



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UN/M
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

LA MONOMERIZACIÓN DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE TRYPANOSOMA CRUZI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

FRANCISCO ZÁRATE PÉREZ

Tutor: Dr. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS



MÉXICO, D. F.

Abril 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar Vázquez Contreras. El trabajo se llevó a cabo en los siguientes laboratorios e instituciones: Laboratorio de Bioquímica, del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”; Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México y Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. La estructura cristalográfica de la mutante monomérica fue obtenida por el Dr. Alfredo Torres Larios del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Edgar Vázquez Contreras	Instituto de Química, UNAM
Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El presente trabajo de investigación contó con los siguientes apoyos económicos: 40524M, 60127Q, 46168M y 41328Q de CONACyT; IN217206 y IN200507 de PAPIIT-UNAM and UAM acuerdos 11 y 13/07 del Rector General. F.Z.P. fue becario de doctorado de CONACyT.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Armando gómez puyou
VOCAL	Dr. Miguel costas Basín
SECRETARIO	Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros
SUPLENTE	Dr. Enrique García Hernández
SUPLENTE	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser la casa que me ha albergado durante estos años de formación en el posgrado.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por darme esta valiosa oportunidad para seguir superandome.

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras por ser mi guía y amigo durante el desarrollo de mi doctorado.

Al Instituto de Química de la UNAM, por permitirme desarrollar en sus instalaciones del Laboratorio de Bioquímica, el proyecto de doctorado.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, del Departamento de Bioquímica de la UNAM, por su amistad, su generosa e invaluable ayuda, apoyo y colaboración en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo de Agosto de 2005 a Julio de 2008.

A la Dra. Vanessa Cabra L. por su permanente ayuda, consejo, amistad y colaboración, así como sus acertados consejos durante el desarrollo experimental de mi trabajo.

A Marco Romero, por su infinito apoyo en todos estos años.

*A mis padres,
Hermanos y
Amigos*

*Fa vint anys que tinc vint anys.
Vint anys i encara tinc força,
i no tinc l'ànima morta,
i em sento bullir la sang.*

*I encara em sento capaç
de cantar si un altre canta.*

*Fa vint anys que tinc vint anys.
i el cor, encara, s'embala,
per un moment d'estimar,
o en veure un infant plorar...*

*Vull cantar l'amor. Al primer. Al darrer.
Al que et fa patir. Al que vius un dia.
Vull plorar amb aquells que es troben tots sols
i sense cap amor van passant pel món.*

*Vull alçar la veu,
per cantar als homes
que han nascut dempeus,
que viuen dempeus,
i que dempeus moren.*

*Vull i vull i vull cantar
avui que encara tinc veu.
Qui sap si podré demà.*

**Fa vint anys que tinc vint anys
Joan Manuel Serrat**

CONTENIDO

	Página
I RESUMEN	8
ABSTRACT	9
II ABREVIATURAS	10
III INTRODUCCION	11
3.1 Antecedentes	12
3.1.1 La estructura de Barril TIM	
3.1.2 Clasificación de las proteínas de Barril TIM	16
3.1.3 Plegamiento y estabilidad de las proteínas de barril TIM	
3.1.4 Plegamiento del Barril TIM	18
3.2 La enzima triosafosfato isomerasa (TIM)	20
3.2.1 Función	21
3.2.2 Glucólisis	
3.2.3 El mecanismo catalítico	22
3.2.4 Características del sitio activo	23
3.2.5 Propiedades cinéticas	25
3.2.6 Deficiencia de TIM	26
3.2.7 Oligomerización del barril (β/α) ₈ en TIM	28
3.3 Estudios de plegamiento en TIM	29
3.3.1 Desnaturalización de proteínas	
3.3.2 Desnaturalización en TIM	30
3.3.3 Descripción de los modelos de desnaturalización en TIM	32
3.3.4 El intermediario dímérico	
3.3.5 El intermediario monomérico	33
3.4 Energética del plegamiento de TIM	34
3.4.1 Estabilidad	
3.5 Ingeniería del plegamiento del barril TIM	35
3.5.1 Las mutantes monoméricas de TIM	
3.5.2 monoTbTIM	37
IV OBJETIVOS	41
4.1 General	
4.2 Particulares	
V MATERIALES Y METODOS	42
5.1 Material Biológico: cepas bacterianas y plásmidos	
5.2 Enzimas y reactivos	
5.3 Mutagénesis y purificación	
5.3.1 Diseño y Obtención de la proteína mutante	

5.3.2	Sobreexpresión y purificación de la proteína mutante	44
5.4	Caracterización de la enzima mutante	45
5.4.1	Determinación de la actividad catalítica	
5.4.2	Obtención de los parámetros cinéticos	
5.4.3	Determinación del peso molecular	46
5.4.4	Determinación del tiempo de equilibrio para la desnaturalización y renaturalización	47
5.4.5	Ensayos de reversibilidad	
5.4.6	Análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular (DC)	48
5.4.7	Análisis del proceso de desplegamiento por Gdn-HCL monitoreado DC y fluorescencia	
5.4.8	Análisis de estructura terciaria por fluorescencia extrínseca	49
5.5	Determinación de parámetros termodinámicos	
5.6	Cristalización de la proteína mutante y colecta de datos	50
5.7	Determinación de la estructura cristalográfica y refinamiento.	51
VI	RESULTADOS	52
6.1	Diseño y purificación de monoTcTIM	
6.2	Peso molecular de monoTcTIM	55
6.3	Análisis de estructura secundaria y terciaria	57
6.4	Actividad catalítica	59
6.5	Desnaturalización y renaturalización de monoTcTIM	59
6.5.1	Patrón de desnaturalización	
6.5.2	Reversibilidad del patrón de plegamiento	62
6.5.3	Cambios en la estructura secundaria	63
6.6	Estabilidad de monoTcTIM	64
6.7	Estructura cristalográfica de monoTcTIM	66
6.8	Unión de ANS	68
VII	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
7.1	Construcción de monoTcTIM	
7.2	Estabilidad del monómero aislado de TcTIM	72
7.3	Exposición de área hidrofóbica	73
7.4	Estructura y catálisis del monómero aislado de TcTIM	74
VIII	CONCLUSIONES	77
IX	PERSPECTIVAS	79

X	REFERENCIAS GENERALES	80
XI	ANEXOS	81

Artículo I **Francisco Zárate-Pérez**, María Elena Chánez-Cárdenas, Rodrigo Arreola, Alfredo Torres-Larios, Edgar Vázquez-Contreras (2009) Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.085

Artículo II **Francisco Zárate-Pérez** and Edgar Vázquez-Contreras (2008) The Oligomeric Nature of Triosephosphate Isomerase. Studies of Monomerization. *American Institute of Physics*. February 14, 1978, 75-86. DOI:10.1063/1.2891415

Artículo III **Francisco Zárate-Pérez**, María Elena Chánez-Cárdenas, and Edgar Vázquez-Contreras (2008) The Folding Pathway of Triosephosphate Isomerase. In P. Michael Conn, editor: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 84, Burlington: Academic Press, pp. 251-267. ISBN: 978-0-12-374595-8

I RESUMEN

En esta tesis se reporta la monomerización de la enzima triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). Se construyó la mutante monomérica (monoTcTIM) acortando el asa tres de interdigitación de la enzima silvestre. La naturaleza monomérica de la mutante fue determinada usando cromatografía de exclusión molecular. Los análisis de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca mostraron una preservación general en su estructura secundaria y terciaria. Asimismo, los ensayos de actividad catalítica indican que la mutante es catalíticamente activa ($K_{cat} = 51.7 \text{ seg}^{-1}$). Se determinó su patrón de plegamiento/desplegamiento usando Gdn-HCl como desnaturizante y con diferentes concentraciones de proteína. No se encontró evidencia de la presencia de reacciones de oligomerización, determinándose un proceso de desnaturalización de dos estados. La estabilidad del monómero obtenida ($\Delta G = 13 \text{ kJmol}^{-1}$) es muy similar a la reportada para otras especies monoméricas de TIM. El cambio en la superficie hidrofóbica expuesta antes y después de la monomerización fue seguido por la fluorescencia del ANS, donde se encontró un incremento de 4 a 5 veces mayor para monoTcTIM respecto a TcTIM, lo cual indica una extensa área hidrofóbica expuesta en la mutante. La estructura cristalográfica de monoTcTIM fue obtenida a 2.0 Å de resolución y muestra la estructura de barril completamente conservada. Se compararon las propiedades de monoTcTIM con las reportadas para otras mutantes monoméricas de TIM. Estos resultados muestran que usando el mismo tipo de mutaciones al nivel del asa 3 de la interface, la actividad de una triosafosfato isomerasa monomérica es 10 veces mayor que la de una enzima homóloga con 74 % de identidad y 86 % de similitud, mientras que la actividad de las enzimas diméricas nativas, es esencialmente la misma.

ABSTRACT

We report the monomerization of triosephosphate isomerase (TIM) from *T. cruzi* (TcTIM). The monomeric mutant (monoTcTIM) was constructed by shortening and modifying loop 3 of the wild-type enzyme. The monomeric nature of monoTcTIM in solution was verified by Size Exclusion Chromatography. To address the degree of structure and function of monoTcTIM, circular dichroism and intrinsic fluorescence analyses were performed revealing overall preservation of the barrel structure. monoTcTIM catalytic activity was followed at different protein concentrations, where it was found that the mutant is catalytically active ($K_{\text{cat}} = 51.7 \text{ seg}^{-1}$). The reversible equilibrium denaturation and renaturation pattern in Gdn-HCl was determined. No evidence of the presence of oligomerization reactions was observed in any of these experiments and the process was determined as a two state process. The stability of the monomer ($\Delta G = 13 \text{ kJmol}^{-1}$) is similar to others monomeric mutant reported for TIM. The change in the exposed hydrophobic surface before and after monomerization was followed by ANS fluorescence; a 4- to 5-fold increase in extrinsic fluorescence was obtained for monoTcTIM when compared with TcTIM, indicating that, after mutation, considerable hydrophobic surface is exposed. The crystallographic model of monoTcTIM (2.0 Å resolution) shows an overall well conserved structure. The properties of monoTcTIM are compared with those of some TIM monomers reported in the literature. These results show that, using the same set of mutations at the level of the interface loop 3, the activity of a triosephosphate isomerase monomeric enzyme is ten times higher than that of a homologous enzyme with 74% identity and 86% similarity, whereas the activity of the native, dimeric enzymes is essentially the same.

II Abreviaturas.

A	Agregado
ANS	Ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfónico
ATP	Adenosin-5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Dicroísmo circular (Circular dichroism)
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DLS	Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminonotetraacético
GAP	Gliceraldehido-3-fosfato
Gdn-HCl	Clorhidrato de guanidina
IF	Intensidad de Fluorescencia
IPP	2-(<i>N</i> -formil- <i>N</i> -hidroxi)-aminoetil fosfonato
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
MALDI_TOF_MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectroscopy
N	Estado nativo
N₂	Dímero nativo
N₂*	Dímero no nativo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de Datos de Proteínas
PGA	2-fosfoglicolato
PGH	fosfoglicolohidroxamato
SCM	Centro espectral de masa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
TEA	Trietanolamina
TED	Trietanol amina, EDTA, DTT
TIM	Triosafosfato isomerasa
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
U	Estado desplegado
2M	Monómeros compactos
2U	Monómeros desnaturalizados
3PG	Glicerol-3-fosfato

III Introducción

La superfamilia de la triosafosfato isomerasa (TIM) o proteínas de barril es una de las más abundantes en la naturaleza, ya que aproximadamente el 10% de todas las proteínas conocidas contienen esta estructura (Reardon & Farber, 1995). Las enzimas TIM catalizan una gran variedad de reacciones metabólicas. Debido a su abundancia, el plegamiento del barril TIM ha sido de gran interés en este campo de investigación. Actualmente existe una gran cantidad de estudios relacionados con la estructura, función y los orígenes evolutivos de esta clase de proteínas.

La TIM es una enzima que en la glucólisis cataliza la interconversión entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (Knowles & Albery 1977, Knowles, 1991). Esta enzima sólo es activa en su forma oligomérica, y la estructura del dímero nativo o del tetrámero en algunas especies, sugiere que el proceso de oligomerización es importante para estabilizar la geometría de algunos de los residuos del sitio activo (Wierenga *et al.*, 1992a, Nájera *et al.*, 2003). La estructura y función de TIM se han estudiado exhaustivamente desde hace muchos años y desde mediados de los años 1970's (Banner *et al.*, 1976), cuando se obtuvo la primera estructura cristalográfica, se han obtenido avances espectaculares en relación a la caracterización bioquímica y estructural. A la fecha se han determinado estructuras tridimensionales de TIM de 20 diferentes especies (Tabla 3.1). En los organismos mesófilos (es decir en aquellos cuyo crecimiento está en un rango de 20-45 °C), la TIM es un homodímero y está compuesto de aproximadamente 250 residuos, con un peso aproximado de 27 kD (Brändén, 1991). La comparación de estas estructuras tridimensionales muestra que cada subunidad corresponde a un barril (β/α)₈ denominado barril TIM. Los residuos catalíticos de esta enzima están autocontenidos en cada

subunidad o monómero. Las asas del extremo carboxilo del barril forman la interfase entre las subunidades (Knowles, 1991).

Se han realizado numerosos esfuerzos para tratar de comprender el mecanismo que subyace a la naturaleza oligomérica de TIM. Una de las estrategias más utilizadas ha sido la desestabilización de la interfase de la enzima silvestre, a partir de la cual se han obtenido proteínas monoméricas mutantes de TIM (ver Tabla 3.3). La catálisis que presentan todas estas mutantes monoméricas de TIM, es mucho más baja respecto a la observada para la enzima silvestre. En numerosos reportes, estos monómeros de TIM se han sometido a diversos estudios para tratar de mejorar su actividad catalítica. Por otro lado, existen varios reportes relativos al plegamiento tanto de la enzima oligomérica como de las mutantes monoméricas. En este sentido, se ha avanzado en la comprensión de diversos aspectos de la relación estructura-función de esta enzima. Respecto a sus rutas de plegamiento, por ejemplo en TcTIMy TbTIM, se han observado intermediarios similares en ambas enzimas durante su desnaturalización por Gdn-HCl. Sin embargo, el proceso solo es reversible para TcTIM (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002 y 2005) (Tabla 3.2).

3.1 Antecedentes

3.1.1. La estructura del barril TIM

El plegamiento de barril TIM fue determinado por primera vez en la triosafosfato isomerasa de pollo (*Gallus gallus*) (Banner *et al.*, 1976) (Tabla 3.1). Este tipo de plegamiento es uno de los más comunes y constituye aproximadamente un 10 % del total de las proteínas conocidas. La similitud estructural entre los miembros de esta familia es muy elevada aún cuando la identidad en secuencia sea en general relativamente baja y define al plegamiento (β/α)₈; a este plegamiento se le ha denominado barril TIM. Los barriles TIM se encuentran en la naturaleza principalmente

como dímeros, aunque hay dos especies donde se encuentra como tetramérica: *Pyrococcus woesei* (Walden *et al.*, 2001 y 2004) y *T. maritima* (Maes *et al.*, 1999).

Código PDB	Especie	Resolución (Å)	año	Referencia
1TIM	<i>Gallus gallus</i>	2.50	1976	Banner <i>et al.</i> , 1976
3TIM	<i>T. brucei</i>	2.80	1991	Wierenga <i>et al.</i> , 1987
1YPI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.90	1991	Lolis <i>et al.</i> , 1990
1TRE	<i>E. coli</i>	2.60	1993	Noble <i>et al.</i> , 1993
1HTI	<i>Homo Sapiens</i>	2.80	1995	Mande <i>et al.</i> , 1994
1BTM	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	2.80	1996	Delboni <i>et al.</i> , 1995
1AMK	<i>Leishmania mexicana</i>	1.83	1997	Williams <i>et al.</i> , 1999
1YDV	<i>P. falciparum</i>	2.20	1997	Velanker <i>et al.</i> , 1997
1TCD	<i>T. cruzi</i>	1.83	1999	Maldonado <i>et al.</i> , 1998
1AW2	<i>Vibrio marinus</i>	2.65	1998	Alvarez <i>et al.</i> , 1998
1B9B	<i>Thermotoga maritima</i>	2.85	2000	Maes <i>et al.</i> , 1999
1HG3	<i>Pyrococcus woesei</i>	2.70	2001	Walden <i>et al.</i> , 2001
1M6J	<i>E. histolytica</i>	1.50	2002	Rodríguez-Romero <i>et al.</i> , 2002
1MO0	<i>C. elegans</i>	1.70	2002	Symersky <i>et al.</i> , 2003
1R2T	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.25	2003	Aparicio <i>et al.</i> , 2003
1W0M	<i>Thermoproteus tenax</i>	2.50	2004	Walden <i>et al.</i> , 2004
1YYA	<i>Thermus thermophilus</i>	1.60	2005	Yamamoto & Kunishima por publicarse
2I9E	<i>Tenebrio molitor</i>	2.00	2006	Schmidt <i>et al.</i> , por publicarse
2H6R	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	2.30	2007	Gayathri <i>et al.</i> , 2007
2JGO	<i>Helicobacter pylori</i>	2.30	2008	Chu <i>et al.</i> , 2008

Tabla 3.1 Estructuras cristalográficas de TIM de diferentes especies reportadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Se muestran las TIM de 20 diferentes especies cuya estructura se determinó por vez primera en los años indicados.

El barril TIM está formado por ocho hebras β paralelas que están unidas unas a otras por puentes de hidrógeno formando una estructura similar a un barril en la parte interna de la proteína; este a su vez, está rodeado de ocho α -hélices conectadas por las hebras precedentes a través de regiones de asas de longitud variable (Figura 3.1). Las α -hélices cubren a la hoja β orientando sus caras hidrofóbicas hacia la hoja β , mientras que sus caras hidrofílicas se orientan hacia el solvente. Las asas $\beta\alpha$ (las que conectan una hebra β a la siguiente α -hélice) tienden a ser más largas que las $\alpha\beta$.

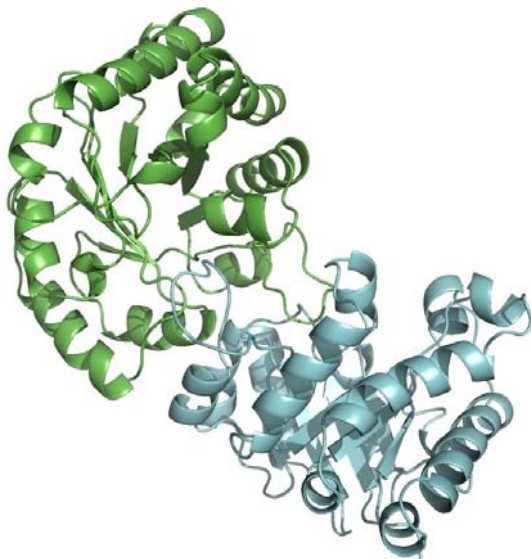


Figura. 3.1 Estructura tridimensional de TIM. Estructura nativa del dímero de la TIM de *Trypanosoma cruzi* (PDB 1TCD). Se muestran las subunidades de diferente color. Se observan las hojas β en la parte interna y las α -hélices hacia el exterior de cada subunidad.

La estructura de barril está estabilizada principalmente por las cadenas hidrofóbicas que están orientadas hacia el centro del barril, así como también por las interacciones entre las hebras β y las α -hélices adyacentes (Wierenga, 2001; Pujadas & Palau, 1999). Aunque este plegamiento se conoce como barril, la estructura β no es circular en la región interna, sino más bien elíptica; asimismo la altura del barril también varía (Reardon & Farber, 1995).

La mayoría de las α -hélices en las proteínas de barril son anfipáticas y se empaican sobre las correspondientes hebras β , dejando una interfase muy hidrofóbica entre el barril β y las α -hélices que lo rodean.

Las asas amino terminal en las proteínas de barril TIM muestran en general, una menor similitud en secuencia comparadas con el resto de la proteína. Ya que el sitio activo se sitúa en el extremo carboxilo terminal del barril β ; las asas amino terminal quedan muy alejadas de él. Se ha postulado que las asas tienen un papel muy importante en la estabilización global de la estructura de la mayoría de las proteínas de barril TIM (Borchert *et al.*, 1994). Por ejemplo, en TIM, el asa 3 entra en la cavidad formada a su vez por las asas 1 y 4 de la interfase de la otra subunidad (Borchert *et al.*, 1994, Saab-rincón *et al.*, 2001).

El sitio activo en todas las enzimas TIM se localiza en los extremos carboxilo terminal de las hebras β y está configurado por las asas $\beta\alpha$ (Farber & Petsko 1990, Pujadas & Palau 1999), y los residuos que conforman el sitio catalítico provienen de diferentes posiciones en la secuencia (Nagano *et al.*, 1999). Los sustratos de las enzimas TIM en su mayoría están cargados negativamente, lo que permite una interacción favorable con el campo electrostático generado por la cadena principal y las laterales de los aminoácidos. Este campo electrostático es positivo en las cercanías del sitio activo (Raychaudhuri *et al.* 1997). Muchos de los sustratos tienen un motivo unión a fosfato; estos sitios aparecen con frecuencia en la región carboxilo terminal (asas 7 y 8); en diversas TIM existe una pequeña hélice de unión de fosfato insertada en el asa 8 (Wilmanns *et al.* 1991). Numerosas enzimas de barril TIM unen cofactores tales como flavin mononucleótido, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), piridoxal-5'-fosfato, o metales divalentes (Nagano *et al.*, 2002). En las enzimas que utilizan

cofactores, éstos siempre se unen en la región carboxilo terminal del barril, al igual que los sustratos.

3.1.2 Clasificación de las proteínas de barril TIM

Se ha mencionado ya que el barril TIM es la conformación más común que adoptan las enzimas. La clasificación denominada CATH (Clase, Arquitectura, Topología y superfamilia homóloga, por sus siglas en inglés) (Orengo *et al.*, 1997), se dividió a las proteínas de barril en 18 superfamilias de estructuras homólogas, que incluyen 8889 plegamientos de barril en 503 registros del banco de datos de proteínas (PDB) (Nagano *et al.*, 1999). En la base de datos de clasificación estructural de proteínas (SCOP), se encuentran 25 superfamilias de barril TIM basadas en similitud estructural. Por otro lado, de acuerdo a sus actividades enzimáticas, las proteínas de barril TIM se dividen en 6 clases, cinco de las cuales son enzimas (Pujadas & Palau 1999). De acuerdo a la Comisión de Enzimas (E.C.), las ligasas es el único grupo donde no se han encontrado enzimas de barril TIM. La mayoría de las enzimas de barril TIM conocidas son hidrolasas. También se pueden encontrar oxidorreductadas, liasas, isomerasas y transferasas. La mayoría de la proteínas de barril TIM de estructura conocida están involucradas en metabolismo y rutas energéticas (Rison *et al.*, 2000).

3.1.3 Plegamiento y estabilidad de las proteínas de barril TIM

La definición de plegamiento actual se deriva de los estudios realizados por Anfinsen en 1973 (Anfinsen, 1973), con la ribonucleasa A, donde estableció que la desnaturalización es un proceso reversible y que la proteína recupera su estructura nativa funcional espontáneamente cuando se elimina el agente desnaturalizante. De estos resultados a su vez, se postuló la hipótesis termodinámica donde se establece que la estructura tridimensional de una proteína en su medio fisiológico normal es aquella en la cual la

energía libre de Gibbs del sistema es menor; es decir, la conformación nativa está determinada por la totalidad de las interacciones interatómicas y, por tanto, por la secuencia de aminoácidos, en un medio determinado. Los estudios posteriores en diversas proteínas globulares confirman las aseveraciones anteriores y en la actualidad existe el consenso generalizado de que toda la información necesaria para el plegamiento de la proteína está contenida en su secuencia de aminoácidos y en su posterior interacción originada por sus propiedades fisicoquímicas. Por lo anterior, se ha planteado la existencia de un código de plegamiento análogo al código genético. Sin embargo, el código de plegamiento de proteínas es muy complejo y aún desconocido. El cómo una cadena polipeptídica adopta una estructura tridimensional única en el medio adecuado es un problema físico-químico que puede ser abordado experimentalmente.

Son numerosos los esfuerzos realizados en los años recientes para encontrar soluciones al problema del plegamiento y generan grandes expectativas en cuanto a las posibilidades de comprender las leyes que rigen al proceso. Como ejemplo del planteamiento anterior se pueden mencionar el diseño de proteínas *de novo* con actividades específicas, el aumento en la estabilidad y la modificación de actividades enzimáticas. En la actualidad el problema del plegamiento se centra fundamentalmente en las preguntas de cómo se pliegan las proteínas; además se trata de determinar cuál es el camino o ruta de plegamiento que sigue una proteína para adoptar su estructura tridimensional nativa a partir de su forma desplegada.

Se sabe que las proteínas tienen una estabilidad relativamente baja (Pace, 1990), lo suficiente para mantener su estructura y tener la flexibilidad necesaria para llevar a cabo su función. Esto implica que existe un balance muy específico en las interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno que determinan su estabilidad (Dill, 1990). Sin embargo, la identificación y determinación de la contribución de las diversas

fuerzas involucradas en el plegamiento y estabilidad, así como la secuencia de eventos que determinan estos procesos, aún queda por resolverse. Uno de los mayores avances en la comprensión del proceso del plegamiento ha sido la evidencia de que las proteínas se estructuran por etapas que van de menor a mayor complejidad, y por rutas específicas, presentándose además, en algunos casos, especies intermedias o intermediarios (Kim, 1982). Al final todas las moléculas convergen en lo que se denomina una ruta de plegamiento (Creighton, 1990). En las dos últimas décadas se ha generado una gran cantidad de investigaciones donde se han identificado y caracterizado las rutas de plegamiento de diversas proteínas.

3.1.4 Plegamiento del Barril TIM

En la actualidad se dispone de una buena cantidad de datos sobre la estabilidad y el plegamiento de las proteínas de barril TIM. Se ha observado que algunas de ellas exhiben rutas de plegamiento similares, como es el caso de las enzimas involucradas en las rutas de síntesis de triptófano (TrpF y TrpA). En estas enzimas las primeras seis unidades se pliegan primero y subsecuentemente se asocian con las dos últimas unidades $\beta\alpha$ (Higgins *et al.* 1979, Eder & Kirschner 1992, Zitzewitz & Matthews 1999). En ambos casos el fragmento N-terminal se pliega semejando la estructura de barril con las dos últimas hojas, mientras que el fragmento del C-terminal no participa. Además se ha sugerido que la unidad $\beta\alpha\beta$ es el bloque de plegamiento en TrpA, y su adición consecutiva incrementa la estructura y estabilidad de la proteína (Zitzewitz & Matthews 1999, Tsai & Nussinov 2001). A través de estudios computacionales se ha observado que los cúmulos de aminoácido hidrofóbicos son muy importantes, ya que actúan como núcleos de iniciación del plegamiento (Mirny & Shakhnovich 1999) y donde además se postula, podrían estar involucradas otro tipo de interacciones tales como puentes de

hidrógeno o puentes salinos. En otro ejemplo de enzimas con plegamiento de barril, las enzimas HisA e HisF de la ruta de síntesis de histidina, presentan una simetría duplicada, donde las mitades pueden plegarse de manera independiente y asociarse para formar un barril TIM funcional (Höcker *et al.* 2001). Por lo tanto a diferencia de TrpA y TrpF, éstas enzimas podrían seguir una ruta de plegamiento “4+4”.

El empacamiento de las cadenas laterales hacia el interior del barril que forman las capas de contacto mencionadas previamente, determinan que la estructura del barril TIM sea muy estable. Otra característica que interviene en la elevada estabilidad de este tipo de plegamiento es la presencia de las interacciones en las cadenas laterales hidrofóbicas entre las α -hélices anfipáticas y las hoja β central (Höcker *et al.* 2001).

En el barril TIM las propiedades catalíticas y de estabilidad están bien definidas. El sitio activo se encuentra hacia el C-terminal y no interviene prácticamente en la propiedad de estabilidad, mientras que el N-terminal se le atribuye en gran medida la estabilidad del plegamiento. El barril TIM es una estructura muy versátil, con actividades catalíticas muy variables y que puede ser modificada con cierta facilidad para generar sitios activos sin interferir con la estabilidad. En el caso de proteínas de barril TIM de extremófilos por ejemplo, se puede aumentar la estabilidad con cambios muy sutiles sin afectar su actividad catalítica. Asimismo, la oligomerización de este plegamiento es vital para aumentar la estabilidad.

Todas las TIM conocidas forman oligómeros, y cuando se generan mutantes monoméricas, invariablemente su actividad se ve seriamente disminuida. Todavía no se conocen las causas del porqué las TIM deben ser al menos dímeros obligados. Aunque se han propuesto tanto razones de ganancia de estabilidad (Mainfroid *et al.* 1996b, Nájera *et al.*, 2003) y de una conformación adecuada del sitio activo (Schliebs *et al.*, 1997). En un análisis comparativo sobre las propiedades de termoestabilidad de 10

diferentes estructuras de TIM (Maes *et al.*, 1999) donde se incluyen enzimas de organismos extremófilos (organismos que viven por debajo o por arriba del rango de temperatura a la cual lo hacen los mesófilos), se encontró que en tres de ellas (*T. maritima* and *Bacillus stearothermophilus* y *Vibrio marinus*) se incrementa el número de puentes de hidrógeno respecto a las TIM de organismos mesófilos. Además tanto en *T. maritima* como en *Bacillus stearothermophilus*, se observó una mayor superficie hidrofóbica oculta comparada con otras TIM. Las observaciones anteriores pueden estar relacionadas con una mayor estabilidad de esas proteínas. Por otro lado, parece haber residuos clave en la secuencia de TIM que podrían ser de importancia vital para mantener la estabilidad inclusive del estado oligomérico. Como ejemplo de lo anterior la Gln65 de la TIM de *Lehismania mexicana* que está conservada en todas las TIM, que está se encuentra en la interfase dimérica y en esta especie está reemplazada por un Glu. A pesar de este cambio, que podría ser desestabilizante, esta enzima es tan estable como las demás. Por lo tanto deben existir otras interacciones para compensar la introducción de un grupo ionizable en la interfase oculta. Al mutar esta Glu por Gln (mutante E65Q) se obtuvo una enzima muy estable con propiedades catalíticas similares a la enzima silvestre (Williams *et al.*, 1999). Por otro lado, la mutación de la muy conservada Cys14 en la TIM de *T. brucei* produce una desestabilización tal en su estructura que abate su actividad catalítica y su estado oligomérico (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002). Asimismo este residuo presenta distinta susceptibilidad a varios reactivos derivatizantes de cisteína (Cabrera *et al.*, 2008).

