nm}$). Samples and conditions were (a) EhTIM at 25°C , (b) mEhTIM at 25°C , (c) EhTIM at 42.5°C , and (d) EhTIM + 10 mM PGA at 42.5°C . The numbers over the curves indicate the elution volume of the peak.

symbols). The first one involves a blue shift in SCM ($\sim 1 \text{ nm}$), whereas in the second one a red shift occurred, indicating the full exposure of tryptophan residues to the solvent. Thus, the intermediate shows a blue shift in SCM and a decrease in fluorescence intensity when compared with native EhTIM (Figure 2). These fluorescence properties are similar to those reported for a monomeric form of EhTIM (mEhTIM) obtained by chemical derivatization of an interface cysteine by MMTS (32). The blue shift in the SCM of mEhTIM has been related to the rearrangement of an interface tryptophan residue (Trp 75) (32). The thermal unfolding of mEhTIM and EhTIM (Figure 2B, open and closed symbols, respectively) showed very similar SCM values at temperatures higher than T_{m1} . Therefore, it is likely that the structural rearrangements observed in mEhTIM are similar to those experienced by the EhTIM unfolding intermediate.

To determine the exposure of hydrophobic regions accompanying TIM unfolding, ANS fluorescence was followed as a function of temperature. At 20°C , ANS binding by mEhTIM is five times higher than that of EhTIM (Figure 2C). This indicates that the derivatized monomer exposes a hydrophobic patch that is not present in the native EhTIM (32). However, ANS binding by mEhTIM decreases steadily with temperature, suggesting that monomer unfolding does not involve the exposure of new hydrophobic pockets (Figure 2C, open symbols). ANS binding by EhTIM increased with temperature in a biphasic way with a clear plateau region from 43 to 50°C . This indicates that the intermediate exposes hydrophobic surface in a way that allows dye binding. At temperatures higher than 55°C a decrease in ANS binding was observed. It is noted that ANS fluorescence at 70°C is higher than at 20°C (Figure 2C, closed symbols). This probably results from aggregation and/or incomplete unfolding of the enzyme.

Association State of the EhTIM Intermediate. The oligomeric state of the EhTIM intermediate was determined by size exclusion chromatography (Figure 3). In accordance to previous reports, at 25°C the elution profiles of EhTIM and mEhTIM showed single peaks corresponding to Stokes radii (R_s) of 31.2 and 26.3 \AA , respectively. The latter is close to the value expected for a compact monomer of the TIM size. The hydrodynamic properties of EhTIM were then determined at an elution-run temperature of 42.5°C . This

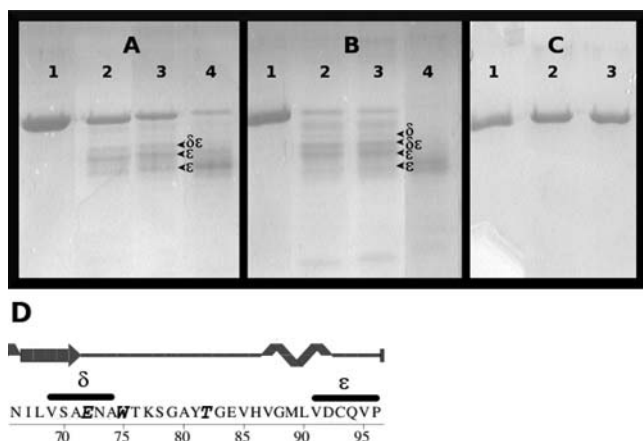


FIGURE 4: Proteolytic cleavage of EhTIM and mEhTIM at 42.5 °C. Time course of EhTIM (panel A) and mEhTIM (panel B) proteolysis by subtilisin (1:2000). Lanes: 1, control; 2, 10 min; 3, 30 min; 4, 45 min. Panel C: Proteolysis of EhTIM samples in the presence of 10 mM PGA. Proteolysis time: 1 h. Lanes: 1, control; 2, EhTIM:subtilisin ratio 1:50; 3, EhTIM:subtilisin ratio 1:200. Panel D shows the amino acid sequence and secondary structure of the β_3/α_3 unit. Solid lines show the amino end sequence of the δ and ϵ fragments shown in panels A and B.

