

“La libertad, Sancho, es uno de los más preciosos dones que a los hombres dieron los cielos; con ella no pueden igualarse los tesoros que encierran la tierra y el mar: por la libertad, así como por la honra, se puede y debe aventurar la vida”.

Miguel de Cervantes Saavedra



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

La conclusión de esta tesis representa para mí mucho más que un trámite académico.

Agradezco a mis padres:

A mi padre por instruirme en la labor dignificante del trabajo  
A mi madre por enseñarme a contar historias

A aquellas mujeres a quienes amo y de las que tanto he aprendido:

Mis hermanas y Lola  
Mi compañera Andrea  
Mi prima Brenda y mis tías  
Mis abuelas  
A la Dra. Silvia Heyser con todo mi respeto



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
Facultad de Química

“Estudio de la estabilidad cinética y termodinámica de  
la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*”

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Valeria Guzmán Luna

Asesora: Georgina Garza Ramos Martínez

## JURADO DE EXAMEN

Presidente	Miguel Costas Basín
Vocal	Andrés Hernández Arana
Secretario	Gloria Saab Rincón
Suplente	Enrique García Hernández
Suplente	Daniel Alejandro Fernández Velasco

## COMITÉ TUTORAL

Georgina Garza Ramos Martínez (Tutora)

Enrique García Hernández

Rosario Muñoz Clares

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por haberme formado a partir mis estudios en el CCH-Sur y por ser desde entonces mi casa

A los investigadores del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas por la libertad y confianza con la que siempre se me permitió trabajar

A Juan Pablo Pardo por su amistad y ayuda desinteresada

A Miguel Costas por otorgarme un espacio en su grupo de trabajo y una beca del SNI

A los miembros de mi comité tutotal:

Georgina Garza Ramos, Rosario Muñoz y Enrique García

A Alejandro Fernández, Andrés Hernández, Adela Rodríguez, Juan Pablo Pardo, Miguel Costas y Rosario Muñoz por su valiosa contribución a mi formación durante el posgrado

A José Manuel Sánchez Ruiz y a la Junta de Andalucía por la beca otorgada para realizar una estancia en la Universidad de Granada

A Eduardo Leyva y Mónica Molina, por su apoyo y amistad

A mis alumnos de la Facultad de Medicina

Durante el doctorado gocé de una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT y de una beca como ayudante del investigador Miguel Costas otorgada por el SNI.

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>El problema del plegamiento .....</b>	<b>6</b>
<b>La paradoja de Levinthal .....</b>	<b>9</b>
<b>Desnaturalización de las proteínas .....</b>	<b>11</b>
<b>Termodinámica del plegamiento de proteínas .....</b>	<b>12</b>
Relación entre el cambio en energía libre y el equilibrio .....	12
Dependencia de la energía libre en la entalpía y entropía.....	12
Contribución del solvente en los parámetros termodinámicos.....	14
Contribución entrópica.....	14
Contribución al calor específico.....	14
Barreras energéticas de solvatación .....	15
Determinación de los parámetros termodinámicos del plegamiento.....	15
Equilibrio conformacional.....	15
Intermediarios de plegamiento .....	16
<b>Análisis del desplegamiento irreversible .....</b>	<b>17</b>
Análisis del desplegamiento irreversible mediante DSC.....	18
<b>La triosafosfato isomerasa .....</b>	<b>18</b>
Barriles TIM.....	20
Contexto biológico de la TbTIM.....	20
Estructura cristalográfica.....	21
Residuos del aminoácido cisteína (Cys) .....	23
Estudios de plegamiento en la TbTIM.....	25
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>27</b>
<b>Expresión y purificación de la proteína.....</b>	<b>27</b>
<b>Desplegamiento inducido por GuHCl .....</b>	<b>27</b>
<b>Ensayos de actividad .....</b>	<b>28</b>
<b>Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC).....</b>	<b>28</b>
<b>Espectroscopía de emisión de fluorescencia.....</b>	<b>29</b>

Experimentos de filtración en gel .....	29
Análisis de los datos.....	30
Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	32
RESULTADOS.....	33
El equilibrio conformacional de la TbTIM.....	33
Experimentos de Filtración en Gel .....	36
Unión a ANS.....	38
Determinaciones de Dicroísmo Circular (DC) en el UV-lejano.....	39
Parámetros termodinámicos asociados a las transiciones conformacionales de la enzima silvestre.....	41
Propiedades espectroscópicas y catalíticas de las mutantes de cisteína .....	42
Transiciones conformacionales de las mutantes de cisteína .....	43
Propiedades estructurales de los intermediarios de plegamiento .....	47
Determinación de la estabilidad cinética de los intermediarios I <sub>2</sub> .....	49
Estabilidad cinética de las conformaciones nativas.....	52
Experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	52
Cinética del desplegamiento de N <sub>2</sub> inducido por GuHCl a 37°C .....	54
DISCUSIÓN .....	58
Transiciones conformacionales .....	58
Efecto de la sustitución de la Cys126 en la TbTIM.....	61
Características estructurales de los intermediarios de plegamiento .....	62
CONCLUSIÓN .....	66
PERSPECTIVAS .....	67
APÉNDICE .....	68
BIBLIOGRAFÍA .....	70
PUBLICACIÓN.....	74



## RESUMEN

Las transiciones conformacionales de la proteína dimérica triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) se estudiaron mediante técnicas espectroscópicas, funcionales, hidrodinámicas y calorimétricas. Se encontró que en el caso más sencillo su vía de plegamiento en el equilibrio es descrita por el mecanismo  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2U$ . De acuerdo a este modelo, se determinaron los siguientes parámetros de la estabilidad termodinámica:  $\Delta G_{I_2-N_2} = 5.5 \pm 0.6$ ,  $\Delta G_{2M-I_2} = 19.6 \pm 1.6$  y  $\Delta G_{2U-2M} = 14.7 \pm 3.1$  kcal·mol<sup>-1</sup>. El intermediario  $I_2$  tiene una estructura compacta que exhibe un valor de  $\alpha S_R = 0.8$ , sin embargo es incapaz de realizar la catálisis o de unir al PGA, el cual es una molécula con estructura análoga a la del sustrato natural. Además, la estructura de  $I_2$  expone cavidades hidrofóbicas que unen ANS y comparada con la conformación nativa contiene aproximadamente 45% de interacciones terciarias y hélices- $\alpha$ . Por otro lado, el intermediario  $2M$  exhibe una conformación significativamente expandida que es poco afín por el ANS. La estructura residual de  $2M$  exhibe un espectro de emisión de fluorescencia similar al de los monómeros desplegados y en relación con la enzima nativa posee 10% de hélices- $\alpha$ . Además, en este trabajo se estudió el efecto en la estructura y estabilidad de la TbTIM luego de mutar a las Cys 14, 39 y 126, las cuales se localizan en el asa<sub>1</sub>, hebra- $\beta_2$  y hebra- $\beta_5$ , respectivamente. En los estudios en condiciones de equilibrio se utilizaron a las mutantes C39A, C126A y C39A/C126A. En las mutantes de C126A el estado  $I_2$  exhibió una alta propensión a formar agregados, además su espectro de emisión de fluorescencia sugiere que el Trp90, residuo localizado en la hebra- $\beta_4$ , está expuesto hacia el solvente. Dada la existencia de una gran cantidad de información relacionada con proteínas que exhiben topologías  $(\beta\alpha)_8$ , es posible proponer la estructura global del intermediario  $I_2$ . Nuestros resultados sugieren que el segmento con estructura regular de  $I_2$  incluye al módulo  $(\beta\alpha)_{1-4}\beta_5$ , el cual es delimitado por el Sy de la Cys126, aminoácido presente en todas las enzimas TIM.

## ABSTRACT

The GuHCl-induced conformational transitions of glycosomal TIM were monitored with functional, hydrodynamic, spectroscopic and calorimetric measurements. The equilibrium folding pathway was found to include two intermediates ( $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2U$ ). According to this model, the conformational stability parameters of TIM are as follows:  $\Delta G_{I_2-N_2} = 5.5 \pm 0.6$ ,  $\Delta G_{2M-I_2} = 19.6 \pm 1.6$  and  $\Delta G_{2U-2M} = 14.7 \pm 3.1$  kcal mol<sup>-1</sup>. The  $I_2$  state is compact ( $\alpha S_R = 0.8$ ), but it was unable to both, carry out catalysis as well as bind the substrate analog PGA. Moreover, the structure of  $I_2$  exposes hydrophobic cavities that bind ANS and it is composed of ~45% of  $\alpha$ -helix and tertiary structure content compared with the native enzyme. Conversely, the  $2M$  state exhibits a fluorescence emission spectrum similar to that from the unfolded monomers, possesses ~10% of the native  $\alpha$ -helical content, is significantly expanded ( $\alpha S_R = 0.2$ ) and has low affinity for ANS. We also studied the effect of mutating C14, C39 and C126 in the structure and stability of TIM, which are located at loop1,  $\beta$  strand 2 and  $\beta$  strand 5, respectively. In the equilibrium experiments, we studied mutants C39A, C126A and C39A/C126A. The  $I_2$  - C126A state, was prone to aggregation and exhibited an emission maximum that was 3-nm red-shifted compared with the  $I_2$  - WT, indicating solvent exposure of W90 at  $\beta 4$ . Our results suggest that the  $I_2$  state comprises the  $(\beta\alpha)_{1-4}\beta_5$  module, in which the conserved C126 residue located at  $\beta 5$  defines the boundary of the folded segment.

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -GDH:  $\alpha$ -glycerol-3-fosfato deshidrogenasa

DGAP: D-gliceraldehído 3-fosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GuHCl: hidrocloreto de guanidina

NADH: nicotin amida adenina dinucleótido hidruro

PGA: 2- fosfoglicolato

$R_s$ : radio de Stokes

TEA: trietanolamina

TIM: triosafosfato isomerasa

TbTIM: TIM de *Trypanosoma brucei*

## INTRODUCCIÓN

En condiciones apropiadas, las proteínas son capaces de adquirir su estructura biológica funcional. Como lo demostraron los estudios pioneros de Anfinsen C. B., el plegamiento de las proteínas es espontáneo y depende de la secuencia de aminoácidos.<sup>1</sup> Experimentos *in vitro*, han permitido el análisis de las vías de plegamiento de una gran cantidad de proteínas monoméricas relativamente pequeñas, las cuales se desnaturalizan reversiblemente.<sup>2</sup> En contraste, el estudio del plegamiento de proteínas de mayor tamaño o multiméricas afronta complicaciones debido a la competencia cinética entre los pasos productivos así como entre aquellos que conducen a estructuras fuera de la vía de plegamiento. Sin embargo, en las células la síntesis y el plegamiento de las proteínas son procesos activos, finamente regulados y sometidos a controles moleculares que rigen la presencia de estructuras correctamente plegadas. Se ha propuesto que el plegamiento es un proceso dirigido por vías cinéticas específicas, así la población de conformaciones posibles que un péptido desplegado puede adquirir es significativamente menor a aquella donde cualquier ruta cinética tiene la misma probabilidad de ser seguida.<sup>3</sup>

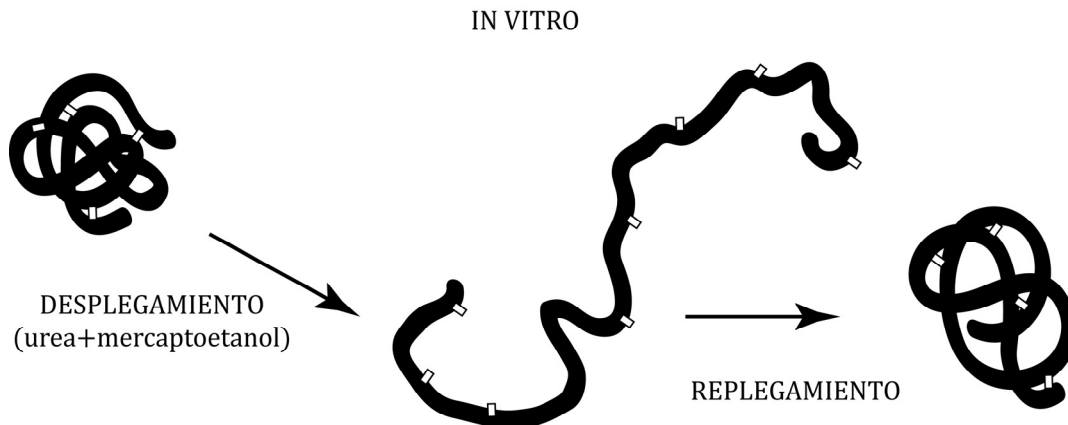
### *El problema del plegamiento*

Para que las proteínas funcionen en su contexto biológico, en general es necesario que adquieran una conformación definida, también llamada estructura nativa. En el caso de las proteínas intrínsecamente desnaturalizadas se ha propuesto que la ausencia de estructura regular local es necesaria para ejercer su función celular.<sup>4</sup> Por esta razón, la comprensión de los procesos fisicoquímicos asociados al plegamiento ha constituido un campo de estudio relevante en la bioquímica de los últimos 50 años.

Experimentalmente, se han empleado dos aproximaciones complementarias para abordar el estudio del plegamiento: la termodinámica y la cinética. Por un lado, el acercamiento termodinámico se

centra en la determinación cuantitativa de los parámetros que rigen la estabilidad de los procesos en el equilibrio, por otro lado, la cinética permite el cálculo de la velocidad y el estudio de la sucesión de las etapas del plegamiento.

Lo anterior se ejemplifica al describir los experimentos realizados en 1962 por Anfinsen y colaboradores en la proteína ribonucleasa. La ribonucleasa está formada por 124 aminoácidos y exhibe una estructura globular, la cual es estabilizada por cuatro enlaces disulfuro específicos. El esquema del experimento general se representa en la Fig. 1 y es descrito a continuación:<sup>1, 5</sup>



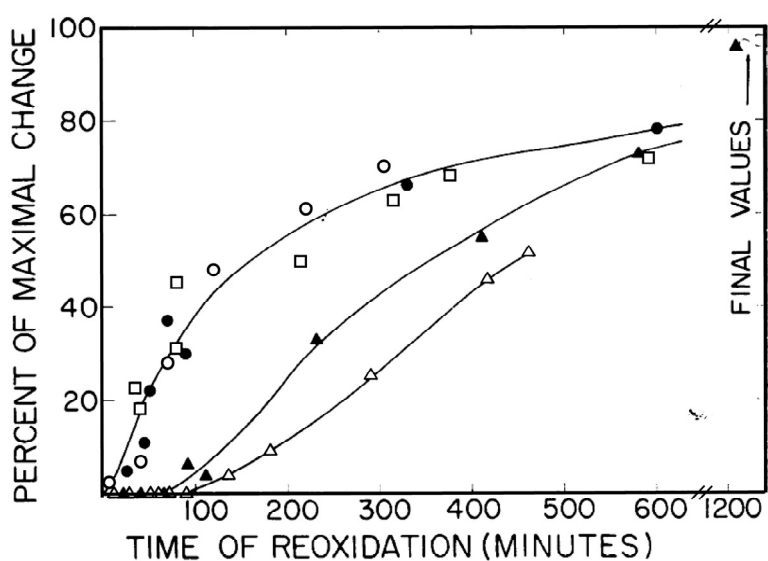
**Figura 1.** Representación esquemática del desplegamiento y reducción de una proteína nativa que contiene 4 enlaces disulfuro en una solución 8M de urea y  $\beta$ -mercaptoetanol. La transformación de un péptido desplegado en una conformación plegada donde los enlaces disulfuro se formaron aleatoriamente se indica en la parte derecha de la figura (imagen modificada de Anfinsen, Science 1973).<sup>5</sup>

- A) Desnaturalización y reducción de los enlaces disulfuro. La ribonucleasa nativa es expuesta a altas concentraciones de agente desnaturalizante y al agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol.
- B) Oxidación de las cisteínas. Mediante la exposición al aire en un pH ligeramente alcalino se forman nuevamente los enlaces disulfuro en presencia de urea 8M. Esta muestra carece de actividad catalítica (1% de la actividad específica de la enzima nativa) y contiene muchos o

todos los 105 isómeros posibles de enlaces disulfuro a partir de 8 cisteínas, es decir, estos residuos se han oxidado aleatoriamente.

C) Diálisis del agente desnaturizante e intercambio de enlaces disulfuro. Mediante la diálisis de la urea y la adición de una pequeña cantidad de un reactivo de grupo sulfhidrilo como el  $\beta$ -mercaptoetanol, se revierte la desnaturalización química de la ribonucleasa y ocurre un reordenamiento de los enlaces disulfuro.

Teóricamente, en estas condiciones la proteína puede o no plegarse nuevamente hasta su conformación nativa. Los resultados del experimento descrito se muestran en la Fig. 2 y muestran los cambios en algunas propiedades de la enzima en función del tiempo de reoxidación.



**Figura 2.** Cambios, durante la oxidación de la ribonucleasa reducida, en los grupos sulfhidrilos medidos por su titulación con p-cloromercuribenzoato (●) y con la reacción con yodoacetato radiactivo (○), rotación óptica (□) y actividad catalítica utilizando como sustratos al ácido ribonucleico (▲) y al uridil monofostato cíclico (△).<sup>6</sup>

En la Fig. 2 se observa que la oxidación de los grupos sulfhidrilos (símbolos ● y ○) coincide con la adquisición de estructura ordenada (series □). Por otra parte, la actividad catalítica (símbolos ▲ y △) es también recuperada progresivamente a pesar de que presenta un retardo de

100 minutos en relación con las propiedades físicas. Al final, las tres variables coinciden. De este experimento se concluye que en tales condiciones la formación de los enlaces disulfuro es un proceso gradual dirigido a alcanzar la configuración nativa.

Las evidencias experimentales aportadas por el trabajo pionero de Anfinsen permitieron el planteamiento de dos paradigmas fundamentales en el estudio del plegamiento de las proteínas:<sup>5</sup>

- 1) En condiciones particulares las proteínas adquieren la estructura termodinámicamente más estable.
- 2) La secuencia de aminoácidos posee la información que determina las características de la estructura nativa, así como el proceso para adquirirla.

### *La paradoja de Levinthal*

A finales de 1960 Cyrus Levinthal propuso la existencia de vías de plegamiento preferenciales que dirigen a un polipéptido desordenado a adquirir la conformación de mínima energía.<sup>7</sup> La *paradoja de Levinthal* se refiere al número astronómico de conformaciones que un polipéptido desplegado puede adoptar, de manera que la búsqueda aleatoria de la estructura con menor energía tomaría un tiempo enorme, no viable para el funcionamiento celular. El planteamiento de Levinthal confrontó a las dos evidencias experimentales del plegamiento de forma excluyente: alcanzar un mínimo energético global y lograrlo rápidamente. Estas dos aproximaciones son conocidas como control termodinámico y control cinético, respectivamente.<sup>8</sup> El control termodinámico significa que el plegamiento de un polipéptido alcanza un mínimo energético global que es independiente de la trayectoria –esto es, que la estructura nativa está determinada únicamente por las condiciones de plegamiento finales y no por las condiciones de desnaturalización– y que requiere una cantidad considerable de tiempo debido a la búsqueda extensiva entre muchísimas

conformaciones. Por su parte el control cinético es dependiente de la trayectoria: la estructura final obedece a las condiciones de desnaturalización desde donde inicia su plegamiento. Al ocurrir rápidamente en escalas de tiempo biológicamente viables la proteína alcanza solamente mínimos energéticos locales.

El argumento de Levinthal condujo a la búsqueda de vías de plegamiento; existen tres propuestas clásicas en torno a éstas:<sup>2</sup>

1. Difusión/colisión: Propone que los elementos locales de estructura secundaria nativa pueden formarse independientemente de la estructura terciaria. En esta propuesta, la estructura secundaria preformada difunde hasta que colisiona para formar interacciones terciarias nativas.

2. Modelo de nucleación (Formación de núcleo): postula que algunos residuos adyacentes en secuencia adquieren estructura secundaria nativa que funciona como un núcleo a partir del cual la formación de estructura se propaga progresivamente. Así, la estructura terciaria se formaría como una consecuencia de la estructura secundaria.

3. Colapso hidrofóbico: este modelo propone que un polipéptido extendido colapsaría alrededor de las cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica para después reestructurarse a partir del espacio conformacional restringido. En este caso, la estructura secundaria sería adquirida a partir de interacciones terciarias nativas.

Finalmente, se ha sugerido que distintas partes de la estructura nativa pueden adquirirse paralelamente a través de distintos mecanismos.<sup>9</sup> Aunque estas teorías ofrecen interpretaciones consistentes con resultados experimentales asociados al plegamiento de proteínas individuales, ninguna de ellas describe en su totalidad los principios subyacentes al plegamiento de todas las proteínas.



### *Desnaturalización de las proteínas*

Las proteínas pueden perder su estructura nativa como respuesta a cambios en la temperatura, aumento considerable de la presión, cambios de pH o fuerza iónica o a la adición de solutos. Según la fuerza con la que interaccionan con el agua, estos solutos pueden clasificarse en dos grupos.<sup>10</sup> Los solutos cosmótopos interaccionan con el agua con más fuerza que las propias moléculas de agua. Mientras que los solutos caotrópicos forman interacciones con las moléculas de agua con menos fuerza que las que establecen las aguas entre sí. En las proteínas, las interacciones que estabilizan a la conformación nativa son perturbadas en presencia de altas concentraciones de moléculas caotrópicas. A pesar de su amplio uso, se desconoce a detalle el mecanismo por el cual los agentes caotrópicos como las sales de guanidinio o la urea desestabilizan a la estructura nativa. En general se asume que alteran la estructura de las proteínas al unirse directamente a ellas o modificando las propiedades del solvente. Experimentos recientes han aportado evidencia que permite dilucidar su mecanismo de acción. Estudios mediante NMR reportan que cada molécula de urea establece un puente de hidrógeno con un grupo NH del enlace peptídico; así, la urea desplazaría a tres moléculas de agua bloqueando la transferencia del protón del grupo amida de la cadena principal hacia el oxígeno de una molécula de agua.<sup>11</sup> Por otro lado, los resultados del análisis de la estructura de la proteína CutA cristalizada en 3M de GuHCl, sugieren que la unión del ión guanidinio ( $\text{GuH}^+$ ) a la proteína nativa es limitada. En este cristal se observan dos iones  $\text{GuH}^+$  en la intercara del trímero interaccionando con los residuos Asp84 y Asp86 de cada monómero. Adicionalmente, en esta estructura se observó que la unión de los iones  $\text{GuH}^+$  a los Trp y a los enlaces peptídicos en la superficie de la proteína, coincide con la perturbación local de la estructura.<sup>12</sup>

### *Termodinámica del plegamiento de proteínas*

Desde la perspectiva termodinámica, el análisis de un sistema biológico permite cuantificar cambios en parámetros como la energía libre, entalpía, entropía, calor específico, entre otros. La determinación de estos parámetros permite profundizar en el conocimiento de las interacciones moleculares que determinan los procesos en estudio. Dada la inherente complejidad de los sistemas biológicos, un análisis termodinámico completo a nivel celular resulta sumamente complejo. Sin embargo, se han realizado avances en el estudio de las moléculas biológicas mediante consideraciones simples.

### *Relación entre el cambio en energía libre y el equilibrio*

El desplegamiento reversible de las proteínas puede someterse al mismo tratamiento termodinámico aplicado al equilibrio de las reacciones químicas, para ello se aplican sistemáticamente ecuaciones fundamentales. La primera ecuación, indica la relación entre la constante de equilibrio K y el cambio en energía libre  $\Delta G^\circ$ :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (1)$$

Reordenando la ecuación 1 en su forma exponencial:

$$K = e^{-\Delta G^\circ / RT}$$

Este arreglo enfatiza la importancia de las interacciones débiles en la estabilidad conformacional proteica. Así, cambios pequeños en  $\Delta G^\circ$  implican cambios mayores en K.

### *Dependencia de la energía libre en la entalpía y entropía*

La segunda relación termodinámica importante en el estudio del plegamiento se indica a continuación:

$$\Delta G^\circ_{N-U} = \Delta H^\circ_{N-U} - T \Delta S^\circ_{N-U} \quad (2)$$

La ecuación (2) relaciona al cambio en energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) con los cambios en entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y entropía ( $\Delta S^\circ$ ) asociados al plegamiento.

En condiciones que favorecen la formación de las interacciones propias de la estructura nativa, el plegamiento de las proteínas es un proceso termodinámicamente favorable, esto es, el  $\Delta G^\circ$  exhibe un signo negativo. Uno de los objetivos de la biofísica de los últimos años ha sido profundizar en las bases moleculares de los parámetros termodinámicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  asociados a los procesos conformacionales de las proteínas. En términos generales el  $\Delta H^\circ$  se relaciona con la formación, ruptura o distorsión de interacciones; mientras que el  $\Delta S^\circ$  se asocia con cambios en los grados de libertad o aleatoriedad del sistema.<sup>13</sup> En un péptido desplegado la cadena principal posee libertad conformacional. Asimismo, los grupos laterales pueden rotar libremente. De acuerdo con la ecuación de Boltzmann (3), este colectivo posee alta entropía dadas las distintas conformaciones que cada molécula puede adoptar:<sup>2</sup>

$$S = k \ln \omega \quad (3)$$

Donde  $\omega$  es una distribución de probabilidad asociada a un estado macroscópico compuesto de muchas moléculas. El valor de  $\omega$  para un estado particular está determinado por el número de conformaciones o microestados moleculares que lo integran. Una población grande de microestados aumenta la probabilidad de que se presente el macroestado al cual constituyen.<sup>14</sup>  $k$  es la constante de Boltzmann, esto es, la constante de los gases ideales ( $R=8.31 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) dividida entre el número de Avogadro ( $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ). Por su parte, el colectivo de moléculas que determinan al estado nativo posee poca entropía debido a las restricciones estructurales ausentes en las moléculas desplegadas, este término es llamado entropía conformacional ( $\Delta S^\circ_{conf}$ ) y constituye la principal contribución desfavorable al término  $\Delta S^\circ$  de la ecuación 2. Así, para que una proteína se pliegue espontáneamente ( $\Delta G^\circ < 0$ ), el proceso debe exhibir valores favorables en el  $\Delta H^\circ$  o  $T\Delta S^\circ$  capaces de compensar al  $\Delta S^\circ_{conf}$ . Un valor de  $\Delta H^\circ < 0$  se debe principalmente a las interacciones que estabilizan a la proteína plegada, como las fuerzas de van der Waals y los puentes de hidrógeno. Mientras que

las contribuciones favorables al  $T\Delta S^\circ$ , surgen principalmente del efecto hidrofóbico. Generalmente, estos efectos compensatorios son suficientes para dotar de una estabilidad marginal a la proteína nativa en comparación con las conformaciones desplegadas.<sup>15</sup> El estudio global del plegamiento de proteínas incluye también la contribución crucial del solvente en los parámetros  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$ .<sup>2</sup>

### *Contribución del solvente en los parámetros termodinámicos*

#### *Contribución entrópica*

Como consecuencia de la interacción del solvente con el péptido desplegado, las moléculas de agua pierden entropía. En condiciones desnaturalizantes las proteínas exponen gran parte de sus grupos laterales hidrofóbicos, alterando así la red de enlaces de hidrógeno del solvente. Se propone que en la distribución más estable, las moléculas de agua se ordenarían alrededor de los grupos apolares aumentando la energía de sus enlaces de hidrógeno. El segundo factor relevante para la disminución de la entropía del solvente son los enlaces de hidrógeno que establecen las moléculas de agua con los átomos de la cadena principal.<sup>2</sup> Por el contrario, en el proceso global del plegamiento existe una compensación entrópica. Mientras que el péptido plegado pierde entropía conformacional, las moléculas de agua ganan libertad al disociarse de los grupos que conforman el interior de la proteína.

#### *Contribución al calor específico*

La contribución del solvente en la capacidad calorífica ( $C_p$ ) es crucial en la interpretación del  $\Delta C_p$  asociado al plegamiento. El calor específico de las conformaciones desplegadas es particularmente alto debido a la solvatación de los grupos no polares por las moléculas de agua. A medida que aumenta la temperatura se rompen los enlaces de hidrógeno que

forman las aguas de solvatación, de esta manera se estima la contribución del calor latente de fusión al  $C_p$  del estado desplegado.<sup>2</sup>

### *Barreras energéticas de solvatación*

En los últimos años se ha propuesto la presencia de barreras energéticas de solvatación asociadas a los estados de transición de cambios conformacionales en proteínas. Visto el proceso desde el plegamiento de un péptido desplegado y solvatado, estas barreras surgen de la asincronía entre la expulsión de las moléculas de agua y la formación de interacciones internas. De acuerdo a esta propuesta, la descomposición de la entalpía de activación ofrece información relacionada con la diferencia en el balance energético entre la estructura nativa y el estado de transición. Esta aproximación permite profundizar en las bases moleculares de los estados de transición que determinan la estabilidad de las proteínas.<sup>16</sup>

### *Determinación de los parámetros termodinámicos del plegamiento*

#### *Equilibrio conformacional*

Clásicamente, el desplegamiento reversible de proteínas es considerado un cambio conformacional altamente cooperativo entre las especies  $N$  y  $U$ . Donde la estructura nativa y las especies desplegadas ( $N$  y  $U$ ) representan a los únicos estados macroscópicos significativamente poblados. El formalismo termodinámico que describe este proceso se desarrolla a continuación:<sup>13</sup>

$$N \leftrightarrow U, \quad K = \frac{U}{N} = e^{-\Delta G^\circ/RT} \quad (4)$$

Donde  $\Delta G^\circ$  indica la diferencia en energía libre entre los macroestados  $N$  y  $U$ . La suma de sus fracciones molares igualan a la unidad ( $X_N + X_U = 1$ ) y se relacionan con la constante de equilibrio  $K$  como lo indican las ecuaciones 5a, 5b y 5c.

$$K = \frac{X_N}{X_U} \quad (5a)$$

$$X_N = \frac{1}{1 + K} \quad (5b)$$

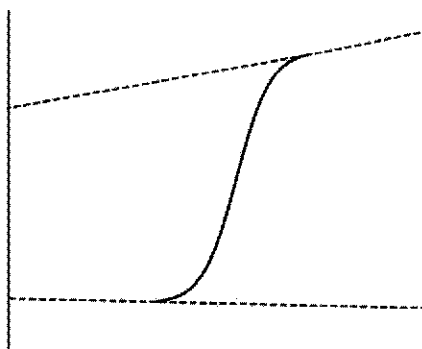
$$X_U = \frac{K}{1 + K} \quad (5c)$$

Las técnicas más comunes en el estudio del equilibrio conformacional incluyen la determinación de actividad catalítica y propiedades espectroscópicas e hidrodinámicas. De acuerdo al formalismo propuesto por Santoro y Bolen, se asume aditividad entre algunas de estas propiedades medibles ( $Y$ ) así como la dependencia lineal de la fracción de moléculas que pueblan cada estado (ecuación 6) en la concentración de desnaturalizante:

17

$$Y = X_N(m_N x + Y_N) + X_U(m_U x + Y_U) \quad (6)$$

Donde  $m_{N,U}$  y  $Y_{N,U}$  indican la pendiente y la ordenada al origen de la propiedad medible de cada macroestado y  $x$  es la concentración del agente caotrópico. La gráfica común de la propiedad sensible al cambio entre las conformaciones N y U en función de la temperatura o agente caotrópico ( $x$ ) se muestra a continuación:



**Figura 3.** Transición conformacional de una proteína que no exhibe intermediarios estables. La población de las especies N y U es medida indirectamente utilizando alguna prueba estructural (ordenada al origen) en función del agente caotrópico (abscisa).