3.2 La enzima triosafosfato isomerasa (TIM)

A través de los años se han realizado numerosos reportes y revisiones referentes a la estructura y mecanismo catalítico de la TIM denominada “enzima perfecta” (Knowles

& Albery 1977, Knowles 1991). En estos trabajos se hace referencia de manera general a los barriles TIM de tipo glicolítico. De manera particular nos referimos en esta tesis a las TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). Sobre esta última se llevaron a cabo todos los estudios y análisis que son presentados en esta tesis.

3.2.1 Función

3.2.2 Glucólisis

La glucólisis es un proceso metabólico utilizado por todos los seres vivos para proveerse de energía y compuestos de carbono. Es un proceso anaeróbico que tiene lugar en el citosol y en algunos casos, en estructuras especializadas como el glicosoma (por ejemplo en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*) que quizás evolucionó en etapas muy tempranas del origen de la vida. En los organismos aeróbicos, la glucólisis es seguida por el ciclo del ácido cítrico y la cadena transportadora de electrones. La ganancia neta de la glucólisis es de dos moléculas de adenosin 5'-trifosfato (ATP) y dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa. La TIM cataliza la interconversión de DHAP y GAP en el paso 5 del proceso. El GAP se oxida posteriormente a 3-fosfoglicerato (Figura 3.2).

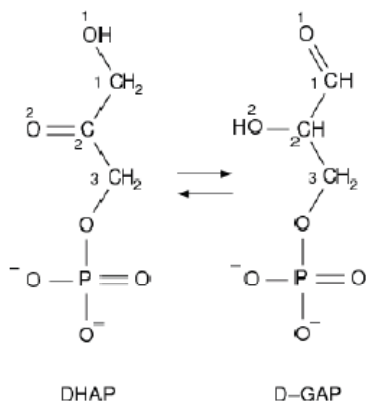


Figura 3.2 La reacción catalizada por TIM es la isomerización reversible entre una aldehído D-gliceraldehído (DHAP) y una cetona, dihidroxiacetona (D-GAP).

3.2.3 El mecanismo catalítico.

El mecanismo catalítico de la TIM involucra una transferencia de protones a través de un intermediario denominado enediolato. Para esta reacción no se requieren cofactores y se ha referido a la TIM como una “enzima perfecta”, porque su capacidad catalítica sólo está limitada por la difusión del sustrato y la salida del producto (Knowles & Alberly 1977, Knowles 1991).

La reacción inicia con la remoción de un protón del carbón C1 del sustrato (DHAP) por el Glu168 (en la secuencia de aminoácidos de TcTIM), lo que da lugar al intermediario enediolato, que es a su vez estabilizado por puentes de hidrógeno (Rieder & Rose, 1959). Otros autores sugieren que el enediolato resultante es estabilizado por un enlace de hidrógeno fuerte con la His95 (Lodi & Knowles, 1991). El protón sustraído por el Glu167 es liberado directamente al carbón adyacente (Knowles & Alberly 1977) y se requiere que la transferencia del protón entre los oxígenos que se cree está mediada por la cadena lateral de la His95. (Lodi & Knowles 1991). En la reacción de TIM, se debe hacer una importante consideración, ya que para evitar la eliminación del fosfato, el oxígeno que se mantiene en el grupo fosfato del sustrato debe mantenerse en el mismo plano que el oxígeno de la cetona del motivo de la triosa, de tal manera que los electrones no puedan deslocalizarse (Lolis & Petsko 1990). En la ausencia del asa 6, el intermediario de reacción se pierde en solución y se degrada hacia fósforo inorgánico (Pi) y metilglioxal, el cual es tóxico para la célula (Pompliano *et al.* 1990).

En la conformación cerrada, la cadena lateral del glutamato 167 no está unida por ningún puente de hidrógeno a los átomos de la proteína, sino sólo al sustrato y a una molécula de agua que es parte de la red de agua que compone al solvente. Se ha discutido ampliamente la importancia de ésta molécula de agua (Zhang *et al.*, 1999) y se cree que la presencia de algunas moléculas en el sitio activo hidrofóbico tenga un

efecto sobre el pKa de la cadena lateral del glutamato, así como también sobre la unión del sustrato o los intermediarios. Más aún, la posición de la cadena lateral del glutamato puede ser influenciada por las moléculas de agua ordenadas en la cercanía.

3.2.4 Características del sitio activo

Como ya se mencionó, el sitio catalítico en todas las proteínas de barril TIM se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal del barril (Figura 3.3A). La TIM tiene una especificidad de sustrato muy estrecha y sus únicos sustratos conocidos son DHAP y GAP. Las asas 6 y 7 presentan un cambio conformacional cuando el ligando se une (Lolis & Petsko 1990, Noble *et al.* 1991a, Noble *et al.*, 1991b, Wierenga *et al.* 1991b).

En ausencia de ligando el asa 6 interactúa con la 5, mientras que en presencia del ligando, interactúa con el motivo denominado YGGS (residuos 210-213) del asa 7. Dos oxígenos de Tyr210 y de Ser213 están unidos por puentes de hidrógeno a la cadena principal de los átomos de nitrógeno de Ala178 y Gly175 en el asa 6 respectivamente. El N de la Gly173 está unido por un puente de hidrógeno a uno de los oxígenos del fosfato del sustrato. Durante el cambio conformacional del estado abierto al estado cerrado, la punta del asa 6 (cerca de Gly 175) se mueve 7 Å como un cuerpo rígido (Wierenga *et al.* 1991b) (Figura 3.3B), mientras que el asa 7 se aplana después de que la Gly211 y la Gly212 rotan 90° y 180° respectivamente. El cierre del asa 6 ha sido estudiado también por cálculos de dinámica molecular (Joseph *et al.* 1990, Derreumaux *et al.* 1998). Los cálculos indican que el asa comienza a abrirse en la región Lys176-Val177 (Joseph *et al.* 1990), y que este evento es iniciado por la pérdida del puente de hidrógeno entre la Gly175 y la Ser213 (Derreumaux *et al.* 1998).

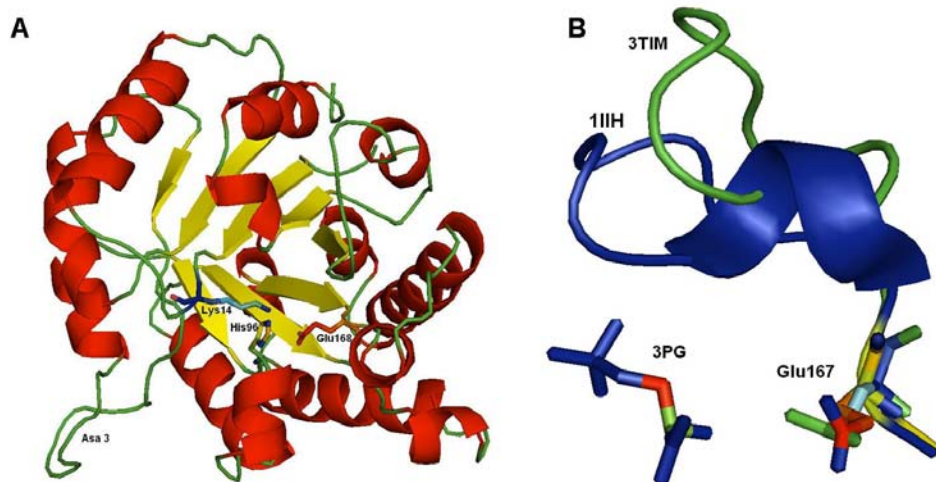


Figura 3.3 A. Representación de la estructura tridimensional de uno de los monómeros de TcTIM (1TCD; Maldonado *et al.*, 1998). Se muestran los residuos catalíticos Lys14, His96 y Glu168, localizados en las asas 1, 4 y 6, respectivamente. Puede observarse el asa 3 de interdigitación que sobresale de la estructura globular de TIM. B. Conformaciones abierta (3TIM, Wierenga *et al.*, 1987) y cerradas (1IIH, Noble *et al.*, 1991a) del asa 6 en TbTIM en ausencia y en presencia de glicerol-3-fosfato (3PG), respectivamente. Se muestran también las cadenas laterales del Glu167 catalítico.

Los residuos catalíticos Lys13, His95 y Glu167, provienen de las asas 1, 4, y 6 respectivamente (Knowles *et al.*, 1991). Los residuos de cada hebra β (o asas subsiguientes) contribuyen al sitio activo. La Thr75 del asa 3 del monómero opuesto se une por un puente de hidrógeno a las cadenas laterales de Asn11 y Glu97, proporcionando así interacciones esenciales para la estabilidad. El Glu167 al inicio del asa 6 exhibe dos conformaciones distintas, la conformación “girada hacia afuera” (“Swing-out”) en la enzima sin ligando, y la conformación “girada hacia adentro” (“Swing-in”) con el ligando (Davenport *et al.* 1991, Lolis *et al.* 1990, Noble *et al.* 1991a, 1993). En la enzima sin ligando, el grupo carboxilato del glutamato se une por un puente de hidrógeno a la Ser96. La unión del ligando induce un cambio conformacional, donde la cadena lateral del glutamato se mueve 2-3 Å quedando oculta en la proteína. Durante este proceso, los puentes de hidrógeno a la Ser96 se

rompen y son reemplazados por contactos con el ligando (Lolis & Petsko 1990, Noble *et al.* 1993a). La Lys13 está presente en una conformación algo más rígida. El posicionamiento exacto de su cadena lateral para crear un ambiente cargado positivamente para unir al intermediario cargado negativamente, es de suma importancia para el mecanismo catalítico. Otros residuos conservados cerca del sitio activo son Asn11, Glu97, Ile172, Leu232, and Cys126. El papel de la His95 no está del todo comprendido, parece tomar parte en el lanzamiento de protones durante el ciclo de reacción, o puede estar presente sólo para estabilizar al intermediario de la reacción, o ambos (Davenport *et al.* 1991).

3.2.5 Propiedades cinéticas.

La TIM es una enzima muy eficiente en la cual la velocidad de reacción está limitada solo por la velocidad de difusión del sustrato y la salida del producto de la superficie de la enzima (Blacklow *et al.* 1988). No requiere cofactores para la reacción, ni tampoco de una cooperación alostérica entre las subunidades. El equilibrio favorece la reacción de GAP hacia DHAP (Reynolds *et al.* 1971).

Existen varios análogos de sustrato con los que se han determinados detalles catalíticos y estructurales de TIM. Entre estos análogos se encuentran el 2-fosfoglicolato (PGA), fosfoglicolohidroxamato (PGH) y 2-(*N*-formil-*N*-hidroxi)-aminoetil fosfonato (IPP) (Kursula & Wierenga, 2003, Lolis & Petsko 1990, Davenport *et al.* 1991, Noble 1991a). Otros ligandos que se han utilizado exitosamente para estudiar detalles estructurales son 3-fosfonopropionato (Noble *et al.* 1991a), 2-fosfoglicerato (Noble *et al.* 1991b), 3-fosfoglicerato (Noble *et al.* 1991a), y glicerol 3-fosfato (Parthasarathy *et al.* 2002). Además del sustrato o de los análogos de transición discutidos antes, existen inhibidores

tales como el sulfato, fosfato y arsenato, que se unen a la cavidad de unión a fosfato en el sitio activo.

3.2.6 Deficiencia de TIM

La deficiencia de TIM es un desorden múltiple recesivo autosomal muy raro, que se caracteriza por un decremento en la actividad enzimática de TIM en todos los tejidos. Está acompañado por la elevación de los niveles de DHAP en los eritrocitos. Los pacientes que sufren deficiencia de TIM presentan anemia hemolítica severa y con frecuencia degeneración neuromuscular progresiva (Orosz *et al.*, 2006, Olah *et al.*, 2002). Además que también se han observado elevadas tasas de infecciones que indican una afectación del sistema inmunológico. En la mayoría de los casos es fatal y los pacientes mueren en etapas tempranas, generalmente en la infancia (Orosz *et al.*, 2006). A la fecha no se ha descrito una terapia efectiva para la deficiencia de TIM.

Se han caracterizado varias mutaciones que causan síntomas severos por la deficiencia de TIM. Estas aparecen en la región regulatoria corriente arriba del gen codificante de TIM. Además, hay una mutación en la cual el codón metionina de inicio ATG está mutado a AAG, y se han reportado corrimientos en el marco de lectura (Schnieder & Cohen-Solal, 1996). Estas mutaciones producen una TIM no funcional. Por otro lado, se han encontrado varias sustituciones de aminoácidos que alteran tanto el mecanismo catalítico, como la estabilidad o el plegamiento de TIM. La mutación más común que causa la deficiencia de TIM es Glu104Asp, que previamente se ha reportado con una baja actividad catalítica (Olah *et al.*, 2002). Entre las dos subunidades existe un puente salido formado por los residuos Arg98 y glu77. La importancia de este enlace electrostático ha sido mostrada anteriormente (Mainfroid *et al.*, 1996b), donde la mutante R98Q de la TIM de humano, da lugar a una enzima inactiva y posiblemente monomérica. Se cree que la mutación Glu104Asp se originó probablemente de una

mutación sencilla en un ancestro común europeo (Arya *et al.*, 1997). Los heterocigotos que contienen esta mutación son clínicamente normales, pero en algunos casos, la combinación con alguna otra mutación en el otro alelo produce deficiencia de TIM. El Glu104 de la TIM de humano es un residuo muy conservado y está casi oculto en la interfase dimérica de las dos subunidades. La cadena lateral de Glu104 yace entre dos residuos positivamente cargados, Arg 98 y Lys112. La Arg98 probablemente se requiera para posicionar adecuadamente a la His95 catalítica. La mutación de Glu104 a Asp acorta la cadena lateral por un átomo de carbono, originando una interacción desestabilizante desfavorable de las cadenas laterales de Arg98 y la Lys112 y posiblemente deslocaliza a la His95 en el sitio activo (Mande *et al.* 1994). En un estudio más reciente se muestra que la mutante E104D tiene capacidad catalítica similar a la silvestre, pero con un importante deterioro en su habilidad para formar dímeros y donde el equilibrio está desplazado hacia las especies monoméricas (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2008). En este estudio se encontró que sólo 3 residuos del asa 3 (asp65, Thr75 y Glu77) están estrictamente conservados en todas las secuencias disponibles de TIM, y la estructura cristalográfica de la mutante E104D muestra una estructura similar a la de la silvestre. Asimismo se encontró que el residuo 104 forma parte de un cúmulo totalmente conservado de 10 aminoácidos, donde 5 corresponden a cada subunidad. Cada una de las moléculas de este cúmulo forma más de cuatro contactos polares con un aminoácido o con otras moléculas de agua. El cúmulo a su vez, forma una cavidad que está lleno de moléculas de agua, de las cuales 11 están conservadas en todas las estructuras cristalográficas estudiadas. En este análisis se sugiere que la principal consecuencia de las mutaciones en esta región, sería la alteración en la red de moléculas de agua que comprende a las dos subunidades de la enzima. En la mutante E104D, se observó la desaparición de una molécula conservada de agua unida al residuo 104 de la

enzima silvestre, un incremento en el factor β de dos moléculas de agua que están unidas al residuo 104 en la TIM de humano y la ausencia de varios puentes de hidrógeno proteína-solvente y solvente-solvente que están presentes en la enzima silvestre. El grado de conservación de los aminoácidos y las moléculas de agua en el cúmulo en todas las TIM dimericas estudiadas, y los datos sobre la baja estabilidad de la mutante dimérica E104D, indican que la integridad de esta porción de la interface es de vital importancia en la estabilidad y la función global de la enzima. Los datos anteriores indican que es muy probable que la mutación que rompe a la red de agua, sea la causa subyacente de las manifestaciones clínicas de la deficiencia de TIM E104D (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2008).

3.2.7 Oligomerización del barril TIM en la triosafosfato isomerasa

En general, la mayoría de las TIM se encuentran como dímeros en los organismos mesófilos (Maes *et al.* 1999, Walden *et al.* 2001), y en algunos organismos extremófilos tales como *Thermatoga maritima* (Maes *et al.*, 1999) y *Pyrococcus woesei* (Walden *et al.*, 2001) forman tetrameros. La enzima TrpF, una enzima involucrada en la síntesis de triptófano, es monomérica en los mesófilos, pero dimérica y muy estable en *T. maritima* (Sternner *et al.* 1996, Hennig *et al.* 1997).

Cuando se monomeriza a las TIM por ingeniería genética, su actividad catalítica se ve seriamente afectada. A la fecha, las razones por las cuales la mayoría de las enzimas silvestres de TIM forman al menos oligómeros para ser catalíticamente competentes, se desconocen. Sin embargo, se ha postulado que la oligomerización puede aportar estabilidad durante el ensamblaje de las subunidades (Manfroid *et al.*, 1996a y 1996b), o que ésta es requerida para que los residuos del sitio catalítico se posicionen correctamente en el espacio (Schliebs *et al.*, 1997). En ciertas TIM de especies

extremófilas como *T. maritima*, *Bacillus stearothermophilus* y *Vibrio marinus*, se ha encontrado un incremento en el número de puentes salinos (Maes *et al.*, 1999). Además se ha observado también un número mayor de interacciones hidrofóbicas en la parte interna de las estructuras durante el plegamiento en el caso de *T. maritima* y *B. Stearothermophilus*, cuando se comparan con las demás TIM.

Como se mencionó anteriormente, algunas de las asas son más largas que otras y entre éstas últimas se encuentran las que corresponden a las asas 3 y 6; la primera se denomina asa de interdigitación y la segunda es el asa de unión a sustrato. El asa 3 que esta hacia el C-terminal, permite la interdigitación con la otra subunidad, y contribuye en buena medida a la estabilización, así como a la arquitectura del sitio activo (Figura 3.3A) (Borchert *et al.*, 1994; Saab-Rincón *et al.*, 2001).

3.3 Estudios de plegamiento en TIM

3.3.1 Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización o desplegamiento de las proteínas es un proceso que involucra la pérdida de la estructura tridimensional. Ya que este proceso no implica el rompimiento de los enlaces peptídicos, la estructura primaria permanece intacta. Sin embargo, el proceso de desnaturalización altera la estabilidad tanto de las α -hélices como de las hebras β de la proteína generando una estructura al azar. Los puentes de hidrógeno entre los oxígenos del carbonilo y las amidas de los enlaces peptídicos se rompen parcial o totalmente. Por otro lado, en la estructura terciaria y cuaternaria, las interacciones no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos (puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones no polares hidrofóbicas) se rompen durante la desnaturalización. La energía involucrada en las interacciones mencionadas es pequeña y se puede alterar usando distintos reactivos y condiciones para desplegar a la proteína. Un fenómeno que

se presenta a menudo en los procesos de desnaturalización es la agregación no específica, la cual se puede observar a nivel macroscópico como una precipitación en la solución de la proteína (Vázquez-Contreras *et al.*, 2008).

3.3.2 Desnaturalización en TIM

El proceso de desplegamiento se ha estudiado ampliamente en varias especies de TIM usando distintos métodos y aproximaciones experimentales, que incluyen el uso de perturbantes o agentes desnaturalizantes, tales como el aumento de la concentración de reactivos como urea y clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl), o modificando la presión y la temperatura. Este proceso se ha estudiado extensivamente y a la fecha se han analizado diversas TIM homólogas (Tabla 3.2). En algunos casos el proceso es reversible y en otros se presenta agregación, es decir, es irreversible. En algunas especies, las enzimas TIM diméricas exhiben un proceso de desnaturalización con únicamente dos estados, y en otros se han observado intermediarios de diferentes tipos. Estos intermediarios reportados en las rutas de desplegamiento de TIM corresponden a intermediarios diméricos que en general son activos, y un intermediario monomérico que es inactivo que aparece con más frecuencia que el intermediario dimérico.

Cuando el proceso de desnaturalización se presenta como irreversible como ocurre en TIM de varias especies representa todo un reto, ya que esta situación dificulta la caracterización de la ruta y su energética. El proceso de irreversibilidad se asocia a la presencia de agregación (Alvarez *et al.*, 1998; Gokhale *et al.*, 1999; Chánez-Cárdenas *et al.*, 2002; Beaucamp *et al.*, 1997) o a una histéresis (Najera *et al.*, 2003) originada por un control cinético. Sin embargo, cuando el proceso es reversible, tanto la ruta de desplegamiento como la energética del proceso pueden determinarse con relativa facilidad, aún cuando la ruta comprenda uno (Rietveld & Ferreira, 1998, Mainfroid *et*

al., 1996a; Lambeir *et al.*, 2000) o más pasos (Zabori *et al.*, 1980; Najera *et al.*, 2003; Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2005; Vazquez-Contreras *et al.*, 2005; Vazquez-Perez & Fernandez-Velasco, 2007) de la reacción total.

Enzima	Código PDB (Å)	Agente Desnaturalizante	Ruta de desplegamiento	ΔG° (kJmol ⁻¹)	Referencia
<i>B. stearothermophilus</i>	1BTM (2.8)	Gdn-HCl	$N_2 \rightarrow 2U$	101.3	Delboni <i>et al.</i> , 1995
<i>T. maritima</i>	1B9B (2.85)	Gdn-HCl	$N_2 \rightarrow A \rightarrow 2U$	-	Maes <i>et al.</i> , 1999
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	1R2R (1.5)	Gdn-HCl	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	70 140.6	Rietveld <i>et al.</i> , 1996, Moreau <i>et al.</i> , 2003; Pan <i>et al.</i> , 2004
		Urea	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	140.6	Pan <i>et al.</i> , 2004
<i>P. falciparum</i>	1YDV (2.2)	Gdn-HCl	$N_2 \rightarrow N_2^* \rightarrow A \rightarrow 2U$	-	Gokhale <i>et al.</i> , 1999
		urea	$N_2 \rightleftharpoons 2U$		Gokhale <i>et al.</i> , 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1YPI (1.9)	Gdn-HCl	$N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	103.5	Vazquez-Contreras <i>et al.</i> , 2000; Morgan <i>et al.</i> , 2000, Nájera & Fernández-Velasco, 2003
		Urea	$N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	108	Nájera & Fernández-Velasco, 2003
		Presión	$2M \rightleftharpoons 2U$	53.1	Vazquez-Perez & Fernández-Velasco, 2007
		Temperatura	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	Benitez-Cardosa <i>et al.</i> , 2001
<i>L. mexicana</i>	1AMK (1.8)	Gdn-HCl	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	82.4	Lambeir <i>et al.</i> , 2000
<i>T. brucei</i>	1TPF (1.8)	Gdn-HCl	$\begin{array}{c} A \quad A \\ \uparrow \quad \uparrow \\ N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U \end{array}$	-	Cháñez-Cárdenas <i>et al.</i> , 2002
<i>T. cruzi</i>	1TCD (1.83)	Gdn-HCl	$N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	105.7	Cháñez-Cárdenas <i>et al.</i> , 2005
<i>Homo sapiens</i>	2JK2 (1.7)	Urea	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	81	Mainfroid <i>et al.</i> , 1996b
		Temperatura	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	81	Mainfroid <i>et al.</i> , 1996b
<i>E. hystolytica</i>	1M6J (1.5)	presión	$2M \rightleftharpoons 2U$	50	Vazquez-Perez & Fernandez-Velasco, 2007

Tabla 3.2 Rutas o patrones de desplegamiento para TIM de varias especies. N_2 , dímero nativo; N_2^* , dímero no nativo; $2M$, monómeros; $2U$, monómeros desnaturalizados. A, agregados. Se muestra el valor total del proceso para ΔG° .

3.3.3 Descripción de los modelos de desnaturalización de TIM

A pesar de que las TIM provenientes de distintas especies son homólogas y presentan una alta identidad en secuencia y estructuras tridimensionales similares, sus rutas de plegamiento/desplegamiento son heterogéneas. La transición entre la proteína nativa y desnaturalizada de TIM ha sido descrita para diferentes modelos con distintos grados de complejidad (Figura 3.4). Estos modelos involucran desde un proceso de dos estados con los monómeros desnaturalizados (U) hacia la formación de los dímeros nativos (N_2), hasta reacciones de más de dos estados que incluyen intermediarios monoméricos ($2M$) e intermediarios diméricos no nativos (N_2^*). Los patrones de plegamiento reversibles encontrados en las TIM de diferentes especies se presentan en la Figura 3.4

Dos estados	Tres Estados	Cuatro Estados
$N_2 \xrightleftharpoons[k_{desplg}]{k_{pleg}} U$	$N_2 \xrightleftharpoons[k_{disoc}]{k_{asoc}} 2M \xrightleftharpoons[k_{desplgM}]{k_{plegM}} U$	$N_2 \xrightleftharpoons[k_{desplgN_2}]{k_{plegN_2}} N_2^* \xrightleftharpoons[k_{disoc}]{k_{asoc}} 2M \xrightleftharpoons[k_{desplgM}]{k_{plegM}} U$

Figura 3.4 Modelos que describen la desnaturalización/renaturalización de TIM. N_2 : dímero nativo; $2M$: intermediario monomérico; N_2^* ; U monómeros desnaturalizados. Se muestran también para cada etapa las constantes de velocidad: para el plegamiento (k_{pleg}), desplegamiento ($k_{despleg}$), de asociación (k_{asoc}) y de disociación (k_{disoc}).

3.3.4 El intermediario dimérico

Como ya se mencionó, las rutas de desplegamiento de las enzimas TIM que se han analizado, exhiben intermediarios que pueden ser monoméricos o diméricos (Zárate *et al.*, 2008). En la TIM de *P. falciparum* se observa el intermediario dimérico a bajas concentraciones de TIM (Gokhale, *et al.*, 1999). Este intermediario tiende a la agregación y se ha observado a través de variaciones en las señales espectroscópicas

respecto al dímero nativo. En el caso de la TIM de *T. brucei* (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002), el intermediario dimérico se observa a concentraciones por debajo de 1.0 M de Gdn-HCl. En la TIM de *T. cruzi* se observa un dímero en concentraciones similares de Gdn-HCl usadas para la TIM de *T. brucei* (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005). Este intermediario presenta aumento en la intensidad de fluorescencia y de estructura secundaria, así como un aumento de actividad cuando se compara con la enzima nativa. Se ha determinado también la estabilidad de éste intermediario dimérico que representa sólo una pequeña contribución del ΔG total (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005). Por otro lado, existe evidencia de un intermediario dimérico en la TIM de *T. maritima* (Beaucamp *et al.*, 1997), el cual se ha inferido de manera indirecta, y que también presenta un aumento de actividad catalítica a una baja concentración de Gdn-HCl durante el proceso de desnaturalización.

3.3.5 El intermediario monomérico

Los monómeros observados en las rutas de desplegamiento/desplegamiento conservan su estructura secundaria y terciaria pero en general son inactivos (Zárate-Pérez *et al.*, 2008). A la fecha se han encontrado intermediarios de este tipo en TIM de 4 especies distintas. En la TIM de *T. cruzi*, el monómero se encuentra entre 1.0 y 2.0 M de Gdn-HCl (Vázquez-Contreras *et al.*, 2004). Presenta una estructura secundaria y terciaria bien conservada, además de una considerable exposición de área hidrofóbica (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005). A una concentración de 1.8 M de Gdn-HCl también se ha observado un intermediario monomérico en la TIM de *T. brucei*, con un volumen molecular mayor al dímero nativo (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002). La TIM de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) presenta un intermediario monomérico cuando es desnaturalizada con Gdn-HCl o con urea (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000; Nájera *et al.*,

2003). Este intermediario presenta una menor estructura secundaria y terciaria cuando se compara con la enzima nativa, sin embargo es muy compacto (Morgan *et al.*, 2000; Nájera *et al.*, 2003). Finalmente, el intermediario monomérico de TIM de conejo, se ha detectado mediante un sistema de micelas invertidas con bajo contenido de agua (Garza-Ramos *et al.*, 1992; Fernández-Velasco *et al.*, 1995). Respecto a la estabilidad de los intermediarios monoméricos, a la fecha solo se ha obtenido para dos especies, que son *S. cerevisiae* (Nájera *et al.*, 2003) y *T. cruzi* (Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2005), donde no se aprecian diferencias importantes en los valores del ΔG para cada uno de ellos (Tabla 3.2).

3.4 Energética del plegamiento de TIM.

3.4.1 Estabilidad

Las diferencias observadas en los mecanismos de desplegamiento de TIM pueden ser debidas a las propiedades particulares de las proteínas analizadas, o a las condiciones experimentales usadas. Sin embargo, es indudable que la estabilidad conformacional se incrementa en gran medida durante el proceso de oligomerización, ya que la estabilidad del monómero es mucho menor cuando se compara con la energía de estabilidad del dímero. A partir de los datos disponibles en la literatura se estima que el ΔG total promedio del proceso es aproximadamente $86 \pm 25 \text{ kJmol}^{-1}$ (Tabla 3.2), que corresponde al 100 % de la energía libre total del proceso. Por otro lado, la estabilidad del monómero ($\approx 13 \pm 5 \text{ kJmol}^{-1}$) corresponde únicamente al 15 % de la energía total. La baja estabilidad del intermediario monomérico es quizá una de las principales razones de la ausencia de catálisis en el monómero aislado. Para el caso de la estabilidad del intermediario monomérico, ésta sólo ha sido determinada para la enzima *T. cruzi* (Cháñez-Cárdenas *et al.*, 2005) y corresponde a $4.5 \pm 1.1 \text{ kJmol}^{-1}$, que representa un 5%

de la energía total del proceso. Así pues, se considera que la asociación de las subunidades representa la principal contribución a la estabilidad total de la proteína.

3.5 Ingeniería del plegamiento de barril TIM

En años recientes ha habido mucho interés en estudios para modificar el plegamiento de barril TIM; estos intentos involucran tanto el diseño de nuevas proteínas de barril TIM, así como también modificaciones específicas de regiones de enzimas existentes. Dichos estudios se han enfocado especialmente hacia el incremento de la estabilidad optimizando las propiedades catalíticas, formando quimeras de diferentes enzimas de barril TIM, o creando actividades enzimáticas completamente nuevas (Borchert *et al.*, 1993a, b, 1994; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003; Alahuhta *et al.*, 2008;)

3.5.1 Las mutantes monoméricas de TIM

La TIM oligomérica silvestre es la única forma completamente activa de la enzima, y en la actualidad se han postulado diversas razones por las cuales se cree que es un oligómero obligado (Nájera *et al.*, 2003). A pesar de lo anterior, se ha mostrado que algunos monómeros obtenidos por ingeniería genética mantienen cierto grado de actividad (Schliebs *et al.*, 1997). Se ha mencionado que una de las razones clave de su baja actividad es la pérdida de rigidez en la interfase dimérica, lo que implica a su vez, conformaciones más flexibles para algunos de los residuos del sitio activo (Wierenga *et al.*, 1992a, Thanki *et al.*, 1997). Esto implica que en las formas monoméricas de TIM con estructura conservada, la población de sitios activos competentes es muy baja.