temperature was chosen because it is close to the end of the first transition and in the upper stability limit of the Superdex resin. A single peak with an R_s of 26.7 Å was observed. The R_s of the intermediate is very similar to the one determined for mEhTIM (Figure 3, compare b and c), indicating that the intermediate observed in the thermal unfolding of EhTIM is a compact monomer. The hydrodynamic properties of EhTIM were then assayed in the presence of phosphoglycolic acid (PGA), a transition state analogue of the substrate (44). For this purpose the column was equilibrated and ran at 42.5 °C in buffer containing 10 mM PGA. As expected, ligand binding stabilized the native state, and the elution profile of EhTIM showed the same R_s obtained for the native dimer at 25 °C (Figure 3, compare d and a).

Proteolytic Cleavage. The temperature-induced conformational changes of EhTIM and mEhTIM were also examined by subtilisin proteolytic cleavage. Temporal courses of samples incubated at 42.5 °C with a 1:2000 subtilisin:TIM ratio showed that cleavage was significantly faster for mEhTIM than for EhTIM (Figure 4, compare panels A and B). And yet, a similar fragment distribution was observed in both cases. Moreover, Edman analysis of the proteolytic fragments showed the same two cleavage sites (Val 69 and Val 91) in both proteins (Figure 4D). But when EhTIM was preincubated in the presence of 10 mM PGA, no proteolytic fragments were detected even after a 1 h incubation at a 1:50 subtilisin:TIM ratio (Figure 4C). Figure 3 shows that PGA shifts the elution profile of EhTIM toward the dimeric state, and the absence of proteolysis in the presence of PGA (Figure 4C) showed that the dimer is much less susceptible to subtilisin cleavage than the monomer. This suggests that the observed fragmentation of EhTIM occurs almost exclusively in the monomeric state. Likewise, at 30 °C EhTIM was not digested by subtilisin (data not shown).

Calorimetric Characterization. The thermal stability of EhTIM was then measured by differential scanning calorimetry (DSC). Two endothermic transitions were observed (Figure 6). An exothermic event (irreversible protein ag-