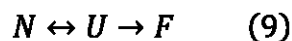
### *Intermediarios de plegamiento*

Con frecuencia durante el plegamiento, la competencia cinética entre pasos productivos y aquellos que conducen a la formación de agregados

comprometen la reversibilidad del desplegamiento de proteínas. En estos casos, las proteínas exhiben estructuras parcialmente plegadas propensas a agregarse como resultado del efecto hidrofóbico. Especialmente complejo resulta el plegamiento de proteínas oligoméricas, en las cuales la asociación de las subunidades requiere que los monómeros alcancen una conformación específica antes de interactuar para formar una estructura cuaternaria nativa.<sup>18</sup> Las propiedades estructurales de los intermediarios de plegamiento, así como sus parámetros termodinámicos y cinéticos proveen información útil para la comprensión del proceso de plegamiento.

### *Análisis del desplegamiento irreversible*

Como se mencionó en la sección anterior, la irreversibilidad del desplegamiento de proteínas es común. Estos procesos exhiben transiciones que al ser cinéticamente controladas no pueden ser descritas por la termodinámica al equilibrio. El análisis de las transiciones de desplegamiento irreversibles ha experimentado un avance significativo a partir de la propuesta del “modelo irreversible de dos estados” realizada por Sánchez-Ruiz *et al.*<sup>19; 20</sup> De acuerdo a esta aproximación, el mecanismo Lumry-Eyring expuesto en la ecuación 9 se reduce a un proceso fenomenológico de dos estados, ecuación 10:



Donde N es la especie nativa, U la desplegada y F una conformación final imposibilitada de replegarse hacia N. En la simplificación de la ecuación 9, se asume que la alteración irreversible (U→F) es tan rápida que las moléculas desplegadas (U) nunca se acumulan considerablemente. En general, este modelo puede aplicarse a distintos casos de desplegamiento irreversible que incluyan un paso irreversible limitado cinéticamente.<sup>21</sup>

### *Análisis del desplegamiento irreversible mediante la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*

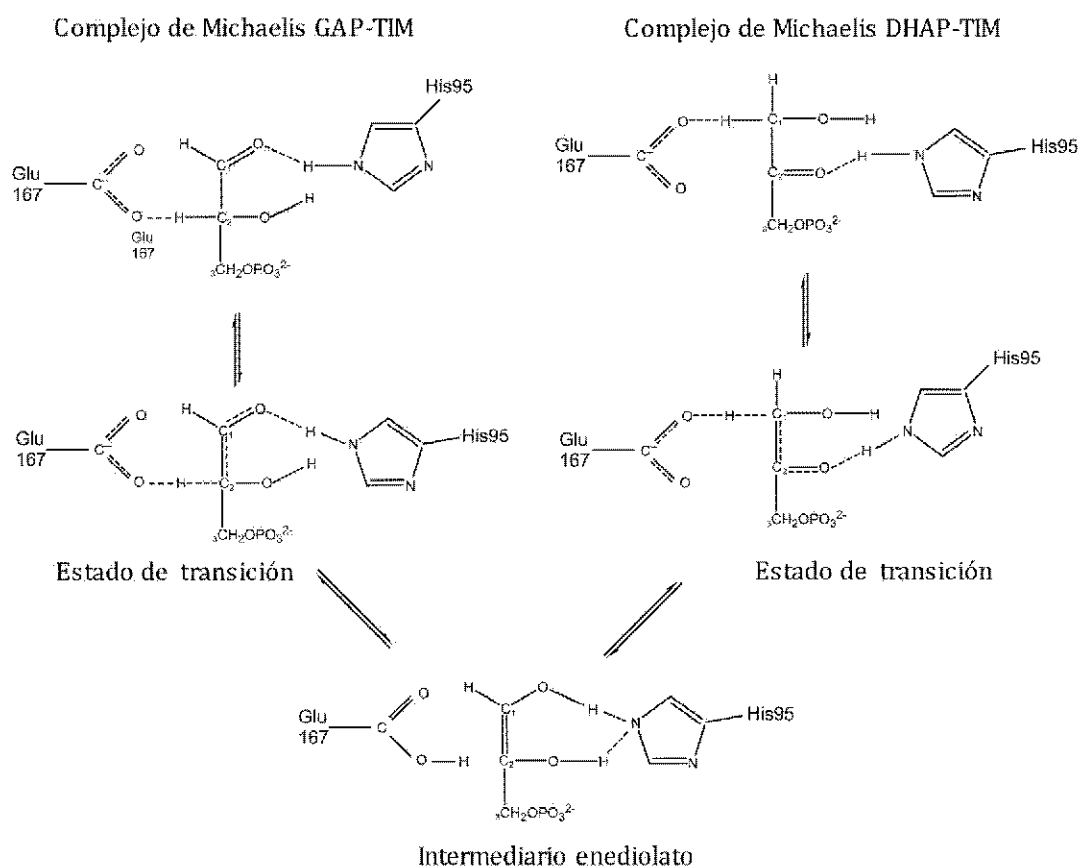
Frecuentemente, el desplegamiento de proteínas seguido por DSC permite conocer dos aspectos del proceso: 1) si éste es reversible y 2) si está controlado cinéticamente. El primer caso es detectado por la ausencia de una transición en el segundo barrido calorimétrico. Este experimento se realiza en la muestra que fue enfriada inmediatamente después de concluir la transición calorimétrica del primer barrido.<sup>22</sup> La gran mayoría de las transiciones calorimétricas cinéticamente controladas exhiben una dependencia en la velocidad de barrido que, en muchos casos pueden ser descritos adecuadamente por el modelo irreversible de dos estados mencionado.<sup>20; 23; 24</sup> Los estudios de DSC en el desplegamiento irreversible de proteínas han evidenciado los dos aspectos de la estabilidad de las proteínas: el cinético y el termodinámico. Mientras que la estabilidad termodinámica se refiere al cambio en energía libre que favorece la población de estructuras nativas en condiciones fisiológicas, la estabilidad cinética se refiere al tiempo en el que esta población permanece sin sufrir alteraciones irreversibles.

#### *La triosafosfato isomerasa*

En este trabajo se utilizó a la enzima dimérica triosafosfato isomerasa (TIM) perteneciente al parásito protista *Trypanosoma brucei* (TbTIM) como modelo para estudiar la estabilidad de una proteína oligomérica. La TIM es una enzima de la glucólisis, ubicua en los organismos; al catalizar la isomerización de los azúcares de tres carbonos dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP), asegura el catabolismo de los seis carbonos de la glucosa. La cinética de saturación por sustrato de la TIM exhibe una hipérbola rectangular que se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten. La TIM pertenece al grupo de enzimas consideradas “*catalizadores perfectos*” ya que la rapidez de la reacción que cataliza se ve limitada



solamente por la difusión, es decir velocidad de unión del sustrato en el sitio activo. Aunque los residuos que conforman el sitio catalítico están contenidos en cada monómero, la asociación entre ellos es necesaria para conformar una enzima activa. El mecanismo de reacción propuesto para la TIM es la transferencia de un protón catalizada por una base con asistencia electrofílica.<sup>25</sup> Los residuos cruciales para llevar a cabo la catálisis son la Lys 13, His 95 y Glu 167, los cuales se ubican respectivamente en las asas 1, 4 y 6. La His 95 cataliza la transferencia del protón entre el oxígeno del C1 y el oxígeno del C2. Mientras que el Glu 167 actúa como base catalítica al realizar la transferencia intramolecular de un protón entre los carbonos 1 (C1) y 2 (C2) del sustrato (Figura 4). La carga positiva de la Lys 12 favorece la unión del sustrato, finalmente, la Ser 96 participa al asistir el posicionamiento adecuado de la base catalítica (Glu 167).



**Figura 4. Mecanismo propuesto para la reacción catalizada por la TIM**

### *Barriles TIM*

Aproximadamente el 10% de las estructuras de proteínas conocidas contienen al menos un dominio estructural de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, también llamado barril TIM. Algunos estudios han demostrado el potencial de este modelo estructural para el diseño de enzimas con nuevas actividades.<sup>26; 27</sup> El prototipo de barril TIM está formado por ocho repeticiones del motivo estructural hebra- $\beta$ -asa-hélice- $\alpha$  ( $\beta\alpha$ ). Las ocho hebras- $\beta$  conforman una hoja- $\beta$  paralela cerrada que se estabiliza por las interacciones entre las hebras- $\beta$  contiguas y constituyen el principal núcleo hidrofóbico. El exterior del barril es formado por las hélices- $\alpha$  de características anfipáticas. En todos los barriles TIM descritos, los residuos catalíticos se localizan en el extremo carboxilo de las hebras- $\beta$  y en las asas  $\beta/\alpha$ . Un barril TIM estándar contiene entre 200 y 260 aminoácidos, en la TIM homodimérica de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), cada subunidad está compuesta por 250 residuos.

### *Contexto biológico de la TbTIM*

La literatura indica que a diferencia de otros tripanosomas, cuando *T. brucei* adquiere la estructura infecciosa “larga y extendida” restringe su catabolismo de carbohidratos a la glucólisis.<sup>28</sup> En *T. brucei*, las siete primeras enzimas de la glucólisis están confinadas al glicosoma,<sup>29</sup> entre ellas se encuentra la TIM. Se sugiere que el aislamiento de estas enzimas es un mecanismo alternativo a la regulación alostérica que en el parásito previene la intoxicación por hexosas fosfato formadas en la primera etapa de la glucólisis.<sup>28</sup> En particular, se ha demostrado que la actividad catalítica de la TIM en el citosol del parásito, inhibe su crecimiento.<sup>30</sup> Asimismo, la TbTIM es la única enzima del glicosoma que no posee a ninguno de los dos péptidos que se encargan de transportar a las proteínas desde el citosol hacia el glicosoma. Recientemente se ha reportado que el fragmento de 22 aminoácidos de la secuencia de TbTIM (140-161), tiene la capacidad de

transportar e internalizar proteínas reporteras hasta el glicosoma.<sup>29</sup> No es sorprendente que las características fisicoquímicas de este péptido sean anfipáticas. Es decir, mientras que la región N-terminal contiene principalmente a los residuos hidrofóbicos 140-AVVVLTQIAAIA-151 que forman a la  $\alpha$ -hélice<sub>5</sub>, el segmento 152-KKLKK-156 exhibiría cuatro cargas positivas a pH fisiológico. Finalmente, la hélice<sub>3-10</sub> localizada en el extremo C-terminal está formada por residuos polares del aminoácido 157 al 161. La figura 5, tomada del artículo original,<sup>29</sup> muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos de este péptido con los fragmentos correspondientes en otras TIMs. La diferencia más drástica es el reemplazo de las Lys 152 y 155, presentes en el péptido señal de la TbTIM.

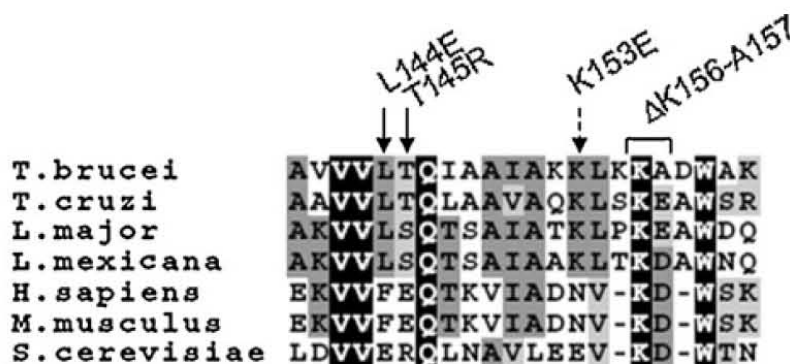
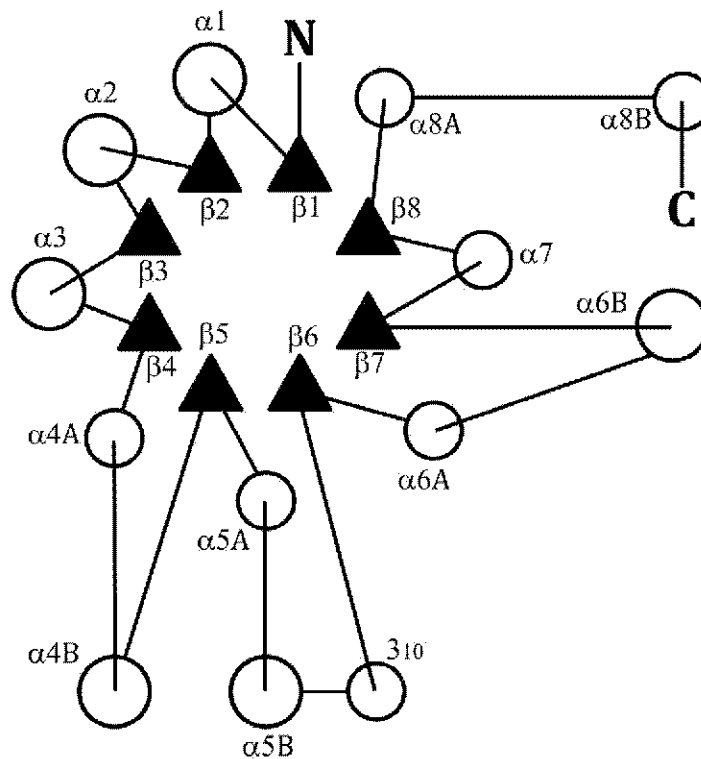


Figura 5. Análisis del péptido señal de la TbTIM. Alineamiento de los aminoácidos 140 a 161 de la TbTIM con el fragmento correspondiente de las TIMs de otras especies. Los aminoácidos idénticos se indican con un fondo negro y los aminoácidos que exhiben diferencias conservativas están sombreadas en gris.<sup>29</sup>

### *Estructura cristalográfica*

Se ha resuelto la estructura tridimensional de la TIM mediante la técnica de cristalografía de rayos X. Recientemente se determinó la estructura del complejo de la TIM unida a través de su sitio activo al fosfoglicolohidroxamato –molécula estructuralmente análoga al sustrato de la reacción catalizada por la TIM– a una resolución de 0.82 Å.<sup>31</sup> La estructura de la TIM contiene un alto porcentaje de estructura secundaria: 55% de hélices- $\alpha$ , 23% de hebras- $\beta$  y 3% de giros- $\beta$  (Fig. 6). Cada una de las ocho hebras que conforman a la hoja- $\beta$  se orienta paralelamente según el orden

de la secuencia de aminoácidos. La última hebra, hebra- $\beta_8$ , forma enlaces de hidrógeno con las hebras- $\beta_7$  y  $\beta_1$ , estructurando así al barril- $\beta$ . Las hebras varían en longitud, desde cuatro a nueve residuos. El principal componente de estructura secundaria es constituido por una hélice- $3_{10}$  y doce hélices- $\alpha$ . Ocho de las cuales ( $\alpha_1$ - $\alpha_7$  y  $\alpha_8A$ , de la Fig. 6) discurren en sentido opuesto a las hebras- $\beta$  para conformar al prototipo de barril ( $\beta\alpha$ ) $_8$ . Los residuos que conectan las hebras- $\beta$  con las hélices- $\alpha$  forman asas, giros- $\beta$  o hélices pequeñas adicionales.



**Figura 6.** Elementos de estructura secundaria del monómero de la TIM

Las hélices varían en tamaño, desde 5 hasta 20 residuos. El resto de la estructura secundaria regular consiste de dos giros- $\beta$ . Uno de los cuales se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la hebra- $\beta_2$  que conecta con la hélice- $\alpha_2$ , mientras que el otro se localiza en el asa que conecta a la hebra- $\beta_3$  con la hélice- $\alpha_3$ . El sitio de contacto entre las dos subunidades es llamado

intercara dimérica<sup>1</sup> y está formado por las asas ( $\beta\alpha$ )<sub>1-4</sub>. El asa 3, también llamada asa *interdigitante* es particularmente relevante en la estabilidad de la estructura cuaternaria. Está constituida por 9 residuos y se extiende dentro de una cavidad formada por las asas 1 y 4 de la subunidad vecina.

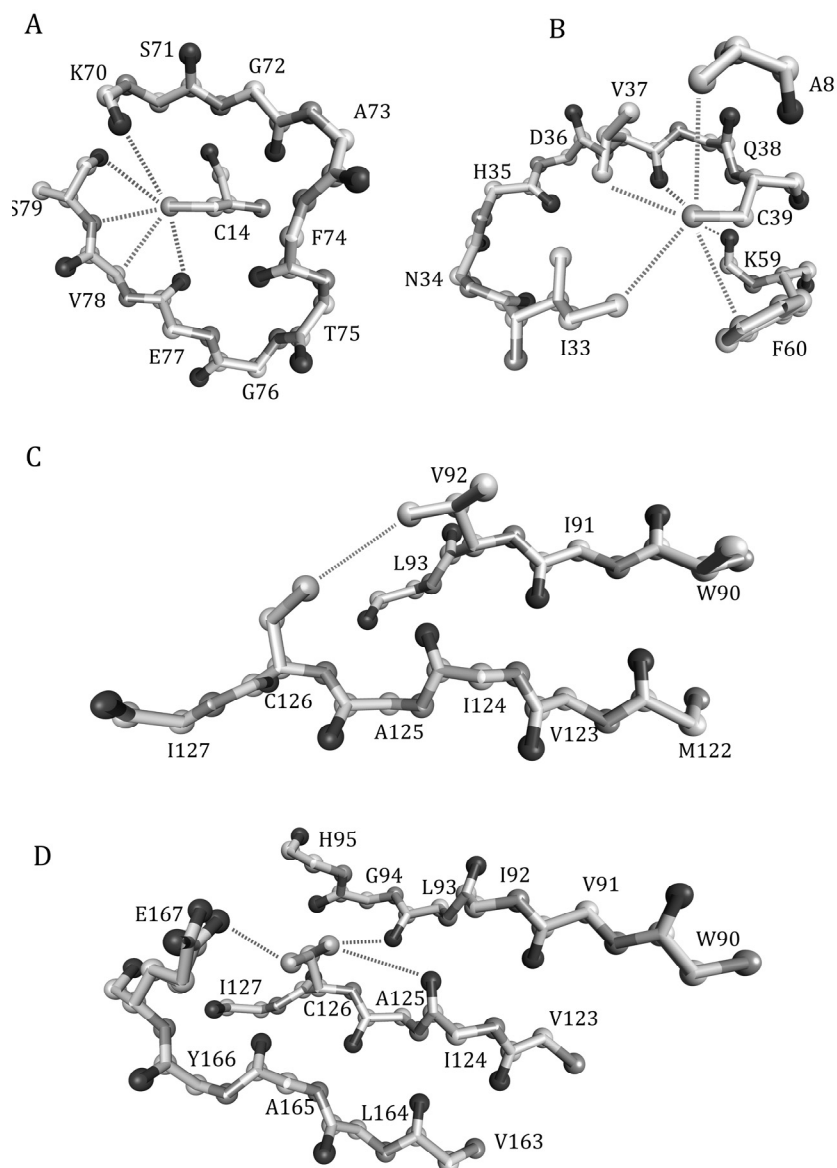
### *Residuos del aminoácido cisteína (Cys)*

En las proteínas, los residuos de Cys son poco frecuentes y en éstas suelen ser importantes en su estructura y función.<sup>32</sup> En el presente trabajo se estudió la contribución de las Cys en la estabilidad de la TbTIM. El monómero de la TbTIM tiene tres residuos de cisteína en las posiciones 14, 39 y 126 (Fig. 7). La Cys14 se localiza en el asa 1 y es uno de los tres residuos que, mientras en el monómero disociado expone su cadena lateral al solvente, en el dímero se oculta en la intercara. Este residuo se encuentra en las TIMs de los parásitos kinetoplastidos pertenecientes a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. En la estructura cristalográfica se observa que la cadena lateral de la Cys14 está rodeada por los residuos del asa 3 de la subunidad vecina a una distancia promedio de 3.7 Å de los átomos de cadena principal de Lys70, Glu77, Val78 y el O $\gamma$  de la Ser79 (Fig. 5A).<sup>33</sup> La Cys39 es un residuo que se localiza en el extremo amino de la hebra- $\beta_2$ . En la TIM de humano ocupa la posición 41. Su grupo lateral apunta hacia la intercara  $\beta/\alpha$ . Las cadenas laterales de los residuos Ala8, Ile33, Phe60 al igual que los átomos de las cadenas principales de los residuos Asp36, Val37 y Lys59 se encuentran a una distancia entre 4 y 4.6 Å. En ninguna interacción polar la geometría es adecuada para formar un enlace de hidrógeno.<sup>33</sup>

Por otra parte, en todas las secuencias de TIM conocidas, un residuo de Cys está presente en la posición equivalente al residuo 126 de la TbTIM. La Cys126 se ubica en el extremo carboxilo de la hebra- $\beta_5$ . Su grupo lateral

---

<sup>1</sup> Utilizo el término intercara por su traducción del inglés *interface*.



**Figura 7.** Interacciones del grupo lateral de las cisteínas de la TbTIM. Las líneas discontinuas muestran los átomos más cercanos al  $S_{\gamma}$  de los residuos de cisteína. Las cadenas laterales se muestran en caso de que participen en la interacción. **Panel A.** Interacciones intermoleculares del  $S_{\gamma}$ -Cys14 con residuos del asa 3 a una distancia promedio de 3.7 Å. **Panel B.** Interacciones intramoleculares del  $S_{\gamma}$ -Cys39 con I33, D36 y V37 (asa  $\alpha_1/\beta_2$ ), K59 ( $\alpha_2/\beta_3$ ), F60 (N-ter de la hebra- $\beta_3$ ) a una distancia entre 4 y 4.6 Å. **Panel C.** Interacción del  $S_{\gamma}$ -C126 con el  $C_{\gamma_1}H_3$  -Val92, residuo localizado en la hebra- $\beta_4$ . **Panel D.** Interacción del  $S_{\gamma}$ -C126 con oxígenos de la cadena principal de residuos alifáticos e interacción del rotámero del  $S_{\gamma}$ -C126 con un oxígeno del Glu catalítico. Las estructuras de los paneles A-C corresponden al cristal de la TbTIM a una resolución de 2.1 Å (PDB: 1TPF),<sup>33</sup> mientras que la estructura del panel D fue resuelta a 0.83 Å (PDB: 1N55).<sup>34</sup>

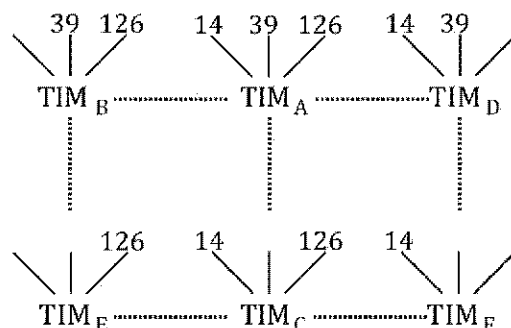
apunta hacia el centro del barril- $\beta$ . El análisis de la estructura de la TIM de *L. mexicana* a 0.83 Å (LmTIM) reveló que el SH-C126 forma un enlace de hidrógeno con los oxígenos de la cadena principal de los residuos Leu93 e Ile124 localizados en las hebras- $\beta$  4 y 5 respectivamente, y está a distancia de un contacto de van der Waals de un oxígeno del residuo catalítico Glu167.<sup>34</sup>

Además, el átomo Sy-C126 se encuentra a 4.04 Å del C $_{\gamma 1}$ H $_3$  de la Val92, residuo localizado en la hebra- $\beta$ <sub>4</sub>.<sup>33</sup> Estudios previos indican que la sustitución de la Cys126 no afecta significativamente la actividad de la TIM de levadura ( $\gamma$ TIM); sin embargo, ésta mutación disminuye la reversibilidad del desplegamiento inducido por temperatura.<sup>35; 36</sup> Por otro lado, se ha reportado que la mutante C41T causante de un desorden recesivo autosomal en humano,<sup>37</sup> así como mutantes de C126 de la TIM de *Plasmodium falciparum*, exhiben anomalías en la asociación de los monómeros comparados con la TIM silvestre.<sup>38</sup>

#### *Estudios de plegamiento en la TbTIM*

Estudios de mutagenesis exhaustiva en la  $\gamma$ TIM determinando la actividad en extractos celulares, mostraron la alta sensibilidad a las mutaciones del núcleo del barril- $\beta$ , mientras que los núcleos hidrofóbicos de las intercaras  $\beta/\alpha$  en general exhibieron mayor tolerancia.<sup>39</sup> Con la finalidad de estudiar el efecto de las mutaciones puntuales en cada uno de los tres núcleos hidrofóbicos de la TbTIM, analizamos la estabilidad de tres mutantes sencillas: C14A, C39A y C126A. Las cadenas laterales de estos aminoácidos se localizan en la intercara dimérica (C14), la intercara  $\beta/\alpha$  (C39) y el núcleo del barril- $\beta$  (C126). Además, para determinar la posible sinergia entre estos residuos, estudiamos a dos dobles mutantes de cisteína: C14A/C39A y C39A/C126A. Las variantes en las cuales ambos residuos C14 y C126 se mutaron simultáneamente generaron una molécula inestable,

imposible de purificar en la fracción soluble. Así, las distintas combinaciones de la sustitución de cisteínas son esquematizadas a continuación:



**Figura 8.** Representación esquemática de las mutantes de Cys 14, 39 y 126 generadas a partir de la enzima silvestre. El ciclo incluye a la enzima silvestre (A), a las mutantes sencillas C14A (B), C39A (C) y C126A (D) y, finalmente, a las dobles mutantes C14A/C39A (E) y C39A/C126A (F).

En esta tesis se estudió el equilibrio conformacional de la enzima silvestre y sus mutantes de cisteína, inducido por GuHCl. Las transiciones conformacionales fueron seguidas mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas y de actividad. Para las proteínas silvestre y dobles mutantes C14A/C39A y C39A/C126A, las condiciones donde el desplegamiento inducido por GuHCl es reversible, se reportaron anteriormente.<sup>40</sup> Asimismo, en la misma tesis se reportó la presencia de un intermediario en el equilibrio, del cual no se determinó su estado de oligomerización. Por otra parte, la estabilidad cinética de la TbTIM y la de sus variantes de cisteína se estudió mediante experimentos de cinética de desplegamiento, así como con experimentos preliminares de calorimetría diferencial de barrido.



## **METODOLOGÍA**

### ***Expresión y purificación de la proteína***

Las variantes de TbTIM fueron expresadas en *Escherichia coli* y purificadas de acuerdo al protocolo descrito para la enzima silvestre con un rendimiento de 30 a 50 mg de enzima pura por litro de cultivo.<sup>41</sup> La pureza de las proteínas se determinó por medio de geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS mostrando una sola banda con una masa molecular aproximado de 27kDa al teñir con azul de Coomassie.

### ***Desplegamiento inducido por GuHCl***

Se estudiaron las transiciones conformacionales inducidas por GuHCl en la TbTIM silvestre y las mutantes C39A, C126A y C39A/C126A a 23°C. Para las transiciones de desplegamiento se mezcló una solución de proteína a la concentración final de 20 µg/mL con 100 mM TEA (pH 7.4), 10 mM EDTA y 1 mM DTT (amortiguador A) en diferentes concentraciones de GuHCl. Dado que la conformación nativa es cinéticamente estable a 23°C, se incubaron las soluciones hasta que se observaron propiedades constantes, es decir, alrededor de siete días. Las transiciones conformacionales de las variantes de TbTIM exhibieron intermediarios al equilibrio propensos a agregar. Por esa razón, los experimentos al equilibrio utilizando concentraciones de proteína mayores a 20 µg/mL, fueron realizados en el sentido del replegamiento dada su mayor rapidez para alcanzar condiciones de equilibrio en comparación con el desplegamiento. Para los experimentos de replegamiento de la Fig. 9, las proteínas nativas en una concentración de proteína de 1 mg/mL fueron inicialmente incubadas durante 2 h en presencia de 6 M GuHCl. Posteriormente, las muestras fueron diluidas en amortiguador A en distintas concentraciones de GuHCl hasta alcanzar una concentración de proteína final de 20 µg/mL y GuHCl en concentraciones desde 0.25 hasta 6 M. En las concentraciones de proteína de 5-70 ó 110-200

$\mu\text{g/mL}$ , las moléculas replegadas se incubaron durante 12 ó 2 h respectivamente, para medir propiedades en el estado estacionario. La concentración de  $\text{GuHCl}$  fue verificada al medir su índice de refracción. Las transiciones conformacionales fueron evaluadas con pruebas de actividad, técnicas espectroscópicas y cromatografía de exclusión molecular.

### ***Ensayos de actividad***

La actividad catalítica fue medida en la dirección  $\text{GAP} \rightarrow \text{DHAP}$  por medio de un ensayo acoplado a la enzima  $\alpha$ -glicerol fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GPDH), la cual cataliza la oxidación del NADH por la DHAP. La velocidad de la oxidación del NADH se siguió midiendo la disminución de absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU7500 a  $25^\circ\text{C}$ ; para ello se utilizaron soluciones a  $50 \mu\text{g/mL}$   $\alpha$ -GPDH, 1 mM GAP y 0.2 mM NADH en 100 mM TEA (pH 7.4) y 10 mM EDTA y 220 pM TbTIM (6 ng/mL), esta concentración de TbTIM es al menos 300 veces menor que la utilizada en los experimentos espectroscópicos. Las muestras fueron primero diluidas hasta una concentración de proteína de 11 nM TbTIM sin cambiar la concentración de  $\text{GuHCl}$ , posteriormente se determinó la actividad a una alícuota de 20  $\mu\text{l}$ . La tasa de oxidación del NADH en función del tiempo fue lineal, indicando que durante el ensayo, la concentración residual de  $\text{GuHCl}$  no afectó a ninguna de las enzimas presentes en la solución. Además, ya que las fracciones de enzima nativa calculadas a partir de las mediciones de actividad son análogas a aquellas determinadas por la emisión de fluorescencia, se concluye que los equilibrios conformacionales no fueron alterados durante este ensayo.

### ***Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)***

Los espectros de DC se determinaron utilizando un espectropolarímetro Applied Photophysics Chirascan CD equipado con un controlador de temperatura Quantum Northwest TC 125. Los espectros de

DC en el UV-lejano de las variantes de TbTIM se obtuvieron en una celda de paso de luz de 0.1-cm, utilizando soluciones a la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TbTIM y en concentraciones específicas de GuHCl. A cada espectro le fue restada la señal de DC generada por el amortiguador en presencia de GuHCl.

### ***Espectroscopía de emisión de fluorescencia***

Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro ISS PC1 equipado con un controlador de temperatura Quantum Northwest TC 125. Los datos de emisión fueron colectados desde 300 hasta 390 nm utilizando una longitud de onda de 280 nm. Los datos normalizados de fluorescencia se determinaron considerando el cambio de intensidad en la  $\lambda_{\text{em}} = 322$  nm. El centro de masas espectrales (CME) se calculó a partir de los datos de emisión de fluorescencia ( $I_\lambda$ ) en cada longitud de onda ( $\lambda$ ) mediante la relación:  $\text{CME} = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$ . Para seguir la compactación progresiva de las moléculas de TbTIM durante el replegamiento, las muestras en el equilibrio conformacional en concentraciones de proteína de 40 ó 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fueron incubadas en ANS a una concentración 300 veces mayor que la de los monómeros de la TbTIM. Luego de un periodo de incubación de 2 h en la oscuridad se determinó el espectro de emisión del ANS desde 420 a 600 nm utilizando una  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm.