La interfase dimérica esta conformada por las asas 1 a 4 (Wierenga *et al.*, 1992b), de las cuales resalta el asa 3 (Figura 3.3A), que sobresale del monómero y se inserta en la profunda cavidad cerca del sitio activo del otro monómero entre las asas 1y 4 (Borchert

et al., 1994). Los contactos átomo-átomo inter-subunidades involucran cerca del 80 % de los átomos del asa 3. El área que abarca la interfase es de aproximadamente de 1600 Å² por subunidad y es muy importante para la estabilidad de la proteína (Janin *et al.* 1988, Wierenga *et al.* 1991b).

Los experimentos de modificación química han mostrado que el sitio catalítico de un monómero es completamente activo cuando está acoplado al otro monómero con un sitio catalítico no funcional (Sun *et al.* 1992a, Sun *et al.* 1992b). La formación de heterodímeros con TIM de *T. cruzi* y *T. brucei* muestran que cerca de la mitad de la actividad de un monómero depende de la integridad de la interacción de la Cys15 de *T. cruzi* (del monómero 1) con el asa 3 (del monómero 2) (Zomosa-Signoret *et al.* 2007). El cambio de la Cys14 de *T. brucei* ha mostrado su importancia en la oligomerización de la enzima, ya que al ser mutada por Phe, genera un monómero (Hernandez-Alcantara *et al.* 2002). Asimismo, la derivatización de esta Cys en la TIM de *P. falciparum*, también da origen a un monómero (Maithal *et al.*, 2002) (ver Tabla 3.3).

Un ejemplo que muestra la importancia de la dimerización y la necesidad de este proceso en la funcionalidad de TIM, es la deficiencia de TIM en humano y sus consecuencias, causada por la mutación E104D, que a su vez resulta probablemente en la inestabilidad de la enzima mutante y en la subsecuente disociación de los dímeros activos en monómeros inactivos (Orosz *et al.*, 2006, Olah *et al.*, 2002).

TIM garantiza la producción de ATP en el proceso glicolítico, lo cual puede aprovecharse para diseñar fármacos contra patógenos que tienen a este proceso metabólico como principal fuente de energía. Sin embargo, la elevada similitud que existe entre los sitios activos de TIM de diferentes especies, ha dificultado precisamente el diseño de inhibidores específicos. La disrupción de la interfase dimerica se ha establecido como una estrategia alternativa para lograr su inhibición (Gómez-

Puyou et al., 1995; Velanker *et al.* 1997, Ostoa-Saloma *et al.* 1997; Tellez-Valencia *et al.* 2002 y 2004; Rodríguez-Romero *et al.* 2002). El estudio de la interfase dimérica es de vital importancia en la comprensión del funcionamiento de la TIM, en este sentido se requiere conocer los residuos, interacciones y áreas involucradas en el proceso de dimerización. Históricamente ha sido el asa 3 de interdigitación una de las primeras áreas exploradas. La mutación puntual H47N en el asa 2 (Borchert *et al.*, 1993b) (Tabla 3.3), así como la doble mutación T75R-G76E en el asa 3 (Schliebs *et al.*, 1997), dan origen a mutantes monoméricas con una actividad catalítica muy baja respecto a la enzima silvestre. La mutante H47N sólo es monómero a bajas concentraciones en solución, y T75R-G76E es todavía menos activa que la variante H47N.

3.5.2 monoTbTIM

Al generar una mutante monomérica, queda expuesta al solvente polar una gran cantidad de área hidrofóbica de la interfase dimérica (Borchert *et al.*, 1994). Mediante un modelo computacional al asa 3, se trató de disminuir dicha área hidrofóbica a la cual se le atribuye la pérdida de actividad. La modificación de los 15 aminoácidos que forman al asa 3, (residuos 68-82), acortando 7 residuos y cambiando 8 por aminoácidos más hidrofílicos, dio origen a la enzima mutante monomérica de TIM de *T. brucei* que se le denominó monoTbTIM. MonoTbTIM resultó ser estable, con una K_{cat} 1000 veces menor y una K_m 20 mayor respecto a la enzima silvestre (Borchert *et al.* 1993a, Borchert *et al.* 1995a, Schliebs *et al.*, 1996). La estructura cristalográfica de monoTbTIM muestra que las posiciones de las asas 1 y 4 están muy afectadas por el acortamiento del asa 3. El asa 1 que contiene a la Lys catalítica, está muy desordenada y es invisible en los mapas de densidad electrónica. Sobre esta monoTbTIM se han llevado a cabo diversas modificaciones estructurales, explorando diversas regiones de

su estructura (Tabla 3.3), entre ellas las que están enfocadas a recuperar las interacciones y posiciones espaciales de los residuos catalíticos (Borchert *et al.* 1995^a, Schliebs *et al.*, 1996, Thanki *et al.*, 1997, Alahuhta *et al.*, 2008).

Una variante de monoTbTIM se obtuvo utilizando una combinación de técnicas como modelamiento, mutagénesis y cristalografía. El asa 8 de unión a fosfato fue acortado a fin de hacer la cavidad del sitio activo más amplia y que fuera capaz de unir sustratos distintos a DHAP y GAP (Norlegde *et al.*, 2001). Una de estas variantes obtenidas es la ML8BTIM, que es estable pero inactiva. Su estructura cristalográfica muestra a la nueva asa 8 en una conformación bien definida y la cavidad del sitio activo más amplia. Asimismo, en esta variante se muestran preservadas la flexibilidad de las asas 6 y 7 y en una posición correcta los residuos catalíticos. Sobre esta mutante se obtuvieron a su vez, nuevas variantes que unen distintos sustratos y análogos de sustrato (Alahuhta, *et al.*, 2008). La estrategia de evolución dirigida también ha sido explorada (Saab-Rincón *et al.*, 2001), y se ha encontrado la persistencia de las mutaciones A43P y T44A, o S. Aún cuando no se conoce la estructura tridimensional de esta mutante, se postula que estas mutaciones estabilizan al asa 2 y serían la causa probable del mejoramiento de la actividad catalítica que presenta esta variante de monoTbTIM. En el caso de la TIM de humano (hTIM), se han creado formas monoméricas en solución (Mainfroid *et al.* 1996b), que dependen de la concentración, son inactivas y con una baja estabilidad (Tabla 3.3).

Como se mencionó anteriormente, la Cys 14 es un residuo importante para la dimerización tanto en la TIM de *T. brucei* como de *P. falciparum* (Hernandez-Alcantara *et al.* 2002, Maithal *et al.* 2002). Sin embargo, en humano la posición 14 corresponde a una metionina. Esta diferencia es muy importante, ya que establece la posibilidad de

desarrollar un fármaco específico para especies causantes de enfermedades en los humanos (Tellez-Valencia *et al.*, 2004).

Especie	Modificación	Región modificada	PDB/resolución (Å)	Referencia
<i>T. brucei</i>	Deleción y sustitución	Asa 3	1TRI (2.40)	Borchert <i>et al.</i> , 1993 ^a
	H47N	Asa 2		Borchert <i>et al.</i> , 1993b
	F45S, V46S; monoTbTIM-SS	Asa 2	1MSS (2.40)	Borchert <i>et al.</i> , 1995 ^a
	F45S, V46S; monoTbTIM-SS-(PGH)	Asa 2	1TTJ (2.40)	Borchert <i>et al.</i> , 1995 ^a
	A100W, monoTbTIMW	Asa 4	1TTI (2.40)	Borchert <i>et al.</i> , 1995 ^a
	T75R-G76E	Asa 3	--	Schliebs <i>et al.</i> , 1997
	A43P, T44A (RMM0-1)	Asa 2	--	Saab-Rincón <i>et al.</i> , 2001
	Deleción de Cys14 (M11TIM)	Asa 1	1ML1 (2.60)	Thanki <i>et al.</i> , 1997
	C14F	Asa 1	--	Hernández-Alcántara, <i>et al.</i> , 2002
	Deleción S235, V236 (M18BTIM)	Asa 8	1DKW (2.65)	Norledge <i>et al.</i> , 2001
	(M18BTIM)-V236A: M18bTIM A-TIM-CA A-TIM-2PG A-TIM-BHAP A-TIM-G3P	Asa 8	2VEI (1.89) 2VEK (1.60) 2VEL (2.30) 2VEM (2.20) 2VEN (2.0)	Alahuhta <i>et al.</i> , 2008
<i>P. falciparum</i>	Y74G	Asa 3	--	Maithal <i>et al.</i> , 2002
<i>H. sapiens</i>	M14QR98Q (hTIM,)	Asa 1, 6	--	Mainforid <i>et al.</i> , 1996b

Tabla 3.3 Mutaciones en TIM que generan monómeros. La mayoría de las mutantes monoméricas de TIM, se derivan de monoTbTIM, que fue obtenida a partir de la enzima silvestre de *T. brucei*. Sólo se han obtenido variantes monoméricas de la TIM de otras dos especies distintas a *T. brucei*.

En particular, en este trabajo fue de sustancial interés tomar bajo estudio a la enzima Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), debido a su elevada identidad en secuencia primaria con la enzima homóloga de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) (74 %), cuya ruta de plegamiento y estructura es muy similar a la de TcTIM (Maldonado *et al.*, 1998). Por otro lado se ha determinado también que estas enzimas presentan diferencias funcionales (Zomosa-Signoret *et al.*, 2007) y de reactividad (Olivares-Illana *et al.*, 2006). La monomerización de la enzima Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* que denominamos monoTcTIM. Esta mutante fue caracterizada funcional, estructural y termodinámicamente. Los estudios iniciales se enfocaron sobre los aspectos funcionales y de plegamiento de esta mutante monomérica. Posteriormente se puso atención a los aspectos estructurales y de estabilidad de la proteína. Las propiedades de monoTcTIM fueron comparadas con las otras mutantes monoméricas reportadas en la literatura. Asimismo, se discute la relación entre la estructura, estabilidad y función del monómero de TcTIM. Los resultados mostraron que las variaciones en secuencia entre dos enzimas con un alto grado de homología y estructura pueden presentar diferencias catalíticas significativas en el sistema de TIM.

IV Objetivos

4.1 General

Estudiar el plegamiento, la estructura, la función y la estabilidad de una mutante monomérica de TcTIM.

4.2 Particulares

- Construir una mutante monomérica estable de la enzima triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (monoTcTIM) a través de mutagénesis sitio-dirigida.
- Caracterizar funcionalmente a monoTcTIM.
- Caracterizar la vía de plegamiento de monoTcTIM al equilibrio siguiendo los cambios originados por Gdn-HCl, en los diferentes niveles de estructura de la proteína (secundaria, terciaria y cuaternaria), utilizando para tal fin técnicas espectroscópicas, cromatográficas y calorimétricas.
- Determinar la energética de la reacción $M \rightarrow U$ por medio de estudios al equilibrio y de la obtención de las constantes de equilibrio obtenidas por técnicas espectroscópicas.
- Cristalización de monoTcTIM y obtención de la estructura tridimensional.

V Materiales y Métodos

5.1 Material Biológico: Cepas bacterianas y plásmidos.

Se utilizó la cepa de *E. coli* XL-1Blue (Bullock *et al.*, 1987) como huésped durante todas las manipulaciones genéticas. La expresión de la mutante monoTcTIM se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Studier *et al.*, 1986). El gen que codifica a TcTIM está clonado en el plásmido pET3a en los sitios de restricción NdeI y BamHI (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997).

5.2 Enzimas y reactivos.

Las enzimas de restricción, la DNA, polimerasa, la ligasa T4DNA y el Gdn-HCl fueron adquiridas de *Boehringer GmbH Mannheim*. Los demás reactivos fueron adquiridos de *Sigma Chemical Co.*

5.3 Mutagénesis y purificación

5.3.1 Diseño y obtención de la enzima mutante.

Para la modificación y delección de los aminoácidos se utilizó la estrategia reportada para la obtención de la enzima mutante monomérica monoTbTIM, a partir de la TIM de *T. brucei* (Borchert *et al.*, 1994). La estrategia consiste en la eliminación selectiva de los aminoácidos que conforman el asa número tres, que interconecta y permite la dimerización de la enzima. La mutagénesis se llevó a cabo en el plásmido pET3a por el método de sobreposición y extensión, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Higuchi *et al.*, 1988). Los oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo a los codones preferenciales usados por *E. coli* (programa *Codon Frequency*, GCG, Genetics Computer Group, Wisconsin, USA). La secuencia de los oligonucleótidos que generan la mutación es la siguiente: 5' ggc aac gca gac gct ctg gcg tcc ctc aag gac tat 3' y 5' gga

cgc cag agc gtc tgc gtt gcc cgc gtt ctg tgc 3'. Como oligonucleótidos externos se utilizaron el T7 promotor y el T7 terminador (Novagen). Las condiciones para la PCR se presentan en la Figura 5.1

	Inicio	Ciclos	Final
Temperatura (°C)	94	94 40 72 72	4
Tiempo (seg.)	60	30 30 90 90	∞

Figura 5.1. Programa utilizado para los ensayos de PCR. Después de 30 ciclos, se obtuvieron los productos F1 y F2 que posteriormente fueron amplificados en una reacción secundaria con el mismo programa para generar un fragmento de 900 pb.

El programa de la Figura 5.1 se ejecutó durante 30 ciclos y los productos obtenidos denominados F1 y F2 (con 308 y 597 pb, respectivamente) fueron sometidos a una reacción secundaria de PCR, con el mismo programa, para generar un producto final de aproximadamente 900 pb. Este último fragmento se digirió con las enzimas de restricción NdeI y BamHI para obtener finalmente un fragmento de aproximadamente 750 bp (que corresponderían a los 230 aminoácidos de la proteína después de la delección). Este fragmento se clonó en el vector pET3a previamente preparado con las enzimas NdeI y BamHI, generando la construcción monoTcTIMpET3a. Finalmente, el vector con el gen modificado de TcTIM fue insertado en las células competentes de *E. coli* BL21(DE3) y la secuencia mutada fue verificada con la secuenciación completa del gen, usando los usando los oligonucleótidos T7prom y T7term.

La Figura 5.2 muestra las modificaciones que se han realizado en la estructura primaria correspondiente al asa 3 para diferentes especies de TIM, y los cambios en secuencia para generar la mutante monomérica en *T. cruzi* (monoTcTIM).

Especie	Región de la secuencia de aa.	Referencia
TbTIM (3TIM)	64 AQNAI AKSGAFTGEV SLPILKDFG 87	Wierenga <i>et al.</i> , 1987
RMM0-1	64 AQNAG... . . . NADALAS SLKDFG 80	Saab-Rincón <i>et al.</i> , 2001
monoTbTIM (1TRI)	64 AQNAG... . . . NADALAS SLKDFG 80	Borchert <i>et al.</i> , 1994
TcTIM (1TCD)	65 AQNAI TRSGAFTGEV SLQILKDYG 88	Ostoa-Saloma <i>et al.</i> , 1997
monoTcTIM (2V5B)	65 AQNAG... . . . NADALAS SLKDYG 81	Este trabajo

Figura 5.2 Cambios realizados en la región de aminoácidos del asa 3 de TcTIM, TbTIM y sus correspondientes mutantes monoméricas. Las enzimas silvestres TcTIM y TbTIM tienen 251 y 250 aminoácidos en su estructura primaria respectivamente; monoTbTIM y monoTcTIM están compuestas por 243 y 244 residuos respectivamente. Las mutaciones se muestran en negritas y los códigos PDB en paréntesis.

5.3.2 Sobreexpresión y purificación de la proteína mutante.

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector monoTcTIMpET3a se cultivaron a 37 °C en el medio Luria-Bertani, complementado con 100 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una absorbencia $A_{600} = 0.8-1.0$. En este punto se indujo la sobreexpresión de la proteína mutante adicionando IPTG a una concentración final de 0.4 mM. El crecimiento continuó toda la noche. La purificación de la enzima se realizó de acuerdo a lo descrito por Ostoa-Saloma *et al.*, 1997 para la enzima silvestre TcTIM. El rendimiento de la enzima purificada fue de 10-15 mg/L de cultivo.

5.4 Caracterización de la enzima mutante.

Las mediciones de absorbencia se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU7500, con un compartimiento múltiple de celdas termorregulado a una temperatura de 25 °C. Las concentraciones de proteína se determinaron por el método de BCA, o midiendo su absorbencia a 280 nm de acuerdo a Pace *et al.*, 1995, usando el coeficiente de extinción de la enzima silvestre (ϵ 36440 m⁻¹ cm⁻¹, Zomosa-Signoret *et al.*, 2003), usando BSA como estándar.

5.4.1 Determinación de la actividad catalítica

La actividad de TIM se determinó con un ensayo de enzima acoplado a 25 °C (Rozacky *et al.*, 1971), en la dirección de la producción de dihidroxiacetona fosfato. Las condiciones de la reacción (1 mL) fueron las siguientes: 100 mM trietanol amina, 10 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól (TED 100/10/1) (pH 7.4), 1.5-3.0 mM D- gliceraldehido 3-fosfato, 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ α -glicerolfosfato deshidrogenasa y 0.2 mM NADH. La detección de actividad catalítica para la mutante comenzó con la adición de 0.2 μg de proteína, en contraste con la cantidad utilizada para la enzima silvestre que es de 5 ng/mL (Borchert *et al.*, 1993b; Gao *et al.*, 1998).

5.4.2 Obtención de los parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos, se usó el protocolo de actividad catalítica mencionado, excepto que en este caso se varió la concentración de sustrato D-gliceraldehido 3-fosfato en el rango de 0.2-9 mM. Los datos se analizaron con el programa Origin 7.0 y se aplicó el análisis no lineal usando la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = V_{\text{max}}[S] / K_m + [S] \quad (1)$$

5.4.3 Determinación del peso molecular.

Las enzimas purificadas (TcTIM silvestre y la mutante monoTcTIM), fueron evaluadas mediante la técnica de cromatografía de exclusión molecular (SEC) en ensayos separados. En un primer experimento se utilizó una columna de Sephacryl S-200, equilibrada con el buffer 20 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA pH 7.4. Se cargaron en la columna 1.2 mg para cada una de las enzimas. La calibración de la columna se hizo con proteínas de peso molecular conocido (ovoalbumina, albumina, ribonucleasa, quimotripsina). Para un segundo experimento, se usó una columna con superdex 200, equilibrada con 20 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 250 μ M EDTA; se cargaron 300 microlitros a una concentración de 300 μ g mL⁻¹ de cada una de las enzimas, igual que en el caso anterior, se calibró la columna con estándares de peso molecular conocido (tiroglobulina, γ -globulina, ovoalbúmina, mioglobina y vitamina B-12).

El cálculo de K_{av} para las proteínas silvestre y mutante se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o) \quad (2)$$

Donde K_{av} es el coeficiente de partición, V_e es el volumen de elución y V_t es el volumen total de la columna.

Se usó también la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el peso molecular. Se utilizó un aparato Zetasizer Dynamic Light Scattering (Nano Series, Malvern instruments, U.S.A.) para coleccionar los datos. Para obtener los datos, las muestras con proteína (900 μ g mL⁻¹) con un volumen total de 50 μ L, se cargaron en una celda Hellma (Precision Cells, Quartz Suprasil); el análisis de tamaño de partícula se realizó con el programa del instrumento.

5.4.4 Determinación del tiempo de equilibrio para la desnaturalización y renaturalización

Para determinar el tiempo de equilibrio de monoTcTIM se siguieron los cambios en su fluorescencia intrínseca a la λ_{\max} nativa (327 nm) excitando a 280nm. Para estos experimentos se incubaron $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de monoTcTIM en concentraciones crecientes de Gdn-HCl (0.0 to 6.0 M). En los experimentos de renaturalización se incubaron $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de monoTcTIM en 6.0 M de Gdn-HCl por 1 h; posteriormente se comenzó el proceso de renaturalización diluyendo las muestras a una concentración final de proteína de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, asimismo, las muestras se ajustaron a las mismas concentraciones usadas en los experimentos de desnaturalización. Posteriormente se siguió cinéticamente durante 2 minutos el efecto de adición (desplegamiento) o dilución (renaturalización) de la guanidina, excitando a 280 nm a la λ_{\max} . Los datos fueron colectados periódicamente de 0 a 72 h. Todos los cambios en fluorescencia fueron monitoreados usando un espectrofluorómetro DM45 OLIS con un compartimiento de celda termorregulado a 25°C .

4 Ensayos de reversibilidad.

Para determinar la reversibilidad del proceso de desplegamiento de monoTcTIM, se incubaron $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ de monoTcTIM a 25°C durante 24 h en 6.0 M de Gdn-HCl. Posteriormente, se adicionó buffer hasta alcanzar una concentración final de proteína y Gdn-HCl de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.1 M, respectivamente. Las muestras fueron incubadas por 24 hrs para alcanzar el equilibrio en el plegamiento, después de las cuales se les determinó su fluorescencia a las longitudes de onda de 280 y 295 nm.

5.4.6 Análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular (DC).

Se realizó el análisis de estructura secundaria para las enzimas TcTIM silvestre y monoTcTIM, usando un espectropolarímetro Jasco-720. Los datos se colectaron en la región del ultravioleta lejano (180-260 nm), usando las unidades estandar de medición ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$), como ha sido reportado antes (Schliebs *et al.*, 1996). Los datos obtenidos se analizaron con el programa CDNN (Gerald Böhm, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Germany) en el rango de 205-260 nm.

5 Análisis del proceso de desplegamiento por Gdn-HCl monitoreado por DC y fluorescencia

Para los experimentos de desnaturalización, se incubaron al equilibrio (24 h) diferentes concentraciones de monoTcTIM (10, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en buffer TED 20/1/1 (pH 7.4) a 25 °C. Para los experimentos de renaturalización, las muestras de proteína con 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se desnaturalización con 6 M de Gdn-HCl y posteriormente se diluyeron hasta una concentración final de proteína de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El rango de concentración de desnaturalizante comprendió de 0.0 a 6.0 M de Gdn-HCl. Se midió la fluorescencia intrínseca de la proteína excitando a las longitudes de onda de 280 y 295 nm (4.0 de ancho de banda); la señal de emisión se colectó en el rango de 300-310 a 400-410 nm (4.0 nm ancho de banda) respectivamente. Los centros espectrales de masas (SCM) se calcularon de acuerdo a la ecuación:

$$\text{SCM} = \frac{\sum \lambda I_{(\lambda)}}{\sum I_{(\lambda)}} \quad (3)$$

Donde $I_{(\lambda)}$ es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda λ .

Se monitorearon los cambios en dicroísmo circular en el ultravioleta lejano a 222 nm, para las muestras de monoTcTIM (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 20/1/1, pH 7.4). Se utilizaron celdas con un paso de luz de 0.1 cm. A temperatura constante de 25 °C. Todas las

medidas espectroscópicas reportadas se obtuvieron después de restar las respectivas muestras de referencia sin proteína.

5.4.8 Análisis de estructura terciaria por fluorescencia extrínseca.

Los registros de fluorescencia extrínseca por ANS se realizaron de la siguiente manera: se adicionaron 100 μM (concentración final) de ANS a cada muestra con y sin proteína. La longitud de onda de excitación fue de 360 nm en un rango de emisión de 400-560 nm. En todos los casos se sustrajeron los espectros de referencia con ANS. El ensayo se hizo con 10, 50, y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la enzima silvestre y la monoTcTIM, respectivamente.

5.5 Determinación de parámetros termodinámicos.

Los datos espectroscópicos de los procesos de desnaturalización y renaturalización se analizaron de acuerdo a un modelo de dos estados que involucran un estado nativo (N) y un estado desplegado (U):



La fracción desnaturalizada, \mathbf{F}_u puede calcularse a partir de:

$$\mathbf{F}_U = (\mathbf{y}_N - \mathbf{y}_{\text{obs}})/(\mathbf{y}_N - \mathbf{y}_U) \quad (5)$$

Donde: y_{obs} es el parámetro determinado experimentalmente (FI o CD), mientras que y_f y y_u son los valores del parámetro característico de las conformaciones plegada y desplegada, respectivamente. Los valores de y_f y y_u en la región de la transición fueron obtenidos experimentalmente extrapolando las porciones lineales de las zonas pre y pos-transicionales de las respectivas curvas de desnaturalización y renaturalización (Pace et al., 1986). Los datos obtenidos se analizaron con el programa ORIGIN 7.0 SRO, V7.0222 (B220) (MA. USA). La diferencia en la energía de Gibbs,

entre las conformaciones del estado nativo (N) y el desplegado (U), se obtuvieron a partir de:

$$\Delta G = -RT \ln k_{eq} \quad (7)$$

Donde R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta. Para obtener los datos, se usó un análisis de mínimos cuadrados para ajustarlos a la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G_{(H_2O)} - m(\text{Gdn-HCl}) \quad (6)$$

Donde: $\Delta G_{(H_2O)}$ es el valor de ΔG en ausencia del desnaturizante, y m refleja la variación de ΔG con respecto a la concentración de desnaturizante.

5.6 Cristalización de la proteína mutante y colecta de datos.

La proteína monoTcTIM se cristalizó por el método de gota colgante. Se mezcló un microlitro de una solución de proteína a 25 mg mL⁻¹ con un mL de solución del reservorio. Después de un periodo de una semana se obtuvieron los cristales en la condición G6 del *kit Crystal Screen HT* (Hampton Research), a 9°C con una solución de reservorio de HEPES 100 mM, pH 7.5, PEG 6000 al 10% y 2-metil-2,4-pentanodiol al 5%. Los cristales se crioprotegieron adicionando PEG 400 en el reservorio a una concentración del 30% y fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. La difracción de datos se llevó a cabo en el Southeast Regional Collaborative Access Team (SER-CAT) 22-ID beamline del Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, IL, USA, usando un detector MarMosaic MX-300. Los datos se procesaron con el programa MOSFLM (Leslie, 1992) y reducidos con SCALA (CCP4, 1994).

5.7 Determinación de la estructura cristalográfica y refinamiento.

La estructura se resolvió con el método de reemplazo molecular usando el programa PHASER (McCoy *et al.*, 2007) y con las coordenadas de la enzima silvestre TIM de *T. cruzi* que tiene una resolución de 1.83 Å (Maldonado *et al.*, 1998) (código PDB: 1TCD).

El refinamiento se realizó con el programa Refmac5 (Pannu *et al.*, 1998) y el modelo se construyó con COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Las estadísticas del refinamiento y calidad del modelo se muestran en la figura 6.4. En el monómero presente en la unidad asimétrica, los residuos 16-21 (asa 1) no fueron visibles en el mapa de densidad. Se usó el 5 % de los datos para validar el refinamiento. Las moléculas de agua se ubicaron en primera instancia automáticamente con COOT y validadas si se observaba un pico por encima de 3 sigma sobre un mapa de diferencia y por encima de 1.5 sigma sobre un mapa de diferencia doble; las moléculas de agua debieron tener al menos un contacto polar entre 2.6 y 3.5 Å. Se utilizaron los mapas de omisión de alineamiento simulado Fo-Fc, con Sigma ajustado, para validar la calidad del modelo y la presencia de moléculas de agua. Las coordenadas y los factores de estructura se depositaron en el PDB (2V5B).

VI Resultados

5.4.8 Diseño y purificación de monoTcTIM

Varias enzimas TIM han sido monomerizadas usando diferentes protocolos y estrategias (ver Tabla 3.3). En este trabajo, el gen de TcTIM fue mutado en el asa 3 siguiendo el protocolo descrito para TbTIM (Tabla 5.2) (Borchert *et al.*, 1994). TbTIM y TcTIM comparten un 74 % de identidad en la secuencia de aminoácidos y sus estructuras tridimensionales son casi idénticas (Maldonado *et al.*, 1998). Considerando todas estas características, se realizaron mutaciones equivalentes en TcTIM. La proteína mutante obtenida es idéntica en secuencia a TcTIM, excepto que el asa 3 es 7 residuos más corta y contiene además las siguientes sustituciones: I69G, G77N, E78A, V79D, S80A, Q82A y I83S (ver Tabla 5.2 y Figura 6.14B).

Los fragmentos de PCR, F1 y F2, con las mutaciones específicas, se obtuvieron como se detalla en Materiales y Métodos. El fragmento de 900 pb de la PCR secundaria fue digerido con las enzimas NdeI y BamHI para obtener el gen mutado de aproximadamente 750 pb (Figura 6.1). Las reacciones de ligación y transformación en células competentes DH5 α (Figura 6.2) dieron como resultado la obtención de diversas clonas que posteriormente fueron evaluadas para verificar la presencia o ausencia del gen mutado.

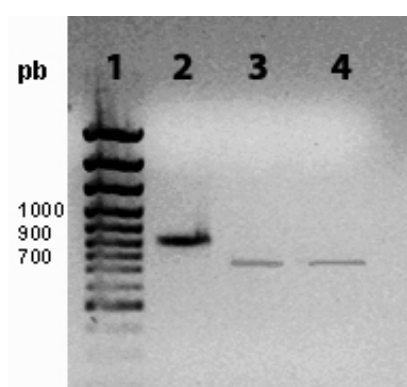


Figura 6.1 PCR del gen mutado de TcTIM. El carril 1 corresponde al marcador del peso molecular de 100 pb (100 bp Plus DNA Ladder). Se muestra el fragmento de 900 pb (carril 2), que posteriormente fue digerido por las enzimas NdeI y BamHI (carriles 3 y 4) y que corresponde al gen mutado de TcTIM, con un tamaño de 750 pb.