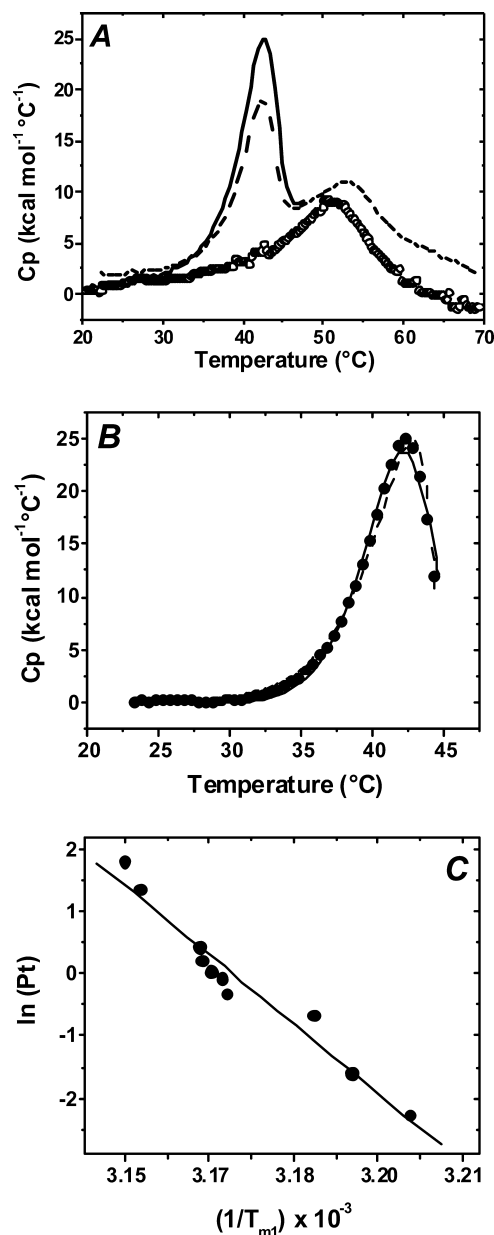


FIGURE 5: Calorimetric analysis of EhTIM and mEhTIM unfolding. (A) DSC profiles of EhTIM and mEhTIM. Samples were heated at a scan rate of 1 °C min⁻¹. EhTIM first scan (solid curve); EhTIM second scan (dashed line); mEhTIM scan (open circles). (B) Representative DSC data fitting for the first transition of EhTIM. Experimental data (closed circles). Area under the curve ($\Delta H_{Diss} = 133$ kcal mol⁻¹). Equilibrium two-state model (eq 1; $\Delta H_{Diss} = 165 \pm 1$ kcal mol⁻¹, solid line) and Lumry-Eyring model (eq 2; $\Delta H_{Diss} = 141 \pm 3$ kcal mol⁻¹; $E_{app} = 70 \pm 1$ kcal mol⁻¹, dashed line). (C) Takahashi-Sturtevant plot (eq 3; $\Delta H_{Diss} = 148 \pm 20$ kcal mol⁻¹, solid line).

gregation) occurred at the end of the second transition. As expected, aggregation was more evident at high protein concentrations; however, higher heating rates decreased aggregation (data not shown). This suggests that irreversibility is linked to the residence time of EhTIM at high temperatures.

Confirming CD melts (Figure 1 inset), considerable reversibility was observed when samples were heated to 50 °C. Under this condition, 70% of the enthalpy change was recovered on a second scan (Figure 5). T_{m1} increased with protein concentration, confirming the bimolecular nature of the first transition. T_{m2} decreased with protein concentration,

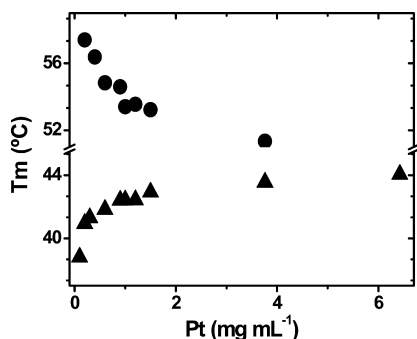


FIGURE 6: Effect of protein concentration on T_m . DSC experiments were done at a scan rate of $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. T_{m1} (closed triangles) and T_{m2} (closed circles).

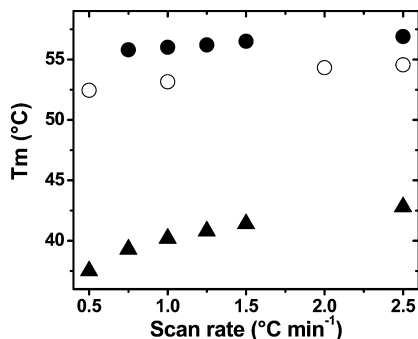


FIGURE 7: Effect of scan rate on T_m . DSC experiments were done at $600\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. EhTIM T_{m1} (closed triangles), EhTIM T_{m2} (closed circles), and mEhTIM T_m (open circles).

as expected for a process involving irreversible aggregation (Figure 6). The DSC profile of mEhTIM showed a single irreversible transition with a T_m similar to T_{m2} of EhTIM (Figure 5). This suggests that the unfolding of mEhTIM and that of the monomeric intermediate of EhTIM are similar.

Taken together spectroscopic, hydrodynamic, and calorimetric data clearly indicate that the temperature-induced unfolding of EhTIM involves two steps: reversible subunit dissociation followed by irreversible monomer unfolding.

The enthalpy change for subunit dissociation (ΔH_{Diss}) was calculated by several methods: (i) Van't Hoff analysis: CD data (Figure 1) were analyzed according to a dissociating system. The obtained ΔH_{Diss} value was $140 \pm 20\text{ kcal mol}^{-1}$. DSC experiments carried out in the $0.2\text{--}6.42\text{ mg mL}^{-1}$ range were analyzed according to the following four approaches, the reported values of which are the average of ten experiments: (ii) Model-free analysis: The area under DSC curves gave an average calorimetric enthalpy of $137 \pm 49\text{ kcal mol}^{-1}$. (iii) Equilibrium two-state model with dissociation: DSC data fitted to this model (see eq 1) gave an average $\Delta H_{\text{Diss}} = 163 \pm 19\text{ kcal mol}^{-1}$. (iv) Lumry–Eyring model: DSC runs carried out at different scan rates showed a slight increase in the T_m values of EhTIM and mEhTIM (Figure 7). Therefore, DSC profiles were also fitted to a kinetic model that includes irreversible aggregation (eq 2). This gives $\Delta H_{\text{Diss}} = 146 \pm 53\text{ kcal mol}^{-1}$ and an activation energy (E_{app}) = $66.2 \pm 7\text{ kcal mol}^{-1}$. (v) Takahashi–Sturtevant plot (37): The enthalpy change calculated from a plot of the $1/T_m$ vs natural logarithm of protein concentration (Figure 5C) gives $\Delta H_{\text{Diss}} = 148 \pm 20\text{ kcal mol}^{-1}$. The fittings for approaches iii and iv are very similar (Figure 5B). The average obtained from all of these approaches (i–iv) gives $\Delta H_{\text{Diss}} = 146.8 \pm 10\text{ kcal mol}^{-1}$.