### ***Experimentos de filtración en gel***

La cromatografía de exclusión molecular se realizó en una columna analítica Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) acoplada a un sistema AKTA-FPLC (Amersham Biosciences) equipado con un detector de UV ( $\lambda = 280$  nm). El radio de Stokes ( $R_S$ ) de las especies estables fue calculado mediante la interpolación a la curva de calibración ( $1000/V$  vs.  $S_R$ ), la cual fue construida como lo reporta Chanez-Cárdenas *et al.*<sup>42</sup> Para

verificar la exactitud de esta curva, se procedió a verificar el peso molecular de proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular. Alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  fueron cargadas en la columna previamente equilibrada y eluidas a la velocidad de 0.5  $\text{mL min}^{-1}$ . Se utilizaron concentraciones de TbTIM a 0.02 - 0.5  $\text{mg/mL}$  en 100  $\text{mM}$  TEA (pH 7.4), 10  $\text{mM}$  EDTA y distintas concentraciones de GuHCl.

### **Análisis de los datos**

Los mecanismos conformacionales mencionados en este trabajo se indican a continuación:



Donde  $\text{N}_2$ ,  $\text{I}_2$ ,  $\text{M}$ ,  $\text{U}$  y  $\text{A}$  indican respectivamente al dímero nativo, un intermediario dimérico, un intermediario monomérico, un monómero desplegado y, finalmente una especie agregada.

Los datos de actividad, mediciones espectroscópicas y de filtración en gel fueron ajustados globalmente utilizando las ecuaciones 11 ó 12, las cuales son modificaciones del modelo de dos estados propuesto por Santoro y Bolen.<sup>17</sup> Las transiciones conformacionales de las enzimas silvestre y C39A en presencia de GuHCl, son descritas por el Mecanismo (2). En estas variantes, los resultados de los experimentos en el equilibrio se ajustaron a la Ecuación (11), la cual está relacionada con el Mecanismo (2). Por otra parte, en las enzimas C126A y C39A/C126A, el desplegamiento inducido por GuHCl fue parcialmente reversible; sus transiciones conformacionales son descritas por el Mecanismo (3), a partir del cual se obtuvo la Ecuación (12) que se utilizó para realizar el ajuste de sus datos. Las derivaciones de las Ecuaciones (11) y (12) se indican en el Apéndice de esta tesis.

$$Y_{obs} = \frac{2Pt f_M^2 (Y_{N_2} + m_{N_2} C + (Y_{I_2} + m_{I_2} C) e^{-\Delta G_1/RT})}{e^{-(\Delta G_1 + \Delta G_2)/RT}} + (Y_M + m_M C) f_M + (Y_U + m_U C) f_M e^{-\Delta G_3/RT} \quad (11)$$

$$Y_{obs} = \frac{f_M e^{-\Delta G_2/RT} (Y_M + m_M C + (Y_U + m_U C) e^{-\Delta G_3/RT}) + 2Pt f_M^2 (Y_{I_2} + m_{I_2} C)}{e^{-\Delta G_2/RT}} \quad (12)$$

Con:

$$\Delta G_1 = m_1 (C - C_{1/2})_1 \quad (13)$$

$$\Delta G_2 = RT \ln(P_t) + m_2 (C - C_{1/2})_2 \quad (14)$$

$$\Delta G_3 = m_3 (C - C_{1/2})_3 \quad (15)$$

Donde  $Y_{obs}$  es la señal de la actividad, datos espectroscópicos o de filtración en gel;  $Y(N_2)$  es la señal del estado nativo para la enzima silvestre y la mutante C39A;  $Y(U)$ ,  $Y(M)$  e  $Y(I_2)$  son las señales de los monómeros desplegados y de los intermediarios 2M and  $I_2$  respectivamente;  $P_t$  es la concentración de proteína total expresada como la molaridad del monomero;  $C$  es la concentración molar de GuHCl;  $C_{1/2}$  es la concentración molar de GuHCl en el punto medio de la transición;  $m(N_2)$ ,  $m(I_2)$ ,  $m(M)$  y  $m(U)$  son las pendientes que describen la dependencia de la señal de los intermediarios en  $C$ ;  $f_M$  es la fracción molar de los monómeros parcialmente plegados, expresada como función de las constantes  $K_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$ ;  $K_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$  son constantes de equilibrio para las transiciones conformacionales  $N_2 \leftrightarrow I_2$ ,  $I_2 \leftrightarrow 2M$  y  $2M \leftrightarrow 2U$  respectivamente, de los Mecanismos (2) y (3);  $m_1$ ,  $m_2$  y  $m_3$  describen la dependencia lineal del  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$  y  $\Delta G_3$  en la concentración de GuHCl, respectivamente.

En cada caso, se llevó a cabo un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de los datos utilizando el programa Microcal Origin versión 7.0.

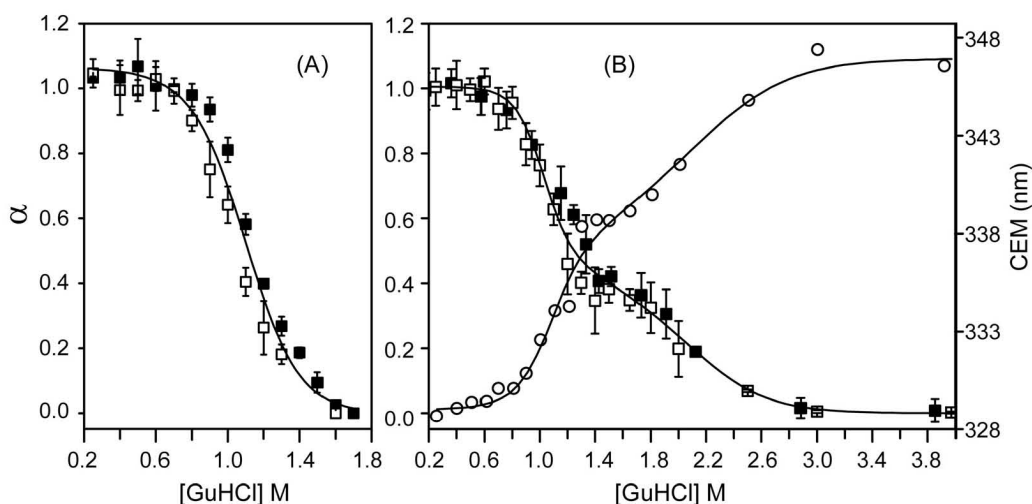
### *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

Los experimentos de DSC se llevaron a cabo en un calorímetro VP-DSC de MicroCal utilizando una velocidad de calentamiento de 1°C/min. Las soluciones de proteína fueron dializadas exhaustivamente en amortiguador 100 mM TEA (pH 7.4) y 10 mM EDTA. Las concentraciones de proteína utilizadas fueron 1 mg/mL y 0.6 mg/mL. Antes de cada experimento se obtuvieron varias líneas base.

## RESULTADOS

### *El equilibrio conformacional de la TbTIM*

Los primeros estudios sobre el equilibrio conformacional de la TbTIM inducido por GuHCl se realizaron siguiendo los cambios en fluorescencia intrínseca, así como en actividad catalítica. Las transiciones conformacionales resultantes de estos experimentos se muestran en la Fig. 9. Los valores de la fracción de proteína replegada ( $\alpha$ ) fueron normalizados considerando que aproximadamente el 90% de las moléculas desplegadas son capaces de replegarse hacia la conformación nativa. Las curvas bifásicas de los cambios en fluorescencia y en el centro de masas espectrales (CME) sugieren que el proceso conformacional es definido por dos equilibrios, donde un intermediario de plegamiento es estable entre 1.3 - 1.8 M GuHCl. Ya que los datos de actividad catalítica son monofásicos y coincidentes con la fase exhibida por los datos de fluorescencia entre 0.25 y 1.3 M GuHCl se concluye que el intermediario es catalíticamente inactivo (Fig. 9)



**Figura 9.** Transiciones conformacionales de la TbTIM en el equilibrio. El desplegamiento y replegamiento se indica con símbolos negros y blancos respectivamente. Los cambios de la señal normalizada ( $\alpha$ ) de la actividad catalítica se indica en (A), mientras que la fluorescencia intrínseca se muestra en (B), los cambios en CME se representan con círculos. Los experimentos se realizaron en la concentración de proteína de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la concentración indicada de [GuHCl] a 23°C. En ambos paneles las líneas continuas son el ajuste global de los datos a la ecuación 11 que resulta del mecanismo 2, los parámetros se indican en la Tabla 1.

Para conocer el estado de agregación del intermediario de plegamiento se estudió la dependencia de las transiciones en la concentración de proteína. Los experimentos de la Fig. 10A, indican que la  $C_{1/2}$  de la transición de 1.5 a 2.5 M GuHCl depende de la concentración de proteína. Dicha dependencia es mejor ejemplificada en las concentraciones de proteína de 5 y 140  $\mu\text{g/mL}$ , donde la transición se desplaza desde 1.7 a 2.0 M GuHCl.

Estos resultados sugieren la presencia de un paso de oligomerización asociado a la transición. El siguiente mecanismo de tres estados representa el modelo más sencillo consistente con la evidencia experimental:



De acuerdo al mecanismo 1, el plegamiento hacia la conformación nativa ( $N_2$ ) a partir de los monómeros desplegados ( $2U$ ) presenta a un intermediario dimérico estable ( $I_2$ ). Cuando se utiliza una concentración de proteína de 20  $\mu\text{g/mL}$ , el  $C_{1/2}$  de la transición unimolecular ( $N_2 \leftrightarrow I_2$ ) es aproximadamente 1.0 M GuHCl. En esta concentración de GuHCl, la determinación de la fracción de moléculas replegadas fue independiente del incremento de hasta 10 veces en la concentración de proteína (Fig. 10B), esta observación es consistente con el mecanismo (1). Dada la existencia de estudios que indican que la TbTIM forma agregados en concentraciones intermedias de desnaturalizantes,<sup>42</sup> se realizaron experimentos de filtración en gel para evaluar el estado de compactación del intermediario.



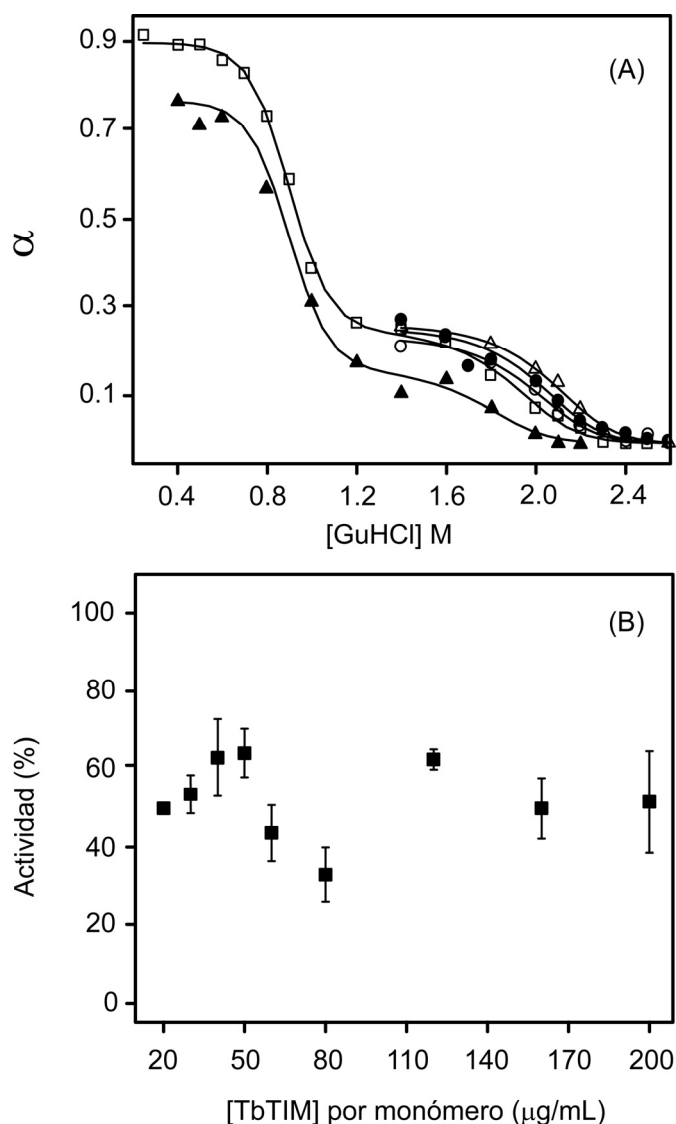
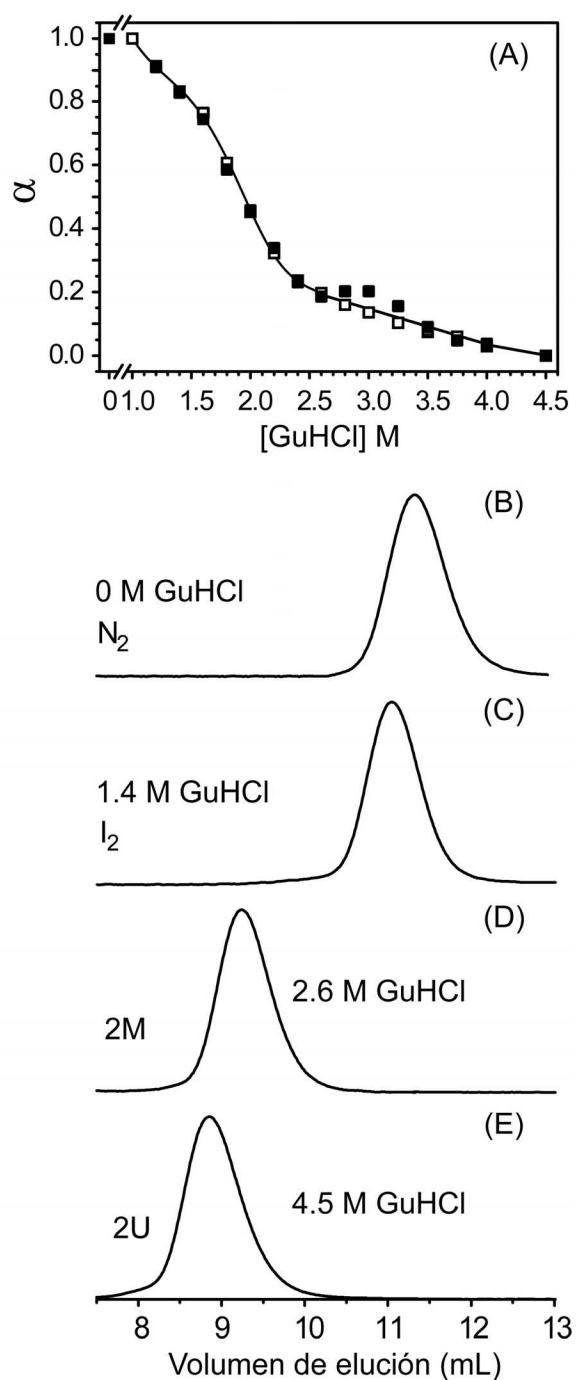


Figura 10. Análisis de las transiciones conformacionales de la TbTIM en presencia de GuHCl. (A) Cambios normalizados de la emisión de fluorescencia en las transiciones en el equilibrio utilizando las concentraciones de proteína de 5, 20, 50, 110 y 140  $\mu\text{g/mL}$ , estas series se indican con los símbolos  $\blacktriangle$ ,  $\square$ ,  $\circ$ ,  $\bullet$  y  $\triangle$ , respectivamente. La línea continua indica el ajuste global de los datos a la ecuación 11, los parámetros se indican en la Tabla 1. (B) Recuperación de moléculas reversiblemente desplegadas en 1 M GuHCl. Las moléculas desplegadas en la concentración de proteína de 1.2 mg/mL fueron replegadas en la concentración final de proteína que se indica en el eje de las abscisas, la actividad les fue determinada luego de 12 h de incubación. El replegamiento se realizó mediante la dilución de alícuotas en amortiguador A en concentraciones tales de GuHCl que se obtuvo la concentración final de 1 M GuHCl.

### ***Experimentos de Filtración en Gel***

El equilibrio conformacional se estudió siguiendo el cambio en las propiedades hidrodinámicas utilizando concentraciones de proteína de 20 y 200  $\mu\text{g/mL}$ . Los experimentos realizados a 20  $\mu\text{g/mL}$  exhibieron siempre un solo pico de elución. Sin embargo, en la concentración de proteína de 200  $\mu\text{g/mL}$  y en concentraciones menores a 1.4 M GuHCl, un segundo pico de absorbencia a 280 nm eluyó en la fracción correspondiente al volumen muerto de la columna, indicando la formación de agregados de alto peso molecular. Los cambios conformacionales de la proteína correlacionan con el incremento gradual de los valores del Radio de Stokes ( $R_s$ , Fig. 11), desde 0 M (26.3 Å), 1.4 M (29.0 Å), 2.4 M (38.5 Å) a 4.5 M GuHCl (42.5 Å). A diferencia de los resultados de la Fig. 10A, la  $C_{1/2}$  de las transiciones conformacionales seguidas por filtración en gel, fueron independientes de la concentración de proteína. Es probable que la drástica dilución de la concentración de proteína a consecuencia del empleo de esta técnica afectara el equilibrio de asociación de  $I_2$ . Es importante señalar que la transición a 200  $\mu\text{g/mL}$  entre 2.8 y 3.2 M GuHCl, exhibió tres puntos con un  $R_s$  menor al que mostraron los datos a 20  $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados sugieren la presencia de monómeros expandidos aproximadamente en 3M GuHCl, los cuales tenderían a asociarse en oligómeros, probablemente en una conformación dimérica más expandida que  $I_2$ , no así en agregados de alto peso molecular que deberían eluir en el volumen muerto de la columna. Puesto que en algunos barriles TIM se ha demostrado que intermediarios de plegamiento monoméricos tienden a asociarse débilmente,<sup>43</sup> se procedió a estudiar el equilibrio conformacional mediante cambios en fluorescencia extrínseca y dicroísmo circular (DC) en el UV lejano.

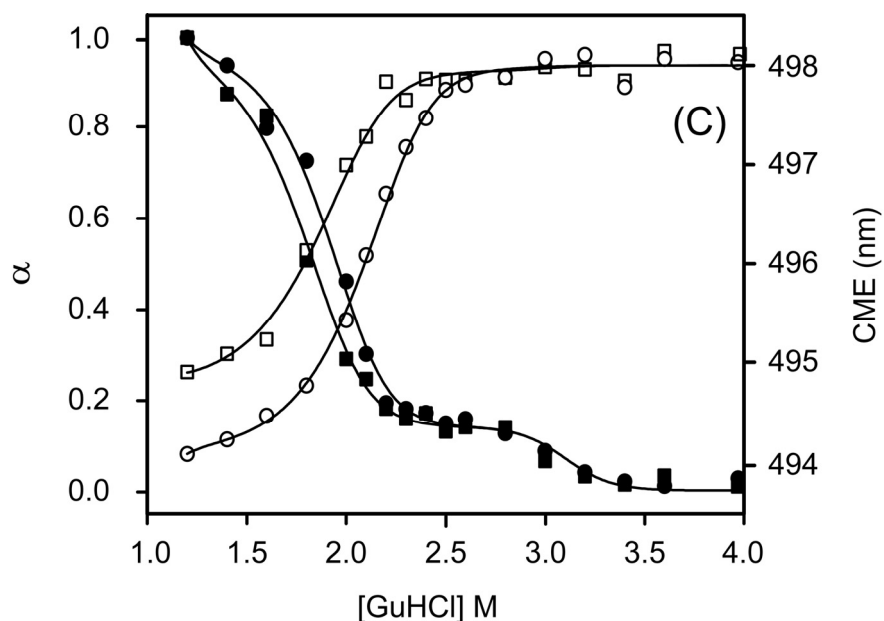


**Figura 11.** (A) Señales normalizadas ( $\alpha$ ) de las transiciones conformacionales de la TbTIM silvestre, determinadas por filtración en gel. Alícuotas de una solución de proteína en la concentración de 1.5 mg/mL y en 6 M GuHCl, fueron diluidas en soluciones de GuHCl en las concentraciones finales de proteína de 20  $\mu\text{g/mL}$  (□) ó 200  $\mu\text{g/mL}$  (■) e incubadas durante 12 ó 2 h respectivamente. La línea continua es el ajuste de los datos a la ecuación 11. En los paneles B a E se indican los perfiles de elución representativos de las especies estables  $N_2$ ,  $I_2$ , 2M y 2U a 20  $\mu\text{g/mL}$  de TbTIM.

### *Unión a ANS*

El 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) es una molécula que emite fluorescencia a consecuencia de la interacción del grupo apolar anilina-naftaleno con solventes orgánicos o, en el caso de las proteínas con sus cavidades hidrofóbicas. Por otra parte, su fluorescencia es extinta por la interacción con moléculas de agua. Así, al evaluar la fluorescencia del ANS en presencia de proteínas se obtiene información estructural relacionada con la exposición de cavidades apolares y con su grado de hidratación. Para determinar la presencia de intermediarios de plegamiento adicionales, se realizaron experimentos de equilibrio conformacional análogos a los de la Fig. 9A en presencia de ANS con una relación molar ANS: monómeros de TbTIM de 300:1 (Fig. 12). Debido a que el espectro de fluorescencia de la muestra que contenía ANS y enzima nativa mostró un CME = 499 nm y un rendimiento cuántico similar a aquellos del espectro de ANS en amortiguador, se concluye que la conformación nativa no expone cavidades hidrofóbicas. Por el contrario, en 1.2 M GuHCl se observa que la conformación I<sub>2</sub> exhibe el máximo número de cavidades hidrofóbicas que unen ANS; a partir de este punto se observa que el aumento en las concentraciones de GuHCl causó un desplazamiento hacia el rojo en el CME del espectro del ANS así como la disminución en la emisión de fluorescencia. El cambio en la fluorescencia del ANS exhibió un comportamiento bifásico en el rango de 1.2 a 4 M GuHCl, a diferencia de la transición aparentemente monofásica de la Fig. 9B, por tanto, se observa un segundo intermediario de plegamiento. Al igual que los resultados de la Fig. 10A, el incremento en la concentración de proteína de 40 a 70 µg/mL causó un ligero desplazamiento en la C<sub>1/2</sub> de la transición observada entre 1.2 a 2.5 M GuHCl. Sin embargo, el cambio en la fluorescencia de ANS fue independiente de la concentración de proteína entre 2.5 y 3.5 M GuHCl, demostrando así la presencia de monómeros estables (2M) en la vía de plegamiento de la TbTIM. La conformación significativamente expandida de 2M fue exhibida por su bajo

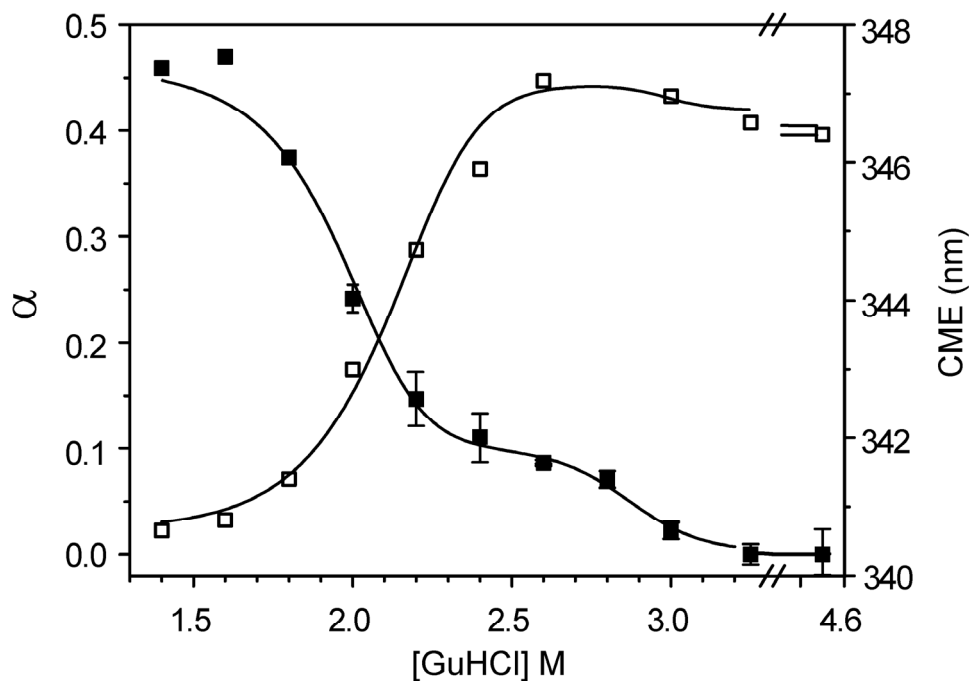
contenido de cavidades hidrofóbicas de unión al ANS. Esto se ilustra mejor por la imposibilidad de detectar a 2M cuando el exceso en la concentración molar de ANS se redujo seis veces.



**Figura 12.** Cambios en la fluorescencia del ANS a 500 nm (símbolos negros) utilizando una concentración molar 300 veces mayor que la del monómero de la TbTIM silvestre. Además, en símbolos blancos se muestran los cambios en el CME de la emisión de fluorescencia del ANS. El ANS se añadió a las soluciones de proteínas en el equilibrio de replegamiento en concentraciones de TbTIM de 40 (■, □) y 70 (●, ○)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las líneas continuas son el ajuste global de los datos a la ecuación 11, los parámetros se indican en la Tabla 1.

### *Determinaciones de Dicroísmo Circular (DC) en el UV-lejano*

Las transiciones de replegamiento al equilibrio fueron determinadas midiendo los cambios en los espectros de DC en función de la concentración de GuHCl. Dado que los experimentos de filtración en gel indicaron la formación de agregados de alto peso molecular en concentraciones de GuHCl menores a 1.4 M, los cambios conformacionales se estudiaron en el rango de 1.4 a 4.5 M GuHCl. En la Fig. 13 se muestran los valores normalizados ( $\alpha$ ) de la elipticidad molar a 224 nm así como los datos crudos del cambio en CME asociados al replegamiento.



**Figura 13.** Señales normalizadas ( $\alpha$ ) de las transiciones de replegamiento de la TbTIM silvestre siguiendo el cambio en la elipticidad molar a 224 nm (■) y en el CME (□). Los experimentos se realizaron en la concentración de proteína de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las líneas continuas son ajustes globales de los datos a la ecuación 11, los parámetros se indican en la Tabla 1. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones utilizando la misma muestra. Las barras de error se removieron de la serie del cambio en CME para observar mejor los datos.

La transición seguida por DC mostró un carácter bifásico, mientras que los datos de CME cambiaron en una sola fase; por lo tanto, la estructura secundaria y terciaria no se adquiere simultáneamente durante el replegamiento. La presencia del intermediario monomérico mostrada por los experimentos de fluorescencia del ANS (Fig. 12) fue confirmada por la meseta de los cambios en elipticidad a 224 nm (Fig. 13), ambas presentes alrededor de 2.6 M GuHCl. Los cambios normalizados en elipticidad indican que los intermediarios estables  $I_2$  y  $2M$  tienen alrededor del 45% y 10% del contenido de hélices- $\alpha$  respectivamente, en comparación con la conformación nativa.

*Parámetros termodinámicos asociados a las transiciones conformacionales de la enzima silvestre*

Las observaciones experimentales de las Fig. 7, 8 y 10 nos permiten plantear el siguiente mecanismo:



Este modelo de plegamiento consiste de tres equilibrios: un paso de desplegamiento de  $N_2$  independiente de la concentración de proteína, seguido por la disociación intermediario dimérico ( $I_2$ ) y, finalmente, un proceso unimolecular del desplegamiento de los monómeros ( $2M$ ) hacia los monómeros desplegados ( $2U$ ). Sin embargo, para la determinación precisa del mecanismo de plegamiento, se deberá evaluar la posible asociación de  $2M$  para conformar a un oligómero adicional en concentraciones significativamente mayores a las que se utilizaron en este estudio. Los parámetros termodinámicos de las transiciones donde el desplegamiento fue reversible se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros termodinámicos del plegamiento de las variantes de TbTIM a 23°C

	$\Delta G_1$	$-m_1$	$C_{1/2(1)}$	$\Delta G_2$	$-m_2$	$C_{1/2(2)}^e$	$\Delta G_3$	$-m_3$	$C_{1/2(3)}$	$\Delta G_{tot}^d$
silvestre <sup>a</sup>	5.5	5.8	0.9	19.6	6.3	1.8	14.7	5.1	2.9	54.5
	(0.6)	(0.7)	(0.2)	(1.6)	(0.3)	(0.4)	(3.1)	(1.2)	(1.3)	(5.3)
C126A <sup>b</sup>	-	-	-	16.8	5.7	1.5	14.4	5.1	2.8	45.6
				(0.9)	(0.2)	(0.3)	(2.8)	(1.8)	(1.5)	(3.7)

Las unidades de  $\Delta G$ ,  $m$ , y  $C_{1/2}$  se indican en kcal mol<sup>-1</sup>, kcal mol<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> y M respectivamente. Los errores representan las desviaciones estándar de los ajustes y se muestran en paréntesis.  $m_1$ ,  $m_2$  y  $m_3$  describen la dependencia lineal del  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$  y  $\Delta G_3$  en la concentración de GuHCl de los equilibrios conformacionales  $N_2 \leftrightarrow I_2$ ,  $I_2 \leftrightarrow 2M$  y  $2M \leftrightarrow 2U$  respectivamente, según los mecanismos (2) y (3). <sup>a,b</sup>Los datos fueron ajustados globalmente a las ecuaciones 11 ó 12. <sup>c</sup>Los valores de la  $C_{1/2}$  se calcularon a la concentración de proteína de 20 µg/mL por monómero. <sup>d</sup> $\Delta G_{tot} = \Delta G_1 + \Delta G_2 + 2\Delta G_3$ .

Los ajustes globales de los datos indican que el cambio en energía libre total de la TbTIM es  $54.5 \pm 5.3$  kcal·mol<sup>-1</sup>. Adicionalmente, los valores de  $m$  son proporcionales al cambio del ASA esperado en el desplegamiento de la TbTIM. Utilizando las correlaciones de Myers *et al.*,<sup>44</sup> a partir de los valores de  $m$  de la Tabla 1 se obtiene un  $\Delta$ ASA de 66,540 (Å<sup>2</sup>), comparable al  $\Delta$ ASA de 62, 540 Å<sup>2</sup> calculado en un estudio previo.<sup>45</sup> A fin de obtener información estructural de dos núcleos hidrofóbicos de la TIM, estudiamos la estabilidad conformacional de los estados I<sub>2</sub> y 2M luego de mutar a los residuos Cys39 y Cys126, cuyas cadenas laterales apuntan respectivamente hacia la zona de contacto entre  $\beta_4$  y  $\alpha_4$  y hacia el interior del barril- $\beta$ .