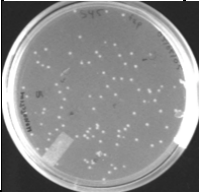
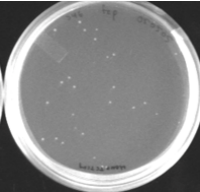
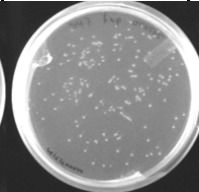
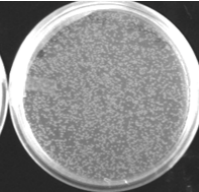
Reacciones de ligación				
Clona	S45	S46	S47	Control (+)
Proporción Vector/inserto	(3:1)	(1:3)	(1:1)	TcTIMpET3a
				
UFC	96	26	167	>1000

Figura 6.2 Ligación y transformación del gen mutado de TcTIM en células de *E. coli* DH5 α , con diferentes proporciones de vector/inserto. Se analizaron 6 diferentes clonas de la cepa S45 para verificar la presencia del gen mutado. UFC: unidades formadoras de colonias

De los resultados de la ligación y clonación se tomó a la clona S45 para su evaluación. Se realizaron análisis de PCR *in situ*, cultivo en medio sólido y en medio líquido de 6 colonias para determinar la presencia del gen de interés. De las 6 colonias evaluadas 4 resultaron positivas para el gen mutado (Figura 6.3)

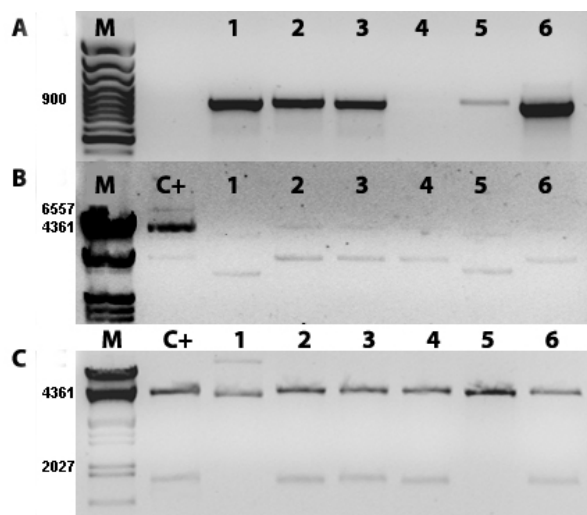


Figura 6.3 Evaluación de 6 colonias de la cepa S45. La figura muestra el análisis de 6 colonias de la cepa por PCR *in situ* (muestras tomadas directamente de la clona S45 (A), purificación y extracción de los plásmidos (B) y cultivo en medio Líquido (LB) (C). En (A) se observan las colonias 1, 2, 3 y 6 con el fragmento de 900 pb del gen mutado. En (B) y (C) las muestras 1, 2, 4 y 6 muestran el tamaño correcto del plásmido con el inserto (≈ 5400 pb), así como el fragmento de 750 pb del gen digerido con NdeI y BamHI, respectivamente. Los marcadores de peso molecular son 100 bp Plus DNA Ladder para A, y λ /HindIII para B y C.

Enzima	Secuencias
TcTIM	MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLNAATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK 60
monoTcTIM	MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLNAATFNHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK 60

	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGHSERRLYYGETNEIVA EKVAQACAA 120
	FQIAAQNAG-----NADALASLKDYGISWVVLGHSERRLYYGETNEIVA EKVAQACAA 113
	***** * *****
	GFHVIVCVGETNEEREAGR TAAVVL TQLAAVAQKLSKEAWSRVVIA YEPVWAI GTGKVAT 180
	GFHVIVCVGETNEEREAGR TAAVVL TQLAAVAQKLSKEAWSRVVIA YEPVWAI GTGKVAT 173

	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK 240
	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK 233

	PEFVEIIEATK 251
	PEFVEIIEATK 244

Figura 6.4 Alineamiento de secuencias de la enzima silvestre de TcTIM (en negritas) y la mutante monomérica monoTcTIM. La secuencia de la mutante muestra los cambios esperados (delección de 7 aminoácidos y sustitución de 7) en la secuencia de monoTcTIM, correspondientes al asa 3 del monómero.

Después de verificar la secuencia (Figura 6.4), la construcción fue clonada en un plásmido de expresión, con el que se transformaron las células competentes de *E. coli*. Las colonias obtenidas y seleccionadas por su resistencia a antibióticos, se crecieron en medio líquido para sobreexpresar a monoTcTIM. La proteína se purificó siguiendo el procedimiento reportado para TcTIM (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997). Las fracciones purificadas en SDS-PAGE mostraron una sola banda con tinción de azul de Coomassie (Figura 6.5)

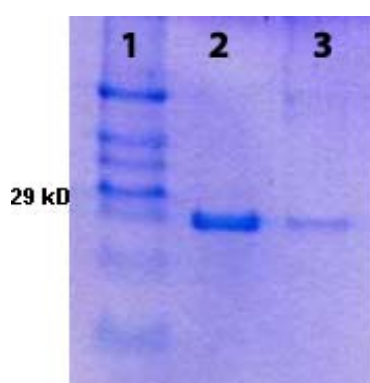


Figura 6.5 Gel de SDS-PAGE donde se muestra la fracción purificada de monoTcTIM (carril 3) y que corresponde a un peso molecular de 27 kD. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular y el carril 2 a la banda de 27 kD de TIM de *T. brucei*.

6.2 Peso molecular de monoTcTIM

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de cromatografía de exclusión molecular por cromatografía (SEC), confirmaron la naturaleza monomérica de monoTcTIM. Estos experimentos se hicieron tanto para TcTIM como para monoTcTIM, a una concentración de proteína de 1.2 mg mL^{-1} para cada una de ellas. Los perfiles de elución obtenidos mostraron un solo pico (ver figura 6.6) y los pesos moleculares calculados se muestran en la Tabla 6.1. La naturaleza monomérica de monoTcTIM fue también determinada a partir de experimentos adicionales (ver más adelante, Tabla 7.1).

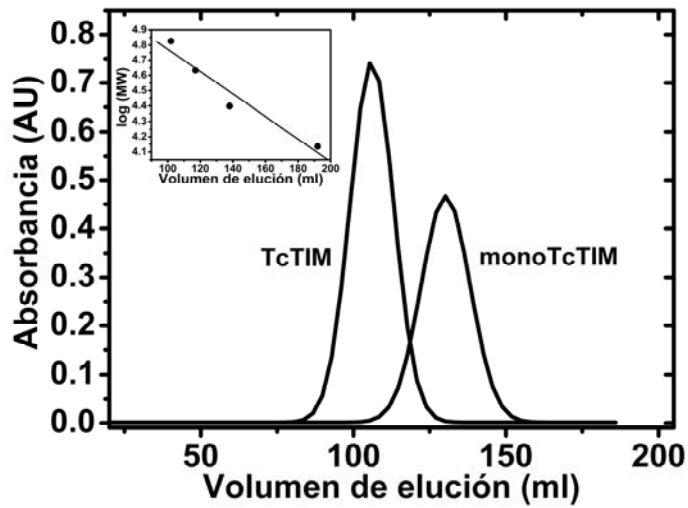


Figura 6.6 Perfil de elución para TcTIM y MonoTcTIM. En experimentos por separado, las proteínas se cargaron en una columna de Sephacryl S-200 previamente equilibrada con 20 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA pH 7.4. El inserto muestra la calibración con proteínas de peso molecular conocido (ver sección de Materiales Métodos). Se cargaron 200 μL . de cada proteína con una concentración de 1.2 mg mL^{-1} .

1: Peso Molecular (kDa)		
	TcTIM	monoTcTIM
SEC	53.3	26.4
2: Estructura secundaria (%)		
	TcTIM	monoTcTIM
Hélice	32.5	32.4
Antiparalela	8.0	8.1
Paralela	9.3	9.3
Giros β	16.8	16.9
<i>Random Coil</i>	34.0	34.0
3: Análisis de estructura Terciaria por fluorescencia		
	TcTIM	monoTcTIM
λ_{\max} (nm)	327 ^A	328 ^A
	328 ^B	329 ^B
SCM (nm)	331 ^A	334 ^A
	339 ^B	342 ^B
IF relativa a la λ_{\max}	1.0 ^A	0.33 ^A
	1.0 ^B	0.42 ^B

Tabla 6.1 Peso molecular y propiedades estructurales de TcTIM y monoTcTIM. **1:** Los experimentos de peso molecular por SEC se realizaron con 1.2 mg mL⁻¹. Los pesos moleculares del homodímero y del monómero por secuencia son 54.48 y 27.24 kDa respectivamente (Garza-Ramos *et al.*, 1996). **2:** Cálculo del contenido de estructura secundaria. Los porcentajes fueron calculados con el programa CDNN usando los datos de DC en el rango de 205-260 nm. **3:** Parámetros de fluorescencia intrínseca. λ_{\max} : longitud de onda de máxima emisión; IF: intensidad de fluorescencia; SCM: centro espectral de masa. A: excitación a 280 nm; B: excitación a 295 nm.

6.3 Análisis de estructura secundaria y terciaria

Para determinar el grado de preservación de estructura secundaria y terciaria de la mutante en solución, se usó la técnica de dicroísmo circular (CD) en la región del UV lejano. Se utilizaron 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada proteína. La TcTIM muestra el espectro de CD característico de las proteínas $(\beta/\alpha)_8$ con dos valores mínimos localizados en 210 y

220 nm respectivamente (Figura 6.7□) (Zomosa-Signoret *et al.*, 2003). El espectro de CD para monoTcTIM es similar al obtenido para TcTIM; Sin embargo se observa un ligero cambio en el mínimo cercano a 210, que podría indicar algún tipo de alteración en la estructura secundaria después de las mutaciones (Figura 6.7●). A pesar de lo anterior, el contenido de estructura calculada es muy similar en ambas proteínas (Tabla 6.1), indicando la conservación global en la estructura secundaria después de las mutaciones en el barril TIM.

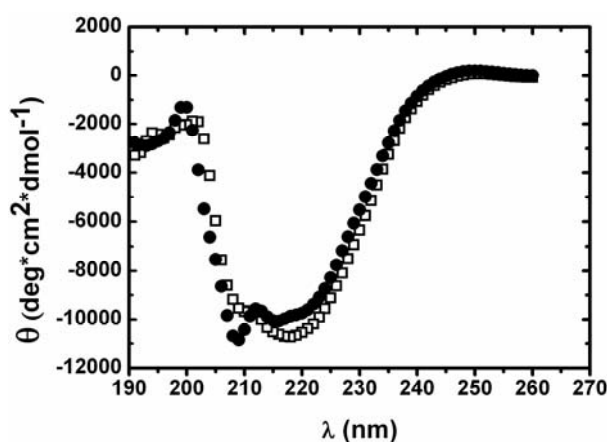


Figura 6.7 Espectros de dicroísmo circular de TcTIM (□) y monoTcTIM (●). Los espectros fueron registrados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

En relación a la estructura terciaria, tanto TcTIM como monoTcTIM fueron analizadas por intensidad de fluorescencia. Las muestras de ambas enzimas con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ se excitaron a 280 y 295 nm. La λ_{max} , el SCM y la intensidad de fluorescencia (IF) fueron similares en ambas enzimas, sugiriendo que la estructura terciaria del barril TIM también está conservada en monoTcTIM, aún cuando la IF de fluorescencia es menor para la mutante, los espectros son básicamente los mismos (Figura 6.8). Los parámetros de los espectros de fluorescencia se muestran en la Tabla 6.1

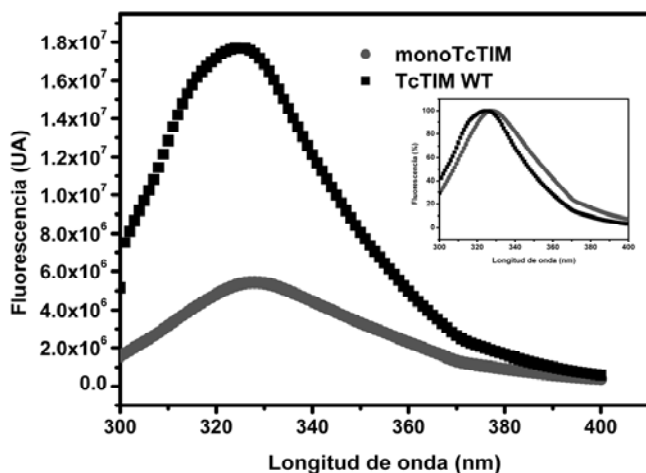


Figura 6.8 Espectros de emisión de fluorescencia a 280 nm para monoTcTIM y TcTIM. El inserto muestra la normalización de los datos de IF.

6.4 Actividad Catalítica.

Los ensayos de actividad catalítica se realizaron de dos maneras con el fin de caracterizar a monoTcTIM. En primer lugar para saber si la mutante era activa y en segundo lugar, para determinar si el incremento en la concentración de proteína tenía algún efecto en su catálisis. Para el primer caso, se usaron $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de monoTcTIM tanto en presencia y como en ausencia de DTT, incrementando la concentración de GAP hasta 10 mM. Los parámetros cinéticos obtenidos de curvas típicas de Michaelis-Menten se muestran en la Tabla 6.2, donde se comparan con las obtenidas para otras mutantes monoméricas. Para el segundo caso y a fin de verificar el efecto de la concentración de proteína sobre la actividad catalítica, se evaluaron muestras de monoTcTIM en el rango de 2 a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, en presencia de 2.5 mM de GAP. No se encontró evidencia de actividad catalítica por debajo de una concentración de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\Delta\text{OD} < 0.005 \text{ U min}^{-1}$). Sin embargo, la actividad catalítica permaneció constante ($\sim 0.6 \text{ U mg}^{-1}$) en el resto de las concentraciones evaluadas (Figura 6.9). Este resultado indica que no ocurren cambios hacia un estado oligomérico cuando se incrementa la concentración de monoTcTIM ni con la presencia o ausencia del DTT.

Proteína	K _m (mM)	V _{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	K _{cat} (sec^{-1})	Referencias
TbTIM	0.45 ^b	9300 ^a	6166.66 ^b	a: Lambeir <i>et al.</i> , 1987; b: Zomosa-Signoret <i>et al.</i> , 2003
monoTbTIM	5.3	0.007	5.2	Borchert <i>et al.</i> , 1994
monoTbTIM	4.1	nr	5.16	Schliebs <i>et al.</i> , 1997
RMMO-1	1.19	nr	58	Saab-Rincón <i>et al.</i> , 2001
pfTIM Y74G	0.34	5.0	118.33	Maithal <i>et al.</i> , 2002
TcTIM	0.66 ^a 0.9 ^c	9670 ^a 7498 ^c	4333.33 ^b	a: Garza-Ramos <i>et al.</i> , 1998; b: Reyes-Vivas <i>et al.</i> , 2001 c: Ostoa-Saloma <i>et al.</i> , 1997
monoTcTIM	10.9±1.6	0.56±0.05	50.6	Este trabajo
monoTcTIM (DTT 1.0mM)	11.2±2.6	0.58±0.09	52.7	Este trabajo

Tabla 6.2 Parámetros cinéticos para algunas TIM y mutantes monoméricas. Se cuantificó la actividad catalítica de las muestras de monoTcTIM ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) en presencia y ausencia de DTT, incrementando la concentración de GAP hasta 10 mM. nr: no reportado.

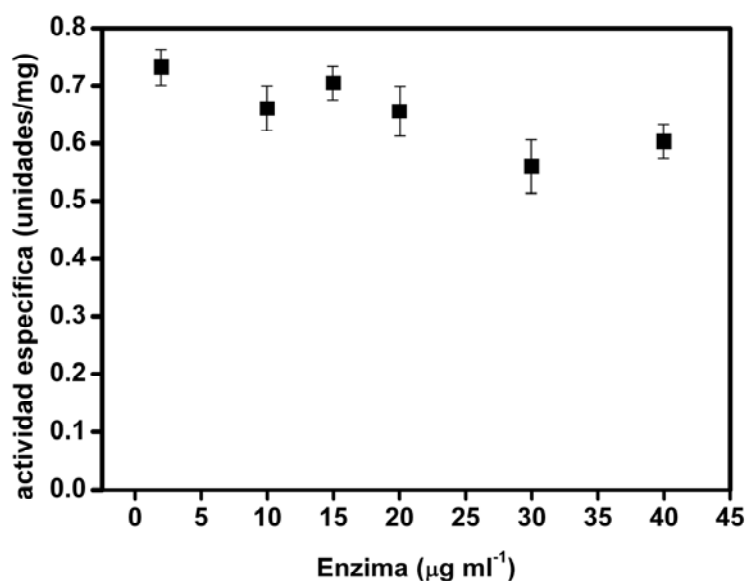


Figura 6.9 Actividad de monoTcTIM en función de la concentración de proteína ($0 - 40 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se usó una concentración constante de GAP (2.5 mM).

6.5 Desnaturalización y renaturalización de MonoTcTIM.

Para encontrar la estabilidad de la subunidad aislada de TcTIM, se llevó a cabo un análisis en condiciones de equilibrio y se verificó la reversibilidad de la reacción.

6.5.1 Patrón de desnaturalización.

Se siguió el desplegamiento de monoTcTIM a diferentes concentraciones de proteína en Gdn-HCl (0 a 6 M) después de incubarse al tiempo de equilibrio. Se observó un incremento en la IF a medida que se aumentó la concentración de proteína (inserto de la Figura 6.10).

El desplegamiento de monoTcTIM seguido por cambios en la fluorescencia (excitación a 280 y 295 nm) mostró un comportamiento monofásico, esta observación fue constante para todos los parámetros espectrales de fluorescencia intrínseca analizados en función de la concentración de Gdn; por ejemplo, la Figura 6.10 muestra los resultados normalizados de los datos mostrados en el inserto, para la IF a la λ_{\max} nativa. Como se esperaba para una proteína monomérica, no hubo un cambio significativo en la $C_{1/2}$ (\approx 2.0 M Gdn-HCl) cuando se incrementó la concentración de proteína.

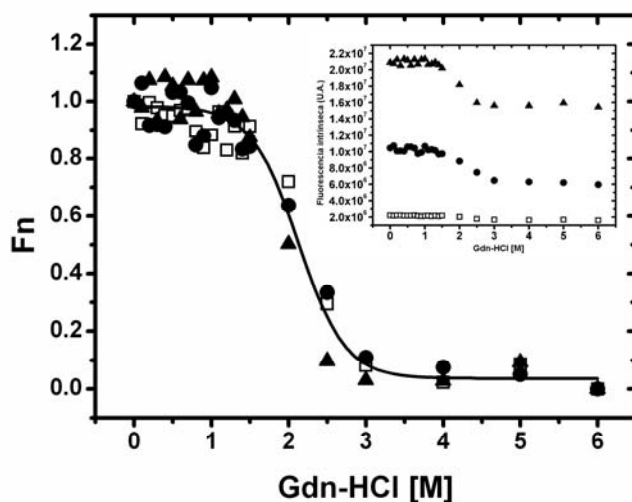


Figura 6.10 Cambios en la estructura terciaria de monoTcTIM en función de las concentraciones de Gdn-HCl. Se obtuvo la IF de monoTcTIM a 10 (\square), 50 (\bullet) y 100 (\blacktriangle) $\mu\text{g mL}^{-1}$, a la λ_{max} nativa (327 nm) al tiempo de equilibrio. El inserto en la figura muestra los resultados de la IF después de excitar a la longitud de onda a 280 nm. Se obtuvieron resultados similares cuando se excitó a 295 nm. Los datos se normalizaron utilizando la ecuación 5. La línea muestra el ajuste simultáneo de los datos de todas las concentraciones al modelo descrito en Materiales y Métodos.

6.5.2 Reversibilidad del patrón de plegamiento

Con el fin de explorar la reacción inversa (replegamiento), se obtuvo el patrón de renaturalización a las mismas concentraciones de desnaturante usado en los experimentos de desplegamiento (ver sección de materiales y métodos). Para examinar la posibilidad de histéresis, se comparó con un patrón de desnaturalización a la misma concentración de monoTcTIM. En la Figura 6.11 se puede observar que los patrones de desnaturalización y renaturalización son monofásicos y tienen lugar en el mismo rango de concentraciones de desnaturante. No se observaron diferencias en la región de la transición ($C_{1/2} \approx 2.0 \text{ M Gdn-HCl}$) para ambos casos, indicando que las reacciones de desnaturalización y renaturalización son equivalentes y no hay histéresis.

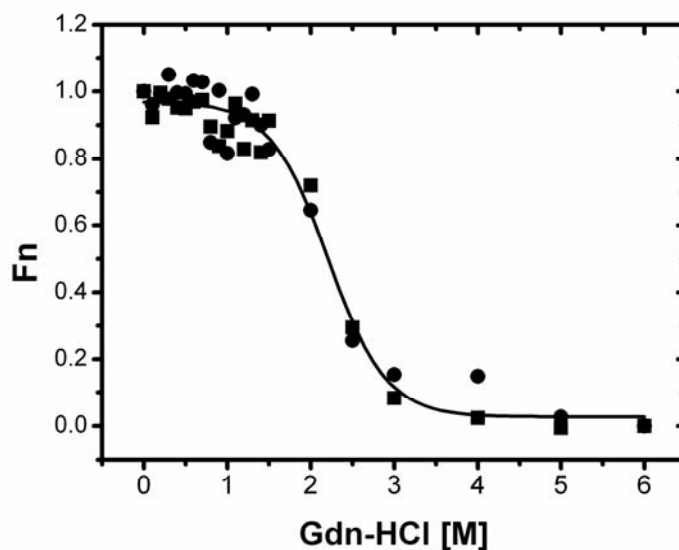


Figura 6.11 Patrones de desplegamiento (■) y replegamiento (●) de monoTcTIM después de la incubación al tiempo de equilibrio e incrementando las concentración de desnaturizante. Para el experimento de renaturalización, primero se desnaturizó a monoTcTIM (0.6 mg mL^{-1}) en 6.0 M Gdn-HCl durante 1h. La renaturalización se inicio por dilución de la muestra hasta una concentración final de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína. Para el patrón de desnaturalización, el experimento es equivalente al presentado en la Figura 6.10. Se determinó la IF (excitación a 280 nm) a la λ_{max} (327 nm) después de 24 h. La línea continua muestra el ajuste simultáneo de todos los datos de acuerdo al modelo descrito en Materiales y Métodos.

6.5.3 Cambios en la estructura secundaria.

La Figura 6.12 muestra las variaciones en la elipticidad residual media a 222 nm de monoTcTIM. Al igual que los cambios observados para la fluorescencia intrínseca (Figuras 6.10 y 6.11), se obtuvo un comportamiento monofásico, y la transición para ambos niveles estructurales ocurre en el mismo intervalo de concentraciones de Gdn-HCl ($C_{1/2} \approx 2.0\text{M}$). El comportamiento monofásico y la coincidencia en la IF y CD, sugieren la ausencia de intermediarios en la ruta (Figura 6.13).

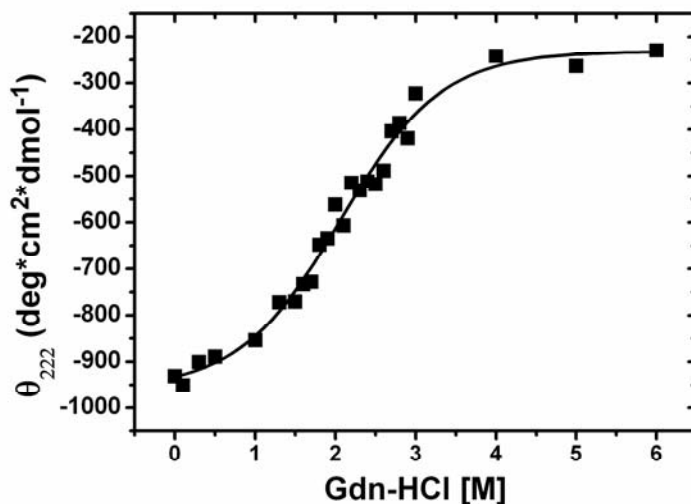


Figura 6.12 Cambios en la estructura secundaria de monoTcTIM en función de las concentraciones de Gdn-HCl. Los valores de la elipticidad residual media a 222 nm (θ_{222}) para monoTcTIM (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se obtuvieron después del tiempo de equilibrio a las concentraciones de desnaturizante indicadas.

6.6 Estabilidad de monoTcTIM.

Las siguientes observaciones indican que la transición entre la monoTcTIM desnaturizada y renaturizada es un proceso unimolecular:

- 1.- se encontró un patrón de plegamiento con comportamiento monofásico en los experimentos de desnaturización y renaturización (Figura 6.10),
- 2.- la coincidencia de los patrones de desplegamiento seguidos por los cambios en la estructura terciaria y secundaria (Figura 6.13), y finalmente
- 3.- no se observó cambio en la $C_{1/2}$ en el patrón a diferentes concentraciones de proteína (10 – 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figuras 6.10 y 6.12).

De esta forma se evaluó la energética de la reacción de acuerdo al modelo de dos estados descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.3.

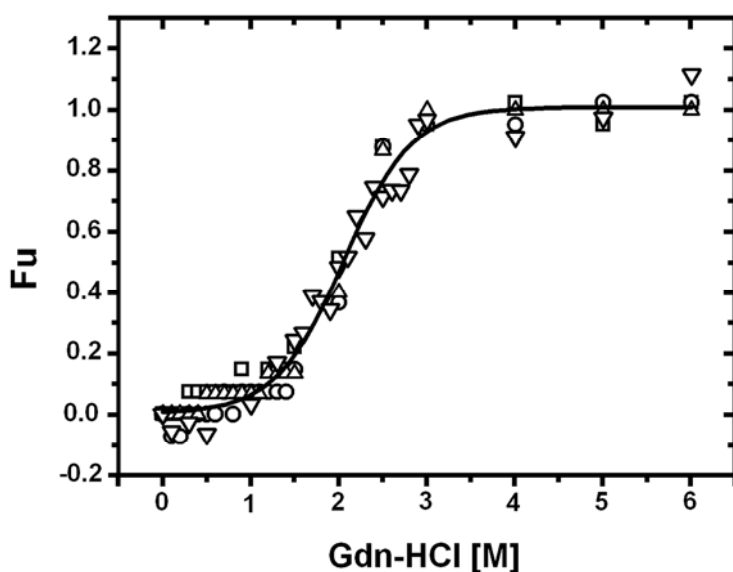


Figura 6.13 Cambios en la estructura secundaria y terciaria de monoTcTIM en función de la concentración de Gdn-HCl. Se obtuvieron los espectros de fluorescencia intrínseca de monoTcTIM a concentraciones crecientes: 10(\square), 50 (\circ), y 100 (Δ) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se obtuvieron las longitudes de onda máxima (λ_{max}) a las concentraciones de Gdn-HCl indicadas después del tiempo de equilibrio. Los valores de elipticidad residual media a 222 nm (θ_{222}) para monoTcTIM (∇ , 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se obtuvieron al equilibrio a las concentraciones de desnaturante indicado. Todos los datos fueron normalizados usando la ecuación 5. La línea corresponde al ajuste global simultáneo de los datos de IF y de CD al modelo descrito en Materiales y Métodos. Ver Tabla 6.3

Datos Ajustados	Proceso	ΔG (kJ mol^{-1})	$C_{1/2}$
$\text{FI}_{\text{max}} 295 \text{ nm/ CD}_{222}$	Desnaturalización	13.45 (6.4)	2.1
$\text{FI}_{\text{max}} 280 \text{ nm}$	Renaturalización	13.11(5.9)	2.2
Promedio		12.93 ± 0.7	2.15 ± 0.01

Tabla 6.3. Estabilidad de monoTcTIM. Los resultados corresponden al ajuste de los datos experimentales mostrados en las Figura 6.13 para la desnaturalización y de la figura 6.11 para la renaturalización, de acuerdo al modelo descrito en Materiales y Métodos. Los valores de la pendiente m se indican en paréntesis. $C_{1/2} = \Delta G_{\text{H}_2\text{O}}/m$

Los valores de ΔG para los procesos de desplegamiento y replegamiento de monoTcTIM en Gdn-HCl fueron muy similares, indicando que el equilibrio se alcanzó en ambas direcciones. Los valores obtenidos de ΔG para monoTcTIM son 30 % menores que los presentados para el intermediario monomérico en el patrón de desplegamiento de TcTIM (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005); sin embargo, el valor obtenido en éste trabajo es similar al reportado para otras mutantes monoméricas, como se mostrará más adelante (Tabla 7.1).

6.7 Estructura cristalográfica de monoTcTIM

Se resolvió la estructura cristalográfica de monoTcTIM a 2.0 Å de resolución por reemplazo molecular (Tabla 6.4). Los datos cristalográficos han sido depositados en el banco de datos de proteínas (PDB) con el código 2V5B. Los mapas de densidad fueron de buena calidad por lo que muestran los mapas de omisión de diferencia de alineamiento simulado (Figura 6.14A). El bajo valor de RMSD (0.88 Å), indica que no existen cambios significativos en la cadena principal de la enzima monomérica cuando se compara con la enzima silvestre TcTIM (PDB código 1TCD). De igual manera, no se detectaron diferencias en la conformación general de la cadena principal entre la TIM monomérica de *Trypanosoma brucei* (código PDB 1TRI) y monoTcTIM (carbón- α RMSD 1.3 Å). En el monómero presente en la unidad asimétrica del cristal (Figura 6.14B), los residuos 16-21, correspondientes al asa 1, no se observan en el mapa; asimismo, los residuos 170-177, correspondientes al asa 6, son poco claros en el mapa de densidad electrónica, sin embargo, si fue posible definirlos. Los residuos catalíticos histidina 96 y lisina 13 están en diferentes posiciones respecto a sus residuos equivalentes en la enzima silvestre (Figura 6.14C). Aún cuando la arquitectura global de la proteína está bien preservada, la presencia de cambios pequeños pero importantes,

explican el porque la enzima monomérica es incapaz de llevar a cabo una catálisis óptima.

Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2
Parámetros de la celda unitaria (Å)	70.33, 77.67, 43.05, 90.0, 90.0, 90.0
Intervalo de resolución (Å)	77.85-2.0
No. de reflexiones	68543 (9953)
No. de reflexiones únicas	16583 (2368)
Completancia (%)	99.9 (99.8)
R _{meas} (%)	5.6 (31)
Mn(I)/sd	18.4 (4.7)
No. de moléculas en la celda asimétrica	1
Estadísticas del refinamiento	
Intervalo de resolución (Å)	50-2.00 (2.07-2.00)
R_{cryst}/R_{free} (%)	21.4 (26.1)/25.7 (32.8)
No. de átomos, proteína/solvente (Å²)	1814/47
Valor B promedio de proteína/solvente (Å ²)	38.6/39.6
Valor B de la gráfica Wilson (Å ²)	33.3
Longitudes de enlace RMSD (Å)	0.01
Ángulos de enlace RMSD (grados)	1.41
Residuos en el gráfico de Ramachandran (%)	
Región mayormente permitida	194 (93.3%)
Región permitida	13 (6.2%)
Región generosamente permitida	1 (0.5%)
No se usaron cortes en el refinamiento (F>0σF)	

Tabla 6.4 **Estadísticas del refinamiento y calidad del modelo**

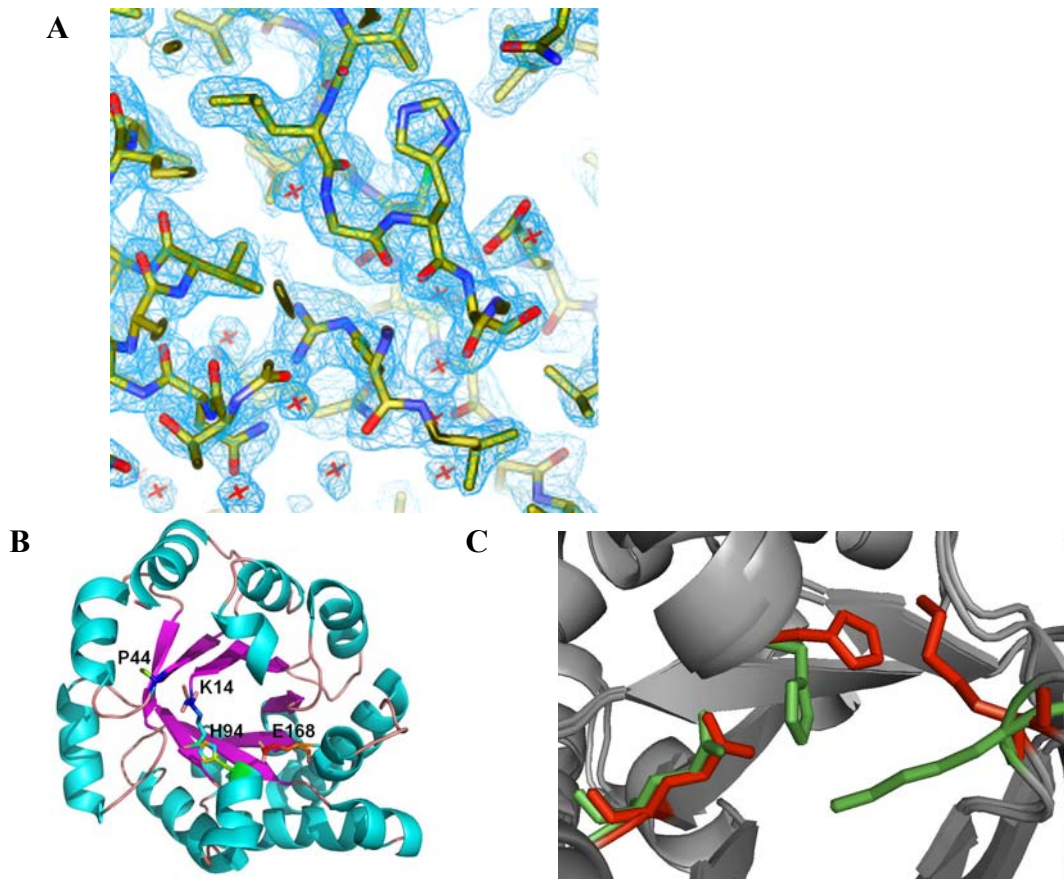


Figura 6.14 Estructura general de monoTcTIM. A) Ajuste Sigma A, mapa de omisión de alineamiento simulado Fo-Fc delineado a 2.5σ para la región alrededor de His96 en el modelo final de monoTcTIM. B) Representación gráfica de la estructura cristalográfica de la variante monomérica de TcTIM. C) Residuos catalíticos en monoTcTIM. Nótese la diferencia de orientación en los residuos Lys14 y His96 de la enzima silvestre (verde) respecto a la monoTcTIM (rojo).

6.8 Unión de ANS

Con el fin de estimar el área hidrofóbica expuesta al solvente después de la monomerización de TcTIM, se evaluó la unión de ANS a las superficies hidrofóbicas de la proteína y se monitoreó su incremento en el rendimiento cuántico de la fluorescencia. Esta sonda se utilizó tanto en monoTcTIM como en TcTIM silvestre en condiciones nativas. Al comparar las IF se encontró un incremento de 4 a 5 veces en la

fluorescencia extrínseca para monoTcTIM, indicando que después de la monomerización se produce una considerable exposición en la superficie hidrofóbica (Tabla 6.5).

<i>Proteína</i>	<i>IF</i> (AU)	ΔIF (%)
TcTIM	174714	100
monoTcTIM	823059	471

Tabla 6.5 Unión de ANS a TcTIM y a monoTcTIM. Se evaluaron las proteínas a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ con la adición de $100 \mu\text{M}$ concentración final de ANS en las muestras. Los espectros de fluorescencia extrínseca se registraron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

VII Análisis de Resultados y Discusión

7.1 Construcción de monoTcTIM.

Se ha reportado previamente que la desnaturalización al equilibrio en Gdn-HCl de TcTIM es reversible (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005), mientras que el desplegamiento de TbTIM con este mismo desnaturalizante es irreversible a la misma concentración de proteína (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002). Basados en la información anterior además de las características funcionales y de reactividad reportadas para estas enzimas (Tellez-Valencia, *et al.*, 2002, 2004; Maldonado, *et al.*, 1998; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003, 2007; Garza-Ramos *et al.*, 1996; Sepulveda-Becerra *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1998, 1999; Gomez-Puyou *et al.*, 1995; Perez-Montfort *et al.*, 1999, 2002; Reyes-Vivas *et al.*, 2001, 2002; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2007), se construyó, purificó y caracterizó una variante monomérica de TcTIM. Esta proteína fue diseñada siguiendo el protocolo reportado para la construcción de monoTbTIM en TbTIM (Borchert *et al.*, 1994). Además se consideró este protocolo como plausible al considerar: 1.- que la superposición de los contactos intersubunidad de la interfase de TbTIM y TcTIM muestran una diferencia de RMS de 0.30 Å para 66 átomos equivalentes del asa 3 (Maldonado *et al.*, 1998); y 2.- la formación de heterodímeros a partir de monómeros de TcTIM y de TbTIM después de la desnaturalización (Zomosa *et al.*, 2003). Considerando que ambas enzimas son muy similares en la región de la interfase, tanto en secuencia primaria (ver Materiales y Métodos) como en estructura tridimensional, se realizó la construcción de una mutante monomérica de TcTIM con el fin de caracterizar las propiedades estructurales y catalíticas de la subunidad aislada de esta enzima. La monoTcTIM resultante es una enzima mutante monomérica; esta variante exhibe una estructura secundaria (Figura 6.7 y Tabla 6.1) y terciaria (Tabla 6.1) muy similares a la enzima silvestre.

Especie	TIM Mutante	ΔG (kJmol ⁻¹)	Actividad ^A (%)	PM (kD)	Rs (Å)	Unión de ANS	Referencia
TbTIM	monoTbTIM	nd	7.5E-5 ^D	27	nd	nd	Borchert <i>et al.</i> , 1994
	RMMO-1	nd	1.07 ^E	nd	-	nd	Saab-Rincón <i>et al.</i> , 2001;
	RMMO-1	-	-	-	19.9	-	Chávez-Cárdenas <i>et al.</i> , 2002
	monoTbTIM-SS	14.2 (10.04) [13.4] ^H	-	25.8	nd	nd	Lambeir <i>et al.</i> , 2000
	RE-TIM	nd	1.6E-2 ^F	26.8	nd	nd	Schliebs1997
TcTIM	monoTcTIM	13.0 (5.8) desnat. [12.3]	6.0E-3	26.4	22.2 ^B	Si	Este trabajo
	monoTcTIM	13.11 (4.4) renat. [12.4]	6.0E-3	26.4	20.3 ^C	Si	Este trabajo
hTIM	M14Q/R98Q	10.5 (11.1) [9.9]	0.0	28	nd	nd	Mainfroid <i>et al.</i> , 1996a
	M14Q/R98Q/ Q179D/ K193A/A215P	16.31 (7.9) [15.4]	-	nd	nd	nd	Mainfroid <i>et al.</i> , 1996b
pfTIM	Y74G	Nd	5.0 ^G	27.8	nd	nd	Maithal <i>et al.</i> , 2002

Tabla 7.1. Propiedades de algunas mutantes monoméricas de TIM. PM: peso molecular determinado por SEC; Rs: radios de Stokes. ANS: ácido 8-anilino-naftaleno sulfónico; A: respecto a la actividad catalítica de su enzima silvestre; B: determinada por SEC; C: determinado por DLS. Los valores de *m* están en paréntesis. nd. No determinado. V_{max} TbTIM WT: 9300 U mg⁻¹ (Lambeir *et al.*, 1987); D: V_{max} monoTbTIM 7.0 nmol min⁻¹ (Borchert *et al.*, 1994); E: V_{max} RMM0-1: 100 U mg⁻¹ (Saab-Rincón *et al.*, 2001); F: V_{max} RE-TIM: 1.5 U mg⁻¹; V_{max} PftIM: 7900 U mg⁻¹ (Maithal *et al.*, 2002) G: V_{max} Y74G: 395 (Maithal *et al.*, 2002). En corchetes se muestran los porcentajes de la estabilidad en relación a su correspondiente enzima silvestre. H: considerando la estabilidad de TbTIM igual a TcTIM (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005).

7.2 Estabilidad del monómero aislado de TcTIM.

A fin de determinar la naturaleza oligomérica obligada de TIM y su eficiencia catalítica, se han desarrollado diversas variantes monoméricas (Figura 3.3). En el presente trabajo, se obtuvo la estabilidad de monoTcTIM en las reacciones de desplegamiento y repliegamiento (ver Tabla 6.3). Las conclusiones de los primeros estudios señalan que la estabilidad de las subunidades es la principal razón de la naturaleza oligomérica obligada de TIM (Borchert *et al.*, 1993; Schliebs *et al.*, 1997). Sin embargo, también se ha discutido que la baja estabilidad de los monómeros de TIM no es la única ni la principal causa de su naturaleza dimerica y que existe una interrelación entre estabilidad y función, implicando la aparición de una alta $\Delta G_{\text{asociación}}$ para realizar la catálisis. El valor de ΔG para las mutantes monoméricas varía de 10 a 15 % de la estabilidad total de la enzima (ver Tabla 7.1) y posiblemente esta es una razón, por la que no ha sido posible hasta ahora crear una variante monomérica de triosafosfato isomerasa con suficientes niveles de actividad semejantes a los de la enzima silvestre. Los esfuerzos para obtener variantes monoméricas por ingeniería genética también producen monómeros con baja estabilidad cuando se comparan con el oligómero silvestre y presentan muy baja o ninguna actividad catalítica (Tabla 7.1). Estas proteínas monoméricas presentan una estabilidad similar a la de los inactivos aunque muy estructurados intermediarios monoméricos producidos por desnaturalización parcial. Quizás para obtener una TIM monomérica por ingeniería genética con niveles de catálisis similares a las de la enzima silvestre, deba incrementarse la estabilidad del monómero, además de tener a los residuos catalíticos en una conformación espacial adecuada.

7.3 Exposición de área hidrofóbica.

Los estudios de monomerización de TIM indican que una importante cantidad de interacciones hidrofóbicas que se encuentran en la enzima silvestre, deben perderse por la separación de los monómeros. Entonces, las variantes monoméricas deben exponer área hidrofóbica al solvente. Una evidencia de este hecho fue confirmada por el uso de ANS. La unión de esta molécula a áreas predominantemente hidrofóbicas en la proteína es acompañado por un importante incremento en el rendimiento cuántico de fluorescencia (Rosen and Weber, 1969; Ptitsyn *et al.*, 1990; Semisotnov *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992). Y como se ha mostrado anteriormente, la desnaturalización parcial en Gdn-HCl de γ TIM (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000), TbTIM (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2003) y TcTIM (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005), producen intermediarios monoméricos muy estructurados pero con baja estabilidad que son capaces de unir ANS. monoTcTIM es la primer mutante monomérica en ser analizada en su superficie hidrofóbica expuesta al solvente. Se uso la TcTIM nativa como control y se encontró un incremento de aproximadamente 5 veces en la fluorescencia extrínseca para monoTcTIM (Tabla 6.5). Este aumento de fluorescencia se debe a la exposición de una considerable cantidad de superficie hidrofóbica después de la desnaturalización. Por lo tanto, la significativa exposición de superficie no polar podría ser una de las razones de la baja estabilidad de las variantes monoméricas de TIM. Por ejemplo, el área de superficie oculta en TcTIM es alrededor de 1480 \AA^2 (Maldonado *et al.*, 1998). Por otro lado, para TbTIM, estos valores son mayores que en TcTIM ($\sim 1530 \text{ \AA}^2$) y quizás sea una causa de la agregación del intermediario monomérico de TbTIM en concentraciones moderadas de Gdn-HCl. Uno de los objetivos particulares de construir variantes monoméricas de TIM es obtener en éstas una actividad catalítica semejante a la enzima silvestre. Por lo tanto, se requiere una mayor y detallada observación de las mutaciones

en la interfase y es posible entonces que disminuyendo el área de exposición hidrofóbica después de la monomerización, pueda aumentar la estabilidad de la proteína y así aumentar la actividad catalítica.

7.4 Estructura y catálisis del monómero aislado de TcTIM.

Como se mencionó antes, algunas mutaciones de asa 3 de la interfase generan variantes monoméricas estables, aunque se han explorado también mutaciones en otras regiones de la interfase. En general, la experiencia en la construcción de monómeros de TIM por ingeniería genética muestra que las mutantes resultantes conservan un grado significativo de estructura secundaria y terciaria, como se ha reportado para TbTIM, hTIM y PfTIM. Sin embargo, esta conservación estructural no es suficiente para producir catálisis en ellas (ver Tabla 7.1). En el caso de la monoTcTIM, como se ha mostrado en los resultados presentados aquí, su estructura secundaria y terciaria está bien conservada, lo cual también se observó en el cristal; sin embargo, sus parámetros catalíticos permanecen en el rango presentado por las mutantes monoméricas de otras especies (ver Tabla 6.2). Algunas características presentes en el modelo cristalográfico podrían relacionarse con esta situación: los residuos correspondientes al asa 1 no son visibles en el mapa y los residuos del asa flexible, son poco claros en el mapa de densidad. En el mismo modelo, se observan los cambios de posición de las cadenas laterales de los residuos catalíticos histidina96 y lisina14 respecto a las posiciones que tienen en la enzima silvestre (Figura 6.14C). Sin embargo, este tipo de cambios también se han detectado en otras mutantes monoméricas.

Las observaciones reportadas aquí, presentan algunos aspectos interesantes en términos de proteínas homólogas: 1.- Considerando las diferencias en reactividad y en la ruta de plegamiento entre TcTIM y TbTIM, fue posible obtener catálisis en monoTcTIM a

partir de TcTIM realizando las mismas mutaciones que producen actividad en monoTbTIM que se obtuvo a partir de TbTIM. monoTcTIM presenta una K_{cat} similar a la de la variante monomérica RMMO-1 de monoTbTIM (ver Tabla 6.2); por otro lado, la afinidad por el sustrato (K_m) es el doble del valor de monoTbTIM lo cual indica un arreglo distinto de los residuos involucrados en la unión del sustrato (Figura 6.14C). Por tanto, las mutaciones realizadas en TcTIM producen una mutante monomérica más eficiente aunque con menos afinidad que en monoTbTIM. 2.- Aún cuando la conformación espacial final del sitio activo está totalmente conservada a través de la evolución, la construcción de su entorno es muy específica, aunque flexible, pues las mutaciones en distintos sitios de la interfase producen tanto monómeros inactivos (Borchert *et al.*, 1993; Schliebs *et al.*, 1997) como activos (Thanki *et al.*, 1997; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2007) con órdenes de magnitud mucho menores a sus correspondientes enzimas silvestres (ver Tabla 7.1). Así pues, el arreglo más adecuado para realizar un sitio catalítico similar al nativo en estas mutantes no se obtiene después del plegamiento, al menos con las especies, regiones y sustituciones exploradas hasta ahora. Por otro lado, la hipótesis de que la presencia de la Pro44 en la secuencia de TIM, podría mejorar la actividad catalítica después de la monomerización porque rigidiza el asa 2 (Saab-Rincon *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la mutación de la Ser por Pro en esta posición podría mejorar la actividad catalítica después de la monomerización. Los resultados obtenidos para monoTcTIM en este trabajo concuerdan con lo anterior, ya que TcTIM incluye este residuo y monoTcTIM presenta la misma K_{cat} que la variante de monoTbTIM (RMMO-1) que incluye a este residuo en esta posición (ver Tabla 6.2).

Las diferencias en la actividad enzimática de dos proteínas muy similares indican la gran interdependencia adquirida por el dímero biológico y que cualquier cambio en la

secuencia es comunicado entre los monómeros para desarrollar la enzima más eficiente posible. Es notable que en todas las enzimas TIM estudiadas a la fecha y provenientes de organismos diversos, su actividad catalítica sea muy similar, a pesar de su variabilidad en la secuencia primaria (Lambeir, 2000; Garza-Ramos *et al.*, 1998). En el presente estudio se mostró que las propiedades enzimáticas de las subunidades catalíticas de TIM son distintas, generando otra línea de estudio para la comprensión de los mecanismos de catálisis, estabilidad de la proteína y la naturaleza dimérica de esta enzima.

VIII Conclusiones.

1. Se construyó, purificó y caracterizó una versión monomérica de TcTIM que presenta características estructurales similares a las de los monómeros de la enzima silvestre.
2. Ésta mutante se denominó monoTcTIM. Su peso molecular corresponde al reportado previamente para los monómeros de TcTIM. Sus niveles de estructura secundaria y terciaria fueron determinados mediante técnicas espectroscópicas y los resultados muestran que ésta es muy parecida a la del monómero silvestre.
3. Se determinó su ruta de desplegamiento/plegamiento usando Gdn-HCl como desnaturizante. El análisis de los datos espectroscópicos referentes a la estructura secundaria y terciaria, indican que no hay presencia de un intermediario, al exhibir un comportamiento monofásico en el patrón de plegamiento/desplegamiento y una coincidencia en los patrones de IF y de DC. Considerando los resultados obtenidos con los datos espectroscópicos donde se evaluaron sus niveles estructurales, se encontró que los datos se ajustan correctamente a un modelo de dos estados: plegado y desplegado ($N \rightleftharpoons U$).
4. La estabilidad de la mutante determinada con los datos espectroscópicos de IF y de DC, muestra valores muy similares a los que se encuentran reportados en la literatura para otros monómeros obtenidos mediante desnaturalización parcial o por ingeniería genética.
5. La actividad catalítica de monoTcTIM fue muy reducida respecto a la enzima silvestre, sin embargo, se encuentran en el rango de las otras enzimas monoméricas reportadas. Comparada con la primera monoTIM reportada (monoTbTIM), monoTcTIM, presenta una K_m mayor. Sin embargo, presenta una K_{cat} 10 veces mayor, indicando que mutaciones equivalentes producen en

TcTIM una proteína monomérica más eficiente, aunque con menos afinidad que la misma proteína de TbTIM.

6. Los estudios realizados sobre la superficie hidrofóbica al utilizar fluorescencia extrínseca, indican que dicha superficie aumenta significativamente al monomerizar a la enzima.
7. Se logró obtener la estructura cristalográfica de monoTcTIM a una resolución de 2 Å. La estructura tridimensional de la proteína muestra una conservación general cuando se compara con el monómero de la enzima silvestre de TcTIM.
8. Los residuos catalíticos en la mutante muestran diferencias en su arreglo espacial respecto al monómero de la enzima silvestre.

IX Perspectivas

1. Caracterización del proceso de desnaturalización utilizando como perturbante de la estructura a la temperatura y analizando el proceso mediante técnicas espectroscópicas, tales como Dicroísmo Circular y fluorescencia.
2. Caracterización de parámetros termodinámicos por calorimetría diferencial de barrido (DSC).
3. Obtener las constantes de afinidad de la proteína a diferentes análogos de sustrato
4. Obtención de las estructuras cristalográficas en presencia de análogos de sustrato y ANS
5. Llevar a cabo un análisis general de la estructura cristalográfica obtenida en este trabajo para determinar parámetros tales como área accesible al solvente, cambios globales y locales en los diferentes niveles estructurales y de la región catalítica.
6. Determinar mediante simulaciones computacionales mutaciones específicas que permitan aumentar la estabilidad del monómero, reduciendo el área hidrofóbica expuesta al solvente y recuperando las interacciones locales perdidas durante el proceso de monomerización.

X Referencias generales

Alahuhta, M., Salin, M., Casteleijn, M.G., Kemmer, C., El-Sayed, I., Augustyns, K., Neubauer, P., and Wierenga, R.K. (2008). Structure-based protein engineering efforts with a monomeric TIM variant: the importance of a single point mutation for generating an active site with suitable binding properties. *Prot Eng. Design & Selection*. **21**(4): 257–266.

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, **181**, 223-230.

Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K., and Maes, D. (1998) Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J.Biol.Chem.* **273**: 2199-2206

Aparicio, R., Ferreira, S.T., Polikarpov, I. (2003) Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity. *J.Mol.Biol.* **334**: 1023-1041.

Arya, R., Lalloz, M.R.A., Bellingham, A.J. & Layton, D.M. (1997) Evidence for founder effect of the Glu104Asp substitution and identification of new mutations in triosephosphate isomerase deficiency. *Human Mut* **10**: 290-294.

Banner, D.W., Bloomer, A., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Wilson, I.A. (1976) Atomic coordinates for triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**: 146-155.

Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., Jaenicke, R. (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Sci* **6**, 2159-2165.

Benitez-Cardoza, C.G., Rojo-Dominguez, A., Hernandez-Arana, A. (2001) Temperature-Induced Denaturation and Renaturation of Triosephosphate Isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of Dimerization Coupled to Refolding of the Thermally Unfolded Protein. *Biochemistry* **40**, 9049-9058.

Blacklow, S.C., Raines, R.T., Lim, W.A., Zamore, P.D. & Knowles, J.R. (1988) Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by ³¹P NMR. *Biochemistry* **27**: 1158-1167.

Borchert, T.V., Kishan, K.V., Zeelen, J.P., Schliebs, W., Thanki, N., Abagyan, R., Jaenicke, R. & Wierenga, R.K. (1995a) Three new crystal structures of point mutation variants of monoTIM: conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8. *Structure* **3**: 669-679.

Borchert, T.V., Abagyan, R., Jaenicke, R. & Wierenga, R.K. (1994) Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1515-1518.

Borchert, T.V., Abagyan, R., Kishan, K.V., Zeelen, J.P. & Wierenga, R.K. (1993a) The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: the correct modelling of an eight-residue loop. *Structure* **1**: 205-213.

Borchert, T.V., Pratt, K., Zeelen, J.P., Callens, M., Noble, M.E., Opperdoes, F.R., Michels, P.A. & Wierenga, R.K. (1993b) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* **211**: 703-710.

Bränden, Carl-Ivar (1991) The TIM barrel the most frequently occurring folding motif in proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **1**:978-983.

Bullock, J.C., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.

Cabrera, N., Hernández-Alcántara, G., Mendoza-Hernández, G., Gómez-Puyou, A. and Perez-Montfort, R. (2008) Key Residues of Loop 3 in the Interaction with the Interface Residue at Position 14 in Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* **47**, 3499–3506

Chávez-Cárdenas, M.E., Fernández-Velasco, D.A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., and Pérez Montfort, R. (2002) Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants, *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 117-129

Chávez-Cárdenas, M.E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B.G., Costas, M. and Vázquez-Contreras, E. (2005) The reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*, **44**, 10883-10892.

Chu, C.-H., Lai, Y.-J., Sun, Y.-J. (2008) Kinetics and Structural Properties of Triosephosphate Isomerase from *Helicobacter pylori*. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **71**: 396.

Collaborative-Computational-Project-4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**: 760-763.

Creighton, T. E. (1990). Protein Folding. *Biochemistry J.*, **270**, 1-16.

Davenport. R.C., Bash, P.A., Seaton, B.A., Karplus, M., Petsko, G.A. & Ringe, D. (1991) Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: An analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* **30**: 5821-5826.

- Delboni, L.F., Mande, S.C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F.M., Martial, J.A., Hol, W.G. (1995) Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**: 2594-2604
- Derreumaux, P. & Schlick, T. (1998) The loop opening/closing motion of the enzyme triosephosphate isomerase. *Biophys J* **74**: 72-81.
- Dill, K.A. (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, **29**(31): 7133-7155.
- Eder, J. & Kirschner, K. (1992) Stable substructures of eightfold ba-barrel proteins: Fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry* **31**: 3617-3625.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt1): 2126-2132
- Farber G.K. & Petsko G.A. (1990) The evolution of α/β barrel enzymes. *Trends Biochem Sci* **15**: 228-234.
- Fernandez-Velasco, D.A., Sepulveda-Becerra, M., Galina, A., Darszon, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. (1995) Water Requirements in Monomer Folding and Dimerization of Triosephosphate Isomerase in Reverse Micelles. Intrinsic Fluorescence of Conformers Related to Reactivation. *Biochemistry* **34**, 361-369.
- Gao X.G., Garza-Ramos G., Saavedra-Lira E., Cabrera N., De Gomez-Puyou M.T., Perez-Montfort R., Gomez-Puyou A. (1998) Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of suramin. *Biochem J.* **332**, 91-96.
- Gao, X.G., Maldonado, E., Perez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou M.T., Gomez-Puyou, A., Rodriguez-Romero, A. (1999) Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 10062-7.
- Garza-Ramos, G., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., Gracy, R. W. (1992) Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur J Biochem* **208**, 389-395.
- Garza-Ramos, G., Perez-Montfort, R., Rojo-Dominguez, A., de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. (1996) Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem.* **241**, 114-20.
- Garza-Ramos, G, Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gomez-Puyou, M., ostoa-Saloma, R., Pérez-Monfort, R., Gómez-Puyou, A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem* **253**, 684-691

Gayathri, P., Banerjee, M., Vijayalakshmi, A., Azeez, S., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, M.R.N. (2007) Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr., Sect. D* **63**: 206-220.

Gokhale, R.S., Ray, S.S., Balaram, H., Balaram, P. (1999) Unfolding of *Plasmodium falciparum* Triosephosphate Isomerase in Urea and Guanidinium Chloride: Evidence for a Novel Disulfide Exchange Reaction in a Covalently Cross-Linked Mutant. *Biochemistry* **38**, 423-431.

Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Dominguez, A., Perez-Montfort, R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol.* **2**, 847-55.

Hennig, M., Sterner, R., Kirschner, K. & Jansonius, J.N. (1997) Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosyl anthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: Possible determinants of protein stability. *Biochemistry* **36**: 6009-6016.

Hernandez-Alcantara, G., Garza-Ramos, G., Hernandez, G.M., Gomez-Puyou, A. & Perez-Montfort, R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* **41**: 4230-4238.

Higgins, W., Fairwell, T. & Miles, E.W. (1979) An active proteolytic derivative of the a subunit of tryptophan synthase. Identification of the site of cleavage and characterization of the fragments. *Biochemistry* **18**: 4827-4835.

Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7351-7367.

Höcker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., Lustig, A. & Sterner, R. (2001) Dissection of a ($\beta\alpha$)₈-barrel enzyme into two folded halves. *Nature Struct Biol* **8**: 32-36.

Janin, J., Miller, S. & Chothia, C. (1988) Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **204**: 155-164.

Joseph, D., Petsko, G.A. & Karplus, M. (1990) Anatomy of a conformational change: Hinged "lid" motion of the triosephosphate isomerase loop. *Science* **249**: 1425-1428.

Kim, P.S. and Baldwin, R. L. (1982) Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein folding. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 459-489.

Knowles, J.R. and Albery, W.J. (1977) Perfection in Enzyme Catalysis: The energetics of Triosephosphate Isomerase. *Acc. Chem. Res.* **10**(4): 105-111.

Knowles, J. R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better, *Nature* **350**, 121-124.

- Kohlhoff M, Dahm A, and Hensel R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea *FEBS Lett.* **383**, 245-50.
- Kursula, I. & Wierenga, R.K. (2003) Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J Biol Chem* **278**: 9544-9551.
- Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V., Wierenga, R. K. (2000) The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur J Biochem* **267**, 2516-2524.
- Leslie, A.G.W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image data. Join CCP4+ESF-EAMCB. *Newsletter on Protein Crystallography*, 26.
- Lodi, P.J. & Knowles, J.R. (1991) Neutral imidazole is the electrophile in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase: Structural origins and catalytic implications. *Biochemistry* **30**: 6948-6956.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C., and Petsko, G.A. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29**: 6609-6618.
- Lolis, E. & Petsko, G.A. (1990) Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: Implications for catalysis. *Biochemistry* **29**: 6619-6625.
- Maes, D., Zeelen, J.P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M.H., Backmann, J., Martial, J.A., Wyns, L., Jaenicke, R., Wierenga, R.K. (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* **37**: 441-453.
- Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H. & Balaram, P. (2002) Inhibition of plasmodium falciparum triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *J Biol Chem* **277**: 25106-25114.
- Mainfroid, V., Mande, S.C., Hol., W.G.J., Martial., J., and Goraj, K. (1996a) Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual α -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110-4117.
- Mainfroid V, Terpstra P, Beaugard M, Frere JM, Mande SC, Hol WG, Martial JA & Goraj K (1996b) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* **257**: 441-456.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes, *J. Mol. Biol.* **283**, 193-203.

Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, K., Martial, J.A. & Hol, W.G. (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci* **3**: 810-821.

McCoy, [A.J.](#), [Grosse-Kunstleve](#), R.W., [Adams](#), P.D., [Winn](#), M.D.L. [Storoni](#), [C.](#) and Read, [R.J.](#) (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl Cryst.* **40**: 658-674.

Mirny, L.A. & Shakhnovich, E.I. (1999) Universally conserved positions in protein folds: Reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *J. Mol. Biol.* **291**: 177-196.

Moreau, V.H., Rietveld, A. W.M., and Ferreira, S.T. (2003) Persistent conformational heterogeneity of triosephosphate isomerase: Separation and characterization of conformational isomers in solution, *Biochemistry* **42**, 14831-14837.

Morgan, C.J., Wilkins, D.K., Smith, L.J., Kawata, Y., and Dobson, C.M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **300**, 11-16.

Nagano N, Hutchinson EG & Thornton JM (1999). Barrel structures in proteins: Automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels. *Protein Sci* **8**: 2072-2084.

Nagano, N., Orengo, C.A. & Thornton, J.M. (2002) One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* **321**: 741-765.

Najera, H., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D.A. (2003) Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**, 785-792.

Noble, M.E., Wierenga, R.K., Lambeir, A.M., Opperdoes, F.R., Thunnissen, A.M., Kalk, K.H., Groendijk, H. & Hol, W.G. (1991a) The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins* **10**: 50-69.