The estimation of the enthalpy change for monomer unfolding (ΔH_{Unf}) from the second calorimetric transition of EhTIM is complicated because the pre- and posttransition baselines are contaminated by dimer dissociation and monomer aggregation, respectively. Therefore, as a first approximation, we have used the mEhTIM endotherm for the estimation of ΔH_{Unf} . This choice is based on the fact that the secondary structure content, hydrodynamic properties, SCM unfolding profiles, and T_m of mEhTIM are similar to those of the monomeric intermediate of EhTIM, and ΔH_{Unf} calculated from the area under the DSC endotherms of mEhTIM gives $59.6 \pm 4.5\text{ kcal mol}^{-1}$.

DISCUSSION

Monomeric intermediates have been frequently observed in both kinetic and equilibrium studies on TIM unfolding induced by urea or Gdn-HCl (8–10, 12–14, 18, 45). In contrast, thermal unfolding studies show monophasic transitions (6, 7, 19–30). This is the first report on the characterization of a monomeric intermediate in the thermal unfolding of a TIM. An unusual property of the EhTIM interface is the presence of glutamine at position 72, while the equivalent position in almost all TIMs is a glutamate residue. This characteristic is shared between EhTIM and the TIM from *Leishmania mexicana* (LmTIM). It has been shown that the ionization of this residue destabilizes LmTIM and causes a pH-dependent unfolding profile (6, 19). The stability of EhTIM also seems to be pH-dependent: At pH 7.4 a monophasic transition with a T_m near $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ was observed (20), whereas in the present work at pH 8.5 two transitions with lower T_m values were observed.

Spectroscopic, calorimetric, and chromatographic techniques showed that the temperature-induced unfolding of EhTIM is a multistate process with at least two transitions. The first step involves the reversible dissociation of the native state into a monomeric intermediate, while the second one is related to monomer unfolding and linked to irreversible protein aggregation. The monomeric intermediate is inactive and compact (R_s native = $31.2\text{ }\text{\AA}$, R_s intermediate = $26.7\text{ }\text{\AA}$), and it has residual secondary structure ($\sim 60\%$ of the CD signal at 222 nm), decreased fluorescence intensity, and a 1 nm blue shift in the SCM. Both the monomeric intermediate and mEhTIM are compact. In contrast, all of the monomeric intermediates thus far reported are expanded.

The different approaches employed in this work to calculate ΔH_{Diss} gave similar values, indicating that the average ΔH_{Diss} ($146.8 \pm 10\text{ kcal mol}^{-1}$) is a good estimation. Regarding monomer unfolding, the enthalpy change estimated from mEhTIM data is $\Delta H_{\text{Unf}} = 59.6 \pm 4.5\text{ kcal mol}^{-1}$. The total enthalpy change (ΔH_{Tot}) for the dissociation and unfolding of EhTIM ($\Delta H_{\text{Tot}} = \Delta H_{\text{Diss}} + 2\Delta H_{\text{Unf}}$) is 266 kcal mol^{-1} . This value is in the range of that obtained for the thermal unfolding of ScTIM ($250\text{--}318\text{ kcal mol}^{-1}$) (7).