### *Propiedades espectroscópicas y catalíticas de las mutantes de cisteína*

En este trabajo estudiamos la estabilidad cinética y conformacional de las enzimas mutantes C14A, C39A, C126A C14A/C39A y C39A/C126A. La Tabla 2 indica las propiedades previamente reportadas para las mutantes.<sup>40</sup> En ninguna de ellas el contenido de estructura secundaria o terciaria, así como el cociente  $k_{cat}/K_m$ , se ven afectados como resultado de las sustituciones.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos y estructurales de la TbTIM silvestre y sus mutantes de cisteína

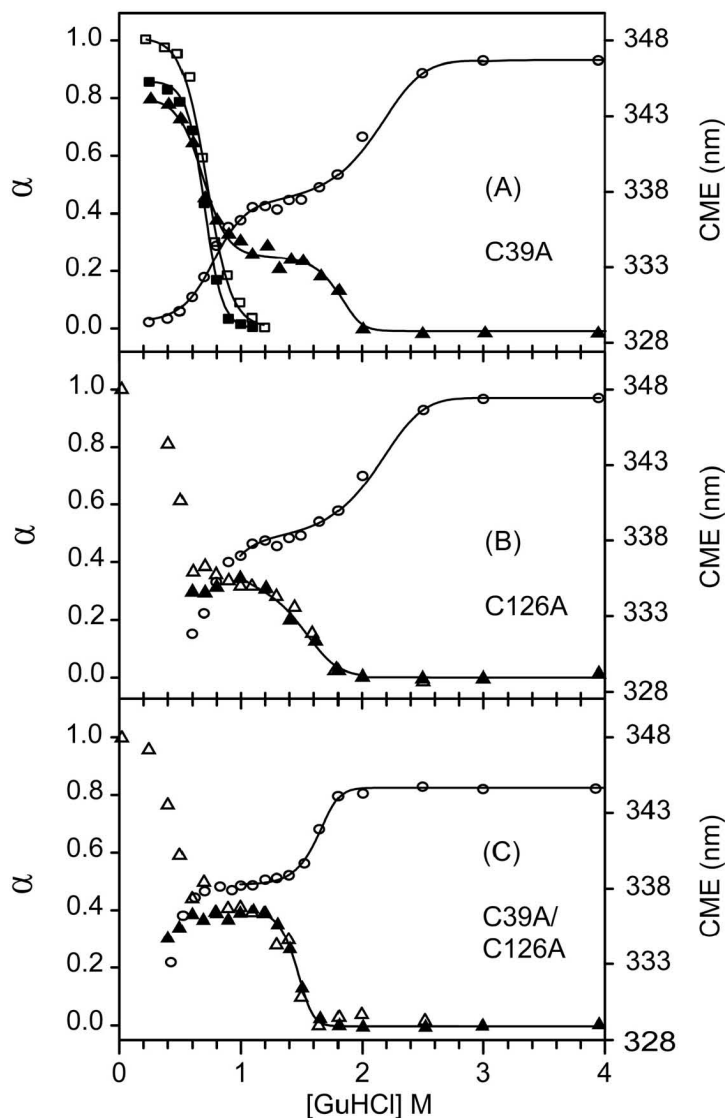
	$k_{cat} / K_m^a$	$K_i^{a,b}$ (PGA)	CME	$\Theta$ (222nm)	$k_{ap}^c$ -PGA	+PGA
silvestre	$11.4 \pm 2.4$	$29 \pm 5$	328.8	14.2	0.14	0.08
C39A	$9.9 \pm 2.7$	27	328.6	11.2		
C126A	$9.3 \pm 0.5$	19	328.8	12.2		
C14A/C39A	$15.4 \pm 0.5$		328.9	13		
C39A/C126A	$9.2 \pm 3.1$	20	328.7	11.7	0.03	0.016

Las unidades de  $k_{cat}/K_m$ ,  $K_i$ , CME,  $\Theta$  y  $k_{ap}$  (de plegamiento) se indican respectivamente en M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> x 10<sup>6</sup>,  $\mu$ M, nm, grados-cm<sup>2</sup>-dmol<sup>-1</sup> x 10<sup>-3</sup> y min<sup>-1</sup>. <sup>a</sup>Las mediciones se realizaron en un amortiguador de TEA 100 mM (pH 7.4) y EDTA 10 mM a 25°C. <sup>b</sup>Determinada utilizando GAP como sustrato. Los valores de  $K_i$  de las mutantes son el promedio de dos experimentos. <sup>c</sup>Determinada mediante los cambios en la actividad catalítica. Las muestras en 6M GuHCl y 1 mg/mL de TIM fueron replegadas luego de un dilución (x50) en amortiguador A o en una solución de amortiguador A a una concentración de PGA 100 veces mayor a la  $K_i$ . la actividad de las muestras se midió en presencia de una concentración residual de PGA (30 veces menos que la  $K_i$ ) a 25°C.



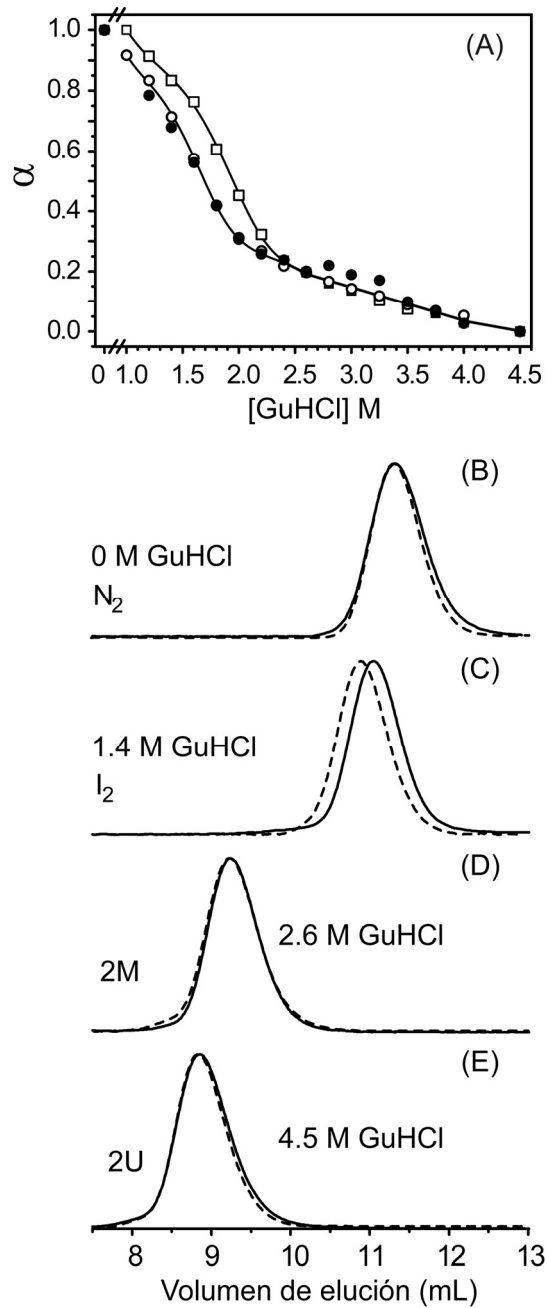
*Transiciones conformacionales de las mutantes de cisteína*

Las transiciones conformacionales de las mutantes C39A, C126A y C39A/C126A inducidas por GuHCl, se indican en la Fig. 14.



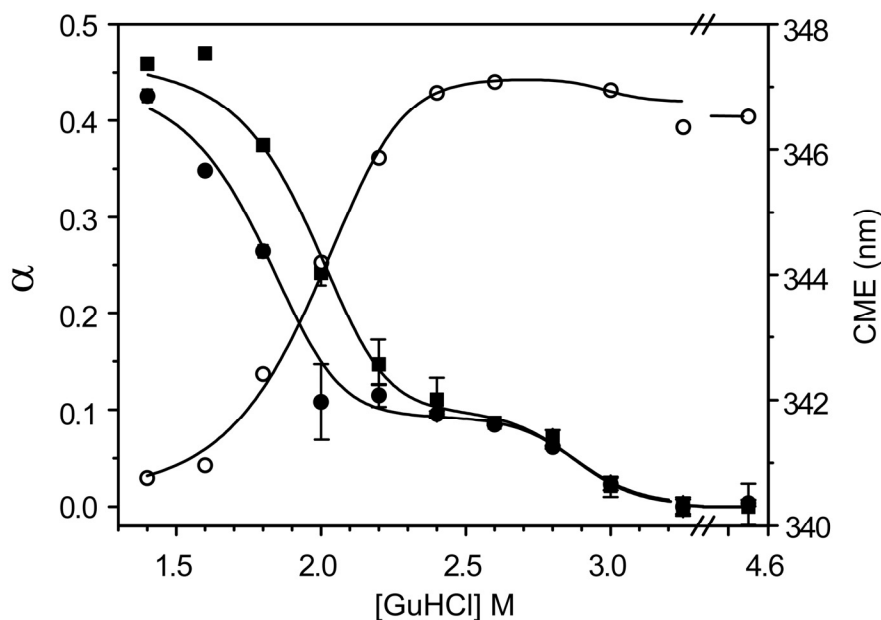
**Figura 14.** Transiciones conformacionales de las variantes de TbTIM C39A (A), C126A (B) y C39A/C126A (C) en el equilibrio. Los experimentos del panel B fueron realizados por la Bióloga Mónica Molina. El desplegamiento y replegamiento se indica con símbolos blancos y negros respectivamente. Los cambios de la señal normalizada ( $\alpha$ ) de la actividad catalítica se indican con cuadrados, mientras que la de la fluorescencia intrínseca se muestra con triángulos, los cambios en CME se representan con círculos. Los experimentos se realizaron en las mismas condiciones que la enzima silvestre (Fig. 9). En el panel A, las líneas continuas indican el ajuste de los datos a la ecuación 11, mientras que las líneas de los paneles B y C son ajustes a la ecuación 12. Los experimentos se realizaron cuatro veces. Las barras de error se removieron para observar mejor los datos.

En general, los patrones de desplegamiento para todas las variantes de TbTIM pueden clasificarse como reversibles (enzimas silvestre y C39A) o parcialmente reversibles (C126A y C39A/C126A). En las mutantes de cisteína, el estudio de la dependencia de las transiciones conformacionales en la concentración de proteína, exhibió resultados equivalentes a los que se indican en la Fig. 10 (ambos paneles) para la enzima silvestre (datos no mostrados). De estos resultados se concluye que las transiciones bifásicas de todas las variantes exhiben la presencia de un intermediario dimerico estable. Dado que las curvas al equilibrio de las variantes C39A y C39A/C126A son similares a las exhibidas por la enzima silvestre y la mutante C126A, respectivamente, los experimentos subsecuentes se realizaron exclusivamente en la variante C126A. Como se muestra en la Fig. 15A, al igual que en la enzima silvestre, los cambios de las propiedades hidrodinámicas de la mutante C126A sugieren la presencia de intermediarios monoméricos con tendencia a asociarse.



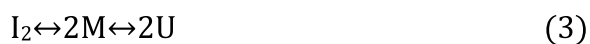
**Figura 15.** (A) Señales normalizadas ( $\alpha$ ) de las transiciones conformacionales de las variantes silvestre a 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $\square$ ) y C126A (círculos), determinadas por filtración en gel. Alícuotas de una solución de proteína en la concentración de 1.5  $\text{mg/mL}$  y en 6 M GuHCl, fueron diluidas en soluciones de GuHCl en las concentraciones finales de proteína de 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $\circ$ ) ó 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $\bullet$ ) e incubadas durante 12 ó 2 h respectivamente. Las líneas continuas son ajustes de los datos a las ecuaciones 11 ó 12 para las enzimas silvestre o C126A, respectivamente. En los paneles B a E se indican los perfiles de elución representativos de las especies estables  $N_2$ ,  $I_2$ , 2M y 2U de la TbTIM silvestre (líneas continuas) y de la C126A (líneas discontinuas), en una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

En la mutante C126A, los cambios en la elipticidad asociados a su replegamiento exhibieron la presencia del intermediario monomérico. Estos resultados se indican en la Fig. 16 y, para comparar los datos de la mutante con los de la enzima silvestre, los resultados de esta última también se muestran.

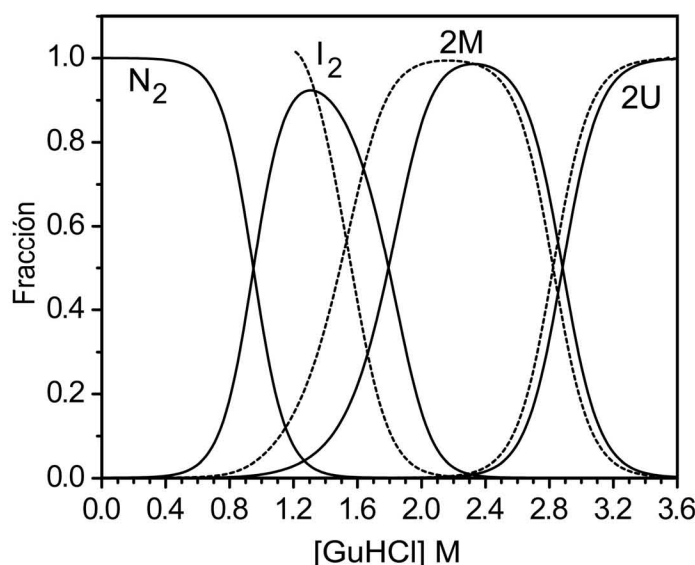


**Figura 16.** Señales normalizadas ( $\alpha$ ) de las transiciones de replegamiento de las variantes silvestre (■) y C126A (●) siguiendo el cambio en la elipticidad molar a 224 nm y en el CME de la mutante (○). Los experimentos se realizaron usando una concentración de proteína de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las líneas continuas son ajustes de los datos a las ecuaciones 11 ó 12 para las enzimas silvestre o C126A, respectivamente. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones utilizando la misma muestra. Las barras de error se removieron de la serie del cambio en CME para observar mejor los datos.

La comparación entre las transiciones de replegamiento de la mutante C126A y la enzima silvestre, indica que entre 1.4 y 2.4 M GuHCl la mutante C126A es menos estable (Fig. 15 y Fig. 16). Mientras que entre 2.5 y 4 M GuHCl, la transición de la mutante C126A se sobrepone con la transición mostrada por la silvestre. Dado que el desplegamiento de la mutante C126A fue parcialmente reversible, las transiciones reversibles de las Fig. 11B y 11C, 9A y 10A se ajustaron al siguiente mecanismo:



Los parámetros termodinámicos resultantes se indican en la Tabla 1. La estabilidad relativa de la conformación  $I_2$  – C126A se redujo en 2.8 kcal·mol<sup>-1</sup>, valor determinado según la ecuación  $\Delta\Delta G = mC_{1/2}^{silv} - mC_{1/2}^{mut}$ . Mientras que la mutación C126A no afectó el cambio en energía libre asociado a la transición  $2M \leftrightarrow 2U$ . De acuerdo con los valores de  $\Delta\Delta G$ , entre 1.2 y 2.2 M GuHCl la población conformada por el estado  $2M$  – C126A es ligeramente mayor con respecto a  $I_2$  – C126A, mientras que las poblaciones relativas de  $2M$  – C126A y  $2U$  – C126A no fueron afectadas por la mutación (Fig. 17).

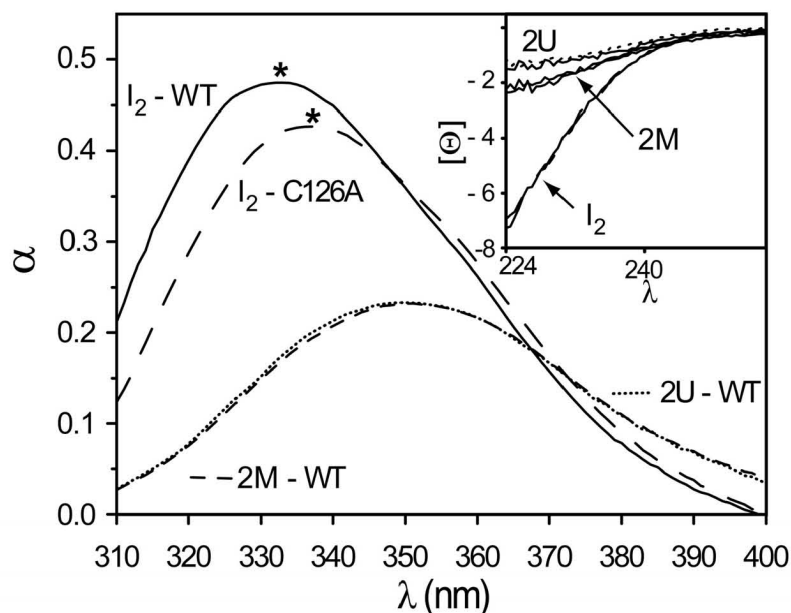


**Figura 17.** Poblaciones de las especies estables de las transiciones conformacionales de las variantes silvestre (líneas continuas) y mutante C126A (líneas discontinuas) en la concentración de proteína de 20  $\mu$ g/mL. La fracción de cada especie molecular fue determinada utilizando los parámetros termodinámicos de la Tabla 1.

### ***Propiedades estructurales de los intermediarios de plegamiento***

Los espectros de emisión de fluorescencia y DC en el UV lejano de las conformaciones  $I_2$  y  $2M$  se muestran en la Fig. 18. Aunque el espectro de fluorescencia intrínseca del intermediario  $2M$  es indistinguible al de los monómeros desplegados  $2U$ , esta conformación exhibe aproximadamente el 10% de elipticidad molar a 224 nm en comparación con la enzima nativa  $N_2$ . En las figuras 9B y 14ABC se muestra que a consecuencia del

despliegamiento, el valor del CME de las conformaciones  $I_2$ , 2M y 2U se desplaza hacia mayores longitudes de onda, indicando un aumento en la exposición de los residuos de triptofano hacia el medio acuoso.<sup>46</sup> Cabe mencionar que el desplazamiento de 3 nm desde 335 a 338 nm, observado en el máximo de emisión de la conformación  $I_2$ -C126A comparado con el  $I_2$ -silvestre, sugiere una mayor exposición de los triptofanos en el intermediario mutante. Asimismo, la comparación entre los valores normalizados del  $R_S$  de los intermediarios  $I_2$  - C126A e  $I_2$  - silvestre indica que el intermediario mutante es menos compacto (Fig. 15A y 15C). Tomando en cuenta las correlaciones propuestas entre los valores de  $m$  y los cambios en el área de la proteína accesible al solvente, es decir  $\Delta ASA$ ,<sup>44</sup> el cambio entre la compactación de los estados  $I_2$  es congruente con la diferencia entre los valores de  $m_2$  de la Tabla 1. Dada la menor compactación de la estructura de  $I_2$  - C126A, se procedió a evaluar si la conformación mutante exhibe una mayor tendencia a la agregación.



**Figura 18.** Espectros normalizados de la emisión de fluorescencia y espectros de DC en el UV lejano (recuadro) de los intermediarios de plegamiento de la TbTIM. En todos los casos se tomaron alícuotas de soluciones en el equilibrio en la concentración de proteína de 0.8 mg/mL y en 5.6 M GuHCl, posteriormente fueron diluidas para obtener una concentración final de proteína de 0.2 mg/mL y de 1.4 ( $I_2$ ), 2.6 (2M) y 4.5 (2U) M GuHCl e incubadas por 30 min.  $[\theta]$  es la elipticidad promedio por residuo y tiene unidades de  $\text{grados}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1} \times 10^{-3}$ .

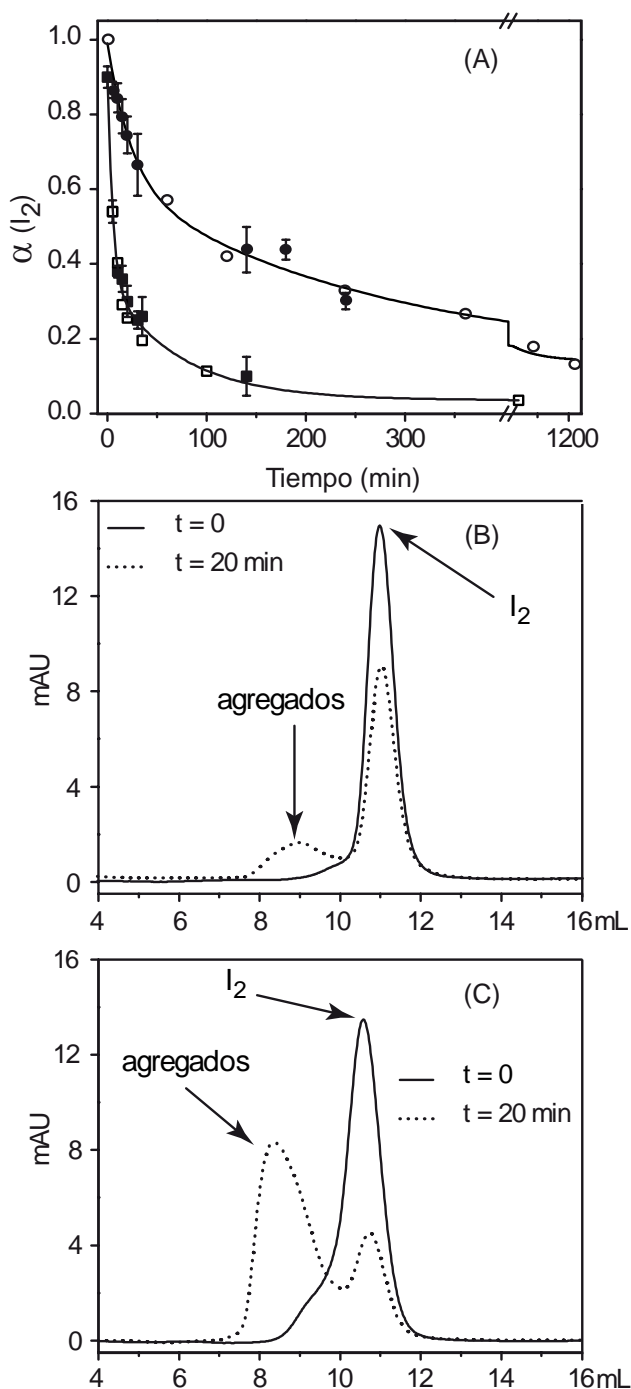
### *Determinación de la estabilidad cinética de los intermediarios I<sub>2</sub>*

En concentraciones bajas de GuHCl, las transiciones de replegamiento de las variantes silvestre y C39A (Fig. 9B), exhiben diferencias en comparación con las transiciones de las mutantes de C126 (Fig. 14B y 14C). En estas últimas mutantes, las mediciones de actividad y fluorescencia en GuHCl < 1 M, indican que el plegamiento hacia N<sub>2</sub> desde I<sub>2</sub> es parcial. La presencia de agregados de alto peso molecular en concentraciones de aproximadamente 1 M GuHCl observada en los experimentos de cromatografía de filtración en gel (no se muestran los datos) sugiere que en concentraciones bajas de desnaturizante la velocidad de agregación de I<sub>2</sub> es mayor que la velocidad de su plegamiento hacia N<sub>2</sub>. A fin de comparar la tendencia a la agregación entre las variantes silvestre y C126A, los intermediarios I<sub>2</sub>, se incubaron durante los intervalos de tiempo indicados en la Fig. 19A.

Las mediciones se realizaron a 23°C en soluciones que contenían la concentración de proteína de 500 µg/mL y 1.4 M GuHCl. La cinética de agregación de I<sub>2</sub> fue determinada mediante dos aproximaciones experimentales distintas. Se realizaron experimentos de filtración en gel para calcular las proporciones del intermediario I<sub>2</sub> y de los agregados de alto peso molecular mediante los cambios en el área de los picos de elución. Los perfiles cromatográficos iniciales y luego de 20 min de incubación del intermediario I<sub>2</sub> se muestran en las Figuras 19B y 19C. Adicionalmente, alícuotas de la solución de I<sub>2</sub> fueron diluidas 25 veces en amortiguador A, e incubadas durante 12 h para su posterior determinación de actividad en el estado estacionario. Así, la fracción de proteína soluble se calculó indirectamente mediante la actividad recuperada en función del tiempo de incubación de I<sub>2</sub>. Como se muestra en la Fig. 19A, los cursos temporales de la agregación de I<sub>2</sub> son esencialmente los mismos utilizando ambas aproximaciones experimentales. El mejor ajuste para estos datos fue el descrito por una función exponencial doble, la cual indica dos constantes de

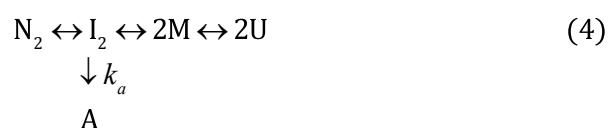
**Figura 19.** Agregación de los intermediarios  $I_2$  de plegamiento de las variantes de TbTIM.

(A) Cinética de agregación del  $I_2$  - silvestre (círculos) y del  $I_2$  - C126A (cuadrados) determinada mediante cambios en los perfiles de elución (símbolos blancos) y la recuperación de actividad catalítica (símbolos negros) luego de los periodos de incubación indicados en el eje de las abscisas. Las líneas sólidas indican el ajuste de los datos a una función exponencial doble. Los datos de actividad representan el promedio de dos experimentos independientes medidos por duplicado. Los intermediarios se obtuvieron de la siguiente manera: alícuotas de soluciones en el equilibrio en la concentración de proteína de 2 mg/mL y en 5.6 M GuHCl fueron diluidas en amortiguador A para obtener una concentración final de proteína de 0.5 mg/mL y de 1.4 M GuHCl. Perfiles de elución ilustrativos de las muestras del  $I_2$  - silvestre (B) y del  $I_2$  - C126A (C) en el tiempo inicial y luego de ser incubados durante 20 min. Los intermediarios silvestre y mutante exhibieron un volumen de elución de 10.9 y 10.6 mL respectivamente. Los agregados de alto peso molecular se observan en el volumen muerto, aproximadamente en 8 mL.





velocidad aparentes: una fase rápida que exhibe una  $k_1$  de  $0.04 \text{ min}^{-1}$  y una fase lenta con una  $k_2$  de  $0.004 \text{ min}^{-1}$  asociadas a la agregación del  $I_2$  – silvestre. Por su parte, las constantes de velocidad de agregación del intermediario  $I_2$  – C126A tienen valores aproximadamente cinco veces mayores con respecto a las de la enzima silvestre, las cuales exhiben los valores  $0.2$  y  $0.014 \text{ min}^{-1}$ . En ningún caso las desviaciones estándar de los ajustes excedieron a  $7\%$ . A pesar de que en la mutante C126A el aumento en la constante de agregación es estadísticamente significativo, la velocidad de agregación no es suficientemente alta para evitar el plegamiento de algunas moléculas desde  $I_2$  hacia  $N_2$ . Considerando que en ambas variantes los cursos temporales de agregación son descritos por funciones exponenciales dobles, es posible que los mecanismos moleculares conducentes a la agregación sean similares. Dichos procesos no fueron estudiados en este trabajo, sin embargo, es probable que sean mediados por la fuerza iónica de bajas concentraciones de GuHCl como se describió recientemente para otro intermediario de plegamiento.<sup>47</sup> En conjunto, los resultados de las mediciones cinéticas y en el equilibrio apuntan hacia un mecanismo general para las variantes de TbTIM:



Donde la  $k_a$  exhibe un valor significativamente mayor en la ausencia del grupo sulfhidrilo de la Cys126. Estos datos apoyan la conclusión del efecto cinéticamente estabilizante de la Cys126 en la estructura de la TbTIM, dado que en un estudio previo hemos reportado que la constante aparente de velocidad de replegamiento es casi cinco veces menor en la mutante C39A/C126A comparada con la enzima silvestre (ver Tabla 2).<sup>40</sup>

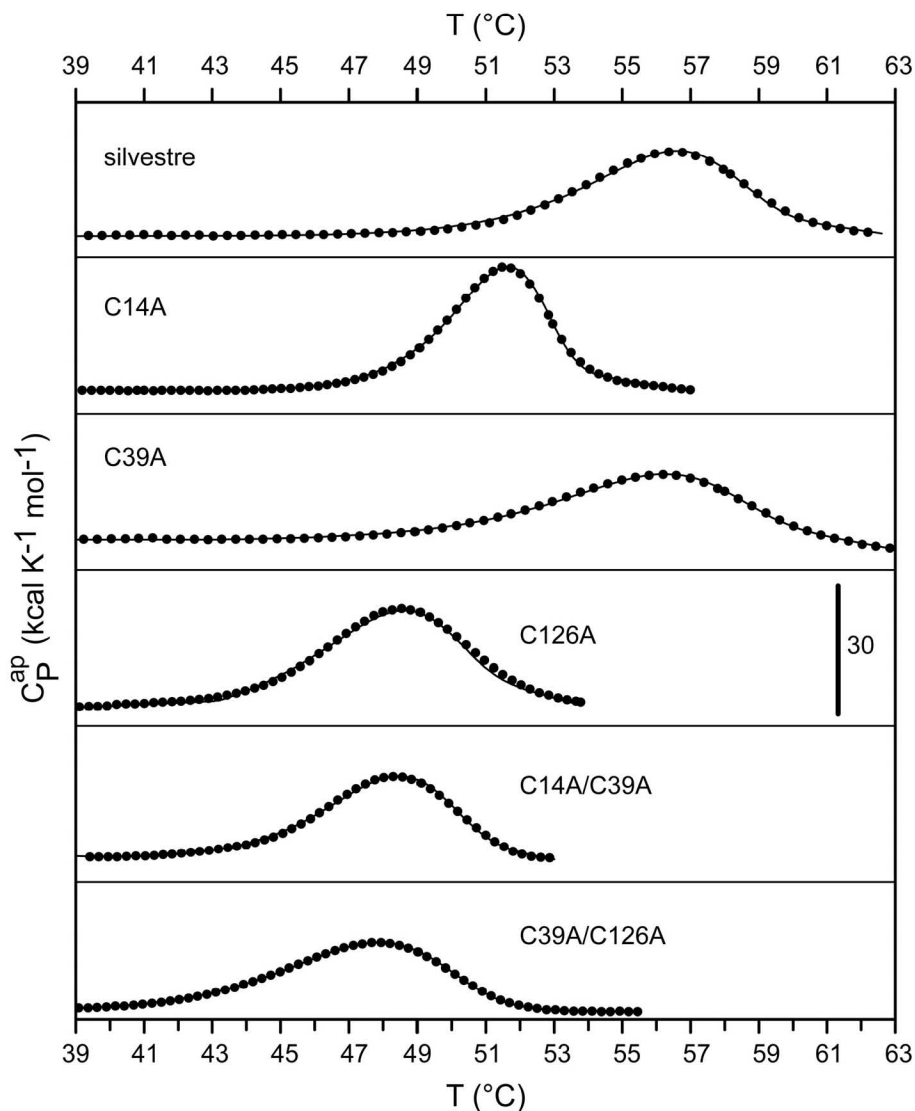
### *Estabilidad cinética de las conformaciones nativas*

#### *Experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

En este trabajo se realizaron experimentos preliminares de DSC para evaluar la estabilidad cinética de las conformaciones mutantes C14A, C39A, C126A, C14A/C39A y C39/C126A. Dada la existencia de un reporte que demuestra que el desplegamiento de la enzima nativa TbTIM se ajusta al modelo irreversible de dos estados,<sup>45</sup> no es sorprendente que en las mutantes de cisteína se observara un comportamiento similar. Todas las variantes exhibieron transiciones conformacionales irreversibles independientes de la concentración de proteína que se ajustaron adecuadamente al modelo mencionado. En la Fig. 20 se muestran ejemplos de los termogramas de las enzimas silvestre y mutantes. Dado que este es un estudio preliminar, las transiciones fueron evaluadas utilizando sólo una velocidad de barrido y dos concentraciones de proteína distintas. Sin embargo, aunque las trazas calorimétricas fueron ajustadas adecuadamente, la validez de la aplicación del modelo de dos estados depende de la coincidencia entre los parámetros derivados de experimentos realizados utilizando diferentes velocidades de barrido. Esta validez ha sido demostrada recientemente mediante experimentos realizados en diferentes velocidades de calentamiento, los cuales también demostraron que el proceso se encuentra bajo control cinético.<sup>2</sup>

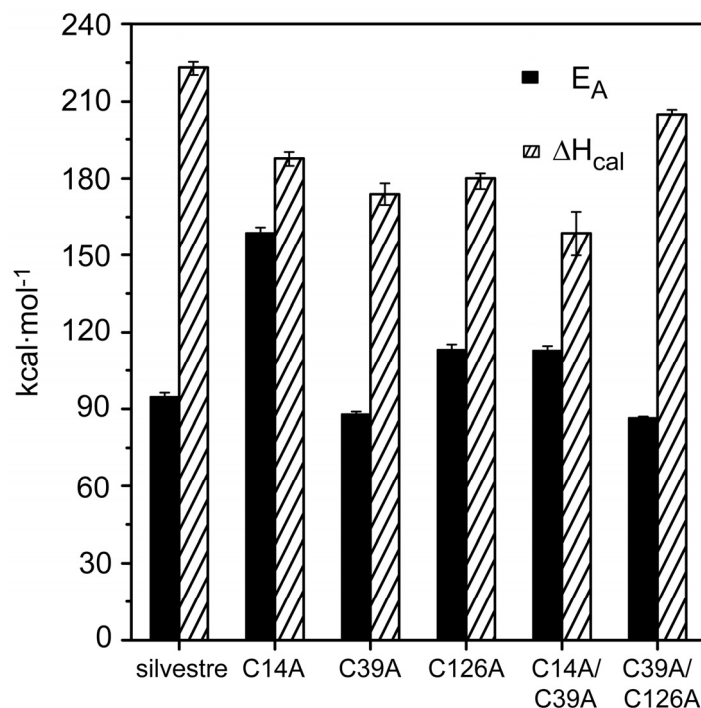
---

<sup>2</sup> Experimentos y análisis realizados por el tesista de licenciatura Miguel Ángel Magaña Fuentes, grupo de trabajo del Dr. Miguel Costas.