Noble, M.E., Verlinde, C.L., Groendijk, H., Kalk, K.H., Wierenga, R.K. & Hol, W.G. (1991b) Crystallographic and molecular modeling studies on trypanosomal triosephosphate isomerase: A critical assessment of the predicted and observed structures of the complex with 2-phosphoglycerate. *J Med Chem* **34**: 2709-2718.

Noble, M.E., Zeelen, J.P., Wierenga, R.K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.C., Martial, J.A. (1993) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr., Sect.D* **49**: 403-417.

- Norlegde, B.V., Lambeir, A.M., Abagyan, R.A., Rottmann, A., Fernandez, A.M., Filimonov, V.V., Peter, M.G., and Wierenga, R.K. (2001) Modeling, Mutagenesis, and Structural Studies on the Fully Conserved Phosphate-Binding Loop (Loop 8) of Triosephosphate Isomerase: Toward a New Substrate Specificity. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **42**:383–389.
- Olah, J, Orosz, F., Keresu, G.M., Kovari, Z., Kovacs, J., Hollan, S., and Ovádi, J. (2002) Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. *Biochemical Society Transactions*, **30**: 30-38.
- Olivares-Illana, V., Perez-Montfort, R., Lopez-Calahorra, F., Costas, M., Rodriguez-Romero, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez Puyou, A. (2006) Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry*. **45**, 2556-60.
- Orengo, C.A., Michie, A.D., Jones, S., Jones, D.T., Swindells, M.B. & Thornton, J.M. (1997) CATH - a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* **5**: 1093-1108.
- Orosz, F., Olah, J. & Ovadi, J. (2006) Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life* **58**: 703-715.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gomez-Puyou, A., Tuena, D.G.-P. & Perez-Montfort, R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* **244**: 700-705.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Pace, C.N. (1990). [Conformational stability of globular proteins](#). *TIBS* **15**, 14-17.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Pan, H., Raza, A.S., and Smith, D.L. (2004) Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **336**, 1251-1263.
- Pannu, N.J., Murshudov, G.N., Dodson, E.J., Read, R.J. (1998) Incorporation of Prior Phase Information Strengthen Maximum-Likelihood Structure Refinement, *Acta Cryst.* section D **54** 1285-1294.
- Parthasarathy, S., Balaram, H., Balaram, P. & Murthy, M.R. (2002) Structures of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase complexed to substrate analogues: Observation of the catalytic loop in the open conformation in the ligand-bound state. *Acta Cryst* **D58**: 1992-2000.
- Perez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Alcantara, G.H., Reyes-Vivas, H., Gao, X.G., Maldonado, E., de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. (1999) Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and

Trypanosoma cruzi as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry*. **38**, 4114-20.

Perez-Montfort, R, de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. (2002) The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Curr Top Med Chem*. **2**, 457-70.

Pompliano, D.L., Peyman, A. & Knowles, J.R. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: Definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **29**: 3186-3194.

Pujadas, G. & Palau, J. (1999) TIM barrel fold: structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biologia, Bratislava*, **54** (3): 231-254.

Pujadas, G. and Palau, J. (2001) Evolution of α -Amylases: Architectural Features and Key Residues in the Stabilization of the $(\beta/\alpha)_8$ Scaffold. *Mol. Biol. Evol.* **18**(1):38–54. 2001.

Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O.I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding, *FEBS Lett.* **262**, 20-24.

Raychaudhuri, S., Younas, F., Karplus, P.A., Faerman, C.H. & Ripoll, D.R. (1997) Backbone makes a significant contribution to the electrostatics of α/β -barrel proteins. *Protein Sci* **6**: 1849-1857.

Reardon, D. & Farber, G.K. (1995) The structure and evolution of α/β proteins. *FASEB J*. **9**, 497–503.

Reyes-Vivas, H., Hernandez-Alcantara, G., Lopez-Velazquez, G., Cabrera, N., Perez-Montfort, R., de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. (2001) Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*. **40**, 3134-40.

Reyes-Vivas, H., Martinez-Martinez, E., Mendoza-Hernandez, G., Lopez-Velazquez, G., Perez-Montfort, R., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. (2002) Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins*. **48**, 580-90.

Reynolds, S.J., Yates, D.W. & Pogson, C.I. (1971) Dihydroxyacetone phosphate. Its structure and reactivity with glycerophosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase and some possible metabolic implications. *Biochem J* **122**: 285-297.

Rieder, S.V. and Rose, I.A. (1959) The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction. *J Biol Chem* **234** (5), 1007-1010.

- Rietveld, A.W., and Ferreira, S.T. (1996) Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: Persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**, 7743-7751.
- Rietveld, A.W., Ferreira, S.T. (1998) Kinetics and Energetics of Subunit Dissociation/Unfolding of TIM: The Importance of Oligomerization for Conformational Persistence and Chemical Stability of Proteins. *Biochemistry* **37**, 933-937.
- Rison, S.C., Hodgman, T.C. & Thornton, J.M. (2000) Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Funct Integr Genomics* **1**: 56-69.
- Rodriguez-Almazan, C., Torner, F.J., Costas, M., Perez-Montfort, R., de Gomez-Puyou M.T., Puyou, A.G. (2007) The stability and formation of native proteins from unfolded monomers is increased through interactions with unrelated proteins. *PLoS ONE*. **2**, e497.
- Rodriguez-Almazan, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-Lopez, B., Tuena de Gómez-Puyou M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A., and Torres-Larios, A. Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency. Mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface (2008). *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 23254-23263.
- 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**: 669-675.
- Rosen, C.G., and Weber, G. (1969) Dimer formation from 1-amino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry* **8**, 3915-3920.
- Rozacky, E.E., Sawyer, T.H., Barton, R.A., and Gracy, R.W. (1971) Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 312-320.
- Saab-Rincón, G., Rivelino-Juárez, V., Osuna, J., Sánchez Filiberto y Soberón, J. (2001) *Protein Engineering* **14**, 149-155.
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R. & Wierenga, R. (1996) Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci* **5**: 229-239.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. y Wierenga, R.K. (1997) A Double Mutation at the Tip of the Dimer Interface Loop of Triosephosphate Isomerase Generates Active Monomers with Reduced Stability. *Biochemistry* **36**, 9655-9662.
- Schmidt, A., Knobloch, D., Scheerer, P., Wessner, H., Scholz, C., Kuettner, G., Krauss, N., Hoehne, W. Structure of Triosephosphate Isomerase of *Tenebrio molitor* To be Published.

- Schneider, A. & Cohen-Solal, M. (1996) Hematologically important mutations: Triosephosphate isomerase. *Blood Cells Mol Dis* **22**: 82-84.
- Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F., and Gilmanshin, R.I. (1991) Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119-128.
- Sepulveda-Becerra, M.A., Ferreira, S.T., Strasser, R.J., Garzon-Rodriguez, W., Beltran, C., Gomez-Puyou, A., Darszon, A. (1996) Refolding of triosephosphate isomerase in low-water media investigated by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, **35**, 15915-22.
- Silva, J.L., Silveira, C.F., Correia, A., Jr., and Pontes, L. (1992) Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor, *J. Mol. Biol.* **223**, 545-555.
- Sterner, R., Kleemann, G.R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M. & Kirschner, K. (1996) Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Sci* **5**: 2000-2008.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Sun, A.Q., Yuksel, K.U. & Gracy, R.W. (1992a) Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *J Biol Chem* **267**: 20168-20174.
- Sun, A.Q., Yuksel, K.U. & Gracy, R.W. (1992b) Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation. *Arch Biochem Biophys* **293**: 382-390.
- Symersky, J., Li, S., Carson, M., Luo, M. (2003) Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **51**: 484-486.
- Tellez-Valencia, A., Avila-Rios, S., Perez-Montfort, R., Rodriguez-Romero, A., Tuena D G-P, Lopez-Calahorra, F. & Gomez-Puyou, A. (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 958-963.
- Tellez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernandez-Santoyo, A., Perez-Montfort, R., Costas, M., Rodriguez-Romero, A., Lopez-Calahorra, F., Tuena, DG-P. & Gomez-Puyou, A. (2004) Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* **341**: 1355-1365.
- Thanki, N., Zeelen, J.P., Mathieu, M., Jaenicke, R., Abagyan, R.A., Wierenga, R.K. & Schliebs, W. (1997) Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): the modelling and structure verification of a seven-residue loop. *Protein Eng* **10**: 159-167.

Tsai, C.J. & Nussinov, R. (2001) The building block folding model and the kinetics of protein folding. *Protein Eng* **14**: 723-733.

Vazquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernandez, G., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D.A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: A monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* **7**, 57-64.

Vázquez-Contreras, E., Sánchez-Rebollar, B.G. and Chánez-Cárdenas, M.E. (2004) "The Equilibrium Folding of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* is a four state process. Intrinsic fluorescent studies". *Journal of the Mexican chemical society* **48**, 296-299.

Vazquez Contreras, E., Pérez Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B.G. and Chánez-Cárdenas M.E. (2005) The unfolding and refolding reactions of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* follow similar pathways. Guanidinium hydrochloride studies. *American Institute of Physics* **757**, 156-167.

Vazqu ez-Contreras, E., Ibarra Rodríguez, P., Castillo-Sánchez., V. and Chánez-Cárdenas, M.E. (2008) The unfolding of proteins induced by different denaturants. In *Advances in Protein Physical Chemistry*, pp. 169-192. García-Hernández, E. and Fernández-Velasco, D.A. Editors.

Vazquez-Perez A.R. and Fernandez-Velasco D.A. (2007) Pressure and Denaturants in the Unfolding of Triosephosphate Isomerase: The Monomeric Intermediates of the Enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry* **46**, 8624-8633.

Velanker, S.S., Ray, S.S., Gokhale, R.S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, M.R. (1997) Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **5**: 751-761.

Walden, H., Bell, G.S., Russell, R.J.M., Siebers, B., Hensel, R., and Taylor, G.L. (2001) Tiny TIM: A Small, Tetrameric, Hyperthermostable Triosephosphate Isomerase. *J. Mol. Biol.* **306**, 745-757.

Walden, H., Taylor, G.L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjaden, B., Hensel, R. (2004) Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J.Mol.Biol.* **342**: 861-875.

Wierenga, R.K., Kalk, K.H. and Hol, W.G.J (1987) Structure Determination of the Glycosomal Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei brucei* at 2-4 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 109-121.

Wierenga, R.K., Noble, M.E., Postma, J.P., Groendijk, H., Kalk, K.H., Hol, W.G., Opperdoes, F.R. (1991a) The crystal structure of the "open" and the "closed" conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins* **10**: 33-49

Wierenga RK, Noble ME, Vriend G, Nauche S & Hol WG (1991b) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* **220**: 995-1015.

Wierenga, R.K., Borchert, T.V. and Noble, M.E.M. (1992a) Crystallographic binding studies with triosephosphate isomerases: conformational changes induced by substrate and substrate-analogues, *FEBS Lett.* **307**, 34-39.

Wierenga, R.K., Noble, M.E. & Davenport, R.C. (1992b) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **224**: 1115-1126.

Williams, J.C., Zeelen, J.P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P.A., Lambeir, A.M., Wierenga, R.K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**: 243-250.

Wilmanns, M., Hyde, C.C., Davies, D.R., Kirschner, K. & Jansonius, J.N. (1991) Structural conservation in parallel β/α -barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. *Biochemistry* **30**: 9161-9169.

Zabori, S., Rudolph, R., Jaenicke, R. (1980). Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z Naturforsch [C]* **35**, 999-1004.

Zárate-Pérez, F., Chánez-Cárdenas, M.E. and Vázquez-Contreras, E. (2008) The folding pathway of triosephosphate isomerase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 84(7), 251-267. P. Michel Conn Editor. Elsevier Inc.

Zitzewitz, J.A. & Matthews, C.R. (1999) Molecular dissection of the folding mechanism of the alpha subunit of tryptophan synthase: An amino-terminal autonomous folding unit controls several rate-limiting steps in the folding of a single domain protein. *Biochemistry* **38**: 10205-10214.

Zhang, Z., Komives, E.A., Sugio, S., Blacklow, S.C., Narayana, N., Xuong, N.H., Stock, A.M., Petsko, G.A. & Ringe, D. (1999) The role of water in the catalytic efficiency of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **38**: 4389-4397.

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. (2003) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*. **42**, 3311-8.

Zomosa-Signoret, V., Aguirre-Lopez, B., Hernandez-Alcantara, G., Perez-Montfort, R., de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A. (2007). Crosstalk between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *Proteins*. **67**, 75-83.

XI. Anexos.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers

Francisco Zárate-Pérez^a, María Elena Chánez-Cárdenas^b, Rodrigo Arreola^c, Alfredo Torres-Larios^c, Edgar Vázquez-Contreras^{a,d,*}

^a Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, México, DF 04510, México

^b Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, DF, México

^c Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

^d Departamento de Ciencias Naturales, CNI, Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa, Pedro Antonio de los Santos 84, Col. Sn. Miguel Chapultepec, Deleg. Miguel Hidalgo, México, DF 11850, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2009

Available online xxx

Keywords:

Triosephosphate isomerase

Catalysis

Evolution

Monomeric TIM

ABSTRACT

It is assumed that amino acid sequence differences in highly homologous enzymes would be found at the peripheral level, subtle changes that would not necessarily affect catalysis. Here, we demonstrate that, using the same set of mutations at the level of the interface loop 3, the activity of a triosephosphate isomerase monomeric enzyme is ten times higher than that of a homologous enzyme with 74% identity and 86% similarity, whereas the activity of the native, dimeric enzymes is essentially the same. This is an example of how the dimeric biological unit evolved to compensate for the intrinsic differences found at the monomeric species level. Biophysical techniques of size exclusion chromatography, dynamic light scattering, X-ray crystallography, fluorescence and circular dichroism, as well as denaturation/renaturation assays with guanidinium hydrochloride and ANS binding, allowed us to fully characterize the properties of the new monomer.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Sequence differences, both at DNA and protein level, are part of the basis of evolutionary change. Even in naturally occurring highly preserved proteins belonging to closely related species, there are different regions that normally do not influence on major structural or functional change. The highly preserved homodimeric glycolytic enzyme triosephosphate isomerase (TIM) has been well characterized over the last 50 years. Especially TIM's from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) and *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), which share a similar amino acid sequence identity of 74% and 86%. However, it has been reported that, despite this, differences exist at the level of sensibility to thiol reagents [1,2] and subtilisin [3], equilibrium unfolding [4,5], as well as in the ability to form active dimers from unfolded monomers [6].

This paper demonstrates that variations in the sequence can also be related to significant catalytic differences of the TIM system. For this, a monomeric variant of TcTIM (monoTcTIM) was characterized. The monomeric nature of monoTcTIM was demon-

strated using size exclusion chromatography, dynamic light scattering, by the fact that the activity is not dependent on the concentration and because the observed monophasic behavior in the denaturation/renaturation experiments. Although the stability of the monomeric enzyme was about 15% of that of the native dimer and an increase in ANS binding was observed, the overall three dimensional structure was preserved as shown using circular dichroism (CD), intrinsic fluorescence (IF) and X-ray crystallography experiments. It was found that the catalytic turnover is ten times higher than that for monoTbTIM [7], the equivalent monomeric mutant from *T. brucei*. Our results are discussed in light of the current information available for single mutants.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids. Overexpression of monoTcTIM was achieved with the *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) [8].

Enzymes and biochemicals. Restriction enzymes, DNA polymerase, T4 DNA ligase and Gdn-HCl were purchased from Boehringer GmbH, Mannheim. All other reagents were obtained from Sigma Chemical Co.

Mutagenesis and purification. Mutagenesis was performed on plasmid pET3a [9]; amino acid insertion was carried out according

* Corresponding author. Address: Departamento de Ciencias Naturales, CNI, Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa, Pedro Antonio de los Santos 84, Col. Sn. Miguel Chapultepec, Deleg. Miguel Hidalgo, México, DF 11850, México. Tel.: 52 55 2636 3800x3853; fax: 52 55 2636 3800x3847.

E-mail address: evazquez@bq.unam.mx (E. Vázquez-Contreras).

to [10]; and overexpression and purification of monoTcTIM according to [11].

Enzyme characterization. Absorbance measurements were obtained with a Beckman DU7500 spectrophotometer with the cell compartment thermoregulated at 25 °C. Protein concentrations were determined using a BCA assay. TIM activity was followed by changes in the absorbance at 340 nm [12]. Conditions for the reaction that produces dihydroxyacetone phosphate were: 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (TED) (pH 7.4), 1.5–3.0 mM D-glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), 5–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ α -glycerophosphate dehydrogenase, and 0.2 mM NADH.

Size-exclusion chromatography (SEC). Purified TcTIM and monoTcTIM were loaded into a Sephacryl S-200 column, previously calibrated with 20 mM Tris-HCl and 1.0 mM EDTA and pH 7.4. The column was calibrated using proteins of known molecular weight according to [5].

Dynamic light scattering (DLS). We used a Zetasizer DLS instrument (Nano Series, Malvern Instruments, USA). To obtain data, 50 μL samples of the protein being studied (900 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were loaded into a Hellma cuvette (Precision Cells, Quartz Suprasil); the particle size analysis tool of the device was used.

Equilibrium time determination for denaturation and renaturation of monoTcTIM. IF was used as a probe and changes at native λ_{max} (327 nm) after excitation at 280 nm were obtained. In the denaturation experiments, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of monoTcTIM were incubated with increasing concentrations of Gdn-HCl. For the renaturation experiments, monoTcTIM (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was first denaturated in 6.0 M Gdn-HCl for 1 h. The renaturation process was initiated by diluting the samples to a final protein concentration of 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the final denaturant concentrations were adjusted to the same concentration used in the denaturation experiments. The effect of the added (unfolding) or diluted (refolding) denaturant was kinetically monitored after excitation at 280 nm at the native λ_{max} for 2 min. Data was periodically collected from 0 to 72 h. No significant differences in the IF values were found after 24 h of incubation for both denaturation and renaturation reactions at each denaturant concentration. The changes in IF were monitored using a DM45 OLIS spectrofluorometer with the cell compartment at 25 °C.

Reversibility assays. MonoTcTIM (600 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was incubated at 25 °C for 24 h in 6.0 M Gdn-HCl to complete denaturation. Thereafter, simultaneous dilution of protein and denaturant was performed by adding buffer to reach 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.1 M final concentrations of monoTcTIM and Gdn-HCl, respectively. The samples were then incubated for 24 h to achieve refolding; following this, IF was determined. No differences were found in the emission spectra of the native and renaturated monoTcTIM using 280 or 295 nm excitation wavelengths in the range from 300–315 to 500–515 nm, respectively (data not shown), indicating complete reversibility of the unfolding and refolding reactions.

Circular dichroism analysis. Spectra were obtained by CD in the far-UV region (180–260 nm). All CD data was collected in a thermoregulated Jasco-720 spectropolarimeter. Molar ellipticity ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) was calculated as reported in [4]. The data was analyzed using the CDNN program in the 205–260 nm range.

Guanidinium hydrochloride unfolding experiments monitored by changes in IF and CD. In denaturation experiments, monoTcTIM (10, 50, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was incubated at equilibrium (24 h) in TED 20/1/1 (pH 7.4) at 25 °C. For renaturation assays, samples (600 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were first denaturated; following this, refolding started with the dilution of samples to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (final protein concentration) in a range between 0.0 and 6.0 M Gdn-HCl. Protein IF was measured with excitation wavelengths of 280 and 295 nm (4.0 nm bandwidth); the emissions was collected from 300–315 to 510–515 nm, respectively (4.0 nm bandwidth). Only the experiments after excitation wavelength at 280 nm are shown, although similar results were obtained after excitation at 295 nm. The spec-

tral center of mass (SCM) was calculated, as in [5]. The far-UV CD changes (180–260 nm) at 25 °C were monitored at 222 nm for monoTcTIM samples (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in TED 20/1/1, pH 7.4) using cells with a 0.1/cm path length. All the spectroscopic measurements reported here were obtained after eliminating the reference samples without protein.

ANS fluorescence intensity. Saturating ANS (100 μM final concentration) was added to each sample with or without protein. The excitation wavelength was 360 nm and the emission range was 400–560 nm. Reference spectra with ANS and without protein were subtracted for all conditions.

Crystal structure determination. MonoTcTIM was crystallized by the sitting drop method. One microliter of protein at 25 mg mL^{-1} was mixed with one microliter of the reservoir. Crystals were grown after one week at 9 °C and obtained with a reservoir solution of 100 mM HEPES, pH 7.5, 10% PEG 6000, and 5% MPD. The crystals were cryoprotected by adding PEG 400 (30%) to the reservoir and frozen in liquid nitrogen. Diffraction data was collected on the SER-CAT beamline at APS, Argonne, USA. The data were processed using MOSFLM [13] and reduced using SCALA [14]. The structure was solved using the molecular replacement method using the PHASER program [15] using the coordinates of TcTIM (PDB code 1TCD) as the search model. Refinement and model building were done using the Refmac5 and COOT programs [16,17]. Data collection and refinement statistics are found in Supplementary Table 2. Fig. 2B was generated with PyMOL (<http://www.pymol.org>). The structure has been deposited in the Protein Data Bank (code 2v5b).

Thermodynamic data analysis. Spectroscopic data was analyzed according to a two-state equilibrium model involving native (N) and unfolded (U) states: $\text{N} \rightleftharpoons \text{U}$. The unfolded fraction, F_{U} , was calculated with $F_{\text{U}} = (y_{\text{N}} - y_{\text{obs}})/(y_{\text{N}} - y_{\text{U}})$; where: y_{obs} is the experimentally determined parameter (IF or CD) and y_{N} and y_{U} are the characteristic parameter values of the folded and unfolded conformations, respectively. The values for y_{N} and y_{U} in the transition region were obtained by extrapolation of the linear portions of the pre- and post-transitional zones of the respective denaturation or renaturation curve [18]. The data were analyzed using the ORIGIN program (MA, USA). The ΔG between N and U conformations was obtained using: $\Delta G = -RT \ln K_{\text{eq}}$; where R is the universal gas constant, T is the absolute temperature and K_{eq} is the equilibrium constant. A least square analysis was used in order to adjust data to the equation: $\Delta G = \Delta G_{(\text{H}_2\text{O})} - m(\text{Gdn-HCl})$; where $\Delta G_{(\text{H}_2\text{O})}$ is the ΔG value in absence of denaturant and m reflects the variation of ΔG with respect to the denaturant concentration.

Results and discussion

The design and properties of a monomeric TIM from T. cruzi (monoTcTIM)

In order to be able to compare the equivalent mutation effects in a highly homologous enzyme, the TcTIM gene was mutated at the interfacial loop 3 region (Supplementary Fig. 1); we designed mutations in TcTIM equivalent to those in TbTIM [7] in order to produce a monomeric mutant and analyze the differences in the properties of isolated subunits.

Given that several monomeric TIM mutants in solution exist in equilibrium between monomers and dimers [19,20], the monomeric nature of monoTcTIM was confirmed. SEC experiments were performed for TcTIM and monoTcTIM (Fig. 1A), and the calculation of the Stokes radii of monoTcTIM was obtained (Supplementary Table 1), confirming its monomeric nature.

The following observations indicate that the transition between folded and unfolded monoTcTIM is a unimolecular process: (1) coincidence in the unfolding patterns followed by changes in ter-

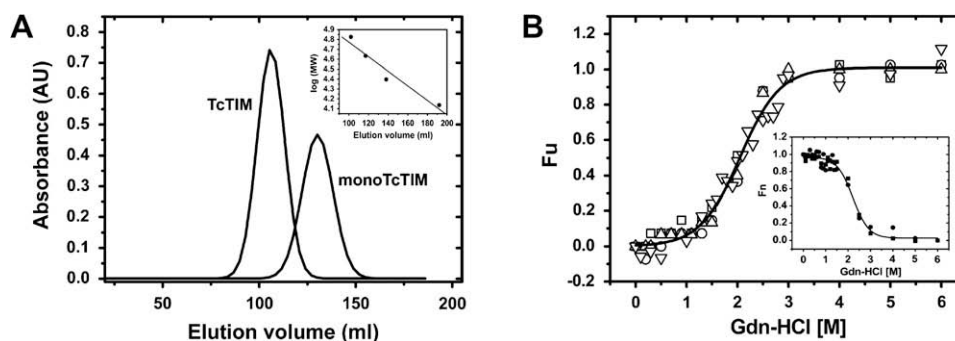


Fig. 1. The monomeric nature of monoTcTIM. (A) Elution profiles. In separate experiments, TcTIM and monoTcTIM (200 μL at 1.2 mg mL^{-1}) were loaded onto a Sephacryl S-200 column. The inset shows the retention volume of the MW standards. (B) Changes in tertiary and secondary structure. Maximum wavelength (λ_{max}) at increasing concentrations: 10(\square), 50(\circ), and 100(Δ) $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the mean residue ellipticity values at 222 nm (∇ , 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were obtained. Inset: unfolding (\blacksquare) and refolding (\bullet) IF patterns after equilibrium (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The lines correspond to the best fit of the data available for the model described in the Materials and methods section.

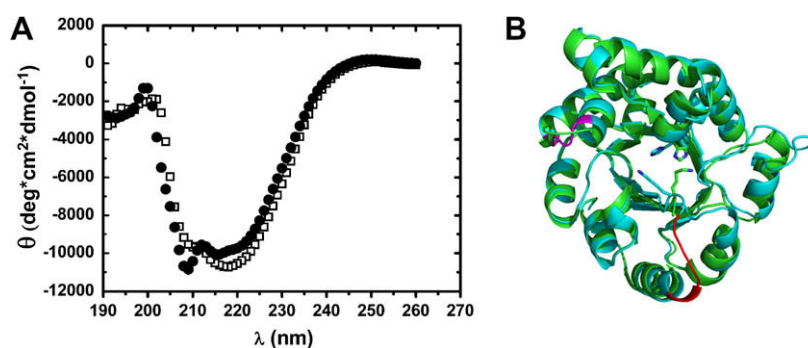


Fig. 2. MonoTcTIM has a native-like structure. (A) CD spectra of TcTIM (\square) and monoTcTIM (\bullet), 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each protein was analyzed. (B) Model superposition of the crystal structure of monoTcTIM (green, PDB code 2v5b) with the apo structure of a monomer of TcTIM (cyan, PDB code 1tcd). The catalytic residues Lys 13 and His 96 are shown in sticks. Loop 6 and loop 1 of TcTIM are shown in magenta and red, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

tiary and secondary structure (Fig. 1B): (2) both denaturation and renaturation experiments show monophasic behavior (inset Fig. 1B); and (3) no shift in $C_{1/2}$ was observed with increasing protein concentration (10–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 1B and Table 1).

Moreover, the catalytic activity of monoTcTIM remains unaltered ($\sim 0.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) using a wide range of protein concentrations (0–40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Supplementary Fig. 2), indicating that no changes occur during the oligomeric state of monoTcTIM, in contrast with other monomeric TIM mutants [19,20].

Stability of monoTcTIM

The energy of the unfolding/refolding reactions of monoTcTIM was evaluated using the two-state model described in the Materials and methods section. The results are shown in Table 1. The ΔG values for unfolding and refolding of monoTcTIM were almost the same, indicating that equilibrium was reached in both directions (Table 1). The ΔG value obtained for the unfolding of monoTcTIM

is 30% lower than that presented by the monomeric intermediate in the TcTIM unfolding pattern [5]; this value is similar to those reported for other monomeric TIM mutants and only represents between 10% and 15% of the total wild-type enzyme value.

One observation from TIM monomerization studies is that some hydrophobic native interactions are lost when the oligomer is disrupted [7,21]. Evidence of this was obtained using ANS. The binding of this dye to predominantly hydrophobic areas of the protein is accompanied by a large increase in its fluorescence quantum yield [22]. TcTIM was used as a control and about a fivefold increase in intrinsic fluorescence for monoTcTIM was obtained (Supplementary Table 1). The significant exposure of the non polar surface could be related to the low stability of monoTcTIM (Table 1).

Structure of monoTcTIM

TcTIM exhibits the characteristic CD spectrum of a $(\beta/\alpha)_8$ protein, with two minima centered at 208 and 218 nm, respectively (\square , Fig. 2, see also [6]). At the same protein concentration, the CD spectrum for monoTcTIM is similar to that obtained for TcTIM; however, a shoulder around 210 nm is obtained, indicating some alterations in the secondary structure (\bullet , Fig. 2). Even so, the calculated secondary structure content is very similar for both proteins (Supplementary Table 1), indicating that the main features of the TIM secondary structure are preserved after the mutations. Regarding tertiary structure, the wild-type and the monomeric proteins were analyzed by fluorescence intensity experiments. Minor differences were observed between both proteins in the λ_{max} and the SCM; however, a significant change in the fluorescence

Table 1
Stability of monoTcTIM.

Fitted data	Process	ΔG° (kJ mol $^{-1}$)	$C_{1/2}$ (M)
$F_{\text{I}_{\text{max}}}$ 280 nm/CD $_{222}$	Unfolding	13.45 (6.4)	2.1
$F_{\text{I}_{\text{max}}}$ 280 nm	Refolding	13.11 (5.9)	2.2
Mean		13.28 ± 0.2	2.15 ± 0.01

Fitting of experimental data to the model described in the Materials and methods section. For unfolding, the parameters were obtained from the simultaneous fitting of data from Fig. 1B; for refolding, the data correspond to inset Fig. 1B. $F_{\text{I}_{\text{max}}}$, maximal fluorescence intensity. m Values are in parentheses. $C_{1/2} = \Delta G^\circ_{\text{H}_{2\text{O}}}/m$.

intensity was found for monoTcTIM at both wavelengths of excitation (Supplementary Table 1); one of the reasons for this could be due to some alterations in the tertiary structure of the TIM barrel produced after monomerization.

To gain further insight into the structural properties of monoTcTIM, its three dimensional structure was determined by means of X-ray crystallography. The low alpha-carbon RMSD value (0.88 Å) indicated no significant changes in the main chain of the monomeric enzyme when compared with TcTIM (PDB code 1TCD, Fig. 2B). Likewise, no differences in the general structure of the main chain were detected between monoTIM from *T. brucei* (PDB code 1TRI) and monoTcTIM (alpha-carbon RMSD 1.3 Å). However, in the monomer present on the asymmetric unit in the crystal (Fig. 2B), residues 16–21, corresponding to loop 1, are not seen on the electron density map and residues 170–177, corresponding to the catalytic loop 6, are less visible on the same map. Also, the catalytic His 96 and Lys 13 residues are in a different, non catalytic position compared to that occupied by the same residues in the wild-type enzyme (Fig. 2B, Supplementary Fig. 3). Thus, although the overall architecture of the protein is well-preserved, the presence of small but important changes indicates that the monomeric enzyme is unable to perform optimal catalysis.