The ΔH_{Diss} value calculated for the rigid body dissociation of TIM monomers (see Materials and Methods), i.e., the exposure of the 74 interface residues (37 per monomer), is between 11 and 51 kcal mol^{-1} (based on the ΔASA or on the number of exposed residues, respectively). Thus, the experimental ΔH_{Diss} is much higher than the theoretical estimate. In contrast, the experimental ΔH_{Unf} is $59.6 \pm 4.5\text{ kcal mol}^{-1}$, much lower than the estimated ΔH_{Unf} for the

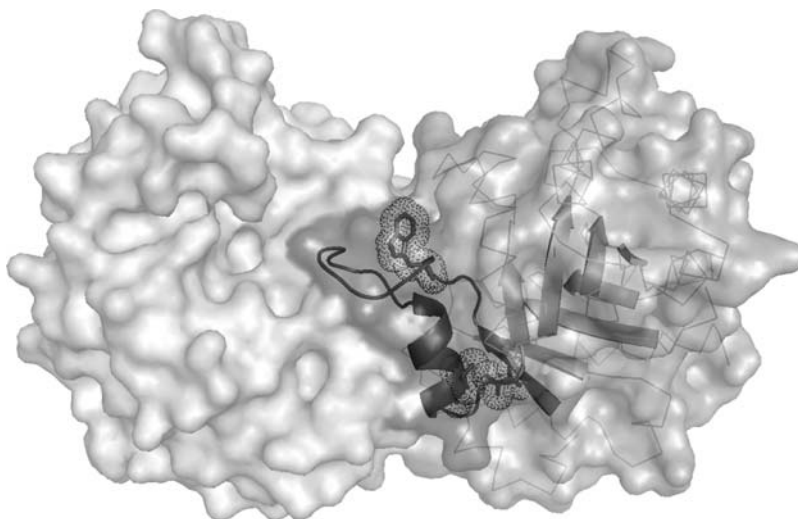


FIGURE 8: The structure of EhTIM. The surface of the two monomers is presented in different shades. For subunit A, the C_{α} trace is shown in lines, the β barrel is depicted in cartoons, the β_3/α_3 unit (Figure 4D) is shown as dark cartoons, and Trp 75, Val 69, and Val 91 are shown as sticks with van der Waals surface in dots. This figure was generated with Pymol (49) using pdb file 1m6j.

unfolding of the 261 aa of each monomer (110 or 180 kcal mol⁻¹, based on the Δ ASA or on the number of residues, respectively).

The total ΔH estimated for the dissociation and unfolding of EhTIM is 220–360 kcal mol⁻¹. The experimental value $\Delta H_{\text{Tot}} = 266$ kcal mol⁻¹ is in this range. It is noteworthy that the experimental ΔH_{Diss} is higher and the experimental ΔH_{Unf} is lower than the values expected for the rigid body dissociation of the dimer followed by the unfolding of native-like monomers. This indicates that dissociation involves not only the hydration of the interface but also the unfolding of other regions. According to enthalpy parametrizations, the experimental ΔH_{Diss} corresponds to the unfolding of ~ 106 residues per monomer, since the interface of EhTIM is composed of ~ 37 residues, suggesting that in each subunit approximately 69 additional residues become solvated upon dissociation. Experimental evidence that extensive unfolding occurs with dissociation comes from the exposure of hydrophobic patches in the monomeric intermediate, as deduced from the increased ANS binding upon dissociation. Similarly, ΔV_{Unf} for the pressure unfolding of the EhTIM monomeric intermediate indicates that this conformer is more hydrated than folded monomers of similar size (18). Fluorescence experiments indicate that, as a consequence of dissociation, structural rearrangements take place in the neighborhood of Trp 75 located in loop 3. This conformational change is expected since loop 3 is the main interface loop. It should be noted that monomerization also involves structural rearrangements in regions that are not part of the interface. For example, Val 69 and Val 91, located in β_3 and α_3 , respectively, are accessible to subtilisin in the monomer but not in the dimer (Figure 8). This suggests that the whole β_3/α_3 unit (Figures 4D and 8) is completely rearranged in the monomeric intermediate. This motif contributes to nearly one-third of the interface residues. Besides its structural role, residues located in loop 3 such as Thr 82 have been implicated in the proper alignment of catalytic residues (29).