**Figura 20.** Termogramas de DSC del desplegamiento de las variantes de TbTIM utilizando una velocidad de calentamiento de 1.0 °C/min. Los círculos representan a los datos experimentales de la capacidad calorífica aparente, mientras que las líneas son los ajustes al modelo irreversible de dos estados.

Los cálculos de la energía de activación  $E_A$  y  $\Delta H_{cal}$  asociados al desplegamiento térmico de las variantes se obtuvieron de los ajustes individuales de cada traza calorimétrica. En la Fig. 21 se observa que la  $E_A$  determinada para la enzima silvestre exhibe un valor prácticamente idéntico a las 95 kcal·mol<sup>-1</sup> determinadas mediante la misma aproximación para la TbTIM, empleando velocidades en el rango entre 0.5 y 2.5 K min<sup>-1</sup>.<sup>45</sup> Los efectos de las mutaciones C14A y C39A en la  $E_A$  se observan en la Fig. 21.



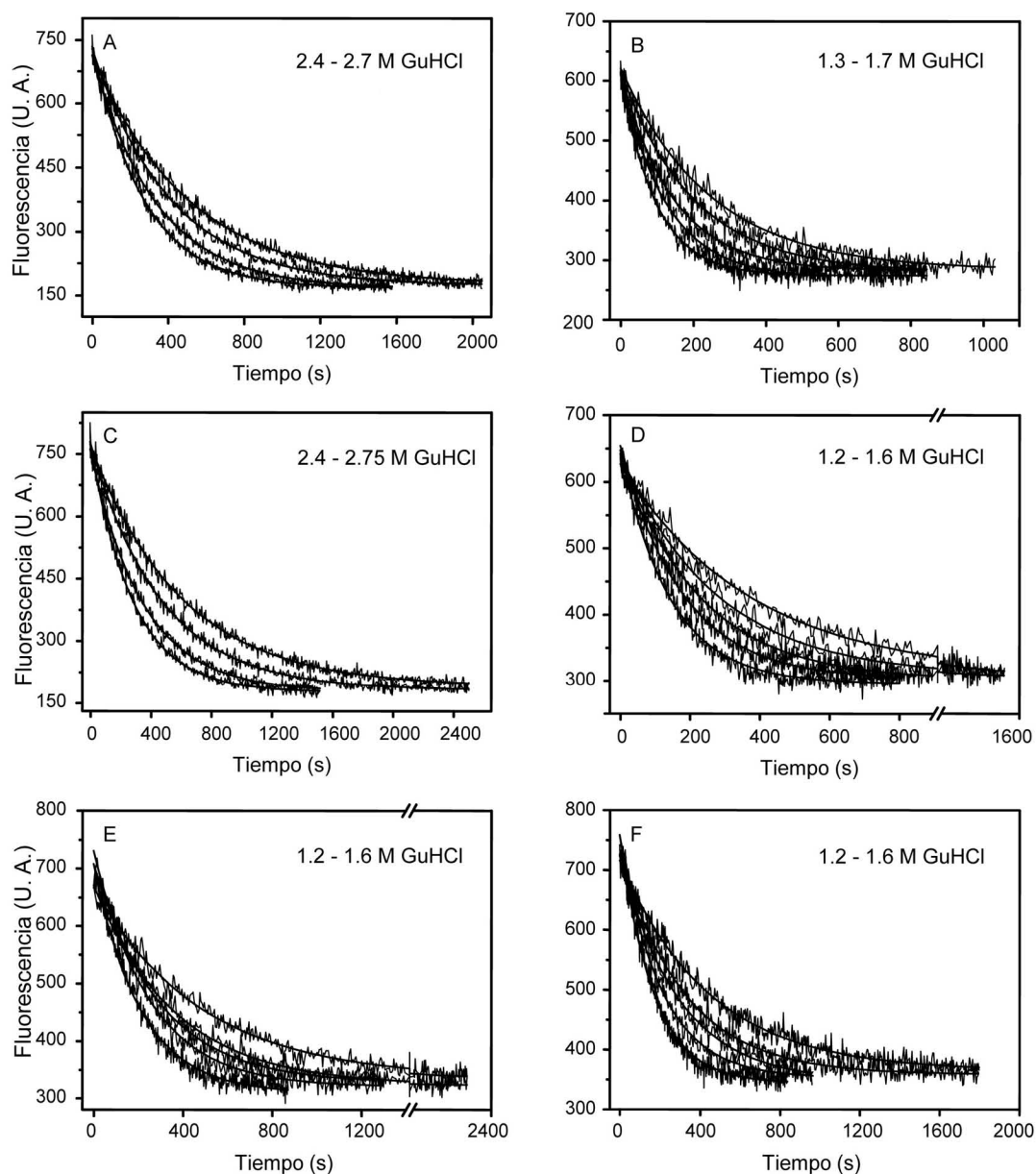
**Figura 21.** Energías de activación ( $E_A$ ) y cambios en las entalpías calorimétricas ( $\Delta H_{cal}$ ) para las variantes de TbTIM, los parámetros se obtuvieron mediante el ajuste de los datos de la Figura 20 al modelo irreversible de dos estados.

Comparadas con la enzima silvestre, en la mutante C14A se observa un aumento significativo en la  $E_A$  de 64 kcal·mol<sup>-1</sup>, por otro lado, la mutación C39A disminuye este parámetro en 46 ó 27 kcal·mol<sup>-1</sup> en presencia de una segunda mutación en C14A ó C126A respectivamente. El valor de la  $E_A$  se relaciona con la diferencia de energía entre el estado nativo y el estado de transición. De acuerdo con la teoría del estado de transición, la energía de activación es igual a la entalpía de activación. Así, es posible obtener el  $\Delta\Delta H^\ddagger$  ocasionado por las mutaciones mediante la expresión  $\Delta\Delta H^\ddagger = \Delta H^\ddagger_{mut} - \Delta H^\ddagger_{silv.}$

#### *Cinética del desplegamiento de $N_2$ inducido por GuHCl a 37°C*

Para determinar el cambio en energía libre de activación entre la conformación nativa y el estado de transición del desplegamiento, estudiamos la cinética del desplegamiento de  $N_2 \rightarrow I_2$  a 37°C. Los experimentos se realizaron en el rango de concentración de GuHCl en el que las amplitudes permanecieron constantes a fin de minimizar la distorsión

causada por otros procesos, por ejemplo la agregación o el desplegamiento de  $I_2$ . En todas las variantes el desplegamiento exhibió cursos temporales que se ajustaron a una exponencial sencilla (Fig. 22).



**Figura 22.** Cinética del desplegamiento de la conformación  $N_2$  hacia  $I_2$  en las variantes de TbTIM a 37°C. Los cursos temporales del desplegamiento en las concentraciones indicadas de GuHCl se muestran para las variantes silvestre (A), C14A (B), C39A (C), C126A (D), C14A/C39A (E) y C39A/C126A (F). En todos los casos las series están ajustadas a una función exponencial sencilla.

El gráfico del logaritmo natural de las constantes de velocidad se ajusta a una recta (datos no mostrados), el cual es un comportamiento esperado en la mayoría de las proteínas globulares en condiciones donde la concentración de GuHCl es mayor a la  $C_{1/2}$ . Las pendientes y ordenadas al origen de los ajustes lineales se muestran en la Tabla 3.

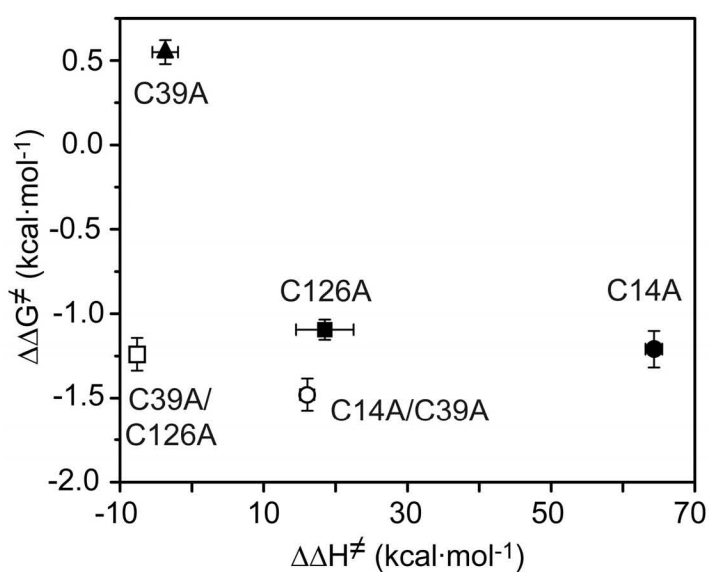
**Tabla 3.** Parámetros cinéticos del desplegamiento de las variantes de TbTIM a 37°C

variante	$\ln k_{H_2O}$	$^a k_{H_2O}$	$^a m_{\neq-N_2}$	R <sup>2</sup>
silvestre	-11.07	9.3E-04 (2E-05)	1.22 (0.06)	0.96
C14A	-9.11	6.6E-03 (3E-04)	1.71 (0.20)	0.92
C39A	-11.97	3.8E-04 (3.E-05)	1.40 (0.23)	0.97
C126A	-9.24	5.8E-03 (1.E-04)	1.65 (0.08)	0.90
C14A/C39A	-8.72	9.8E-03 (3E-04)	1.32 (0.11)	0.91
C39A/C126A	-9.07	6.9E-03 (3E-04)	1.51 (0.17)	0.98

<sup>a</sup> Los valores de la  $k_{obs}$  y  $m$  están dados en  $\text{min}^{-1}$  y  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  respectivamente. Los errores representan la desviación estándar de los ajustes y se muestran en paréntesis. El parámetro  $m$  describe la dependencia lineal del  $\ln k$  en la concentración de GuHCl para el desplegamiento de  $N_2 \rightarrow I_2$ .

Los efectos de las mutaciones en la energía libre de activación a 37 °C fueron determinados a partir de las constantes de desplegamiento de acuerdo a la siguiente relación:  $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln(k_{mut}/k_{silv})$ . Estos parámetros se indican en la Fig. 23, así como los cambios en la entalpía de activación ocasionados por las mutaciones  $\Delta\Delta H^\ddagger$ . Estrictamente, los valores del  $\Delta\Delta H^\ddagger$  y del  $\Delta\Delta S^\ddagger$  dependen de la temperatura de acuerdo al  $\Delta C_p^\ddagger$ . Sin embargo, dada la etapa preeliminar de este estudio se considerará que ambos parámetros permanecen constantes y que pueden compararse con el  $\Delta\Delta G^\ddagger$  determinado a 37°C. Es importante mencionar que el aumento significativo en la entalpía de activación ocasionado por las mutaciones C14A y C126A es superado por el efecto compensatorio de la entropía de activación  $T\Delta\Delta S^\ddagger = \Delta\Delta H^\ddagger - \Delta\Delta G^\ddagger$  y,

en consecuencia, las mutaciones disminuyen la estabilidad cinética. Esto es particularmente notorio en la mutante C14A, la cual exhibe un valor de  $\Delta\Delta G^\ddagger$  similar al de las dobles mutantes y al de la variante C126. Aunque en estas variantes el valor del  $\Delta\Delta H^\ddagger$  es significativamente menor al de la mutante C14A (Fig. 23), en éstas, la compensación energética del término  $T\Delta\Delta S^\ddagger$  fue significativamente menor. Este efecto compensatorio también se ha encontrado para algunas lipasas.<sup>48</sup>



**Figura 23.** Cambios en la energía libre de activación y entalpías de activación ocasionados por las sustituciones de residuos de cisteínas en la TbTIM.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la estabilidad termodinámica y cinética de las enzimas silvestre y de las mutantes de cisteína de la TbTIM. Caracterizamos la vía de plegamiento de la TbTIM silvestre utilizando al GuHCl como agente caotrópico. Además, se determinó la contribución del residuo de Cys126 en la estabilidad y en las propiedades estructurales del intermediario de plegamiento I<sub>2</sub>. También, encontramos que las transiciones conformacionales de la mutante C39A/C126A son similares a las de la mutante sencilla C126A. En este contexto, proponemos que a 23°C la mutación C39A no tiene efecto en los parámetros termodinámicos de la vía de plegamiento de la TbTIM.

### ***Transiciones conformacionales***

En esta tesis se indican condiciones experimentales que permiten estudiar el desplegamiento reversible de la TbTIM silvestre. Determinamos que en los experimentos de replegamiento la concentración de proteína utilizada es crítica en concentraciones de GuHCl menores a 0.4 M. Cuando se utilizan concentraciones de proteína mayores a 20 µg/mL se observa la presencia de agregados de alto peso molecular, mientras que en menores concentraciones de proteína la reversibilidad es disminuida y los controles son inestables. Estas condiciones contrastan con las reportadas por Chanez-Cárdenas, *et al.*,<sup>42</sup> en dicho estudio, el replegamiento se evaluó mediante la incubación de las muestras en soluciones de GuHCl entre 0 y 6 M y utilizando una concentración de proteína entre 2 y 5 mg mL<sup>-1</sup>; posteriormente, el replegamiento fue inducido mediante diluciones en amortiguador. En dicho estudio se demostró que, la reversibilidad del desplegamiento de la TbTIM depende de la concentración de proteína utilizada en el replegamiento y de la concentración de GuHCl de desnaturalización: cuando las muestras son desnaturalizadas a altas concentraciones de GuHCl y la concentración de proteína final en el



replegamiento es de 2 ó 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , el replegamiento es nulo o parcial respectivamente, mientras que en ambas concentraciones de proteína, la reversibilidad alcanza apenas el 10% cuando la especie nativa a 2 ó 5  $\text{mg mL}^{-1}$  es desnaturalizada en 1.5 M GuHCl (Figura 3 de la referencia mencionada). Es importante señalar que esos resultados son adecuadamente descritos por el mecanismo de desplegamiento propuesto por esta tesis. Asimismo la tendencia a agregar del intermediario de plegamiento  $I_2$  tiene como consecuencia la irreversibilidad del desplegamiento en concentraciones de GuHCl intermedias.

Los experimentos al equilibrio indican que la vía de plegamiento de la TbTIM incluye a dos intermediarios estables ( $I_2$  y 2M), los cuales fueron identificados por su afinidad al ANS y mediciones de DC en el UV lejano. Las especies  $I_2$  y 2M fueron las especies predominantes en concentraciones de GuHCl alrededor de 1.2 y 2.2 M, respectivamente (Fig. 12). Por tanto, para la enzima silvestre proponemos un modelo conformacional de cuatro estados (mecanismo 2). Los parámetros termodinámicos que describen a este mecanismo se indican en la Tabla 1 y muestran la gran estabilidad termodinámica tanto de los intermediarios monoméricos (2M) como de su asociación en la conformación  $I_2$ . La estabilidad total del intermediario  $I_2$  (49  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) es similar al cambio en energía libre entre los estados nativo y desplegado de la proteína dimérica Ure2p,<sup>49</sup> en cuya vía de plegamiento al equilibrio se exhibe a un intermediario dimérico a pH 7.5. De acuerdo a los datos de la Tabla 1, la contribución energética de la interacción entre subunidades es de al menos 19.6  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . La gran estabilidad termodinámica de la intercara dimérica parece ser una propiedad intrínseca de la TbTIM, ya que su desplegamiento térmico exhibe transiciones independientes de la concentración de proteína.<sup>45</sup> Los valores de  $\Delta G$  de la Tabla 1 indican que la contribución energética de la reacción de plegamiento  $2U \leftrightarrow 2M$  a la estabilidad total de la TbTIM es aproximadamente del 0.54, valor obtenido usando la expresión  $2\Delta G_3/\Delta G_{\text{tot}}$ , este dato es comparable con

el calculado para la TIM de *Trypanosoma cruzi*, TcTIM.<sup>50</sup> Por tanto, en las enzimas TbTIM y TcTIM, la energía del plegamiento del monómero contribuye en mayor medida a la estabilidad total en comparación con otras TIMs, en las cuales la contribución fraccional varía desde 0.14 a 0.32 para las enzimas de conejo y levadura respectivamente.<sup>51; 52</sup> Sin embargo, el valor del  $\Delta G_3$  de la TbTIM, es significativamente mayor que el cambio en energía libre asociado al plegamiento del monómero de TcTIM, calculado en 9 kcal·mol<sup>-1</sup>.<sup>50</sup> En cambio, la alta estabilidad del intermediario monomérico de la TbTIM es comparable al cambio en energía libre de desplegado de 15.4 kcal·mol<sup>-1</sup> determinado para la subunidad- $\alpha$  de la enzima triptofano sintasa ( $\alpha$ TS), una proteína monomérica que exhibe la topología de barril TIM.<sup>53</sup>

El mecanismo de plegamiento de cuatro estados que proponemos para la TbTIM contrasta con los modelos de dos o tres estados propuestos para otras TIMs silvestres. Por ejemplo, las transiciones conformacionales de la TIM de humano inducidas por urea se ajustan a un modelo de dos estados,<sup>54</sup> mientras que en la TIM de levadura la presencia de urea en concentraciones moderadas estabiliza a un intermediario monomérico.<sup>51</sup> Adicionalmente, se ha propuesto una vía de plegamiento que incluye a dos intermediarios diméricos para la mutante de la TIM de levadura, en la cual la hidrofobicidad de la intercara dimérica fue incrementada.<sup>55</sup> Aunque se sugiere la presencia de un intermediario dimérico en la vía de plegamiento de la TcTIM,<sup>50</sup> las transiciones conformacionales de esta enzima demuestran el efecto de la fuerza iónica en el estado oligomérico – la actividad del intermediario de plegamiento exhibe un aumento de 1.2 veces en la actividad catalítica comparado con la enzima nativa – alrededor de 0.5 M GuHCl. Estos datos indican que en las TIMs no existe un consenso entre sus vías de plegamiento a pesar de que sus cadenas principales exhiben la misma topología. Sin embargo, los análisis cinéticos y termodinámicos realizados en los barriles TIM monoméricos:  $\alpha$ TS, indol-3-glicerol fosfato sintasa, así como en la proteína codificada por el gen *ioll* de *Bacillus subtilis*,

todos ellos plantean que la topología de la cadena principal define la vía de plegamiento.<sup>43</sup> Cabe señalar que el intermediario de plegamiento I1 común en estas proteínas exhibe propiedades aparentemente similares a las de la conformación I<sub>2</sub>-silvestre. El intermediario I1 posee un valor de elipticidad molar aproximadamente de  $-8 \times 10^{-3}$  grados·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup> a 222 nm y se asocia débilmente para conformar homodímeros.<sup>43; 53; 56; 57; 58</sup> Además, para la proteína  $\alpha$ TS se detectó a un segundo intermediario de plegamiento monomérico I2, estable en concentraciones de urea alrededor de 5M. A pesar de la ausencia de estructura secundaria y de que todas las tirosinas se encuentran expuestas al solvente, el intermediario I2 es muy estable a consecuencia de interacciones hidrofóbicas residuales.<sup>59; 60</sup> A partir de estos datos no es posible determinar si las similitudes entre los intermediarios de plegamiento entre los barriles TIM y la TbTIM tienen alguna relación molecular. Para evaluar esta posibilidad es necesario estudiar los procesos conformacionales de la TbTIM utilizando técnicas de alta resolución como NMR.

### ***Efecto de la sustitución de la Cys126 en la TbTIM***

Los datos del replegamiento en el equilibrio para las mutantes de C126 fueron analizados de acuerdo al mecanismo 3, en el cual se omite la transición N<sub>2</sub>↔I<sub>2</sub>. La sustitución de la C126 disminuyó la estabilidad relativa de la conformación I<sub>2</sub> en aproximadamente 2.8 kcal·mol<sup>-1</sup>. Mientras que el valor de desestabilización aparente de aproximadamente 5 kcal·mol<sup>-1</sup> reportado para la mutante C126A de la TIM de levadura,<sup>35; 36; 61</sup> coincide con el valor del  $\Delta G_I$  de 5.5 kcal·mol<sup>-1</sup> calculado en la enzima silvestre. Ya que en el presente estudio no se determinó el  $\Delta G_I$  para la mutante C126A debido a que el proceso N<sub>2</sub>→I<sub>2</sub> es irreversible en nuestras condiciones experimentales, estos datos sugieren que la mutación C126A no afecta significativamente la estabilidad termodinámica de la TbTIM.

Sin embargo, el efecto cinético del Sy de la Cys126 se demostró por el

aumento en la tendencia a agregar del intermediario I<sub>2</sub>– C126A en comparación con el I<sub>2</sub>–silvestre bajo condiciones idénticas. Además, como se indica en un estudio previo,<sup>40</sup> la constante aparente de velocidad de replegamiento es cinco veces menor para la mutante C39A/C126A que para la enzima silvestre (0.016 *vs* 0.08 min<sup>-1</sup>). De acuerdo con el mecanismo 4, a medida que se acumulen las moléculas del intermediario I<sub>2</sub> – C126A, su plegamiento hacia la conformación nativa se verá comprometido dada la competencia cinética que favorecería la agregación de I<sub>2</sub>. El mismo estudio demostró que, aunque la presencia del fosfoglicolato –molécula análoga al estado de transición de la reacción catalizada por la TIM– duplica la velocidad del replegamiento, éste no modifica la tasa de moléculas que se repliegan hasta la conformación nativa.

Por tanto, en estas condiciones experimentales, el residuo de Cys126 aumenta la estabilidad cinética del intermediario de plegamiento dimérico I<sub>2</sub> en contraposición con la estructura que carece del Sy de la Cys126, la cual es altamente propensa a la formación de agregados de alto peso molecular. Estos resultados concuerdan con los estudios del desplegamiento de la TIM de levadura, que demostraron que la mutación C126A compromete la reversibilidad del desplegamiento térmico.<sup>35</sup>

### *Características estructurales de los intermediarios de plegamiento*

A continuación se muestra la lista de evidencias experimentales presentadas en otros trabajos, así como las evidencias presentadas en esta tesis que permiten sugerir una estructura probable para el intermediario de plegamiento I<sub>2</sub>.

1. **Estructura secundaria.** Las propiedades de la enzima silvestre mostradas en las Fig. 11, 12 y 18 indican que el contenido de estructura secundaria y terciaria en el intermediario I<sub>2</sub> permite ensamblar a la intercara dimérica y constituir además una conformación compacta. Como se observa en la Fig. 18, aproximadamente el 45% del contenido de hélices- $\alpha$

así como de la fluorescencia de los triptofanos se recuperan en el I<sub>2</sub>-silvestre a consecuencia de la asociación y plegamiento parcial de los monómeros desplegados (2U). Bajo la premisa de que las porciones plegadas del intermediario I<sub>2</sub>-silvestre están dadas por interacciones nativas, se propone que en el I<sub>2</sub> – silvestre el contenido de hélices- $\alpha$  podría corresponder a las hélices- $\alpha_{1-4}$ , dado que la intercara dimérica comprende a las asas<sub>1-4</sub>.

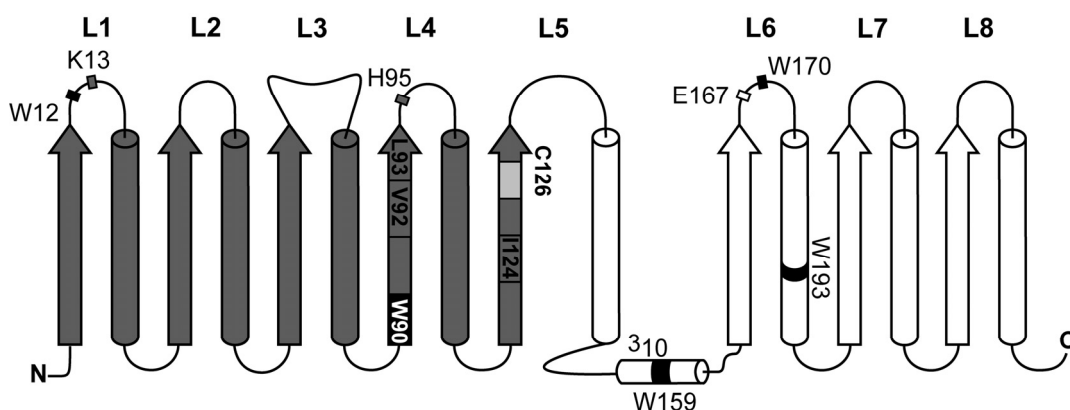
2. **Estructura terciaria.** Cada monómero de la TbTIM contiene cinco residuos de triptofano (Trp) en las posiciones 12, 90, 159, 170 y 193, los cuales se localizan respectivamente en el asa<sub>1</sub>, hebra- $\beta_4$ , hélice<sub>3-10</sub>, asa<sub>6</sub> y hélice- $\alpha_6$  (Fig. 24); sin embargo únicamente los residuos W12, W90 y W170 determinan la fluorescencia de la enzima. Se ha demostrado que ninguno de los residuos W159 y W193 contribuye a la fluorescencia intrínseca de la TIM, el primero porque es totalmente apagado por el W193, el cual a su vez se encuentra en la superficie de la proteína y expone su cadena lateral hacia el solvente.<sup>42; 62</sup> Debido a que el plegamiento desde I<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> exhibe una transición monofásica cooperativa, puede asumirse que los segmentos que comprenden a las hélice<sub>3-10</sub> y hélice- $\alpha_6$  no poseen una estructura regular en la conformación I<sub>2</sub>. Puesto que el intermediario I<sub>2</sub> – silvestre es un estado compacto ( $\alpha R_s = 0.8$ ), los contactos terciarios deberían incluir los módulos ( $\beta\alpha$ ) localizados en el extremo amino terminal, donde se localiza la intercara dimérica. Dado que la conformación I<sub>2</sub> es incapaz de llevar a cabo la catálisis, en la transición I<sub>2</sub>→N<sub>2</sub> debería ocurrir la reestructuración de los segmentos críticos para la catálisis –como el cierre concertado de las asas<sub>6-7</sub> y el reacomodo del residuo Glu167 localizado en el asa<sub>6</sub> sobre el sitio activo para la unión del ligando – localizados en el extremo carboxilo terminal de la proteína.<sup>63</sup> De acuerdo con esto, la fluorescencia parcial a 322 nm mostrada por la conformación I<sub>2</sub>-silvestre estaría reflejando la fluorescencia de los residuos W12 y W90. Así, el incremento en fluorescencia exhibido en el proceso de plegamiento desde I<sub>2</sub> hacia N<sub>2</sub> debería reflejar el posicionamiento adecuado del residuo W170, el cual se ubica en el asa<sub>6</sub> y establece enlaces de

hidrógeno en ambas conformaciones “abierta” y “cerrada” del sitio catalítico.<sup>42; 62</sup> Como se explica a continuación, el espectro de emisión del intermediario I<sub>2</sub>-C126A apoya esta hipótesis.

3. **Intermediario dimérico (I<sub>2</sub>).** El análisis de las estructuras de varias TIMs indica que el S $\gamma$  de la Cys126 establece un enlace de hidrógeno con los oxígenos de la cadena principal de los residuos Leu93 e Ile124 localizados respectivamente en las hebras- $\beta_4$  y  $\beta_5$ , además se encuentra a una distancia de 4.04 Å del C $\gamma_1$ H<sub>3</sub> de la Val92, localizada a su vez en la hebra- $\beta_4$  (Fig. 24).<sup>33; 34; 64</sup> Entre tales residuos alifáticos, la cadena lateral de la Ile124 se identificó como un elemento clave de un sitio de inicio y propagación del plegamiento de la TIM.<sup>65</sup> Además, en barriles TIM monoméricos se ha demostrado una correlación entre las zonas estructuradas en los intermediarios de plegamiento y la presencia de núcleos hidrofóbicos conformados por las cadenas laterales de aminoácidos alifáticos ramificados.<sup>66</sup> Por lo tanto, es lógico proponer que la alta propensión a agregar mostrada por el intermediario I<sub>2</sub> - C126A resulte de la exposición al solvente del núcleo hidrofóbico compuesto por los residuos Val92, Leu93 e Ile124. De acuerdo con la hipótesis de la contribución de los residuos W12 y W90 en la fluorescencia intrínseca del intermediario I<sub>2</sub>-silvestre, el cambio en 3 nm hacia el rojo mostrado por la  $\lambda_{max}$  del espectro de fluorescencia del I<sub>2</sub>-C126A (Fig. 18), sugiere una mayor exposición del W90, el cual se encuentra en la hebra- $\beta_4$ .

4. **Intermediario monomérico (2M).** En los intermediarios monoméricos (2M) las interacciones que mantienen compacta la estructura del I<sub>2</sub> se han eliminado al mismo nivel entre las enzimas silvestre y la mutante C126A; sin embargo, en ambas variantes existe el 10% de estructura residual de hélices- $\alpha$  (Fig. 18). Dada la similitud entre los espectros de fluorescencia de los intermediarios 2M y 2U (Fig. 18), se infiere que en la estructura residual de la conformación 2M ambos residuos W12 y W90, localizados en la intercara y en la hebra- $\beta_4$  respectivamente, se encuentran expuestos hacia el

solvente. Además, en el intermediario 2M la ausencia de señal de estos triptofanos indica tanto la disociación de las subunidades como la ausencia de contactos terciarios medibles en el barril- $\beta$ , ambos correlacionan con la conformación significativamente expandida mostrada por los experimentos de filtración en gel y unión a ANS (Fig. 11 y 12).



**Figura 24.** Diagrama esquemático de la estructura secundaria de la TbTIM. La región  $(\beta\alpha)_{1-4}\beta_5$  se muestra en gris oscuro. Las ocho asas que conectan a las hebras- $\beta$  con la hélice- $\alpha$  consecutiva se indican como L1 - L8. Los residuos de aminoácidos se indican de la siguiente manera: Cys126 en gris claro, W12-W193 en color negro, además se muestra a algunos aminoácidos hidrofóbicos de cadena ramificada y a los aminoácidos K12, H95 y E167 que participan en la catálisis.

Estos resultados aunados a los datos estructurales de los aminoácidos que contactan al Sy de la Cys126 sugieren que en la conformación  $I_2$  – silvestre, el segmento plegado corresponde al módulo estructural  $(\beta\alpha)_{1-4}\beta_5$  de cada monómero (Fig. 24). Además, ya que la Cys126 se localiza en el extremo carboxilo terminal de la hebra- $\beta_5$ , la estructura propuesta para el intermediario  $I_2$  sugiere que el residuo de Cys126 preservado por la evolución, define el límite de la región plegada en esta estructura. Para probar esta hipótesis, las conformaciones silvestre y mutante C126A del estado  $I_2$  deberán ser estudiadas con técnicas de alta resolución molecular.