For all the parameters described above, the known properties of monoTbTIM are fairly similar to those reported here for monoTcTIM i.e., the magnitude of the ΔG of unfolding, the Stokes radii and the general properties of the X-ray crystal structure [23]. Overall, our results show that the enzymatic activity presented by monoTcTIM (see below) is only due to a monomeric species of the molecule.

Differential activity of monoTcTIM and monoTbTIM

Although the catalytic activity of TcTIM and TbTIM native dimers is approximately the same, monoTcTIM presents a K_{cat} ten times higher than that observed for monoTIM from TbTIM (Table 2). Regarding substrate affinity (K_m), in monoTcTIM, this parameter is twice the value reported for monoTbTIM; however, the V_{max} of monoTcTIM is 83 times higher than that observed in monoTbTIM, indicating that equivalent mutations produce a more efficient monomeric protein in TcTIM, although with less affinity than the same protein from TbTIM.

It is difficult to predict the precise location of the monomer catalytic differences. A clue could be given by the presence of Pro44, a residue located in the loop 2 of TcTIM (Supplementary Fig. 1). It has been suggested that a mutation of serine for proline at this position, could enhance the catalytic activity after monomerization [21]. The results obtained for monoTcTIM agree with those stated above, because the mutant RMMO-1 [21] that contains the Pro44 residue in the primary sequence shows a significant increase in K_{cat} compared to monoTbTIM, which lacks this residue (Table 2).

Table 2
Catalytic activity of monoTcTIM.

Protein	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	References
TbTIM	0.45 ^a	9300 ^b	6166.66 ^a	a: [23] b: [25]
monoTIM	5.3	0.007	5.2	[7]
	4.1	Nr	5.16	[26]
monoTIM-SS	6.1	Nr	7.83	[27]
RMMO-1	1.19	Nr	58	[21]
RE-TIM	17.2	Nr	0.46	[27]
TcTIM	0.66 ^c	9670 ^c	4333.33 ^d	c: [1] d: [28]
	0.9 ^e	7498 ^e		e: [11]
monoTcTIM	11.2 ± 2.6	0.58 ± 0.09	52.7	This work

Kinetic parameters for some TIMs and monomeric mutants. nr, not reported.

The differences in the catalytic activity of two highly similar proteins indicate the great interdependency acquired by the biological dimer. Any changes at the sequence level are communicated between the monomers to develop the most efficient possible enzyme. In this sense, it is noteworthy that, for all the studied TIMs from several organisms, their catalytic activity remains the same despite their sequence differences [1,24]. This study shows that the catalytic properties of isolated enzymatic TIM subunits do differ, thus providing another tool for the study of the mechanisms of catalysis, protein stability and dimeric nature of this enzyme.

Acknowledgments

We thank the Laboratorio de Físicoquímica y Diseño de Proteínas, Facultad de Medicina, UNAM and A. Gómez-Puyou and M. Tuena, IFC, UNAM, for making their laboratories available to us. Data was collected in SER-CAT 22-ID beamline at the APS, Argonne, IL, USA. We thank B. Aguirre for her technical help. This work was supported by Grants 40524M, 60127Q, 46168M, 47310106 and 41328Q from CONACyT; IN217206 and IN200507 from PAPIIT-UNAM and UAM (agreements 11 y 13/07 of the General Rector). The first author was the recipient of a CONACyT PhD fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.085.

References

- [1] G. Garza-Ramos, N. Cabrera, E. Saavedra-Lira, M. Tuena de Gómez-Puyou, P. Ostoa-Saloma, R. Pérez-Montfort, A. Gómez-Puyou, Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity—triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*, Eur. J. Biochem. 253 (1998) 684–691.
- [2] R. Pérez-Montfort, G. Garza-Ramos, G.H. Alcántara, H. Reyes-Vivas, X.G. Gao, E. Maldonado, M.T. de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface, Biochemistry 38 (1999) 4114–4120.
- [3] H. Reyes-Vivas, E. Martínez-Martínez, G. Mendoza-Hernández, G. López-Velázquez, R. Pérez-Montfort, M. Tuena de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer, Proteins 48 (2002) 580–590.
- [4] M.E. Cháñez-Cárdenas, D.A. Fernández-Velasco, E. Vázquez-Contreras, R. Coria, G. Saab-Rincón, R. Pérez Montfort, Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants, Arch. Biochem. Biophys. 399 (2002) 117–129.
- [5] M.E. Cháñez-Cárdenas, G. Pérez-Hernández, B.G. Sánchez-Rebollar, M. Costas, E. Vázquez-Contreras, The reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* involves stable dimeric and monomeric intermediates, Biochemistry 44 (2005) 10883–10892.
- [6] V. Zomosa-Signoret, G. Hernandez-Alcantara, H. Reyes-Vivas, E. Martinez-Martinez, G. Garza-Ramos, R. Perez-Montfort, M. Tuena De Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers, Biochemistry 42 (2003) 3311–3318.
- [7] A. Borchert, R. Jaenicke, R.K. Wierenga, Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase, Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994) 1515–1518.
- [8] F.W. Studier, B.A. Moffatt, Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 189 (1986) 113–130.
- [9] R. Híguchi, B. Krummel, R.K. Saiki, A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, Nucleic Acids Res. 16 (1988) 7351–7367.
- [10] N. Thanki, J.Ph. Zeelen, M. Mathieu, R. Jaenicke, R.A. Abagyan, R.K. Wierenga, W. Schliebs, Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): the modelling and structure verification of a seven residue loop, Protein Eng. 10 (1997) 159–167.
- [11] P. Ostoa-Saloma, G. Garza-Ramos, J. Ramírez, I. Becker, I. Berzunza, A. Landa, A. Gómez-Puyou, M. Tuena de Gómez-Puyou, R. Pérez-Montfort, Cloning,

- expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*, Eur. J. Biochem. 244 (1997) 700–705.
- [12] E.E. Rozacky, T.H. Sawyer, R.A. Barton, R.W. Gracy, Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes, Arch. Biochem. Biophys. 146 (1971) 312–320.
- [13] A.G.W. Leslie, Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsl. Protein Crystallogr. (1992).
- [14] Collaborative-Computational-Project-4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, Acta Crystallogr. D 50 (1994) 760–763.
- [15] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, J. Appl. Cryst. 40 (2007) 658–674.
- [16] N.J. Pannu, G.N. Murshudov, E.J. Dodson, R.J. Read, Incorporation of prior phase information strengthen maximum-likelihood structure refinement, Acta Crystallogr. D 54 (1998) 1285–1294.
- [17] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60 (Pt. 12, 1) (2004) 2126–2132.
- [18] C.N. Pace, Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, Methods Enzymol. 131 (1986) 266–280.
- [19] K. Maithal, G. Ravindra, G. Nagaraj, S.K. Singh, H. Balaram, P. Balaram, Subunit interface mutation disrupting an aromatic cluster in *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: effect on dimer stability, Protein Eng. 15 (2002) 575–584.
- [20] V. Mainfroid, P. Terpstra, M. Beauregard, J.M. Frère, S.C. Mande, W.G.J. Hol, J.A. Martial, K. Goraj, Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer, J. Mol. Biol. 257 (1996) 441–456.
- [21] G. Saab-Rincón, V. Rivelino-Juárez, J. Osuna, F. Sánchez, J. Soberón, Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution, Protein Eng. 14 (2001) 149–155.
- [22] C.G. Rosen, G. Weber, Dimer formation from 1-amino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties, Biochemistry 8 (1969) 3915–3920.
- [23] T.V. Borchert, K. Pratt, J.P. Zeelen, M. Callens, M.E. Noble, F.R. Opperdoes, P.A. Michels, R.K. Wierenga, Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant, Eur. J. Biochem. 211 (1993) 703–710.
- [24] A.M. Lambeir, J. Backmann, J. Ruiz-Sanz, V. Filimonov, J.E. Nielsen, I. Kursula, B.V. Norledge, R.K. Wierenga, The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 2516–2524.
- [25] A.M. Lambeir, F.R. Opperdoes, R.K. Wierenga, Kinetic properties of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*. A comparison with the rabbit muscle and yeast enzymes, Eur. J. Biochem. 168 (1987) 69–74.
- [26] W. Schliebs, N. Thanki, R. Jaenicke, R.K. Wierenga, A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability, Biochemistry 36 (1997) 9655–9662.
- [27] W. Schliebs, N. Thanki, R. Erijta, R.K. Wierenga, Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies, Protein Sci. 5 (1996) 229–239.
- [28] H. Reyes-Vivas, G. Hernandez-Alcantara, G. Lopez-Velazquez, N. Cabrera, R. Perez-Montfort, M.T. de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, Biochemistry 40 (2001) 3134–3140.

The Oligomeric Nature of Triosephosphate Isomerase. Studies of Monomerization

Francisco Zárate-Pérez and Edgar Vázquez-Contreras.

*Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México,
Circuito Exterior, México, DF 04510, México.*

Corresponding autor: E-mail: vazquezc@servidor.unam.mx

Abstract. In this work, we report the implications of the monomerization of triosephosphate isomerase (TIM) from *T. cruzi* (TcTIM). A monomeric mutant (monoTcTIM) of this species was constructed by genetic engineering, shortening the main loop of interdigitation, which is fundamental for its dimerization. The properties of monoTcTIM were compared with those of the other TIM monomeric versions, specifically genetically engineered mutants, or equilibrium intermediates obtained by chemical denaturation. The stability for almost all the monomeric mutants so far reported appears in the same range, and also presents similar structural characteristics. Regarding the catalytic activity of monomeric mutants, when it is present is in several orders of magnitude lower than those observed in their respective wild-type enzyme.

The change in the hydrophobic surface of TcTIM after and before monomerization was also studied and corresponds to an extensive area of the interface region, which becomes exposed when monomers are dissociated. This fact could be related with conformational changes in the local environment of the catalytic amino acids responsible for the isomerization of the substrate and consequently the inactivation of its catalytic properties. Comparison of the structural, folding and unfolding properties, as well as stability studies could give answers on why this enzyme is an obligate oligomer.

Keywords: **triosephosphate isomerase; unfolding; monomeric mutant; monomeric intermediate; monomerization**

INTRODUCTION

Almost ten percent of the most efficient enzymes in nature belong to the superfamily of triosephosphate isomerase (TPI or TIM) barrel proteins (1, 2). TIM barrel enzymes catalyze a variety of reactions, although almost all of them are related to key metabolic pathways. Because of its abundance, the TIM barrel fold is of great interest for protein design as well as for protein evolution research. An extensive literature on the structure and evolutionary relationships of this class of proteins is now available. Regarding protein folding studies with homologous proteins, it is known since the early reports that the folding pattern is conserved through evolution; however, in the literature different folding pathways for homologous proteins with the same denaturant condition have been reported. In this context, TIM is one of the most

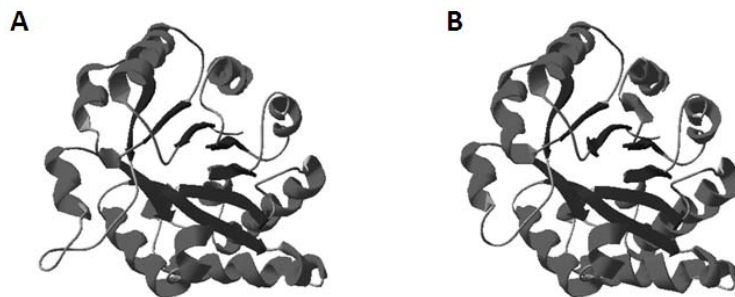
studied proteins (3). The oligomeric nature of TIM has been analyzed on enzymes mainly from mesophile organisms, where it is always a homodimeric protein and being the simplest model of oligomerization. Also TIM studies have been generated a great interest because the attempts to understand why this protein must have a quaternary structure to be catalytically competent, if the catalytic residues are self-contained in the individual monomers. Notwithstanding, monomeric TIM barrels carrying different catalytic activities do exist in nature. The main function of TIM is to ensure the net production of ATP in the conversion of glucose to pyruvate, and hence, it is essential for maintaining life under anaerobic conditions. These facts make of TIM a target for drug design against human anaerobic parasites (4, 5). Comparison of amino acid sequence of TIM illustrates their high degree of evolutionary conservation throughout evolution; for example, the sequence around the active site residue (the glutamic acid 168) is totally conserved. The crystallographic structures of wild-type TIMs and engineered mutants have been determined for some species comprising from *Archaea* (6, 7) and *Bacteria* (8-11) to *Eukarya* (12-21). Each TIM subunit has ~250 amino acid residues with a molecular mass close to 27 kDa and folds into a $(\beta/\alpha)_8$ scaffold denominated "TIM barrel" (22). The loops at the carboxyl termini of the barrel contain forms the interface and the active site residues are self-contained in each monomer (23).

TIM barrel structure. The common TIM barrel scaffold contains eight parallel β strands which are hydrogen bonded to each other forming a barrel-like structure in the core of the protein; this barrel is surrounded by a shield of eight α helices connected to the preceding strands by loop regions of varying length. The α helices cover the β strands such that the hydrophobic face is towards the β sheet and the hydrophilic region interacts with solvent. On the other hand, $\beta\alpha$ loops (the loops connecting a β strand to the following α helix) tend to be longer than the $\alpha\beta$ loops. TIM structure has two protruding loops from the globular structure: the dimer interdigitation loop 3 and the substrate binding loop 6. Most TIMs are homodimers whose quaternary structure is forming when the C-terminal loops (loop 3) of every subunit gets buried inside the adjacent monomer during folding (Figure 1a). Two exceptions are the tetrameric TIMs from the thermophilic bacteria *T. maritima* and *P. woesei*, (7, 8).

Folding and stability. All known wild-type TIMs are oligomers. When the enzyme is genetically engineered in order to monomerize it, the catalytic activity is severely diminished. To date, the reason for which wild-type TIMs form at least dimers to be catalytically competent is unknown. It has been postulated that the dimerization would give either the gain in stability upon subunit assembly (24) or that dimerization is necessary for the correct spatial conformation of the active-site pocket (25). In a comparative analysis on the thermostability properties of the enzyme performed by Maes *et al.*, (8) with ten different TIM structures including two thermophilic (*T. maritima* and *Bacillus stearothermophilus*) and one psychrophilic (*Vibrio marinus*), it was found that in both thermophilic and psychrophilic TIMs, an increased amount of salt bridges are present. On the other hand, in the thermophilic enzymes, more

hydrophobic surface was found to be buried during folding compared with the other TIMs.

Figure 1. Secondary and tertiary structure of TcTIM and the monomeric mutant from TcTIM. A) Viewing along the barrel axis. The protruding interdigitation loop 3 is visible at the left bottom of the Figure. B) Modelling of the monoTcTIM using the Swiss Model program (<http://swissmodel.expasy.org>), where the shortened loop 3 can be observed. (PDB entry 1TCD) (18)



The dimer interface. In TIM, the dimer interface is formed mainly by loops 1-4. Loop 3 protrudes from the monomer and extends into a deep pocket formed by loops 1, 2, and 4 of the adjacent subunit interacting with Lys13 and Glu97 through van der Waals contacts and Hydrogen bonds. For example, a Hydrogen bond is formed between Thr75 in loop 3 and the carboxylate group of Glu97 (26). Two of the active-site residues come from loops 1 and 4 (Lys13 and His95), and the active site is actually located at the dimer interface, although all the residues that directly interact with the substrate molecule come from the same subunit. The interactions between loop 3 and loops 1 and 4 from every subunit influence the final positioning of active-site residues from loops 1 and 4, respectively. In the dimer interface of *L. mexicana* TIM, a Gln residue present in all other TIMs (27) is replaced by a Glu. In despite of this primary sequence variation, the *L. mexicana* TIM is as stable as the others. Thus, other interactions must be present in the protein to compensate the introduction of an ionizable group (Glu) in the buried interface. Mutating this Glu for Gln (the E65Q mutant) originates a superstable enzyme with similar catalytic properties to those observed in the wild-type enzyme (27). The T_m of this variant is almost 30 °C higher than the obtained for the wild-type protein.

Protein engineering studies on triosephosphate isomerase. Monomeric TIM variants, in which some regions of the enzyme mainly at the interface were mutated in order to obtain genetic engineering monomeric proteins, have been reported. With these protocols, monomeric variants of TIM have been developed and some of them

retain activity while others are inactive. The activity observed for these monomeric mutants, is always many orders of magnitude lower than those observed for the wild-type enzyme. The first genetic engineering monomerization studies of TIM were performed in the enzyme from *T. brucei* (TbTIM) (28). The fifteen hydrophobic residues of the loop 3 have been changed by 8 more hydrophilic ones. The monomeric variant, named MonoTIM, is soluble and stable, although exhibits only about one thousandth of the catalytic activity observed in the dimeric wild-type enzyme (26). Crystallographic studies of these monomeric TIM mutants show that the positions of loops 1 and 4 are severely affected by the shortening of loop 3. The Loop 1 which contains the catalytic residue lysine after mutation, becomes so disordered that it is impossible observe it in the electron density maps.

In order to obtain another monomer from TbTIM, Schliebs and co-workers (25) performed two point mutations on the tip of loop 3 of TbTIM, and the resulting activity of this variant was as low as that observed in the original MonoTIM. Monomeric variants of human TIM have also been produced after performing point mutations (24, 29). The TIM of *P. falciparum* was also monomerized (30). Combining modeling with mutagenesis and crystallography studies, variants of MonoTIM have been designed. In one of these studies, the phosphate-binding loop 8 has been shortened, in order to make the active-site pocket wider and capable of binding substrates other than DHAP and DGAP (33), the resulting protein is stable although inactive. However the crystal structure showed a well-defined conformation of the new loop 8 and a binding widened pocket. Another approach has been followed by Saab-Rincón *et al.* (34) using directed evolution trying to improve the catalytic activity of MonoTIM. It seems that the loss of activity in the monomeric variants is largely due to increased flexibility of the active-site loops, as the stabilizing interactions with the other subunit have been lost. Replacing these intersubunit interactions with intrasubunit ones might lead to recovery of activity. The randomizing strategy was applied to the whole gene sequence in general and also in loop 2; the resulting mutants (A43P and T44A/S) presents an 11-fold increase in k_{cat} when is comparing with the wild-type enzyme.

Considering the newest attempts to know more about of the reasons for the obligated dimeric nature of TIM, we depict some characteristics of a monomeric mutant for TcTIM performed by genetic engineering. This monomeric TIM mutant was thermodynamically characterized in their unfolding and refolding reactions. Their structure-stability-function relationships were compared with the monomeric versions of TIM monomer available to date. The relevance of these results is also discussed in order to understand the folding and evolution process in homologous proteins.

Folding and unfolding Studies. Denaturation studies on TIM have been performed widely. Unfolding patterns of the wild-type TIM from different species have been studied using physical and chemical denaturants, namely urea, Gdn-HCl, temperature and pressure. Sometimes the denaturing processes are reversible, while in others, unspecific aggregation appears (irreversibility). The most simple unfolding model is described by a two-state transition for some species (24, 35-38), while in others more complex models, including intermediates, have been observed (3, 32, 39-43). These

intermediates are responsible for the aggregation and irreversibility observed during folding experiments *in vitro*. The intermediates reported in the folding pathway of TbTIM and TcTIM show two states of oligomerization: a dimeric intermediate, which is catalytically competent and less frequently found than the other state, a monomeric intermediate, always inactive (3, 32). Notwithstanding that both enzymes share the same folding pathway induced by Gdn-HCl, TbTIM is irreversible (32) while TcTIM is fully reversible (3).

Design and Expression of a new monomeric TIM: MonoTcTIM. It was previously reported, that the equilibrium unfolding in Gdn-HCl of TcTIM is highly reversible (3) in contrast of what occurs in their very close relative TbTIM (32). Based on this information and in many other differences reported for these enzymes (4, 18, 44-57), it was designed, constructed, purified and characterized a monomeric variety of TcTIM. This protein was constructed following the observations reported for the monoTIM in TbTIM (28). The followed strategy was performed taking into account some other considerations as: 1.- the superposition of the intersubunit contacts of the interface which shows an RMS difference of 0.38 Å for 66 equivalent atoms in ten residues of loop 3 (18). 2.- the different arrangement of the interface Cys from a monomer with the residues of loop 3 of the other monomer would not seem to account for the marked difference in sensitivity of TcTIM and TbTIM to sulfhydryl reagents (46); and 3.- it was reported the generation of heterodimers between these both enzymes after denaturation (57). Considering that TcTIM and TbTIM are very similar at the interface level both in primary sequence and in three-dimensional levels, a genetic construction for a monomeric variant of TcTIM was designed in order to know the structural and catalytic properties of the isolated subunit of this enzyme. Ten equivalent mutations were performed in TcTIM as in the previously reported monomer from TbTIM. The designed protein is identical in sequence to the wild-type TcTIM enzyme except for the loop 3, which is seven residues shorter and has seven substitutions: I69G, G77N, E78A, V79D, S80A, Q82A and I83S. After sequencing, the construction was cloned into an expression plasmid and *E. coli* cells were transformed with the vector and selected by antibiotic resistance. The obtained colonies were grown in liquid medium in order to over-express monoTcTIM. The protein was purified following the procedure reported for the wild-type enzyme (48). The resulting protein was named “monoTcTIM” (figure 1b), and is a stable monomeric mutant of TcTIM; this variant exhibits significant secondary and tertiary structure, that are very similar respecting the wild-type enzyme as was observed by means of spectroscopic evaluations (Circular Dichroism and intrinsic fluorescence assays) (Table 1). Additional analyses in order to know the molecular weight of monoTcTIM were performed and showed a molecular weight of 27 kD; with this data the calculated Stokes Radii of the protein were obtained: 22.2 and 20.3 Å, for Size Exclusion Chromatography (SEC) and Dynamic Light Scattering (DLS) determinations respectively. On the other hand, the calculated stability for this enzyme (ΔG) was 13 kJmol⁻¹.

Table 1. Structural characteristics of monoTcTIM. Similarities between monoTcTIM and wild-type enzyme are shown. The percentages for every structural

level were obtained from Circular Dichroism and Intrinsic Fluorescence experiments. The molecular weight was obtained by DLS, MALDI-TOF and SEC experiments.

<i>Protein</i>	<i>Molecular Weight</i>	<i>Secondary structure</i>	<i>Tertiary Structure</i>	<i>Reference</i>
TcTIM	27 kD (each monomer)	100	100	(3)
monoTcTIM	26.4 kD	99.6	99	This work

The obtained MonoTcTIM showed similar characteristics in its molecular weight (MW), Stokes radii (Sr) and stability (ΔG) when comparisons with other monomeric variants previously reported in the literature are made. Nevertheless a change in stability can be observed when monoTcTIM is compared with the monomeric intermediate obtained in the equilibrium unfolding pathway of the wild-type enzyme. This difference in stability between the equilibrium intermediate (17.8 kJmol^{-1}) (3) and the monomeric mutant (13.0 kJmol^{-1}) can be attributable in some extent, to the method used to calculate the ΔG ; the obtained value for the equilibrium intermediate could be overestimated because the four state process described by the pathway, while in the monomeric mutant the ΔG is consider being more accurate because is described by a two state process. Notwithstanding the aforementioned observations, all of the values obtained in monomeric TIM variants reported so far, shows a well defined range of similar ΔG values (3, 24, 29, 35, 38, 41).

Regarding the size of the monomeric variants expressed as Stokes radii (Sr), two species are observed namely compact and expanded conformers,. In γ TIM where only one equilibrium intermediate has been reported (41), the conformer presents almost the same size of the native homodimer i.e., it is considerably more expanded, respecting the size of the wild-type subunit in the oligomer. On the other hand, in TIM from human and tripanosomatids, the size for the isolated monomer is compact, independently of their genetic engineering or equilibrium intermediate origin; in fact it is very close to the magnitude presented for the monomer in the wild-type dimer (3, 24, 29, 32, 38). Even though the general structure and the absence of catalysis are common to the monomeric intermediates from different TIM species, their size is observed in a similar range.

In the early studies of acquisition of three-dimensional structure in proteins it was concluded that the folding pattern will be conserved in homologous proteins, and as discussed before (3) this supposition is not true at all, as there are examples of homologous proteins in which the folding pattern differs, being TIM the most widely studied. The reasons for the selection of TIM from different species to perform folding studies resides in characteristics such as their elevate catalysis, reason why this protein has been named a “perfect catalyst” (1), the abundance on nature of this scaffold (1, 2), and because its oligomeric nature, TIM presents a quaternary structure in despite of the presence of the catalytic residues in the individual monomer. In the origins of

stability studies of this enzyme, it was believed that the low stability of the subunits was the main reason for the obligate oligomeric nature of TIM (24, 29). In this sense, the stability of monoTcTIM is now available and the ΔG unfolding of the monomeric intermediate in the wild-type enzyme is the highest reported to date (3).

Structural and catalytical properties of the TIM monomer. The most common procedure to monomerize TIM is performing mutations on loop3. The first protocol showed that mutations of the interface loop 3 (28) originates stable monomeric units. It has been also reported other changes including: deletions (33, 58), substitutions (24, 29, 25, 30, 38, 59) and combinations of these alterations (34, 53). The change in polarity (25, 30, 38) and in size of the side chains of residues composing the interface (25, 30, 53) were also explored; even though it was found that point mutations produce monomeric proteins (25, 30, 53, 59). In some cases, the monomeric nature of some of these species depends on protein concentrations and exists in equilibrium toward dimerization (34, 59). As was aforementioned, some of these engineered proteins show catalytic activity (26, 30, 34, 53, 58, 59) and others are inactive (24, 29, 33, 38). Some of them have been crystallized and x ray diffracted (33, 38, 58, 60). The position of the mutations in many cases was performed at interface level. The interface in the dimeric wild-type enzyme is mainly composed by loop 3. These interface component interdigitates into the pocket of the active site of the other subunit, interacting with residues of loop 1 and 4. The insertion of loop 3 pulls loop 1 from the other subunit into the active site cavity; in TbTIM was also reported that this introduction forms a salt bridge between residues Lys13 and Glu97 (26). The formation of this bond pulls loop 4 in such a way that His95 is positioned in the correct three-dimensional position to perform catalysis. The arrangement of active site in TcTIM is nearly identical with those of human TIM and TbTIM, for example the RMS differences between the catalytic residues Lys14, His96 and Glu168 in the closed monomers of TcTIM and TbTIM were 0.4, 0.2 and 1.2 Å, respectively. In the open conformation, the corresponding values were 0.3, 0.1 and 1.0 Å (18). Observations in the monomeric engineered TIMs shown that in general no dependence exists with the region mutated at the interface and the resulting high degree of the three-dimensional structure conserved in the proteins. In the case of monoTcTIM it conserves structure at secondary and tertiary levels as has been described in the literature for others interface mutants. However, this elevated amount of general structure is not enough to produce catalysis. On the other hand, when catalysis is found in some monomeric mutants, it is only in amounts considerably lower to those observed in the wild-type enzyme (26, 30, 34, 53, 58, 59). Then, although the mutation in different sites of the interface produces monomeric TIM barrels, the finest arrangement to perform the perfect catalytic site is not obtained after folding, at least with the regions and substitutions explored up to now.

Another procedure to obtain monomeric varieties of TIM has been explored; it consists in incubating the native homodimer in chemical denaturants. The first report on this monomeric intermediate was obtained at the equilibrium denaturation of γ TIM in Gdn-HCl. This conformer appears at mild denaturant concentrations (41, 42, 43). The presence of this intermediate was also observed in the partial denaturation with the same denaturant of TbTIM (32) and in TcTIM (3) (Table 2). The main difference

between these enzymes is that in TbTIM, its monomeric intermediate tends to aggregation, turning the unfolding irreversible and difficult to know its stability. On the other hand, in TcTIM the folding pathway is highly reversible, even with the presence of two intermediates (monomeric and dimeric). The monomeric intermediate of TcTIM has a considerable amount of secondary and tertiary structures (3). As observed in some monomeric mutants, this intermediate is inactive and although a method designed to quantify activity in the presence of denaturant was developed (3, 32), no evidence of activity was found. In order to evaluate if monoTcTIM presents any catalytic activity, a coupled assay enzyme tracking NADH oxidation was used (61). As much as 100 ng mL^{-1} of monoTcTIM as final protein concentration was used in the assay and no catalytic activity was detected. This result suggests that no matter the high equivalence in sequence and three-dimensional arrangement in the two homologous TIMs (TcTIM and TbTIM); it was not possible to obtain catalysis in monoTcTIM performing the same mutations that produce monoTIM from TbTIM. Although the final spatial conformation of the active site in TIM is could be totally conserved through evolution, the construction of their vicinity is delicate, although flexible, since mutating in different sites in the wild-type interface, produces both monomeric inactive and active mutants.

It has been discussed that the low stability of TIM monomers is neither the only, but not the main, cause of their dimeric nature and that there is an interaction between stability and function implying the appearance of a high ΔG_{assoc} to perform catalysis. It is likely that there is not evolutionary pressure that favors the appearance of stable TIM monomers (43). Although there is a short range for the stability of the monomer, its amount, independently of their genetic engineering or intermediate origin, is always around the fifth part of the total ΔG , and may be for this reason it has not been possible to construct a monomeric variant of triosephosphate isomerase with enough activity levels as those observed in the respective wild-type enzyme. In fact, in the TIM of the hyperthermophilic Archaeas *Pyrococcus woesei* and *Methanothermus fervidus* (62), the quaternary structure is represented by a homotetramer, and then through evolution it was primordial to conserve the oligomeric state of TIM. The reason for the low stability of the monomers is possible due to their null possibility to perform enough catalysis. In addition, the monomeric species preceding the oligomer formation must exist for a short time in the cell; the synthesis on TIM is constant and encounters between monomers to oligomerize are common. Thus, it is possible that nature would prefer maintain the recently formed monomeric intermediate inactive and unstable because the resulting dimerization enhance activity in several orders of magnitude. On the other hand, efforts to obtain monomeric genetic engineering variants of TIM also produce unstable monomers and when are compared with the oligomer, they present very low or none catalytic activity. These engineered proteins conserve the amount of stability presented in the inactive although highly structured monomeric intermediates produced by partial denaturation. Then, there are a consensus which to obtain a monomeric TIM catalytically competent, as in the levels observed in the wild-type enzyme is maybe required to increase the stability of the monomer, as has been suggested before (34).

ANS binding. One emerging observation from monomerizing TIM studies is that many hydrophobic wild-type interactions should be lost by the impossibility of oligomerization. Then, the monomeric variants, independently of their equilibrium unfolding or genetic engineering origin must expose wide interface hydrophobic areas to the solvent. Evidence of this hypothesis was confirmed by the use of ANS. Binding of ANS to predominantly hydrophobic areas of the protein are accompanied by a large increase in its fluorescence quantum yield (63-66).