The experimental results presented in this work indicate that before association TIM monomers are only partially folded. A similar behavior was observed in simulations using

a minimalist Go model (46). The partially structured nature of the intermediate should increase both flexibility and the capture radius, thereby enhancing the speed of association. This behavior has been termed the “fly-casting mechanism” (47). In this regard, we have previously shown that TIM association is a very efficient process, limited only by monomer diffusion through the solvent (48). The coupling between folding and association suggests that the interface plays a central role on the stability and function of TIM. Studies with mutants obtained by *in silico* design and directed evolution have shown that changes at the interface affect not only the assembly and stability of the protein but also its catalytic properties (25). The significant gain of structure upon association places the interface as a final nucleation motif that directs/controls both the global folding of the protein and the construction of the active site geometry.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Prof. M. Costas and Prof. J. M. Sánchez-Ruiz for helpful suggestions and for the use of the DSC calorimeters at the UNAM and the Universidad de Granada, respectively, Dr. H. Reyes-Vivas and M. Sc. I. De la Mora-De la Mora for help, advice, and suggestions in proteolysis experiments, and Mns. Lenin Domínguez-Ramírez and Nacha Cattan for valuable suggestions and unselfish involvement.

REFERENCES

- 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) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609–614.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E., and Davenport, R. C. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 224, 1115–1126.
- Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative

- thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 37, 441–453.
4. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beaugard, M., Frere, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441–456.
 5. Rietveld, A. W., and Ferreira, S. T. (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* 37, 933–937.
 6. Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V., and Wierenga, R. K. (2000) The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* 267, 2516–2524.
 7. Benitez-Cardoza, C. G., Rojo-Dominguez, A., and Hernandez-Arana, A. (2001) Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* 40, 9049–9058.
 8. Chanez-Cardenas, M. E., Fernandez-Velasco, D. A., Vazquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincon, G., and Perez-Montfort, R. (2002) Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 117–129.
 9. Chanez-Cardenas, M. E., Perez-Hernandez, G., Sanchez-Rebollar, B. G., Costas, M., and Vazquez-Contreras, E. (2005) Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* 44, 10883–10892.
 10. Najera, H., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* 370, 785–792.
 11. Zomosa-Signoret, V., Hernandez-Alcantara, G., Reyes-Vivas, H., Martinez-Martinez, E., Garza-Ramos, G., Perez-Montfort, R., Tuena De Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (2003) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* 42, 3311–3318.
 12. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y., and Dobson, C. M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 300, 11–16.
 13. Zabori, S., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1980) Folding and association of triose phosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch.* C35, 999–1004.
 14. Waley, S. G. (1973) Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* 135, 165–172.
 15. Garza-Ramos, G., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., and Gracy, R. W. (1992) Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* 208, 389–395.
 16. Silverman, J. A., and Harbury, P. B. (2002) The equilibrium unfolding pathway of a $(\beta/\alpha)_8$ barrel. *J. Mol. Biol.* 324, 1031–1040.
 17. Pan, H., Raza, A. S., and Smith, D. L. (2004) Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* 336, 1251–1263.
 18. Vazquez-Perez, A. R., and Fernandez-Velasco, D. A. (2007) Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: the monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry* 46, 8624–8633.
 19. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M., and Wierenga, R. K. (1999) Structural and mutagenesis studies of *Leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* 12, 243–250.
 20. Landa, A., Rojo-Dominguez, A., Jimenez, L., and Fernandez-Velasco, D. A. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur. J. Biochem.* 247, 348–355.
 21. Hernandez-Alcantara, G., Garza-Ramos, G., Hernandez, G. M., Gomez-Puyou, A., and Perez-Montfort, R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 41, 4230–4238.
 22. Gopal, B., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Balam, H., Murthy, M. R., and Balam, P. (1999) Cavity-creating mutation at the dimer interface of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry* 38, 478–486.
 23. Mixcoha-Hernandez, E., Moreno-Vargas, L. M., Rojo-Dominguez, A., and Benitez-Cardoza, C. G. (2007) Thermal-unfolding reaction of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein J.* 26, 491–498.
 24. Gonzalez-Mondragon, E., Zubillaga, R. A., Saavedra, E., Chanez-Cardenas, M. E., Perez-Montfort, R., and Hernandez-Arana, A. (2004) Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry* 43, 3255–3263.
 25. Peimbert, M., Dominguez-Ramirez, L., and Fernandez-Velasco, D. A. (2008) Hydrophobic repacking of the dimer interface of triosephosphate isomerase by in silico design and directed evolution. *Biochemistry* 47, 5556–5564.
 26. Reyes-Lopez, C. A., Gonzalez-Mondragon, E., Benitez-Cardoza, C. G., Chanez-Cardenas, M. E., Cabrera, N., Perez-Montfort, R., and Hernandez-Arana, A. (2008) The conserved salt bridge linking two C-terminal β/α units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 72, 972–979.
 27. Cabrera, N., Hernandez, A., Gloria, Mendoza, H., Guillermo, Gomez-Puyou, A., and Perez-Montfort, R. (2008) Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* 47, 3499–3506.
 28. Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., and Wierenga, R. (1996) Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* 5, 229–239.
 29. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1997) A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36, 9655–9662.
 30. Sun, J., and Sampson, N. S. (1999) Understanding protein lids: kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 38, 11474–11481.
 31. Cabrera, N., Hernandez-Alcantara, G., Mendoza-Hernandez, G., Gomez-Puyou, A., and Perez-Montfort, R. (2008) Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* 47, 3499–3506.
 32. Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., and Fernandez-Velasco, D. A. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 322, 669–675.
 33. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423.
 34. Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A., and Gracy, R. W. (1971) Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 312–320.
 35. Thorolfsson, M., Ibarra-Molero, B., Fojan, P., Petersen, S. B., Sanchez-Ruiz, J. M., and Martinez, A. (2002) L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* 41, 7573–7585.
 36. Sanchez-Ruiz, J. M. (1992) Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys. J.* 61, 921–935.
 37. Takahashi, K., and Sturtevant, J. M. (1981) Thermal denaturation of streptomyces subtilisin inhibitor, subtilisin BPN', and the inhibitor-subtilisin complex. *Biochemistry* 20, 6185–6190.
 38. Uversky, V. N. (1993) Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32, 13288–13298.
 39. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.