## CONCLUSIÓN

Las transiciones conformacionales de las enzimas silvestre y mutantes de cisteína inducidas por GuHCl exhiben características particulares en comparación con otras proteínas TIM. Los experimentos de fluorescencia extrínseca y de DC en el UV-lejano evidenciaron la presencia de los intermediarios estables de plegamiento I<sub>2</sub> y 2M. La comparación entre la estabilidad cinética de los intermediarios I<sub>2</sub> –silvestre e I<sub>2</sub> –C126A demostró que el residuo C126A contribuye a la estabilidad cinética en contra de la agregación. Dada la gran cantidad de información estructural disponible de proteínas que exhiben topologías (β $\alpha$ )<sub>8</sub>, es posible obtener información estructural global para los intermediarios de plegamiento. Sin embargo, es necesaria su posterior caracterización estructural utilizando técnicas de alta resolución molecular. Debido a la alta estabilidad termodinámica de los intermediarios de plegamiento, es factible contemplar su participación en la vía de plegamiento en la célula o en su participación en los procesos conformacionales de transporte hacia el glicosoma. Así, el estudio de las interacciones entre las conformaciones parcialmente plegadas y otras moléculas presentes en las células es fundamental para la comprensión de los cambios conformacionales de la TbTIM en su contexto biológico.



## PERSPECTIVAS

1. Analizar la contribución de los residuos de cisteína en la estabilidad cinética y en el grado de solvatación de los estados de transición del desplegamiento. Para esto, actualmente el grupo del Dr. Miguel Costas realiza experimentos de DSC en estas variantes de TbTIM en presencia de concentraciones bajas de GuHCl.

2. Estudiar el mecanismo de agregación de I<sub>2</sub>.

3. Evaluar la posible asociación de los intermediarios monoméricos (2M) en concentraciones altas de proteína.

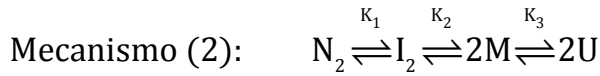
4. Caracterizar los pasos cinéticos asociados a la vía de plegamiento en el equilibrio.

5. Evaluar la posibilidad de formación de fibras amiloides a partir de los intermediarios de plegamiento.

6. Resolver la estructura de los intermediarios de plegamiento utilizando cristalografía de rayos X o NMR.

## APÉNDICE

Derivación de la ecuación 11:



Las constantes de equilibrio asociadas a los cambios en energía libre ( $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$  y  $\Delta G_3$ ) de cada paso se definen a continuación:

$$K_1 = \frac{I_2}{N_2}, K_2 = \frac{M^2}{I_2} \text{ y } K_3 = \frac{U}{M}$$

La fracción molar de cada especie estable está dada por:

$$f_{N_2} = \frac{2[N_2]}{Pt}, f_{I_2} = \frac{2[I_2]}{Pt}, f_M = \frac{[M]}{Pt} \text{ y } f_U = \frac{[U]}{Pt} \quad (1)$$

Donde Pt es la concentración molar de proteína en función de los monómeros y la suma de las fracciones de cada especie es igual a 1 como se indica en las siguientes expresiones:

$$Pt = [N_2] + [I_2] + [M] + [U] \quad (2)$$

$$1 = f_{N_2} + f_{I_2} + f_M + f_U \quad (3)$$

Sustituyendo a las concentraciones molares de la ecuación (2) con las constantes de equilibrio y las expresiones indicadas en (1), se obtiene la siguiente ecuación de segundo grado en función de  $f_M$ :

$$0 = f_M^2 \left( \frac{2Pt}{K_2} + \frac{2Pt}{K_1 K_2} \right) + f_M (1 + K_3) - 1 \quad (4)$$

Para la cual sólo la raíz positiva tiene un sentido físico y se indica en (5):

$$f_M = \frac{-(1 + K_3) + \sqrt{(1 + K_3)^2 + 8Pt \left( \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_1 K_2} \right)}}{4Pt \left( \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_1 K_2} \right)} \quad (5)$$

Así, a partir de la determinación de la  $f_M$  es posible el cálculo de las fracciones  $f_{N_2}$ ,  $f_{I_2}$  y  $f_U$ :

$$f_{N_2} = \frac{2f_M^2 Pt}{K_1 K_2}, f_{I_2} = \frac{2f_M^2 Pt}{K_2} \text{ y } f_U = f_M K_3 \quad (6)$$

Las cuales son sustituidas en la ecuación (7) que relaciona al dato de la variable medida ( $Y_{\text{obs}}$ ) con el valor de las diferentes fracciones molares

$$Y_{\text{obs}} = Y_{N_2}^{\text{obs}} f_{N_2} + Y_{I_2}^{\text{obs}} f_{I_2} + Y_M^{\text{obs}} f_M + Y_U^{\text{obs}} f_U \quad (7)$$

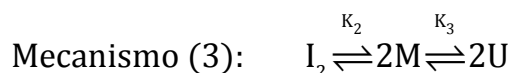
Para dar lugar a la expresión (8):

$$Y_{\text{obs}} = \frac{2Pt f_M^2 (Y_{N_2}^{\text{obs}} + Y_{I_2}^{\text{obs}} e^{-\Delta G_1/RT})}{e^{-(\Delta G_1 + \Delta G_2)/RT}} + Y_M^{\text{obs}} f_M + Y_U^{\text{obs}} f_M e^{-\Delta G_3/RT} \quad (8)$$

En la cual, al ser sustituidas las variables  $Y_{N_2}^{\text{obs}}$ ,  $Y_{I_2}^{\text{obs}}$ ,  $Y_M^{\text{obs}}$  y  $Y_U^{\text{obs}}$  por la ecuación correspondiente que describe la dependencia lineal de la propiedad medida en función de la concentración de desnaturalizante (C), se obtiene la ecuación (11) del texto principal (sección Análisis de los datos):

$$Y_{\text{obs}} = \frac{2Pt f_M^2 (Y_{N_2} + m_{N_2} C + (Y_{I_2} + m_{I_2} C) e^{-\Delta G_1/RT})}{e^{-(\Delta G_1 + \Delta G_2)/RT}} + (Y_M + m_M C) f_M + (Y_U + m_U C) f_M e^{-\Delta G_3/RT}$$

### Derivación de la ecuación 12:



El cálculo de la  $f_M$  del Mecanismo (3), utilizando el tratamiento algebraico descrito para el Mecanismo (2), se indica a continuación:

$$f_M = \frac{-(1+K_3) + \sqrt{(1+K_3)^2 + \frac{8Pt}{K_2}}}{4Pt} \quad (9)$$

Así, para el Mecanismo (3), la expresión final obtenida es la ecuación (12) del texto principal (sección Análisis de los datos):

$$Y_{\text{obs}} = \frac{f_M e^{-\Delta G_2/RT} (Y_M + m_M C + (Y_U + m_U C) e^{-\Delta G_3/RT}) + 2Pt f_M^2 (Y_{I_2} + m_{I_2} C)}{e^{-\Delta G_2/RT}}$$

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). *The behavior of biological macromolecules. Their Biophysical chemistry* pt 3, W. H. Freeman, San Francisco.
2. Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding*, W.H. Freeman, New York.
3. Nölting, B. (2006). *Protein folding kinetics : biophysical methods*. 2nd edit, Springer, Berlin ; New York.
4. Uversky, V. N. & Dunker, A. K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta* 1804, 1231-64.
5. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30.
6. Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White, F. H., Jr. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47, 1309-14.
7. Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique* 65, 45.
8. Baker, D. & Agard, D. A. (1994). Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry* 33, 7505-9.
9. Harrison, S. C. & Durbin, R. (1985). Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4028-30.
10. Schweitzer-Stenner, R. (2012). *Protein and peptide folding, misfolding, and non-folding*. Wiley series in protein and peptide science, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
11. Lim, W. K., Rosgen, J. & Englander, S. W. (2009). Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2595-600.
12. Tanaka, Y., Tsumoto, K., Umetsu, M., Nakanishi, T., Yasutake, Y., Sakai, N., Yao, M., Tanaka, I., Arakawa, T. & Kumagai, I. (2004). Structural evidence for guanidine-protein side chain interactions: crystal structure of CutA from *Pyrococcus horikoshii* in 3 M guanidine hydrochloride. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 323, 185-91.
13. Bloomfield. (2002). Thermodynamics and statistical thermodynamics. In *Biophysics Textbook Online* (V., D. F., ed.).
14. Cramer, W. A. & Knaff, D. B. (1990). *Energy transduction in biological membranes : a textbook of bioenergetics*. Springer advanced texts in chemistry, Springer-Verlag, New York.
15. Pace, C. N. G., Gerald R; and Scholtz, J Martin. (December 2009). Protein Stability. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* (Sons, J. W., ed.), Ltd: Chichester.
16. Rodriguez-Larrea, D., Minning, S., Borchert, T. V. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2006). Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *Journal of Molecular Biology* 360, 715-24.
17. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8.
18. Jaenicke, R. (1995). Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 348, 97-105.
19. Sanchez-Ruiz, J. M. (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J* 61, 921-35.

20. Sanchez-Ruiz, J. M., Lopez-Lacomba, J. L., Cortijo, M. & Mateo, P. L. (1988). Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* **27**, 1648-52.
21. Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophys Chem* **148**, 1-15.
22. Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2006). Differential Scanning Calorimetry of Proteins: an Overview and Some Recent Developments  
Advanced Techniques in Biophysics (Arrondo, J. L. R. & Alonso, A., eds.), Vol. 10, pp. 27-48. Springer Berlin Heidelberg.
23. Sanchez-Ruiz, J. M. (1995). Differential scanning calorimetry of proteins. *Subcell Biochem* **24**, 133-76.
24. Plaza del Pino, I. M., Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2000). Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins* **40**, 58-70.
25. Voet, D. & Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*. 4th ed. edit, Wiley, Hoboken, N.J.
26. Rothlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A. M., Jiang, L., DeChancie, J., Betker, J., Gallaher, J. L., Althoff, E. A., Zanghellini, A., Dym, O., Albeck, S., Houk, K. N., Tawfik, D. S. & Baker, D. (2008). Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* **453**, 190-5.
27. Saab-Rincon, G., Olvera, L., Olvera, M., Rudino-Pinera, E., Benites, E., Soberon, X. & Morett, E. (2012). Evolutionary Walk between (beta/alpha)<sub>8</sub> Barrels: Catalytic Migration from Triosephosphate Isomerase to Thiamin Phosphate Synthase. *J Mol Biol* **416**, 255-70.
28. Haanstra, J. R., van Tuijl, A., Kessler, P., Reijnders, W., Michels, P. A., Westerhoff, H. V., Parsons, M. & Bakker, B. M. (2008). Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 17718-23.
29. Galland, N., de Walque, S., Voncken, F. G., Verlinde, C. L. & Michels, P. A. (2010). An internal sequence targets Trypanosoma brucei triosephosphate isomerase to glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* **171**, 45-9.
30. Helfert, S., Estevez, A. M., Bakker, B., Michels, P. & Clayton, C. (2001). Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in Trypanosoma brucei. *Biochem J* **357**, 117-25.
31. Alahuhta, M. & Wierenga, R. K. (2010). Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: new insight in the proton transfer reaction mechanism. *Proteins* **78**, 1878-88.
32. Pe'er, I., Felder, C. E., Man, O., Silman, I., Sussman, J. L. & Beckmann, J. S. (2004). Proteomic signatures: amino acid and oligopeptide compositions differentiate among phyla. *Proteins* **54**, 20-40.
33. Kishan, K. V., Zeelen, J. P., Noble, M. E., Borchert, T. V. & Wierenga, R. K. (1994). Comparison of the structures and the crystal contacts of trypanosomal triosephosphate isomerase in four different crystal forms. *Protein Sci* **3**, 779-87.
34. Kursula, I. & Wierenga, R. K. (2003). Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-A resolution. *J Biol Chem* **278**, 9544-51.
35. 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.
36. Silverman, J. A. & Harbury, P. B. (2002). The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha)<sub>8</sub> barrel. *J Mol Biol* **324**, 1031-40.
37. Ralsler, M., Heeren, G., Breitenbach, M., Lehrach, H. & Krobitsch, S. (2006). Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization--not catalytic inactivity--of the mutant enzymes. *PLoS One* **1**, e30.

38. Samanta, M., Banerjee, M., Murthy, M. R., Balaram, H. & Balaram, P. (2011). Probing the role of the fully conserved Cys126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis--distal effects on dimer stability. *FEBS J* **278**, 1932-43.
39. Silverman, J. A., Balakrishnan, R. & Harbury, P. B. (2001). Reverse engineering the (beta/alpha)<sub>8</sub> barrel fold. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3092-7.
40. Guzmán-Luna, V. (2006). Participación de las cisteínas en la estabilidad y estructura de la triosafosfato isomerasa *Trypanosoma brucei*, Tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, UNAM.
41. Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. P., Callens, M., Noble, M. E., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. & Wierenga, R. K. (1993). Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* **211**, 703-10.
42. 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.
43. Forsyth, W. R., Bilsel, O., Gu, Z. & Matthews, C. R. (2007). Topology and sequence in the folding of a TIM barrel protein: global analysis highlights partitioning between transient off-pathway and stable on-pathway folding intermediates in the complex folding mechanism of a (betaalpha)<sub>8</sub> barrel of unknown function from *B. subtilis*. *J Mol Biol* **372**, 236-53.
44. Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* **4**, 2138-48.
45. Costas, M., Rodriguez-Larrea, D., De Maria, L., Borchert, T. V., Gomez-Puyou, A. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2009). Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol* **385**, 924-37.
46. Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York.
47. Povarova, O. I., Kuznetsova, I. M. & Turoverov, K. K. (2010). Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: molten globule state and aggregates. *PLoS One* **5**, e15035.
48. Rodriguez-Larrea, D., Minning, S., Borchert, T. V. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2006). Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *J Mol Biol* **360**, 715-24.
49. Zhu, L., Zhang, X. J., Wang, L. Y., Zhou, J. M. & Perrett, S. (2003). Relationship between stability of folding intermediates and amyloid formation for the yeast prion Ure2p: a quantitative analysis of the effects of pH and buffer system. *J Mol Biol* **328**, 235-54.
50. 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.
51. 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.
52. Rietveld, A. W. & Ferreira, S. T. (1996). Deterministic pressure dissociation and unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**, 7743-51.
53. Gualfetti, P. J., Iwakura, M., Lee, J. C., Kihara, H., Bilsel, O., Zitzewitz, J. A. & Matthews, C. R. (1999). Apparent radii of the native, stable intermediates and unfolded conformers of the alpha-subunit of tryptophan synthase from *E. coli*, a TIM barrel protein. *Biochemistry* **38**, 13367-78.

54. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J. M., Mande, 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.
55. 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.
56. Gualfetti, P. J., Bilsel, O. & Matthews, C. R. (1999). The progressive development of structure and stability during the equilibrium folding of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Protein Sci* 8, 1623-35.
57. Forsyth, W. R. & Matthews, C. R. (2002). Folding mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: a test of the conservation of folding mechanisms hypothesis in (beta(alpha))(8) barrels. *J Mol Biol* 320, 1119-33.
58. Wintrode, P. L., Rojsajakul, T., Vadrevu, R., Matthews, C. R. & Smith, D. L. (2005). An obligatory intermediate controls the folding of the alpha-subunit of tryptophan synthase, a TIM barrel protein. *J Mol Biol* 347, 911-9.
59. Saab-Rincon, G., Froebe, C. L. & Matthews, C. R. (1993). Urea-induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase: one-dimensional proton NMR evidence for residual structure near histidine-92 at high denaturant concentration. *Biochemistry* 32, 13981-90.
60. Saab-Rincon, G., Gualfetti, P. J. & Matthews, C. R. (1996). Mutagenic and thermodynamic analyses of residual structure in the alpha subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry* 35, 1988-94.
61. Cruces-Angeles, M. E., Cabrera, N., Perez-Montfort, R., Reyes-Lopez, C. A. & Hernandez-Arana, A. (2011). Thermodynamic and Kinetic Destabilization of Triosephosphate Isomerase Resulting from the Mutation of Conserved and Non-conserved Cysteines. *Protein Pept Lett*.
62. Sampson, N. S. & Knowles, J. R. (1992). Segmental movement: definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 31, 8482-7.
63. Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G. & Venkatesan, R. (2010). Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci* 67, 3961-82.
64. 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.
65. Kannan, N., Selvaraj, S., Gromiha, M. M. & Vishveshwara, S. (2001). Clusters in alpha/beta barrel proteins: implications for protein structure, function, and folding: a graph theoretical approach. *Proteins* 43, 103-12.
66. Gu, Z., Zitzewitz, J. A. & Matthews, C. R. (2007). Mapping the structure of folding cores in TIM barrel proteins by hydrogen exchange mass spectrometry: the roles of motif and sequence for the indole-3-glycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* 368, 582-94.

# The folding pathway of glycosomal triosephosphate isomerase: Structural insights into equilibrium intermediates

Valeria Guzman-Luna\* and Georgina Garza-Ramos

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

## ABSTRACT

The guanidine hydrochloride-induced conformational transitions of glycosomal triosephosphate isomerase (TIM) were monitored with functional, spectroscopic, and hydrodynamic measurements. The equilibrium folding pathway was found to include two intermediates ( $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2U$ ). According to this model, the conformational stability parameters of TIM are as follows:  $\Delta G_{I_2-N_2} = 5.5 \pm 0.6$ ,  $\Delta G_{2M-I_2} = 19.6 \pm 1.6$ , and  $\Delta G_{2U-2M} = 14.7 \pm 3.1$  kcal mol<sup>-1</sup>. The  $I_2$  state is compact ( $\alpha_{SR} = 0.8$ ); it is able to bind 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid ANS and it is composed of ~45% of  $\alpha$ -helix and tertiary structure content compared with the native enzyme; however, it is unable to bind the transition-state analog 2-phosphoglycolate. Conversely, the 2M state lacks detectable tertiary contacts, possesses ~10% of the native  $\alpha$ -helical content, is significantly expanded ( $\alpha_{SR} = 0.2$ ), and has low affinity for ANS. We studied the effect of mutating cysteine residues on the structure and stability of  $I_2$  and 2M. Three mutants were made: C39A, C126A, and C39A/C126A. The replacement of C39, which is located at  $\beta_2$ , was found to be neutral. The  $I_2$ -C126A state, however, was prone to aggregation and exhibited an emission maximum that was 3-nm red-shifted compared with the  $I_2$ -wild type, indicating solvent exposure of W90 at  $\beta_4$ . Our results suggest that the  $I_2$  state comprises the  $(\beta\alpha)_{1-4}\beta_5$  module in which the conserved C126 residue located at  $\beta_5$  defines the boundary of the folded segment. We propose a folding pathway that highlights the remarkable thermodynamic stability of this glycosomal enzyme.

Proteins 2012; 00:000–000.  
© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** hydrophobic clusters; kinetic stability; partially folded conformations; thermodynamic stability; TIM barrels.

## INTRODUCTION

Studying equilibrium folding pathways can reveal the principles that dictate the acquisition of a biologically relevant protein conformation. The dimeric triosephosphate isomerase of *Typanosoma brucei* (TbTIM) is an ideal model for studying the energetic contribution of quaternary interactions to the conformational stability of a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel enzyme, which is the most common fold found in nature. Triosephosphate isomerase (TIM) is a ubiquitous enzyme that catalyzes the fifth reaction in glycolysis. In mesophiles, the catalytically active conformation is a homodimer that depends on quaternary interactions to carry out the isomerization reaction. The typical  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel contains approximately 200–260 amino acids. In TbTIM, each subunit is composed of 250 residues. TbTIM must be located in the glycosome to carry out the physiological function, as the expression of TIM in the cytosol of *T. brucei* inhibits parasite growth.<sup>1</sup> Thus far, TIM is the only enzyme of *T. brucei* that is known to be devoid of the consensus motifs for either of the two reported peroxisome-targeting signals that are essential for glycosomal localization. Instead, TbTIM has an internal fragment of 22 amino acids (from 140 to 161) that transfers the protein inside glycosomes of *T. brucei*.<sup>2</sup>

Approximately, 10% of all known protein structures contain at least one  $(\beta/\alpha)_8$  barrel domain, which is also known as the TIM barrel. Not surprisingly, experimental and computational work has focused on the viability of this scaffolding for enzyme design.<sup>3</sup> A TIM barrel consists of an eightfold repeat of a  $\beta$ -strand-loop- $\alpha$ -helix ( $\beta\alpha$ ) motif. The eight  $\beta$ -strands form a central parallel  $\beta$ -sheet, which constitutes the major hydrophobic core, whereas the amphipathic  $\alpha$ -helices form the external envelop. In all known TIM barrels, the catalytic residues are located at the C-terminal ends of the  $\beta$ -strands and in the  $\beta/\alpha$ -loops. Our current understanding of the molecular folding mechanisms of TIM barrels is largely based on

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Abbreviations:**  $\alpha$ -GDH,  $\alpha$ -glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GuHCl, guanidine hydrochloride; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide hydride; PGA, 2-phosphoglycolate; TbTIM, Trypanosoma brucei TIM; TEA, triethanolamine; TIM, triosephosphate isomerase.

Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 41328.

\*Correspondence to: Valeria Guzman-Luna, Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. México, D.F. 04510, México. E-mail: valguz@laguna.fmedic.unam.mx

Received 7 September 2011; Revised 9 February 2012; Accepted 23 February 2012

Published online 12 March 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/prot.24063



the experiments performed on monomeric proteins.<sup>4</sup> Some of these proteins share common elements, such as folding subdomains, and have a C-terminal portion of the barrel that exhibits kinetic or thermodynamic instability.<sup>5–8</sup>

Although oligomeric proteins are widely distributed, their folding processes are poorly understood. Homodimers, such as mesophilic TIMs, are the simplest model system for studying protein–protein interactions. Folding studies of rabbit and yeast TIMs (rTIM and  $\gamma$ TIM) using high-resolution methods have determined the folding intermediate composition of  $\beta\alpha$ -motifs. For rTIM, hydrogen exchange mass spectrometry experiments have revealed the presence of a monomeric kinetic folding intermediate comprising the  $(\beta\alpha)_{4-8}$  fragment.<sup>9</sup> When monitoring the transient exposure of cysteine (Cys) residues using the misincorporation proton-alkyl exchange technique,  $\gamma$ TIM was found to exhibit a very stable core involving strands  $\beta_2$ - $\beta_4$ .<sup>10</sup> Previously, the studies of guanidine hydrochloride (GuHCl) or urea-induced unfolding of TbTIM have described partial unfolding reversibility and the presence of dimeric and monomeric states prone to aggregation.<sup>11,12</sup> These findings have demonstrated that TIMs do not share a common folding pathway *in vitro*. Here, we report the experimental conditions for the reversible unfolding of the wild-type (WT) TbTIM enzyme. The GuHCl-induced conformational transitions were fit to a four-state mechanism that includes two inactive, partially folded states. To characterize the folding intermediates, we studied how mutating the Cys residues would affect its structure and stability, as Cys is one of the most rarely used amino acids and can play important roles in the structure and function of proteins.<sup>13</sup> Each monomer of TbTIM contains three Cys residues at positions 14, 39, and 126. C14 is conserved across parasite TIMs. As it is buried in the dimer interface, its  $S_\gamma$  atom is accessible only in the monomeric conformation. The crystal structure (at 1.8 Å resolution) showed that the  $S_\gamma$ -C14 is 4.5 Å away from residues 68 to 79, which are part of loop<sub>3</sub> of the adjacent monomer.<sup>14</sup> C39 is located at the N-terminus of  $\beta_2$  and in human TIM it occupies position 41.  $S_\gamma$ -C39 is approximately 3.9 Å from the branched aliphatic residues I33 and V37.<sup>14</sup> C126 is a fully conserved residue at the C-terminal end of  $\beta_5$ . An analysis of the high-resolution structure of TIM (at 0.83 Å) showed that  $S_\gamma$ -C126 is in van der Waals contact with oxygen of the catalytic residue E167.<sup>15</sup> Also,  $S_\gamma$ -C126 is hydrogen bonded to the main chain oxygen of the branched aliphatic residues I124 and L93 from the  $\beta$ -barrel and 4.04 Å apart from the  $C_\gamma H_3$  of Val92.<sup>14,15</sup> Previous studies have reported that the substitution of Cys 126 has little effect on the catalytic activity of  $\gamma$ TIM but decreases the thermal unfolding reversibility, suggesting that this conserved residue is required for efficient folding and protein stability.<sup>10,16</sup> Interestingly, both the disease-causing mutant C41T of

human TIM and the C126 mutants of *Plasmodium falciparum* TIM exhibit a strongly altered dimerization behavior compared to the WT variant.<sup>17,18</sup>

An exhaustive combinatorial mutagenesis of  $\gamma$ TIM, using the catalytic activity in crude cell extracts as an assay, revealed that the central core of the  $\beta$ -barrel is highly sensitive to mutation, whereas the  $\beta/\alpha$  interfaces are more tolerant.<sup>19</sup> As the side chains of C39 and C126 point outward toward the  $\alpha$ -helices or toward the inside of the  $\beta$ -sheet, respectively, we studied the conformational transitions of mutants C39A and C126A. In addition, to assess the linkage between C39 and C126, which are 15 Å apart from each other diagonally through the  $\beta$ -barrel, we studied the stability of the double mutant C39A/C126A.

Our results provide the thermodynamic parameters of the folding pathway exhibited by the TbTIM. The presence of inactive intermediates (I<sub>2</sub> and 2M) with high thermodynamic stability is remarkable. Also, the mutant C126A exhibits both a higher tendency to aggregate and the slower folding rates compared to the WT, thus, demonstrating the essential role of Cys 126 in maintaining the kinetic stability of the enzyme.

## MATERIALS AND METHODS

### Site-directed mutagenesis

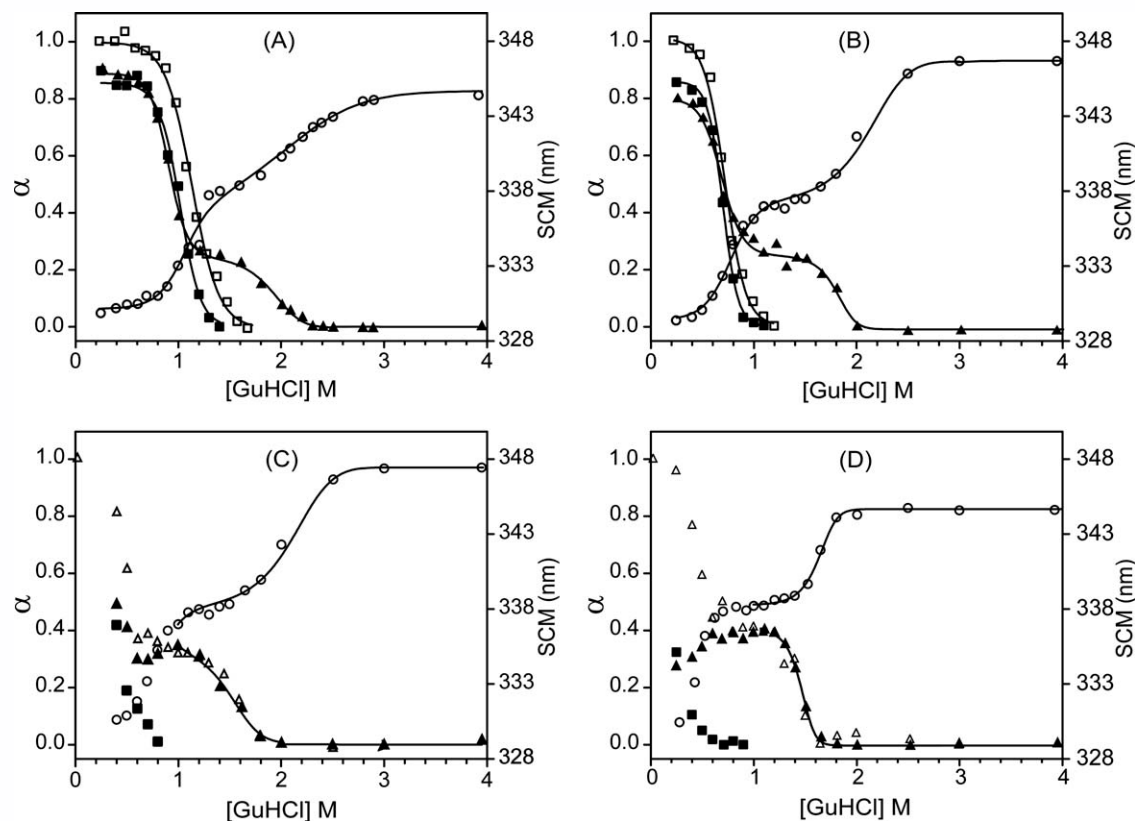
The Ala substitution of C39 and C126 in TbTIM was achieved by site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction (PCR) and the Expand High-Fidelity PCR System (Boehringer). To generate the double mutant C39A/C126A, the substitution was introduced in the C39A mutant gene using the appropriate mutagenic oligonucleotide (C126A). The PCR products were cloned into the pET3a vector after digestion with NdeI. After confirming the presence of the desired mutation by DNA sequencing, we used the mutant plasmids to transform BL21(DE3) pLysS cells (Novagen).

### Protein expression and purification

The expression and purification of the TbTIM variants were carried out as described by Chanez-Cardenas *et al.*<sup>11</sup> Cells expressing the Cys 126 mutants were incubated at 30°C after IPTG addition. The degree of protein purity was assessed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and catalytic activity at each purification step. The protein concentration was determined from the absorbance at 280 nm, using an absorption coefficient of  $A_{1\text{cm}}^{0.1\%} = 1.298$ .

### Guanidine hydrochloride-induced unfolding

The GuHCl-induced conformational equilibrium transitions were assessed for the TbTIM WT and Cys mutants (C39A, C126A, and C39A/C126A) at 23°C. For the unfolding transitions, we mixed 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final

**Figure 1**

Normalized signal ( $\alpha$ ) of the GuHCl-induced conformational transitions of the TbTIM variants: (A) WT, (B) C39A, (C) C126A, and (D) C39A/C126A, measured with catalytic activity assays of the unfolding/refolding transitions (open/black squares, respectively), intrinsic fluorescence (IF) of unfolding/refolding transitions (open/black triangles, respectively) and SCM of the refolding transition (circles). Experiments were performed at a protein concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  at the indicated [GuHCl], as explained in the Materials and Methods section. For (A) and (B), the data were fit to Eq. (1), whereas data from (C) and (D) were fit to Eq. (2). The experiments were performed four times; error bars were removed for clarity.

protein concentration with 100 mM triethanolamine (TEA) (pH 7.4), 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 1 mM dithiothreitol (buffer A), containing increasing concentrations of GuHCl. As the native conformation is kinetically stable at 23°C, we incubated the solutions until constant properties were observed (approximately, 7 days). For the refolding experiments, from Figure 1, the native protein was first incubated at 1 mg/mL in 6M GuHCl for 24 h to ensure complete denaturation. Then, the samples were diluted into buffer A at different GuHCl concentrations to attain a final protein concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and GuHCl in the range of 0.25–6M. At protein concentrations of 5–70 or 110–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , refolded samples were incubated for 12 or 2 h, respectively, to monitor steady-state changes. The GuHCl concentrations were verified by measuring the refractive index. The conformational transitions were monitored with catalytic activity assays, spectroscopic techniques, and size exclusion chromatography (SEC).