40. Creamer, T. P., Srinivasan, R., and Rose, G. D. (1995) Modeling unfolded states of peptides and proteins. *Biochemistry* 34, 16245–16250.
41. Creamer, T. P., Srinivasan, R., and Rose, G. D. (1997) Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility. *Biochemistry* 36, 2832–2835.
42. Lee, B., and Richards, F. M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 55, 379–400.
43. Xie, D., and Freire, E. (1994) Molecular basis of cooperativity in protein folding. V. Thermodynamic and structural conditions for the stabilization of compact denatured states. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 19, 291–301.
44. Wolfenden, R. (1969) Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature* 223, 704–705.
45. Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., and Fernández-Velasco, D. A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: A monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* 7, 57–64.
46. Patel, B., and Finke, J. M. (2007) Folding and unfolding of gammaTIM monomers and dimers. *Biophys. J.* 93, 2457–2471.
47. Levy, Y., Cho, S. S., Onuchic, J. N., and Wolynes, P. G. (2005) A survey of flexible protein binding mechanisms and their transition states using native topology based energy landscapes. *J. Mol. Biol.* 346, 1121–1145.
48. Najera, H., Dagdug, L., and Fernandez-Velasco, D. A. (2007) Thermodynamic and kinetic characterization of the association of triosephosphate isomerase: the role of diffusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 985–994.
49. DeLano, W. L. (2002) The Pymol Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA.

BI801360K

Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para
cambiar lo que somos.

GALEANO,
El libro de los abrazos.

Uma, por las imprecisas instrucciones de viaje “*Si has iniciado un camino...*”

Chief Bacha, por las lecciones, en particular las de amistad y poliamor.

Maki, porque nunca tuviste una *Barbie*.

Experto, *sintigo* habría hecho nada.

Lenin, qué bueno que no fuiste Stalin.

Daniel, Compadre!

Sosa, porque seguro vas a leer esto.

J, por los puntos y las comas... pero sobre todo por los punto y coma.

Nacha, por soportar a J.

Vito, porque sí.

Cisneros, y porqué no.

A la *comuna* del doctor Calcagno.

A la UNAM y a la NASA.

A los demás, de nada.