#### Catalytic activity assays

Activity was followed by measuring the rate of absorbance decrease at 340 nm in a Beckman DU7500 spectrophotometer that was maintained at a temperature of 25°C. The activity was measured in a 1-mL mixture of 100 mM TEA (pH 7.4), 10 mM EDTA, 0.2 mM nicotinamide adenine dinucleotide hydride (NADH), 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\alpha$ -glycerol-3-phosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GDH), 1 mM D-glyceraldehyde 3-phosphate, and 220 pM TbTIM (6 ng/mL). In the folding experiments, the protein concentration was at least 1500-fold higher than that used in the activity assays. Samples were first diluted to 11 nM TbTIM without varying the GuHCl concentration, and then 20  $\mu\text{L}$  was removed and added to the activity reaction mixture to yield a final protein concentration of 220 pM. The traces following the oxidation of NADH were linear, indicating that the residual concentration of GuHCl did not affect the coupling enzyme ( $\alpha$ -GDH). Furthermore, the curves obtained were analogous to those obtained with fluorescence, indicating that the

equilibrium between stable species was not distorted during the activity measurements.

### Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were obtained at 23°C with an Applied Photophysics Chirascan CD spectropolarimeter equipped with a Quantum Northwest TC 125 for temperature control. The far-UV CD spectra of the TIM samples in buffer A were measured in a 0.1-cm path-length cell, using 200 µg/mL protein solutions at selected GuHCl concentrations. Each spectrum was buffer-corrected.

### Fluorescence emission spectroscopy

Protein fluorescence was measured with an ISS PC1 spectrofluorimeter equipped with a Quantum Northwest TC 125 Temperature Controller. Emission data were collected from 300 to 390 nm at an excitation wavelength of 280 nm. The fluorescence spectral center of mass (SCM) was determined from the intrinsic fluorescence data ( $I_\lambda$ ) at each wavelength ( $\lambda$ ) by using the relationship:  $SCM = \Sigma \lambda I_\lambda / \Sigma I_\lambda$ . To monitor the progressive compaction of the protein molecules during refolding, pre-equilibrated samples at 40 and 70 µg/mL protein concentration were incubated with a 300-fold molar excess (per monomer concentration) of 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS) for 2 h at 23°C in the dark. Then, fluorescence emission spectra were measured from 420 to 600 nm with  $\lambda_{ex} = 360$  nm.

### Gel filtration

SEC was performed with a Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) analytical column coupled to an AKTA-FPLC system (Amersham Biosciences) equipped with a UV detector ( $\lambda = 280$  nm). The Stokes Radius ( $S_R$ ) of the stable species was calculated by interpolating the calibration curve (1000/V vs.  $S_R$ ) constructed as reported by Chanez-Cardenas *et al.*<sup>11</sup> To check the accuracy of this calibration curve, proteins from a standard molecular mass marker set were run through the column. Aliquots of 100 µL at 0.02–0.5 mg/mL protein concentration in 100 mM TEA (pH 7.4), 10 mM EDTA, and selected GuHCl concentrations were loaded onto the pre-equilibrated column. The samples were eluted at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>.

### Data analysis

Data were fitted to different folding models depending on the unfolding reversibility. The two models used for fitting of the data are described below. In each case, non-linear least-squares fitting of the data was carried out using the Microcal Origin version 7.0 software.

The activity, spectroscopic, and SEC data were globally treated with Eq. (1) or (2), which are modifications of the

two-state model proposed by Santoro and Bolen.<sup>20</sup> The GuHCl-induced unfolding of WT and mutant C39A was found to be fully reversible and exhibited monomeric and dimeric intermediates; thus, the data were fit to the following equation, which is related to the Mechanism (8):

$$Y_{obs} = \frac{2Pt f_M^2 (Y_{N_2} + m_{N_2} C + (Y_{I_2} + m_{I_2} C) e^{-\Delta G_1/RT})}{e^{-(\Delta G_1 + \Delta G_2)/RT} + (Y_M + m_M C) f_M + (Y_U + m_U C) f_M e^{-\Delta G_3/RT}}, \quad (1)$$

For mutants C126A and C39A/C126A, the GuHCl-induced unfolding was found to be partially reversible. The transitions  $I_2 \leftrightarrow 2M \leftrightarrow 2U$  [Mechanism (9)] reflect equilibrium conditions. Thus, for the variants C126A and C39A/C126A, the data were fit to the following three-state equation:

$$Y_{obs} = \frac{f_M e^{-\Delta G_2/RT} (Y_M + m_M C + (Y_U + m_U C) e^{-\Delta G_3/RT}) + 2Pt f_M^2 (Y_{I_2} + m_{I_2} C)}{e^{-\Delta G_2/RT}}, \quad (2)$$

with

$$\Delta G_1 = m_1 (C - C_{1/2})_1 \quad (3)$$

$$\Delta G_2 = RT \ln(P_t) + m_2 (C - C_{1/2})_2 \quad (4)$$

$$\Delta G_3 = m_3 (C - C_{1/2})_3, \quad (5)$$

where  $Y_{obs}$  is the signal of activity, spectroscopic, or SEC data;  $Y(N_2)$  is the signal for the native state for the WT and mutant C39A;  $Y(U)$ ,  $Y(M)$ , and  $Y(I_2)$  are the signals for the unfolded monomers and intermediate states 2M and  $I_2$ , respectively;  $P_t$  is the total protein concentration, expressed in monomer molarity;  $C$  is the molar GuHCl concentration;  $C_{1/2}$  is the GuHCl concentration at the middle of the transition;  $m(N_2)$ ,  $m(I_2)$ ,  $m(M)$ , and  $m(U)$  are the slopes that describe the signal dependence of the stable states on  $C$ ;  $f_M$  is the molar fraction of the partially folded monomers, expressed as a function of constants  $K_1$ ,  $K_2$ , and  $K_3$ ;  $K_1$ ,  $K_2$ , and  $K_3$  are equilibrium constants, for the conformational equilibria  $N_2 \leftrightarrow I_2$ ,  $I_2 \leftrightarrow 2M$ , and  $2M \leftrightarrow 2U$ , respectively from Mechanisms (8) and (9);  $m_1$ ,  $m_2$ , and  $m_3$  describe the linear dependence of  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$ , and  $\Delta G_3$  on the GuHCl concentration, respectively. For the WT and C39A,  $f_M$  may be solved analytically using the solution for the quadratic equation  $2P_t((1+K_1)/K_1 K_2) f_M^2 + (1+K_3) f_M - 1 = 0$ , in which only the positive root has physical significance, to give:

$$f_M = \frac{-(1+K_3) + \sqrt{(1+K_3)^2 + 8P_t((1+K_1)/K_1 K_2)}}{4P_t((1+K_1)/K_1 K_2)}, \quad (6)$$

A similar expression for  $f_M$  is obtained for the mutants of C126 by substituting the  $a$  constant from the quadratic equation for  $2P_i/K_2$ .

## RESULTS

### The TbTIM enzyme reversibly unfolds

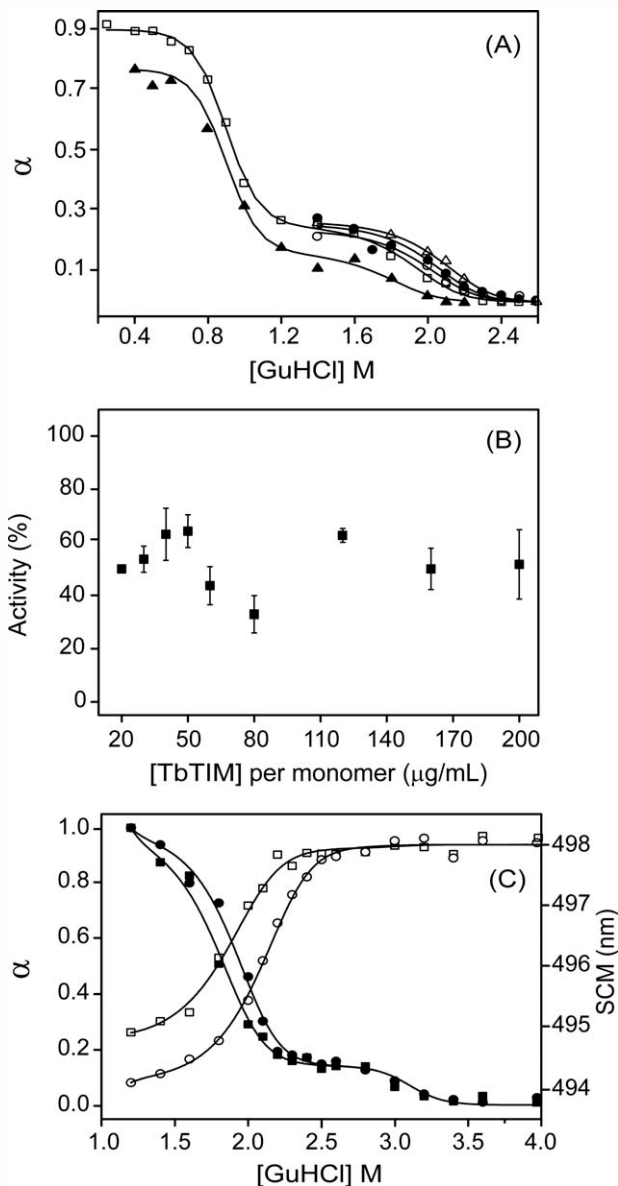
As shown in Figure 1(A), we show that TbTIM-WT reversibly unfolds when it is denatured by concentrated solutions of GuHCl. Previous studies of TbTIM unfolding have shown that its chemical denaturation produces aggregates of high molecular weight, precluding the reversibility of the process.<sup>11</sup> After testing the influence of protein concentration (5–200  $\mu\text{g/mL}$ ) and temperature (10–37°C) on TbTIM reactivation, we determined that at a protein concentration of 20  $\mu\text{g/mL}$  and a temperature of 23°C, GuHCl-induced unfolding is quite reversible, as  $\sim 90\%$  of the molecules are able to regain native properties [Fig. 1(A)]. Thus, for the reactivation experiments, protein samples at 1 mg/mL were incubated for 24 h in 6M-GuHCl and then diluted to a final protein concentration of 20  $\mu\text{g/mL}$  at the indicated GuHCl concentrations.

### The conformational equilibrium of TbTIM

To characterize the GuHCl-induced conformational transitions of TbTIM-WT, we first used fluorimetry and catalytic activity assays [Fig. 1(A)]. The biphasic curves of the normalized fluorescence and SCM suggest that the refolding process is defined by two equilibria, with an intermediate appearing at mild GuHCl concentrations (1.3–1.8M). The activity, however, decays in a single-phase coincident with the transition at low GuHCl concentrations (0.25–1.3M), indicating that the intermediate conformation is not catalytically active. To assess the oligomerization state of the folding intermediate, we determined the dependence of the transition curves on protein concentration. As shown in Figure 2A, we observed a shift, from 1.7M at 5  $\mu\text{g/mL}$  to 2.0M at 140  $\mu\text{g/mL}$  protein concentration, in the midpoint ( $C_{1/2}$ ) of the higher GuHCl concentration transition. These fluorescence results suggest that TbTIM dimerizes during this transition, supporting the following three-state Mechanism (7):



In this mechanism, the overall folding process begins with two unfolded monomers (2U), with a dimeric intermediate ( $I_2$ ) being well-populated. At 20  $\mu\text{g/mL}$ , the  $C_{1/2}$  of the  $N_2 \leftrightarrow I_2$  transition occurs approximately at 0.9M GuHCl. In agreement with Mechanism (7), at this concentration of GuHCl, the fraction of refolded molecules, as measured by fluorescence and activity assays, was found to be independent of the 10-fold increase in protein concentration [Fig. 2(B)]. As the presence of high-



**Figure 2**

Analysis of the TbTIM-WT conformational transitions in the presence of GuHCl. (A) Normalized fluorescence emission changes in the equilibrium transitions at protein concentrations of 5, 20, 50, 110, and 140  $\mu\text{g/mL}$  (black triangles, open squares, open circles, black circles, and open triangles, respectively). (B) Final yield of refolded molecules at 1M GuHCl. Unfolded samples at 1.2 mg/mL protein concentration were refolded at the indicated final concentrations, and activity was monitored after 12 h incubation at 23°C. Refolding was carried out by dilution into buffer A at specific GuHCl concentrations to yield 1M. (C) Normalized fluorescence emission of a 300-fold molar excess of ANS at 500 nm (black symbols) and SCM changes (open symbols) added to refolded samples at 40 and 70  $\mu\text{g/mL}$  protein concentration (squares and circles, respectively). In each panel, continuous lines are fits to Eq. (1).

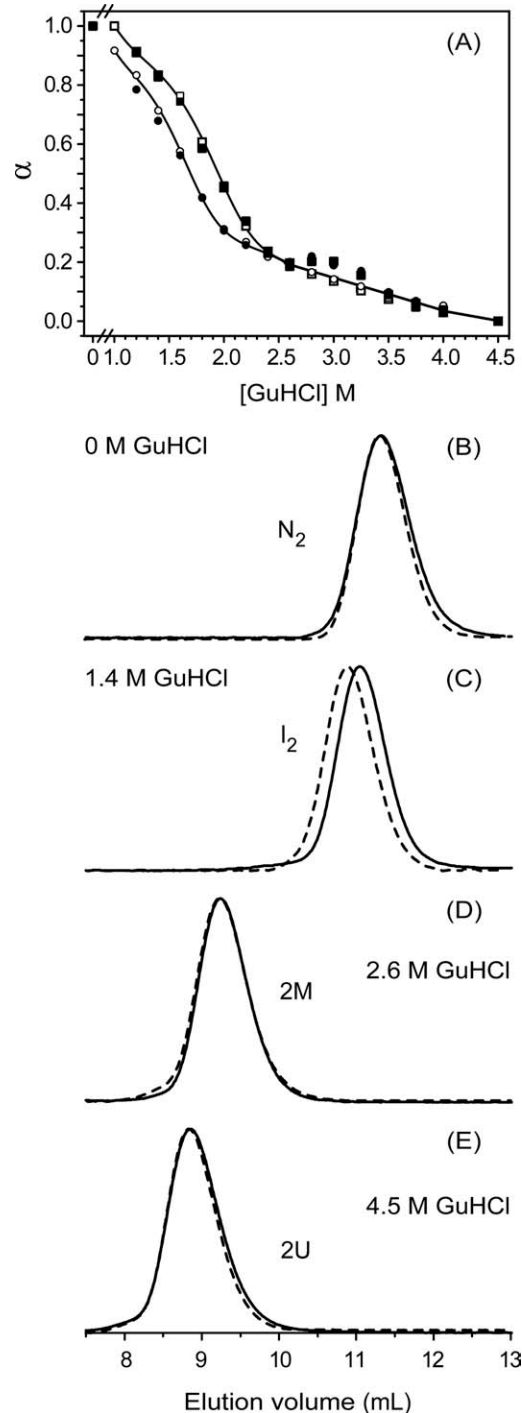
molecular-weight aggregates of TbTIM has been reported at mild denaturant concentrations,<sup>11</sup> we next performed SEC experiments.

## Gel filtration experiments

We studied the WT conformational transitions by following the changes in hydrodynamic properties at two different protein concentrations. At 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a single elution peak was observed at all evaluated GuHCl concentrations; however, the transition at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protein concentration exhibited another peak that eluted in the void volume at denaturant concentrations lower than 1.4M (data not shown). Thus, the presence of high-molecular-weight aggregates in this experimental condition could explain the previously observed irreversible TbTIM unfolding.<sup>11</sup> Representative elution profiles are shown in Figure 3(B–E). The calculated Stokes Radius ( $S_R$ ) values for the WT protein gradually increased with increasing concentration of GuHCl: from 26.3  $\text{\AA}$  (0M), to 29.0  $\text{\AA}$  (1.4M), to 38.5  $\text{\AA}$  (2.4M) and then to 42.1  $\text{\AA}$  (4.5M). In contrast to the fluorescence data from Figure 2A, the conformational transitions followed by SEC were independent of protein concentration [Fig. 3(A)]. It is likely that the dramatic dilution of the minute amount of enzyme owing to SEC has caused the dissociation of the  $I_2$  state. Interestingly, between 2.8 and 3.2M GuHCl, the transition at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protein concentration exhibited three points with a smaller  $S_R$  value compared to those at 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These data suggest the presence of expanded monomers approximately at 3M GuHCl, which at high protein concentrations would associate into oligomers; very likely into a dimeric state more expanded than  $I_2$  instead of a high-molecular-weight aggregate that should elute earlier, in the void volume. As exposed in the DISCUSSION section, it has been reported that partially folded intermediates from monomeric TIM barrels tend to weakly self-associate ( $K_d = 184 \times 10^{-6}M$ )<sup>8</sup>. Therefore, to test the presence of a monomeric intermediate, the conformational transitions were monitored by following the changes in the extrinsic fluorescence and far-UV CD.

## ANS binding

ANS is a fluorophore that increases its fluorescence quantum yield upon noncovalently binding to hydrophobic cavities of proteins. In the native conformation, TbTIM did not bind ANS, that is, the fluorescence spectra of the ANS in presence of the native enzyme, exhibit both a SCM value of 499 nm and a fluorescence emission yield, similar to that of ANS in buffer (data not shown). On the contrary, the  $I_2$  state exhibited the maximal number of binding sites for ANS at 1.2M GuHCl; higher GuHCl concentrations caused both a red-shift effect in the SCM of the fluorescence spectra of ANS and a decrease in the fluorescence emission [Fig. 2(C)]. When monitored by ANS fluorescence, the apparent monophasic transition  $I_2 \leftrightarrow 2U$  shown in Figure 2(A) becomes biphasic, and thus, a second intermediate was stabilized at about 2.6M GuHCl. In agreement with the data shown



**Figure 3**

(A) Normalized signal ( $\alpha$ ) of the GuHCl-induced conformational transitions of the TbTIM variants WT (squares) and C126A (circles), followed by SEC. Pre-equilibrated protein samples (1.5 mg/mL) at 6M [GuHCl] were diluted in GuHCl solutions at protein concentrations of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (open symbols) or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (black symbols) and incubated for 12 or 2 h, respectively. Continuous lines are fits to Eqs. (1) and (2). Representative elution profiles of the stable species of TbTIM WT (continuous lines) and C126A (broken lines) at 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protein concentration: (B)  $N_2$ , (C)  $I_2$ , (D) 2M, and (E) 2U at 23°C. Each sample (100  $\mu\text{L}$ ) was injected into a Superdex 75 column equilibrated in the corresponding denaturant solution. Elution profiles were monitored with UV-Abs.

in Figure 2(A), the increase on protein concentration, from 40 to 70  $\mu\text{g/mL}$ , caused a minor shift in the  $C_{1/2}$  of the transition observed from 1.2 to 2.5M GuHCl. However, the transition monitored by the ANS fluorescence at high GuHCl concentrations was independent of protein concentration; thereby confirming the presence of stable monomers (2M) in the TbTIM folding pathway. The extended conformation of 2M was exhibited by its low affinity for ANS. This is illustrated by the failure to detect the monomer when the molar excess of ANS concentration was reduced from 300- to 50-fold. Further increases in the GuHCl concentration decreased the emission of ANS fluorescence to a minimum, suggesting that at a concentration of 3M GuHCl, the unfolded conformation does not bind ANS.

### CD measurements

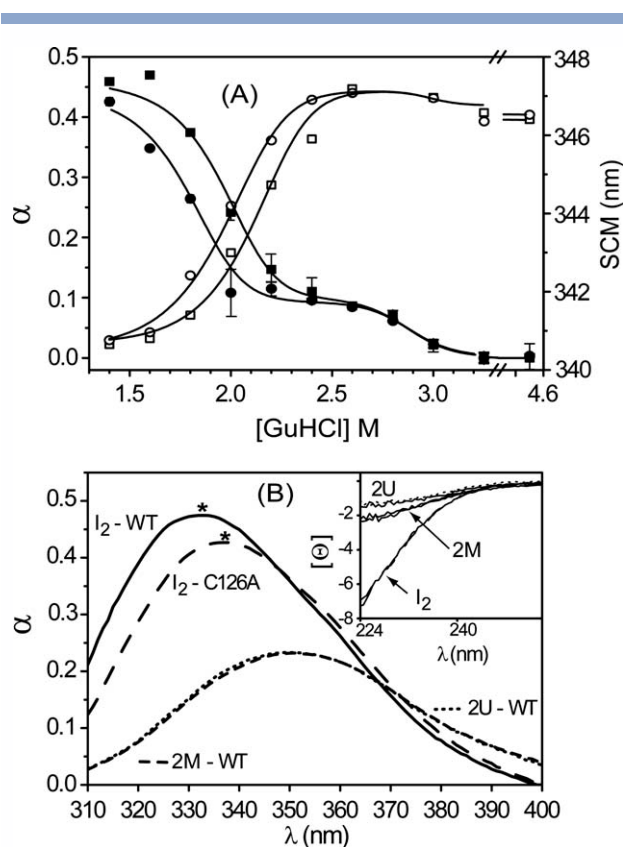
We also studied the steady-state refolding transitions by far-UV CD measurements. However, as protein aggregation took place at [GuHCl] lower than 1.4M, the conformational equilibrium of  $N_2 \leftrightarrow I_2$  was not studied by this technique. In Figure 4(A), we show the normalized molar ellipticity changes at 224 nm and the SCM raw data for the refolding transitions. The ellipticity transition exhibits a biphasic character, whereas the SCM data change in a single phase; thus, secondary and tertiary structures are not concomitantly acquired during refolding. The presence of the monomeric intermediate was exhibited by the plateau approximately at 2.4–2.8M GuHCl. This is consistent with the ANS fluorescence data shown in Figure 2(C). The normalized changes on molar ellipticity at 224 nm show that the stable states  $I_2$  and 2M exhibit approximately 45 and 10% of the native content, respectively.

### Thermodynamic parameters

In the simplest model, the experimental observations shown in Figures 1(A), 2(A–C) and 4(A) support the following Mechanism (8):



This folding model consists of three equilibria: an initial folding step independent of protein concentration followed by subunit association (2M) into a dimeric intermediate ( $I_2$ ) and then a unimolecular process to conform the native state ( $N_2$ ). However, to obtain an accurate folding mechanism, the possibility that the monomers weakly self-associate into a different dimeric state as suggested by the SEC data should be studied at higher protein concentrations than those used in this study. The thermodynamic parameters for the TbTIM reversible transitions are summarized in Table I. The total thermodynamic stability of TbTIM was estimated to be  $54.5 \pm 5.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Also, the  $m$ -values, are consistent



**Figure 4**

(A) Normalized signal ( $\alpha$ ) of the GuHCl-induced conformational transitions of the TbTIM WT (squares) and C126A (circles), followed by monitoring the molar ellipticity at 224 nm (black symbols) and SCM (open symbols) of the refolding transition. Experiments were performed at a protein concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$  at the indicated [GuHCl], as explained in the Materials and Methods section. Continuous lines are fits to Eqs. (1) and (2). Data represent the average of two independent experiments of three technical replicates each; error bars indicate  $\pm$  SD. For SCM measurements, error bars were removed for clarity. (B) Normalized emission fluorescence ( $\alpha$ ),  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  and far-UV CD spectra (inset) of TbTIM folding intermediates. Pre-equilibrated protein samples (0.8 mg/mL) at 5.6M [GuHCl] were diluted to a final protein concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$  at 1.4 ( $I_2$ ), 2.6 (2M), and 4.5 (2U) M GuHCl and incubated for 30 min at 23°C.  $[\Theta]$  is the mean residue ellipticity  $\times 10^{-3}$  in degrees  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

with the  $m$ -value expected for a protein of this size.<sup>21</sup> To obtain structural insights into the hydrophobic cores, we next studied the conformational stability of  $I_2$  and 2M after mutating Cys39 and Cys126, the lateral chains of which point toward the  $\beta\alpha$  interface and into the  $\beta$ -barrel, respectively.

### Structural and catalytic properties of cysteine mutants of TbTIM

The WT protein was mutated at positions C39 or C126, which were individually substituted with Ala. A double mutant, C39A/C126A, was also generated. The far-UV CD and fluorescence spectra of the Cys mutants

**Table I**Thermodynamic Parameters for the Folding of the TbTIM Variants at 23°C<sup>a</sup>

	$\Delta G_1$	$m_1$	$C_{1/2(1)}$	$\Delta G_2$	$m_2$	$C_{1/2(2)}$ <sup>b</sup>	$\Delta G_3$	$m_3$	$C_{1/2(3)}$	$\Delta G_{tot}$
WT <sup>c</sup>	5.5 (0.6)	5.8 (0.7)	0.9 (0.2)	19.6 (1.6)	6.3 (0.3)	1.8 (0.4)	14.7 (3.1)	5.1 (1.2)	2.9 (1.3)	54.5 (5.3)
C126A <sup>d</sup>	–	–	–	16.8 (0.9)	5.7 (0.2)	1.5 (0.3)	14.4 (2.8)	5.1 (1.8)	2.8 (1.5)	45.6 (3.7)

<sup>a</sup> $\Delta G$ ,  $m$ , and  $C_{1/2}$  values are expressed in kcal mol<sup>-1</sup>, kcal mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>, and M units, respectively. Errors represent standard deviations of the fits and are shown in parentheses.  $m_1$ ,  $m_2$ , and  $m_3$  describe the linear dependence of  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$ , and  $\Delta G_3$  on the GuHCl concentration for the conformational equilibria  $N_2 \leftrightarrow I_2$ ,  $I_2 \leftrightarrow 2M$ , and  $2M \leftrightarrow 2U$ , respectively, from Mechanisms (8) and (9).

<sup>b</sup> $C_{1/2}$  values were calculated at a protein concentration of 20 μg/mL per monomer.

<sup>c</sup>Data were globally fit to Eq. (1) or (2), respectively.

displayed no differences compared with those of WT (Supporting Information Fig. S1). The emission spectra of all TbTIM variants exhibited a maximum at 322 nm, indicating that on average, the five tryptophan residues in each subunit are well protected from solvent exposure. In addition, their far-UV CD spectra were characteristic of a structured TIM barrel. The Cys mutations had a minor effect on the catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_M$ ) and the affinity ( $K_i$ ) of TbTIM for the transition-state analog 2-phosphoglycolate (PGA, Supporting Information Table S1).

### Conformational transitions of TbTIM cysteine mutants

The GuHCl-induced conformational transitions for the Cys mutants are shown in Figure 1(B–D). The unfolding patterns for all TbTIM variants can be classed as reversible (WT and C39A) or partially reversible (C126A and C39A/C126A). All mutants exhibited equivalent results (data not shown) to those of the WT, which are shown in Figure 2. As the folding/refolding curves from C39A and C39A/C126A exhibit no differences compared with WT and C126A, respectively, subsequent equilibrium experiments were conducted using the C126A mutant only. As shown in Figure 3(A), the changes in hydrodynamic properties suggest that the mutant monomeric intermediates would also tend to weakly self-associate. Comparison of the refolding profiles shown in Figures 3(A) and 4(A) indicates that position in the first transition is slightly affected by the C126 mutation, whereas the second transition is superimposable between the two variants. As for mutant C126A partially reversible unfolding transitions were observed, the reversible conformational changes from Figure 1(C,D), 3(A) and 4(A) were fit to the following Mechanism (9):

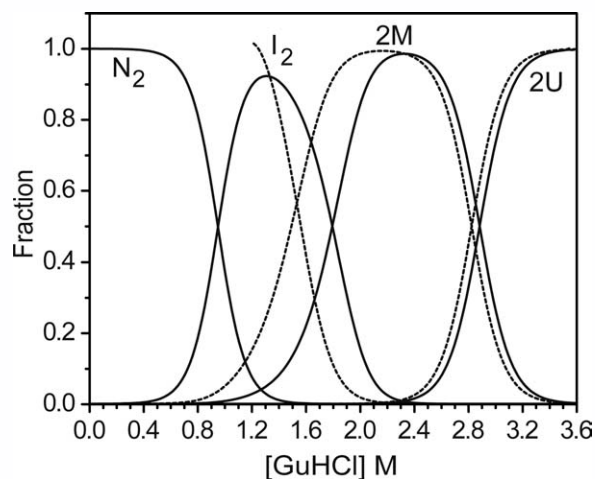


The resulting thermodynamic parameters are listed in Table I. The relative stability of the  $I_2$ –C126A is reduced by 2.8 kcal mol<sup>-1</sup> ( $\Delta\Delta G_2 = m^{WT}C_{1/2}^{WT} - m^{mut}C_{1/2}^{mut}$ ),

compared with the  $I_2$ –WT, whereas the relative free energy change for the second transition ( $\Delta\Delta G_3$ ) is unaffected by the C126 mutation. The comparison of  $m_2$  values from Table I revealed a slightly higher value for the WT enzyme. These data translate to a slightly increased population of the 2M–C126A state relative to the  $I_2$ –C126A state, whereas the relative populations of 2M–C126A and 2U–C126A remain unchanged despite the mutation (Fig. 5).

### Structural properties of the folding intermediates of the TbTIM variants

The representative fluorescence and far-UV CD spectra (inset) of  $I_2$  and 2M are shown in Figure 4(B) to emphasize the absence of any detectable tertiary structure in the 2M state although it possesses residual molar ellipticity at 224 nm. The same result was obtained in the fluorescence spectra when using  $\lambda_{ex} = 295$  nm. As shown in Figure 4(B), upon unfolding, both the emission maximum and the SCM from the  $I_2$ , 2M, and 2U species are red-shifted, which indicates increased exposure of the tryptophan residues to the aqueous medium.<sup>22</sup> Remarkably, the emission maximum of the  $I_2$ –C126A (338 nm, Fig. 4(B)) was found to be 3 nm red-shifted compared with the  $I_2$ –WT (335 nm), suggesting that the tryptophans are more exposed in the mutant conformation. Additionally, the SEC experiments showed that the compactness of the  $I_2$ –C126A decreased compared with the  $I_2$ –WT, with  $S_R$ -normalized values of 0.70 and 0.83, respectively [Fig. 3(C)]. Considering the proposed corre-

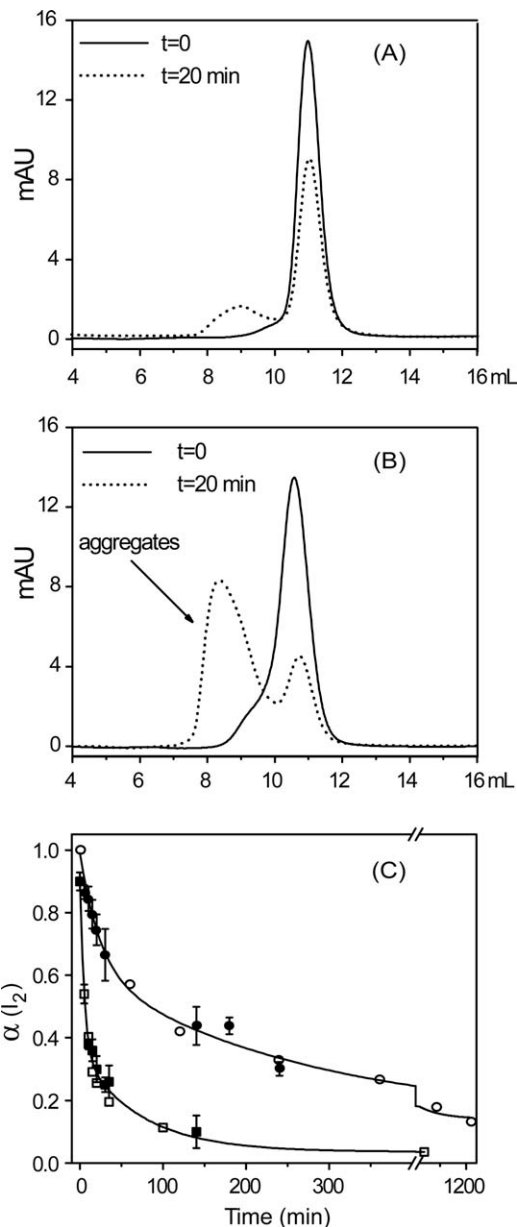
**Figure 5**

Predicted populations of stable species in the refolding transitions of WT and C126A at 23°C and 20 μg/mL protein concentration (continuous and discontinuous lines, respectively). The fraction of each molecular species was built using the thermodynamic parameters listed in Table I.

lations between the  $m$ -values and the unfolding changes in the  $\Delta ASA$ ,<sup>21</sup> the difference between the  $I_2$  compactness is consistent with the  $m_2$  values that are listed in Table I. It should be noted that a more expanded conformation, such as that in the  $I_2$ -C126A, may result in a higher propensity to aggregate. Thus, we next studied the kinetic stability of the  $I_2$  states.

#### Assessment of the apparent rate constant for $I_2$ aggregation

As shown in Figure 1(C,D), at denaturant concentrations lower than 1.0M, the refolding curves of the C126 mutants exhibited intriguing differences from curves of WT and C39A [Fig. 1(A,B)]. Although the refolding curve from the 2U state into  $I_2$  displays a cooperative biphasic transition [Fig. 4(A)], further folding from  $I_2$  into  $N_2$  was found to be partial only at protein concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [Fig. 1(C,D)]. The SEC results showed that at GuHCl concentrations of approximately 1M, C126A mutants aggregated (data not shown), suggesting that at low-denaturant concentrations, the aggregation rate becomes significantly higher than the rate of refolding from  $I_2$  into  $N_2$ . To compare the solubility properties of the  $I_2$  states of WT and C126A, both proteins were incubated at 23°C for the times shown in Figure 6(C). A protein concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in solutions containing 1.4M GuHCl was optimal to follow the kinetics of  $I_2$  aggregation in this study (>50% after 120 min). The kinetics of  $I_2$  loss and aggregate formation were analyzed by integration of the peaks from the gel filtration data to obtain information on the relative quantities of the protein species [Fig. 6(A,B)]. In addition, at each time point, aliquots from the  $I_2$  solution were refolded using a 25-fold dilution with buffer A and incubated for 12 h (to ensure complete refolding). Thus, the fraction of  $I_2$  capable of refolding back into  $N_2$  was monitored indirectly by measuring the recovered catalytic activity. We found that data from the SEC and refolding assays followed essentially the same time course [Fig. 6(C)]. These data fitted well to a double exponential function, representing two aggregation rates: a fast phase with an apparent rate constant  $k_{app1}$  of 0.04  $\text{min}^{-1}$  and a slow phase with  $k_{app2}$  of 0.004  $\text{min}^{-1}$  for  $I_2$ -WT. The apparent rate constants for  $I_2$ -C126A exhibited values approximately fivefold higher than those of the WT (0.2 and 0.014  $\text{min}^{-1}$ ). The standard deviations did not exceed 7%. This fivefold increase in the apparent rate constant for  $I_2$ -C126A aggregation was statistically significant, but it was not high enough to fully prevent refolding into the native state of some  $I_2$ -C126A intermediates. This double-exponential pattern of the kinetic traces indicates similarities in the mechanisms of aggregation of the WT and C126A  $I_2$ . These mechanisms were not investigated in the present study; however, because the  $I_2$  aggregation process is accelerated at denaturant

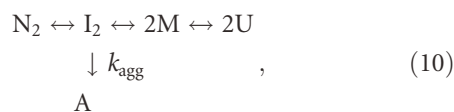


**Figure 6**

Aggregation of the  $I_2$  intermediates of TbTIM variants. Illustrative SEC-FPLC chromatograms of (A)  $I_2$ -WT and (B)  $I_2$ -C126A, at  $t = 0$  and after incubation of 20 min at 23°C. The elution volume of  $I_2$ -WT was 10.9 mL, and that of  $I_2$ -C126A was 10.6 mL. The high-molecular-weight aggregates eluted in the void volume ( $\sim 8$  mL). (C) Kinetics of aggregation of  $I_2$ -WT (circles) and  $I_2$ -C126A (squares) as monitored by integration of protein peaks in SEC chromatograms (open symbols) and recovered catalytic activity (black symbols) after the indicated incubation periods (x-axis). The solid line through the data represents the fit to a double exponential function. Activity data represent the average of two independent experiments of two technical replicates each; error bars indicate  $\pm$  SD. The intermediate states were obtained as follows: pre-equilibrated protein samples (2 mg/mL) at 5.6M [GuHCl] were fourfold diluted in buffer A to yield a protein concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 1.4M GuHCl. SEC data were collected under the same technical conditions as shown in Figure 3. Additional details are given in the main text.



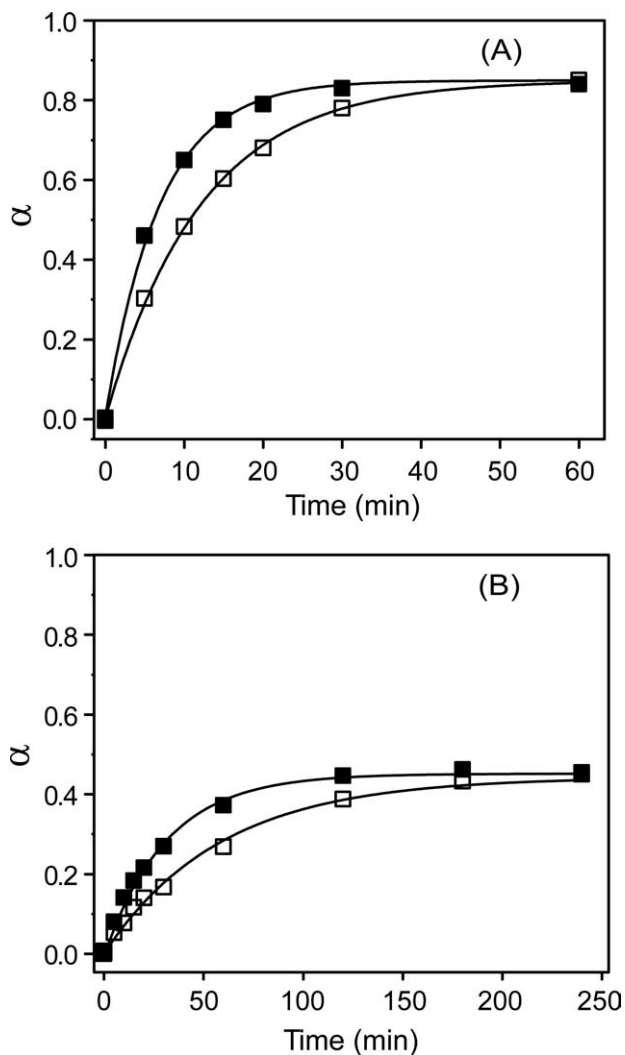
concentrations lower than 1M, it is likely to be mediated by the ionic strength of low GuHCl concentrations, as recently described for a molten globule.<sup>23</sup> These data point to a general conformational Mechanism (10) for TbTIM variants, where  $k_{\text{agg}}$  exhibits a significantly higher value in the absence of the sulfhydryl group of residue C126 at 23°C and at a protein concentration of 500  $\mu\text{g/mL}$ .



We then proceeded to determine the apparent refolding constants and the effect of the PGA on refolding rates.

### The effect of PGA on the refolding kinetics

The refolding kinetics of unfolded WT and C39A/C126A variants were monitored by following the changes in catalytic activity, which enabled us to determine the apparent refolding rate constants. We also assessed whether the presence of PGA could prevent I<sub>2</sub>-C126A aggregation and thereby enhance the yield of refolded molecules. The kinetic refolding curves for the WT and C39A/C126A variants [Fig. 7(A,B)] fit well to a single exponential curve. The results show that the yield of refolded molecules remains the same in the presence of PGA. Nonetheless, upon the addition of PGA, the pseudo first-order rate constants for the WT and C39A/C126A variants appeared to increase slightly (approximately two-fold: 0.14 and 0.03  $\text{min}^{-1}$ , respectively) than the refolding constants obtained in the absence of the inhibitor (0.08 and 0.016  $\text{min}^{-1}$ ). Also, because the rate of refolding is fivefold slower for the mutant compared to the WT, these data strengthened the conclusion about the kinetically stabilizing effect of S $\gamma$  from C126. These observations suggest that the active site architecture that is capable of binding PGA is not restored in the I<sub>2</sub> intermediate. This result was expected because this conformation is catalytically inactive. In addition, I<sub>2</sub>-PGA titration experiments did not exhibit intrinsic fluorescence quenching, as was observed in the native variants. As the rate of the refolding transition was found to increase but the final yield of the refolded molecules did not, it appears likely that the transition state in the refolding from I<sub>2</sub> to N<sub>2</sub> can bind PGA. This explanation agrees with the results of the temperature-induced unfolding of  $\gamma$ TIM, which indicated that PGA binds to the dimeric transition state (dimeric-TS).<sup>24</sup> Interestingly, in both the WT and the C39A/C126A mutant, the rate constants were found to increase by the same magnitude (twofold) in the presence of PGA, which strongly supports the similarity between the dimeric-TS structures of the molecules that fold into N<sub>2</sub>.



**Figure 7**

Refolding kinetics of TbTIM variants WT (A) and C39A/C126A (B), monitored by the normalized catalytic activity ( $\alpha$ ). Unfolded samples at 6M GuHCl and 1 mg/mL TIM concentrations were refolded with a 50-fold dilution into buffer A (open symbols) or PGA (100-fold above of the  $K_i$ ) containing buffer A (black symbols) at 23°C. Samples were monitored by activity in the presence of a low concentration of PGA (30-fold lower than  $K_i$ ). Solid lines represent the fit to a single exponential.

## DISCUSSION

In this study, we assessed the thermodynamic and kinetic stability of WT and Cys mutants of TbTIM. We characterized the GuHCl-induced equilibrium folding pathway of TbTIM-WT, and we determined the contribution of an evolutionarily conserved residue on the kinetic stability and structural properties of a folding intermediate by individually substituting the Cys residues at positions 39 and 126 with Ala. We also constructed a double mutant, C39A/C126A, and found that it behaved like the

single C126A variant. The substitution at C39 was found to be neutral.

### Conformational transitions

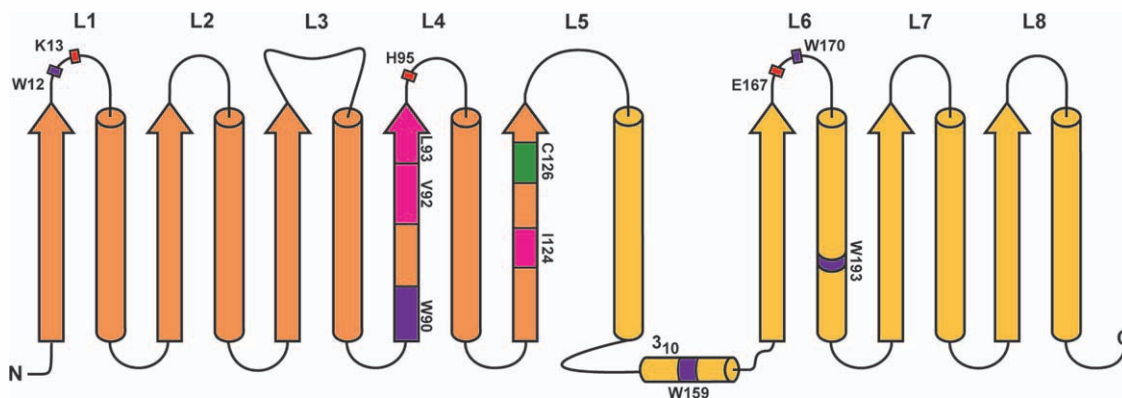
We report specific conditions that provide optimal reversibility of TbTIM-WT unfolding. In the refolding experiments, the concentration of TIM was found to be critical at  $[\text{GuHCl}] < 400 \text{ mM}$ ; protein concentrations higher than  $20 \mu\text{g/mL}$  per monomer were found to promote aggregation. At lower protein concentrations, the unfolding reversibility was diminished, and the control samples exhibited inconsistent properties.

For the reversibly unfolded WT protein, equilibrium experiments indicated that the folding pathway involved the formation of two folding intermediates ( $I_2$  and  $2M$ ), which were identified by their ANS binding and far-UV CD measurements. The  $I_2$  and  $2M$  were the predominant species at approximately 1.2 and 2.2M GuHCl, respectively (Fig. 5). Thus, for the WT protein we propose a four-state equilibrium model [Mechanism (8)]. The thermodynamic data summarized in Table I exhibit the significantly high stability of both the  $2M$  intermediates and the dimeric interface. The total thermodynamic stability of  $I_2$  ( $49 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) is similar to the difference between the native and the unfolded states for the dimeric protein Ure2p,<sup>25</sup> which exhibits a dimeric folding intermediate at pH 7.5. Accordingly to the data summarized in Table I, at least  $19.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  is contributed by intersubunit interactions. This stability appears to be an intrinsic property of TbTIM because the unfolding assessed by differential scanning calorimetry<sup>26</sup> exhibited irreversible transitions that were independent of the protein concentration. Comparison of  $\Delta G$  values listed in Table I indicates that the high fractional energetic contribution of the folding reaction  $2M \leftrightarrow 2U$  accounts for approximately 0.54 of the  $\Delta G_{\text{tot}}$  ( $2\Delta G_3/\Delta G_{\text{tot}}$ ), a value comparable to that calculated for the *Trypanosoma cruzi* TIM (TcTIM).<sup>27</sup> Thus, for TbTIM and TcTIM, the energy of monomer folding contributes at a higher extent to the total conformational stability compared with other TIMs, which varies between 0.14 for rTIM and 0.32 for  $\gamma$ TIM.<sup>28,29</sup> Nevertheless, the  $\Delta G_3$  value of TbTIM (Table I) is significantly higher than  $9 \text{ kcal mol}^{-1}$ , reported for the folding of monomeric TcTIM intermediates.<sup>27</sup> Rather, the high stability of the  $2M$  intermediates of TbTIM is comparable to the total free-energy change of the monomeric TIM protein  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase ( $15.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\alpha$ TS).<sup>30</sup> This multistate unfolding/refolding model for TbTIM is in contrast to the concerted two-state or three-state models that have been proposed for other WT TIMs. For instance, the urea-induced conformational transition of human TIM follows a two-state mechanism,<sup>31</sup> whereas for  $\gamma$ TIM, the presence of intermediate urea concentrations stabilizes a monomeric intermediate.<sup>28</sup> Moreover, a folding pathway

that includes two dimeric intermediates has been proposed for a mutant  $\gamma$ TIM in which the hydrophobicity of the dimeric interface was increased.<sup>32</sup> Although it has been suggested that a dimeric intermediate exists in the folding pathway of TcTIM, the conformational transitions of this enzyme demonstrate the effect of the ionic strength of GuHCl on the native state; the activity of the dimeric intermediate increases by 1.2-fold at denaturant concentrations of approximately 0.5M.<sup>27</sup> These data indicate that the folding pathways among TIMs are independent of the topology of the main chain. In contrast, as suggested by Forsyth *et al.*,<sup>8</sup> kinetic and thermodynamic analyses of the folding of the three monomeric TIM barrel proteins  $\alpha$ TS, indole-3-glycerol-phosphate synthase and the protein of unknown function encoded by the *Bacillus subtilis* *iol* I gene, point to the dominant role of the main chain topology in defining the energy surface for the folding reaction. Importantly, equilibrium on-pathway intermediates ( $I_1$ ) for these monomeric proteins that exhibit similar properties are presumably similar to the  $I_2$ -TbTIM. The  $I_1$  state possesses an MRE value of approximately  $-8 \times 10^{-3} \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  at 222 nm, and it associates weakly to form homodimers.<sup>6,8,30,33,34</sup> Furthermore, its conversion to the native state is the rate-limiting step in the folding pathway. Moreover, for the  $\alpha$ TS protein, an additional monomeric intermediate ( $I_2$ ) has been reported, which is highly populated at 5M urea. Despite the lack of secondary structure and total tyrosine exposure to the solvent, the  $I_2$  conformation is highly stabilized by hydrophobic contacts compared with the unfolded state ( $\Delta G = 8.2 \pm 0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).<sup>35,36</sup> It is unclear from the available data whether the apparent similarity between the equilibrium intermediates of these monomeric TIM barrels and TbTIM is related to their common molecular mechanisms. Further experiments using high-resolution techniques to study TbTIM are required.

### Effect of the Cys 126 substitution on the TbTIM

For the C126A mutant, the refolding data were analyzed as a three-state equilibrium transition [Mechanism (9)] because only partial folding from  $I_2$  to the  $N_2$  was observed [Fig. 1(C,D)]. The substitution of C126 decreased the relative thermodynamic stability of the  $I_2$  state; by approximately  $2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $\Delta G_2$ , Table I). The apparent destabilization values ( $\Delta\Delta G_{\text{tot}}$ ) of approximately  $5 \text{ kcal mol}^{-1}$  for the  $\gamma$ TIM-C126A agree with the  $\Delta G_1$  value listed in Table I ( $5.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).<sup>10,16,37</sup> However, it was not possible to determine this parameter for the C126A mutant. These data suggest a minor effect of the C126A mutation on the thermodynamic stability of TbTIM. Nonetheless, a kinetic effect of S $\gamma$ -C126 was observed because there was a significantly higher tendency of the  $I_2$ -C126A state to aggregate compared with

**Figure 8**

Schematic diagram of the secondary structure of TbTIM. Regions proposed to be folded in the  $I_2$ -WT state are colored in orange. L1-L8 represent loops that connect  $\beta$ -strands to consecutive  $\alpha$ -helices. Residues are colored as follows: C126 (green); branched-chain aliphatic residues, V92, L93, I124 (pink); W residues (purple); catalytic residues (red).

the  $I_2$ -WT intermediate at equimolar concentrations. Also, the rate of refolding is fivefold slower for the C39A/C126A mutant than for WT. According to Mechanism (10), as the  $I_2$ -C126A molecules accumulate, their refolding into the  $N_2$  conformation will be compromised because of the kinetic competition favors  $I_2$  aggregation. This unproductive step does not diminish in the presence of PGA as shown by the data in Figure 7(A,B). Thus, the evolutionarily conserved Cys residue at position 126 appears to result in a kinetically stable intermediate rather than a conformation prone to aggregation. This finding is consistent with the previous research, showing that the substitution of C126 in  $\gamma$ TIM compromises the reversible unfolding induced by heat.<sup>16</sup>

### Structural insights into the folding intermediates

The WT properties shown in Figures 3 and 4 indicate that at GuHCl concentrations about 1.4M, the enzyme possesses secondary and tertiary structure to yield both a stable dimeric interface and a compact conformation. As shown in Figure 4(A,B), ~45% of the  $\alpha$ -helical content and the tryptophan fluorescence are restored in the  $I_2$  state. Unfortunately, we could not determine the  $\beta$ -structure content in the folding intermediates by CD measurements. On the assumption that the folded portions of the  $I_2$ -WT include only native interactions, we propose that the  $\alpha$ -helical content in  $I_2$  should comprise segments of  $\alpha$ -helices<sub>1-4</sub> because the dimeric interface involves loops<sub>1-4</sub> (Fig. 8). The TbTIM monomer has five Trp residues at positions 12, 90, 159, 170, and 193 located at loop<sub>1</sub>,  $\beta_4$ , helix<sub>3-10</sub>, loop<sub>6</sub>, and  $\alpha$ -helix<sub>6</sub>, respectively (Fig. 8); however, only W12, W90, and W170 contribute significantly to the fluorescence emission of native TIM. In contrast, it has been shown that neither W159 nor

W193 contributes to the TIM fluorescence, as the former is completely quenched by W193, which is exposed to the solvent.<sup>11,38</sup> Thus, as the folding of  $I_2 \rightarrow N_2$  exhibits a monophasic cooperative transition, it may be assumed that those segments comprising helix<sub>3-10</sub> and  $\alpha$ -helix<sub>6</sub> have no regular structure in the  $I_2$  conformation. As the  $I_2$ -WT is a compact inactive state ( $\alpha_{SR} = 0.8$ ), its tertiary interactions should include the ( $\beta\alpha$ ) modules from the N-terminus, where the interface between monomers is located. Accordingly, in the  $I_2 \rightarrow N_2$  transition, restructuring of the critical segments for catalysis located at the C-terminus should occur, such as the concerted closure of loops<sub>6-7</sub> and the rearrangement of Glu167 located at loop<sub>6</sub> for ligand binding over the active site.<sup>39</sup> The partial fluorescence emission at 322 nm exhibited by the  $I_2$ -WT conformation may reflect the burial of W12 and W90. Also, the restored intrinsic fluorescence exhibited by the folding of  $I_2 \rightarrow N_2$  should be obtained from the properly positioned W170, which lies at loop<sub>6</sub> and is hydrogen bonded in both the “open” and “closed” conformations of the catalytic site.<sup>11,38</sup> The emission spectra of the  $I_2$ -C126A support this hypothesis, as explained below. Analyses of the high-resolution structures of TIM have shown that the  $S_\gamma$  of Cys 126 is hydrogen bonded to the main chain oxygen of L93 and I124 at  $\beta_4$  and  $\beta_5$  and at 4.04 Å from the  $C_{\gamma 1}H_3$  of V92 at  $\beta_4$  (Fig. 8).<sup>14,15,40</sup> Of these aliphatic residues, the side chain of I124 has been proposed to be a key component of a potential folding nucleation site.<sup>41</sup> The presence of hydrophobic cores in branched aliphatic side chains has been correlated with the composition of folded segments in partially folded states of TIM barrels proteins.<sup>7</sup> Therefore, it seems reasonable to suggest that the higher propensity of the  $I_2$ -C126A to aggregate is caused by the exposure of the hydrophobic core of residues V92, L93, and I124. According to our hypothesis that W12 and

W90 contribute to the fluorescence of I<sub>2</sub>-WT, the 3-nm red-shift observed in the emission maxima of the I<sub>2</sub>-C126A [Fig. 4(B)] suggests a partial solvent exposure of W90, which is located at β<sub>4</sub>. Conversely, in the 2M state, tight packing interactions are largely lost to the same extent on the WT and C126A variants; however, 10% of native α-helix content is still present [Fig. 4(A)]. As the emission fluorescence spectra of 2M and 2U are the same [Fig. 4(B)], it appears that neither W12 (loop<sub>1</sub>) nor W90 (β<sub>4</sub>) is buried in the remaining structure of the 2M conformation. Moreover, the lack of signal from W90 (β<sub>4</sub>) on 2M would indicate the absence of measurable tertiary contacts from the original β-barrel, which correlates to a highly extended conformation [Fig. 3(D)].

Our results, together with the structural data on the residues contacting the S<sub>γ</sub> of Cys 126, suggest that in the I<sub>2</sub>-WT conformation, the segment (βα)<sub>1-4</sub>β<sub>5</sub> from each monomer is folded (Fig. 8). In addition, because Cys 126 is located at the C-terminus from β<sub>5</sub>, the proposed structure for the folding intermediate suggests that the evolutionarily conserved S<sub>γ</sub> of Cys 126 defines the boundary of the structured region of the I<sub>2</sub> intermediate. To test this hypothesis, both the WT and the C126A mutant conformation of I<sub>2</sub> should be assessed by high-resolution techniques.

## CONCLUSION

The GuHCl-induced conformational transitions of TbTIM and its cysteine mutants are quite different to those observed in TIM proteins. A population of two stable intermediates was indicated by extrinsic fluorescence and far-UV CD experiments. By comparing the kinetic stability of the I<sub>2</sub>-WT and I<sub>2</sub>-C126A states, we demonstrated that the C126 position plays a role in stabilizing the I<sub>2</sub> conformation against aggregation. As the structural and spectroscopic properties of several TIM barrels have now been widely studied under standard conditions, we were able to propose general structural insights on the I<sub>2</sub> and 2M states. Additional studies employing high-resolution techniques are required to obtain accurate atomic resolution of the intermediate structure.

The significantly high stability of the folding intermediates may argue in favor of their involvement in the actual TbTIM folding mechanism and/or its translocation into the glycosome. The study of interactions between such partially folded states and other cellular partner molecules is fundamental for understanding the conformational changes of TbTIM on its biological context.

## ACKNOWLEDGMENTS

V. G. is deeply indebted to J. P. Pardo-Vazquez and M. C. L. De Anda-Aguilar for careful and critical reading of the manuscript. The authors thank Dr. D. A. Fernandez-Velasco and Dr. J. M. Sanchez-Ruiz for stimulating dis-

ussions. Thanks also belong to M. Molina-Torres Arpi for valuable technical support. V. G. received a scholarship from CONACyT.

## REFERENCES

- Helfert S, Estevez AM, Bakker B, Michels P, Clayton C. Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 2001;357:117–125.
- Galland N, de Walque S, Voncken FG, Verlinde CL, Michels PA. An internal sequence targets *Trypanosoma brucei* triosephosphate isomerase to glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* 2010;171:45–49.
- Rothlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, Jiang L, DeChance J, Betker J, Gallaher JL, Althoff EA, Zanghellini A, Dym O, Albeck S, Houk KN, Tawfik DS, Baker D. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* 2008;453:190–195.
- Hocker B, Beismann-Driemeyer S, Hettwer S, Lustig A, Sterner R. Dissection of a (betaalpha)<sub>8</sub>-barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struct Biol* 2001;8:32–36.
- Zitzewitz JA, Matthews CR. 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* 1999;38:10205–10214.
- Wintrode PL, Rojsajjakul T, Vadrevu R, Matthews CR, Smith DL. An obligatory intermediate controls the folding of the alpha-subunit of tryptophan synthase, a TIM barrel protein. *J Mol Biol* 2005;347:911–919.
- Gu Z, Zitzewitz JA, Matthews CR. Mapping the structure of folding cores in TIM barrel proteins by hydrogen exchange mass spectrometry: the roles of motif and sequence for the indole-3-glycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol* 2007;368:582–594.
- Forsyth WR, Bilsel O, Gu Z, Matthews CR. Topology and sequence in the folding of a TIM barrel protein: global analysis highlights partitioning between transient off-pathway and stable on-pathway folding intermediates in the complex folding mechanism of a (betaalpha)<sub>8</sub> barrel of unknown function from *B. subtilis*. *J Mol Biol* 2007;372:236–253.
- Pan H, Raza AS, Smith DL. Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* 2004;336:1251–1263.
- Silverman JA, Harbury PB. The equilibrium unfolding pathway of a (beta/alpha)<sub>8</sub> barrel. *J Mol Biol* 2002;324:1031–1040.
- Chanez-Cardenas ME, Fernandez-Velasco DA, Vazquez-Contreras E, Coria R, Saab-Rincon G, Perez-Montfort R. Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch Biochem Biophys* 2002;399:117–129.
- Zomosa-Signoret V, Hernandez-Alcantara G, Reyes-Vivas H, Martinez-Martinez E, Garza-Ramos G, Perez-Montfort R, Tuena De Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* 2003;42:3311–3318.
- Pe'er I, Felder CE, Man O, Silman I, Sussman JL, Beckmann JS. Proteomic signatures: amino acid and oligopeptide compositions differentiate among phyla. *Proteins* 2004;54:20–40.
- Kishan KV, Zeelen JP, Noble ME, Borchert TV, Wierenga RK. Comparison of the structures and the crystal contacts of trypanosomal triosephosphate isomerase in four different crystal forms. *Protein Sci* 1994;3:779–787.
- Kursula I, Wierenga RK. Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J Biol Chem* 2003;278:9544–9551.
- Gonzalez-Mondragon E, Zubillaga RA, Saavedra E, Chanez-Cardenas ME, Perez-Montfort R, Hernandez-Arana A. Conserved cysteine 126

- in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry* 2004;43:3255–3263.
17. Ralsler M, Heeren G, Breitenbach M, Lehrach H, Krobitsch S. Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization—not catalytic inactivity—of the mutant enzymes. *PLoS One* 2006;1:e30.
  18. Samanta M, Banerjee M, Murthy MR, Balam H, Balam P. Probing the role of the fully conserved Cys126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis—distal effects on dimer stability. *FEBS J* 2011;278:1932–1943.
  19. Silverman JA, Balakrishnan R, Harbury PB. Reverse engineering the (beta/alpha)<sub>8</sub> barrel fold. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3092–3097.
  20. Santoro MM, Bolen DW. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 1988;27:8063–8068.
  21. Myers JK, Pace CN, Scholtz JM. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* 1995;4:2138–2148.
  22. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy, xiv. New York: Plenum Press; 1983.496p.
  23. Povarova OI, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: molten globule state and aggregates. *PLoS One* 2010;5:e15035.
  24. Gonzalez-Mondragon E, Zubillaga RA, Hernandez-Arana A. Effect of a specific inhibitor on the unfolding and refolding kinetics of dimeric triosephosphate isomerase: establishing the dimeric and similarly structured nature of the main transition states on the forward and backward reactions. *Biophys Chem* 2007;125:172–178.
  25. Zhu L, Zhang XJ, Wang LY, Zhou JM, Perrett S. Relationship between stability of folding intermediates and amyloid formation for the yeast prion Ure2p: a quantitative analysis of the effects of pH and buffer system. *J Mol Biol* 2003;328:235–254.
  26. Costas M, Rodriguez-Larrea D, De Maria L, Borchert TV, Gomez-Puyou A, Sanchez-Ruiz JM. Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol* 2009;385:924–937.
  27. Chanez-Cardenas ME, Perez-Hernandez G, Sanchez-Rebollar BG, Costas M, Vazquez-Contreras E. Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* 2005;44:10883–10892.
  28. Najera H, Costas M, Fernandez-Velasco DA. 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* 2003;370:785–792.
  29. Rietveld AW, Ferreira ST. Deterministic pressure dissociation and unfolding of triose phosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* 1996;35:7743–7751.
  30. Gualfetti PJ, Bilsel O, Matthews CR. The progressive development of structure and stability during the equilibrium folding of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Protein Sci* 1999;8:1623–1635.
  31. Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, Frere JM, Mande SC, Hol WG, Martial JA, Goraj K. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol Biol* 1996;257:441–456.
  32. Peimbert M, Dominguez-Ramirez L, Fernandez-Velasco DA. Hydrophobic repacking of the dimer interface of triosephosphate isomerase by in silico design and directed evolution. *Biochemistry* 2008;47:5556–5564.
  33. Gualfetti PJ, Iwakura M, Lee JC, Kihara H, Bilsel O, Zitzewitz JA, Matthews CR. Apparent radii of the native, stable intermediates and unfolded conformers of the alpha-subunit of tryptophan synthase from *E. coli*, a TIM barrel protein. *Biochemistry* 1999;38:13367–13378.
  34. Forsyth WR, Matthews CR. Folding mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: a test of the conservation of folding mechanisms hypothesis in (beta(alpha))<sub>8</sub> barrels. *J Mol Biol* 2002;320:1119–1133.
  35. Saab-Rincon G, Froebe CL, Matthews CR. Urea-induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase: one-dimensional proton NMR evidence for residual structure near histidine-92 at high denaturant concentration. *Biochemistry* 1993;32:13981–13990.
  36. Saab-Rincon G, Gualfetti PJ, Matthews CR. Mutagenic and thermodynamic analyses of residual structure in the alpha subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry* 1996;35:1988–1994.
  37. Cruces-Angeles ME, Cabrera N, Perez-Montfort R, Reyes-Lopez CA, Hernandez-Arana A. Thermodynamic and kinetic destabilization of triosephosphate isomerase resulting from the mutation of conserved and non-conserved cysteines. *Protein Pept Lett* 2011;18:1290–1298.
  38. Sampson NS, Knowles JR. Segmental movement: definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 1992;31:8482–8487.
  39. Wierenga RK, Kapetaniou EG, Venkatesan R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:3961–3982.
  40. Rodriguez-Romero A, Hernandez-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernandez-Velasco DA. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol* 2002;322:669–675.
  41. Kannan N, Selvaraj S, Gromiha MM, Vishveshwara S. Clusters in alpha/beta barrel proteins: implications for protein structure, function, and folding: a graph theoretical approach. *Proteins* 2001;43:103–112.