The monomeric engineered versions as well as the equilibrium monomers on the unfolded pathways of TIM, binds ANS (3, 32, 41, 43). Dissociation of the TIM monomers originates an exposition to the solvent of all the interface hydrophobic amino acids which originates the increase in fluorescence signal when it is exposed to the dye. The last observation suggests the formation of the monomers for either the monomeric mutant (41, 42) or the equilibrium intermediate during the specific unfolding conditions utilized in each case. Concerning the monoTcTIM, a similar increment in fluorescence by ANS was also found as observed in the equilibrium intermediate previously reported (3) (Table 2).

Table 2. ANS Fluorescence intensities of the monomeric forms of TcTIM. Extrinsic fluorescence of a mild unfolding monomeric intermediate and the monoTcTIM were explored. It is showed the fluorescence intensities by ANS (ANS FI) for each protein and their corresponding percentages (%) (see the text for details).

<i>Protein</i>	<i>Condition</i>	<i>ANS FI</i>	<i>% Fluorescence</i>
TcTIM	native	174714	100
monoTcTIM	native	823059	471
TcTIM	1.4 M Gdn-HCl	737434	422

And as just mention before, the monomeric intermediate produced by the mild denaturation of γ TIM (41, 42), TbTIM (32) and TcTIM (3), are able to bind the fluorescent dye (see Table 2). The effect of ANS on native monoTcTIM was as high as 5 times increasing in extrinsic fluorescence comparing with the native wild-type, TcTIM. This increment in fluorescence is due to the exposition of considerable amounts of hydrophobic surface to the solvent in monoTcTIM. This increase is almost in the same amount as that observed in the monomeric intermediate obtained after mild denaturation in Gdn-HCl. Consequently, the significant exposure of non polar surface could be the main reason for the low stability of the monomeric species of TIM, independently of their genetic engineering or mild denaturation origin. For example, the buried surface areas in TcTIM were 1476 and 1491 Å² for monomers A and B respectively in the dimer (18), and it is very possible that the amount of this kind of surface increases after mutations in the interface and equilibrium denaturation.

On the other hand, in TbTIM, these values were higher than in TcTIM (1522 and 1533 Å² respectively) and are maybe the reason of the aggregation behavior that the monomeric intermediate of this enzyme presents under mild denaturant concentrations. Finally, the binding of ANS is commonly used as a characteristic to describe the widely observed folding intermediate denominated “molten globule” (67). It was earlier reported by our group that the monomeric equilibrium unfolding intermediate observed in TcTIM could be a “molten globule” (3), and as was observed for monoTcTIM, both monomers shows considerable amounts of secondary and tertiary structure, they are also non active and binds ANS in almost the same amount. Hence it is likely that some of the molten globule properties observed in the wild-type monomeric intermediate in Gdn-HCl could also persists in the monomeric mutant. Taking into account that one general objective is to construct a monomeric variant of TIM with enough amounts of catalytic activity as the observed in the wild-type enzyme, and that the low stability of the monomer is possibly the main reason for its inactive or very low active nature, it is possible then that decreasing the hydrophobic exposition after monomerizing could be a solution for recovering the function of the enzyme in a monomeric form.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laboratorio de Fisicoquímica y Diseño de Proteínas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, and Dr. A. Gómez-Puyou and Dra. Marietta Tuena, IFC Universidad Nacional Autónoma de México, for generously making available their equipment facilities. We are grateful to Beatriz Aguirre and Ana Lilia Ramírez for their help in purification. This work was supported by Grants 40524M and 41328Q from CONACyT and Grant IN217206 from PAPIIT-UNAM. F.Z.P. is the recipient of a PhD fellowship from CONACyT.

REFERENCES

1. Farber, G. K., and Petsko, G. A. (1990). *Trends Biochem. Sci.* 15, 228-234.
2. Reardon, D., and Farber, G. K. (1995). *FASEB J.* 9, 497-503. 3
3. Cháñez-Cárdenas, ME., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B.G., Costas, M. and Vázquez-Contreras, E. (2005). *Biochemistry*, 44, 10883-10892.
4. Tellez-Valencia, A., Avila-Rios, S., Perez-Montfort, R., Rodriguez-Romero, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., Lopez-Calahorra, F., and Gomez-Puyou, A. (2002). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 958-963.

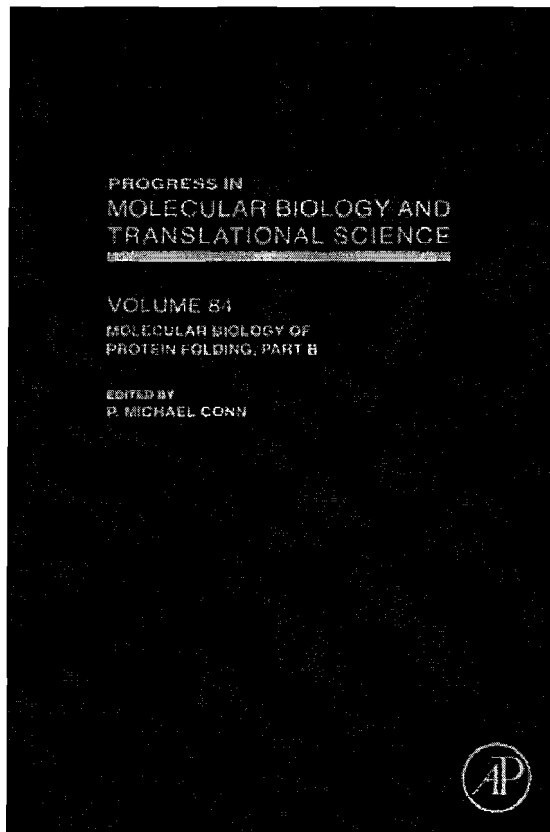
5. Tellez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernandez-Santoyo, A., Perez-Montfort, R., Costas, M., Rodriguez-Romero, A., Lopez-Calahorra, F., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (2004). *J. Mol. Biol.* 341, 1355-1365.
6. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., and Taylor, G. L. (2001). *J. Mol. Biol.* 306, 745-757.
7. Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjaden, B., Hensel, R. (2004). *J. Mol. Biol.* 342, 861
8. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Dao Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1999). *Proteins* 37, 441-453.
9. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 2199-2206.
10. Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C., and Martial, J. A. (1993). *Acta Crystallogr. D*49, 403-417.
11. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1995). *Protein Sci.* 4, 2594-2604.
12. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. A. (1990). *Biochemistry* 29, 6609-6618.
13. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975). *Nature* 255, 609-614.
14. Aparicio, R., Ferreira, S. T., and Polikarpov, I. (2003). *J. Mol. Biol.* 334, 1023-1041.
15. Contreras, C. F., Canales, M. A., Alvarez, A., De Ferrari, G. V., Inestrosa, N. C. (1999). *Protein Eng* 12, 959-966
16. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., and Hol, W. G. J. (1991). *J. Mol. Biol.* 220, 995-1015.
17. Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., and Murthy, M. R. N. (1997). *Structure* 5, 751- 761.
18. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998). *J. Mol. Biol.* 283, 193-203.
19. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vried, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambeir, A. M., and Wierenga, R. K. (1999). *Protein Eng.* 12, 243-250.
20. Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., Del Pozo-Yauner, L., Kornhauser, A., and Fernandez-Velasco, D. A. (2002). *J. Mol. Biol.* 322, 669-675
21. Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., and Hol, W. G. (1994). *Protein Sci.* 3, 810-821.
22. Knowles, J. R. (1991). *Nature cc20020*, 121-124.
23. Branden, C. I., and Tooze, J. (1991) *Introduction to protein structure*, Garland Publishing Inc., New York.
24. Mainfroid, V., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J., and Goraj, K. (1996). *Biochemistry* 35, 4110-4117.
25. Schliebs, W. Thanki, N., Jaenicke, R. y Wierenga, R.K. (1997). *Biochemistry* 36,9655-9662
26. Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., and Wierenga R. (1996). *Protein Science*, 5:229-239
27. Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA, Lambeir AM & Wierenga RK (1999). *Protein Eng.* 12: 243-250.
28. Borchert, Abagyan, R., Jaenicke, R. y Wierenga, R.K. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1515-1518
29. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère J.M., Mande, S.C., Hol, W.G.J., Martial, J.A., Goraj, K. J. (1996). *J. Mol. Biol.*, 257, 441-456.
30. Maithal, K., Ravindra, G., Nagaraj, G., Singh, S.K., Balaram, H., and Balaram P. (2002). *Protein engineering* 15, 575-584
31. Zomosa-Signoret V, Aguirre-Lopez B, Hernandez-Alcantara G, Perez-Montfort R, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A. (2007). *Proteins.* 67(1):75-83.
32. Chánéz-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., and Pérez Montfort, R. (2002). *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 117-129.
33. Norledge, B.V., Lambeir, A.M., Abagyan, A.R., Rottmann, A., Fernández, A.M., Filimonov, V.V., Peter, M.G., and Wierenga, R.W. (2001). *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 42, 383-389.

34. Saab-Rincón, G., Rivelino-Juárez, V., Osuna, J., Sánchez Filiberto y Soberón, J. (2001). *Protein Engineering* 14, 149-155
35. Rietveld, A. W., and Ferreira, S. T. (1996). *Biochemistry* cc2002, 7743-7751.
36. Moreau, V. H., Rietveld, A. W. M., and Ferreira, S. T. (2003). *Biochemistry* 42, 14831-14837.
37. Pan, H., Raza, A. S., and Smith, D. L. (2004). *J. Mol. Biol.* 336, 1251-1263.
38. Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V., and Wierenga, R. K. (2000). *Eur. J. Biochem.* 267, 2516-2524.
39. Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., and Jaenicke, R. (1997). *Protein Sci.* 6, 2159-2165.
40. Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H., and Balaram, P. (1999). *Biochemistry* 38, 423-431.
41. Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., and Fernández-Velasco, D. A. (2000). *Protein Pept. Lett.* 7, 57-64.
42. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y., and Dobson, C. M. (2000). *J. Mol. Biol.* 300, 11-16.
43. Najera, H., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2003). *Biochem. J.* 370, 785-792.
44. Zubillaga RA, Perez-Montfort R, Gomez-Puyou A. (1994). *Arch Biochem Biophys.* 1994 Sep; 313(2):328-36.
45. Gomez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, Rojo-Dominguez A, Perez-Montfort R. (1995). *Chem Biol.* 2(12):847-55.
46. Garza-Ramos G, Perez-Montfort R, Rojo-Dominguez A, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A. (1996). *Eur. J. Biochem.* 1;241(1):114-20.
47. Sepulveda-Becerra MA, Ferreira ST, Strasser RJ, Garzon-Rodriguez W, Beltran C, Gomez-Puyou A, Darszon A. (1996). *Biochemistry.* 10;35(49):15915-22.
48. Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, I., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez- Puyou, M., and Pérez-Montfort, R. (1997). *Eur. J. Biochem.* 244, 700-705.
49. Gao XG, Garza-Ramos G, Saavedra-Lira E, Cabrera N, De Gomez-Puyou MT, Perez-Montfort R, Gomez-Puyou A. (1998). *Biochem. J.* 15;332 (Pt 1):91-6.
50. Gao XG, Maldonado E, Perez-Montfort R, Garza-Ramos G, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A, Rodriguez-Romero A. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Aug 31;96(18):10062-7.
51. Perez-Montfort R, Garza-Ramos G, Alcantara GH, Reyes-Vivas H, Gao XG, Maldonado E, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A. (1999). *Biochemistry.* Mar 30;38(13):4114-20.
52. Reyes-Vivas H, Hernandez-Alcantara G, Lopez-Velazquez G, Cabrera N, Perez-Montfort R, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A. (2001). *Biochemistry.* Mar 13;40(10):3134-40.
53. Hernández-Alcantara G, Garza-Ramos G, Hernández GM, Gomez-Puyou A, Perez-Montfort R. (2002). *Biochemistry.* 41(13):4230-8
54. Perez-Montfort R, de Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A. (2002). *Curr Top Med Chem.* May;2(5):457-70. Review.
55. Reyes-Vivas H, Martinez-Martinez E, Mendoza-Hernandez G, Lopez-Velazquez G, Perez-Montfort R, Tuena de Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. (2002). *Proteins.* Aug 15;48(3):580-90.
56. Tellez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernandez-Santoyo, A., Perez-Montfort, R., Costas, M., Rodriguez-Romero, A., Lopez-Calahorra, F., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (2004). *J. Mol. Biol.* 341, 1355-1365.
57. 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. (2003). *Biochemistry.* 42, 3311-8.
58. Thanki, N., Zeelen, J.Ph., Mathieu, M., Jaenicke, R., Abagyan, R.A., Wierenga, R.K., and Schliebs, W. (1997). *Protein engineering:* 10, 159-167
59. Borchert, T.V., Zeelen, J. Ph., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., Wierenga, R.K. (1995). *FEBS Lett.*, 367, 315-318.
60. Borchert, TV, Prat, K, Zeelen, J.Ph., Callens, M, Noble M.E. M., Opperdoes, F.R., Michels, P.A. M and Wierenga, R.K. (1993). *Eur. J. Biochem.* 211, 703-710
61. Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A., and Gracy, R. W. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 312-320.
62. Kohlhoff M, Dahm A, and Hensel R. (1996). *FEBS Lett.* 383(3):245-50.
63. Rosen, C. G., and Weber, G. (1969). *Biochemistry* 8, 3915-3920.

64. Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O. I. (1990). *FEBS Lett.* 262, 20-24.
65. Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991). *Biopolymers* 31, 119-128.
66. Silva, J. L., Silveira, C. F., Correia, A., Jr., and Pontes, L. (1992). *J. Mol. Biol.* 223, 545-555.
67. Ptitsyn, O. B. (1992). The molten globule state, in *Protein Folding* (Creighton, T. E., Ed.) pp 243-255, Freeman, New York.

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the book *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 84, published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues who know you, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at: <http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From: Francisco Zárate-Pérez, María Elena Chánez-Cárdenas, and Edgar Vázquez-Contreras, The Folding Pathway of Triosephosphate Isomerase. In P. Michael Conn, editor: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 84, Burlington: Academic Press, 2008, pp. 251-267.

ISBN: 978-0-12-374595-8

© Copyright 2008 Elsevier Inc.

Academic Press.

Author's personal copy

The Folding Pathway of Triosephosphate Isomerase

FRANCISCO ZÁRATE-PÉREZ,[°]
MARÍA ELENA CHÁNEZ-
CÁRDENAS,[†] AND
EDGAR VÁZQUEZ-CONTRERAS^{°,‡}

[°]*Departamento de Bioquímica, Instituto de
Química, Universidad Nacional Autónoma
de México, Circuito Exterior, México,
DF 04510, México*

[†]*Laboratorio de Patología Vascular
Cerebral, Instituto Nacional de Neurología
y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez",
México DF, México*

[‡]*Departamento de Ciencias Naturales, CNI,
Universidad Autónoma Metropolitana
Cuajimalpa, Artificios No. 40, 6[°] Piso Col.
Hidalgo Alvaro Obregón, C. P. 01120
México D. F., México*

I. Introduction	252
A. Triosephosphate Isomerase.....	252
B. Protein Denaturation.....	253
II. The Denaturation of TIM	254
III. The Reversibility of TIM Denaturation	254
IV. Models Describing TIM Denaturation.....	257
V. The Monomeric Intermediate.....	257
VI. The Folding Pathway of (β/α) ₈ Proteins.....	259
VII. The Dimeric Intermediate.....	260
VIII. Energetic of the TIM Unfolding.....	261
A. Stability	261
B. Kinetics	261
IX. Final Remarks	262
References.....	263

Triosephosphate isomerase (TIM) is a widely studied enzyme. Their ubiquity, efficient catalytic activity, and its (β/α)₈ barrel three-dimensional conformation, make this enzyme an excellent model to perform almost any kind of research. In this chapter, TIM folding pathway studies are reviewed. These results show that even the native conformation is almost the same for all the species so far analyzed and that the percentage of identity in their primary is

higher than 70%, the unfolding pathway is not the same to all of them. The characteristics of the available TIMs are analyzed, their kinetic and equilibrium unfolding studies in different denaturants (urea, guanidine hydrochloride, temperature, and pressure), the reversibility of the processes, the models and energetic of the conformers in the pathway, as well as other properties of the unfolding intermediates are discussed. The interesting case of these homologous proteins is discussed in terms of their folding nature, the $(\beta/\alpha)_8$ barrel.

I. Introduction

A. Triosephosphate Isomerase

Triosephosphate isomerase (TIM) is a glycolytic enzyme that catalyzes the interconversion between glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP) in the fifth reaction of glycolysis. This reaction is catalyzed with high efficiency (1), and it is a diffusive process, limited only by the rate at which GAP encounters or departs from the active site. All the wild-type TIMs so far studied are oligomers composed by subunits of ~ 250 amino acid residues and close to 27 kDa (2). The crystallographic structures of the wild-type TIMs and some mutants have been determined for species ranging from Archaea (3, 4) and Bacteria (5–8) to Eukarya, including unicellular (9) and multicellular organisms (10–12), parasites (13–17), and human (18). The comparison of these three-dimensional structures shows that each subunit corresponds to a common protein fold, the $(\beta/\alpha)_8$ barrel denominated “TIM barrel” which is an eightfold repeat of a β -loop- α motif (Fig. 1). About 10% of the known enzyme structures are made by or contain a TIM barrel structural domain (19, 20). Some species of TIM have been co-crystallized with their substrates: DHAP and GAP, and also in the presence of some inhibitors.¹ Regarding the sequence identity from crystallized TIMs, these vary in a wide range, for instance, from 28.8% between human and *Pyrococcus woesei* TIMs to 98.4% between human and rabbit enzymes.

TIM is active only in the oligomeric form (revised in (21)), and the structure of the native dimer suggests that the presence of both subunits is important for stabilizing the active-site residues (22). Each monomer contains catalytic residues and the loops at the carboxyl termini of the barrel form the

¹PGA, 2-phosphoglycolic acid; PGH, phosphoglycolhydroxamate; IPP, 2(formyl-hydroxy-amino)-ethyl-phosphonic acid; GP, glycerol phosphate.



FIG. 1. The homodimer of TIM. The two subunits composed by $(\beta/\alpha)_8$ barrels are shown.

interface between subunits (2). The catalytic triad observed in TIM (Lys13, His95, and Glu165) are considered as the "fingerprint" of this enzyme. In addition, it is known that the side chains of other residues (Asn11, Ser96, and Glu97) adopt a three-dimensional orientation which favors their interaction with both, the sugar portion of the substrate or with each other residue. When the substrate is bound to the active site, the catalytic loop-6 suffers a large conformational motion, closing the cavity and proceeding with the catalytic cycle. Due to the mobility of this loop is difficult to observe it in the crystallographic studies.

B. Protein Denaturation

Protein denaturation is a natural and an artificial process which involves the disruption of the three-dimensional organization of the protein molecules, that is, the secondary, tertiary, and the quaternary structure (revised in (23)). Since the denaturation reaction does not disrupt the peptide bonds, the primary structure remains intact after a denaturation process. In general, the native structure of all proteins is composed of two kinds of regular secondary structure. The denaturation process alters the stability of the native α -helix and β -sheets contained in a protein and uncoils them into a random structure. The hydrogen bonds between the carbonyl oxygen and the amides of the peptide bond responsible for the secondary structure are partially or totally broken. On the other hand, at the tertiary and quaternary structure, the three kinds of noncovalent interactions between amino acid side chains (hydrogen bonds, salt bridges, and nonpolar hydrophobic interactions) are disrupted during denaturation. As the energetic nature for the aforementioned interaction is very small, a variety of reagents and conditions could unfold the protein.

A common observation after a denaturation process is the nonspecific aggregation; this reaction could be also observed macroscopically as precipitation of the protein solution. The other possible kind of interaction that maintains the native structure is the formation of covalent disulfide bonds, which in general remain intact during natural denaturation; although *in vitro* they can be disrupted adding a reducing molecule.

II. The Denaturation of TIM

The unfolding of several TIM species has been extensively studied by a variety of methods and experimental approaches; these include the use of different perturbants, such as increasing the concentration of urea and guanidinium hydrochloride (Gdn-HCl) or modifying the temperature and pressure. In some cases the process is reversible; however, unspecific aggregation has also been observed for some TIMs. The unfolding is described by a two-state transition for some species, while in others, intermediates have been observed. The intermediates reported in the folding pathway of TIMs show two states of oligomerization: a dimeric intermediate, which is catalytically competent and a monomeric intermediate, always inactive. The dimeric intermediate has been found less frequently than the monomeric state. In the present work, we describe the characterization of the unfolding pathway of TIM. A summary of the denaturation studies of TIM from different species is presented in Table I.

III. The Reversibility of TIM Denaturation

The unfolding process of TIM is one of the most studied. To date, the denaturation of several homologous TIMs have been analyzed (see Table I). The challenge in studies of the folding pathway of proteins with quaternary structure is the possible of irreversibility in the denaturation process. This inconvenience makes the thermodynamic characterization of the folding mechanism a difficult task. It has been found that the unfolding process is either reversible or irreversible for TIM (see Table II). When the denaturation is reversible, the folding pathway ranges from one step to multistep reactions and has been characterized by both kinetic and equilibrium experiments. When the process is irreversible, it could be linked to aggregation or has a remarkable hysteresis due to kinetic control (see Table II).

TABLE I
ANALYSIS OF THE UNFOLDING OF TIM

Enzyme ^a	PDB Code ^c	Denaturant	UP	Denat 1/2	AH	Unfolding pathway ^f	IAB ANS	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)	Ref.
<i>B. stearothermophilus</i> ^b [252/6.37]	1BTM [2.8]	Gdn-HCl	nr ^d	nr	No	$N_2 \rightarrow 2U$	-	101.3	(24)
<i>T. maritima</i> ^b [253/5.38]	1B9B [2.85]	Gdn-HCl	MP	3.5 ^f	Yes	$N_2 \rightarrow A \rightarrow 2U$	-	-	(39)
Rabbit b [248/6.89]	1R2R [1.5]	Gdn-HCl	MP	0.55 ^f	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	70 [60/5] j 140.6	(25,26-27)
<i>P. falciparum</i> ^b [248/6.37]	1YDV [2.2]	Urea	MP	4.5 ^f	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	140.6	(27)
		Gdn-HCl	NMP	~1.5 ^f	No	$N_2 \rightarrow N_2^* \rightarrow A \rightarrow 2U$	-	-	(28)
Yeast ^b [248/5.86]	1YPI [1.9]	Urea	MP	>6.0 ^f	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	-	(28)
		Gdn-HCl	MP	nr	No	$N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	Yes	103.5	(29,30-31)
			NMP ^e					[70.3/ 16.6] j	
<i>L. mexicana</i> [250/8.2]	1AMK [1.83]	Urea	NMP	nr	No	$N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	-	108	(31)
		Pressure	MP	146 ^g	No	$2M \rightleftharpoons 2U$	-	53.1 k	(32)
		Temperature	MP	49 ^h	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	ΔH_{cal} 810	(33)
		Gdn-HCl	MP	nr	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	82.4	(34)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Enzyme ^a	PDB Code ^c	Denaturant	UP	Denat 1/2	AH	Unfolding pathway ^f	IAB ANS	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)	Ref.
<i>T. brucei</i> ^b [250/9.85]	1TPF [1.8]	Gdn-HCl	NMP	1.1 ^f , 2.2 ^f	No	A ↑ A	Yes	-	(35)
<i>T. cruzi</i> ^b [251/8.19]	1TCD [1.83]	Gdn-HCl	NMP	1.2 ^f , 2.4 ^f	Yes	$N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$ $N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	Yes	105.7 [4.5/ 65.8/ 17.8] ⁱ	(36)
Human ^h [248/6.5]	2JK2 [1.7]	Urea	MP	~1.5 ^f	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	81	(37)
<i>E. histolytica</i> ^b [261/5.82]	1M6 [1.5]	Temperature	MP	55 ^h	No	$N_2 \rightleftharpoons 2U$	-	81	(37)
		Pressure	MP	133 ^g	No	$2M \rightleftharpoons 2U$	-	50	(32)

^aIn brackets: Number of total amino acids by monomer/isoelectric point.^bRecombinant enzyme obtained in *E. coli*.^cProtein Data Bank Code. In brackets: Resolution of the crystal.^dIt must be monophasic.^eIn renaturation.^fIn [M].^gIn MPa M⁻¹.^hIn °C.ⁱN₂, native dimer; N₂^{*}, non native dimer; M, folded monomer; U, unfolded monomer; A, aggregate.^jIn brackets: ΔG^0 dissociation/ ΔG^0 monomer unfolding.^kCalculations were obtained using both pressing and depressing data.^lIn brackets: ΔG^0 nonnative dimer/ ΔG^0 dissociation/ ΔG^0 monomer unfolding.nr, not reported; UP, unfolding pattern, followed by changes in secondary and/or tertiary structure and ¹H NMR.MP, monophasic; NMP, non-monophasic; Denat_{1/2}, transition midpoint.

AH, activity higher than for the native enzyme at low Gdn-HCl concentrations.

IABANS, Intermediate able to bind ANS.

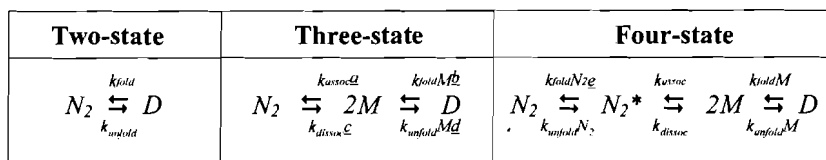


FIG. 2. Models describing TIM denaturation. N_2 : native dimer; $2M$: monomeric intermediate; N_2^* : dimeric intermediate; D : denaturated monomers. The constants of every step are also shown. The available kinetic data are as follows: (A).- for the enzymes of *T. cruzi* and *T. brucei* 2.6×10^{-5} and $0.2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectively (48); for the yeast enzyme $6.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (44) and for the rabbit enzyme $3 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (40); (B).- for rabbit enzyme: 189 s^{-1} (40), 91.8 s^{-1} (26) and 1.9×10^{-2} (40); for the enzyme of both *T. cruzi* and *T. brucei* 0.08 s^{-1} (48); for the yeast enzyme 0.015 s^{-1} (44); (C): for the yeast enzyme $3.54 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ (44) and for the enzyme of rabbit $2.75 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (40). (D): for the yeast enzyme $3.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (44); for the rabbit enzyme 25 s^{-1} (40) and 7.6 s^{-1} (26); (E): for the enzymes of *T. cruzi* and *T. brucei* 8.1×10^{-3} and $1.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ respectively (48).

TABLE III
PROPERTIES OF THE MONOMERIC INTERMEDIATE OBSERVED IN TIM DENATURATION

	Denaturant concentration (M)	R_s (Å)	% of native FI	% of native CD	ANS binding	ΔG (kJ mol^{-1})	Ref.
<i>T. cruzi</i>	1.0–2.0 ^a	30	~60	~60	Yes	35.5	(36)
<i>T. brucei</i>	2.0 ^a	35	~45	~30	Yes	nd	(35)
<i>S. cerevisiae</i>	1.0 ^a	24	~50	~50	nr	16.6	(31)
	1.1 ^a	30	~75	~20	Yes	nr	(30)
	2.5 ^b	nr	~45	~45	nr	16.6	(31)

^aGdn-HCl.

^bUrea.

nr. Not reported; nd. not determined. The R_s of native dimer is 28.7 Å.

and tertiary structure, they exhibit an inability to perform catalysis; a general feature of the monomeric intermediates. In the equilibrium denaturation of *Trypanosoma cruzi* TIM, a monomeric intermediate was observed between 1.0 and 2.0 M Gdn-HCl (48). This intermediate (Table III) has an R_s close to the native dimer size, exposes considerable hydrophobic regions to the solvent, as has been detected by ANS binding, and also retains considerable amount of fluorescence and dichroism parameters (36). In the equilibrium unfolding of the enzyme of *Trypanosoma brucei* in Gdn-HCl, at 2.0 M a monomeric intermediate is observed (Table III). Its R_s value is 25% higher than the native

dimers, suggesting that it is expanded (35). In the equilibrium unfolding of the yeast enzyme induced by both Gdn-HCl (31) or urea (30, 31), a monomeric intermediate was also observed (Table III). This intermediate conserves nearly half of both the circular dichroism signal and the intrinsic fluorescence when compared with the native dimer. Two different R_s values have been reported for this intermediate. Using pulse-field gradient nuclear magnetic resonance measurements, Morgan *et al.* suggest a compact intermediate ($R_s = 24 \text{ \AA}$) (30), whereas using size exclusion chromatography experiments Nájera *et al.* suggest that the Stoke's radius of the intermediate is the same observed for the native dimer ($R_s = 30 \text{ \AA}$) (31). The other monomeric intermediate of TIM has been observed in the refolding of the rabbit enzyme in reverse micelles with low water content; in this condition a highly fluorescent intermediate was stabilized (41, 50). Regarding the stability of the monomeric intermediate, it was only obtained for two species yeast (31) and *T. cruzi* (36). The ΔG value for the last is twice the stability for the former (see Table III). Unfortunately with the available data, it is not easy to determine if this difference is due to the particular properties of the analyzed TIM or is attributable to the different employed experimental conditions.

VI. The Folding Pathway of $(\beta/\alpha)_8$ Proteins

TIM monomers folding process involves the three-dimensional arrangement of their adjacent $(\beta/\alpha)_8$ units in order to obtain stable subdomains. Several approaches including equilibrium and kinetic analysis, mutagenesis, and fragmentation characterization have been used to propose that the folding of $(\beta/\alpha)_8$ barrels (see Fig. 1) is a modular process. Two different strategies have been performed in order to understand the assembly of the (β/α) units in TIM. First, in the enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* misincorporation proton-alkyl exchange² experiments were used in order to identify cooperativity between unfolding subdomains as well as partially unfolded monomeric intermediates (51). The results indicated that the unfolding of the monomeric TIM protein begins with the formation of units (β/α) 7 and 8 located in the C-terminal domain, followed by the units (β/α) 1, 5, and 6 and finally by the formation of the units (β/α) 2, 3, and 4. These authors suggest that the mechanism which describes the unfolding of TIM is a 3 + 3 + 2 model, which is similar to that proposed for the unfolding of a $(\beta/\alpha)_8$ protein, the tryptophan synthase (52). The second approach to describe the folding and unfolding of TIM was the use of mass spectrometry and amide hydrogen exchange in the process induced by

²MPAX: study the accessibility to derivatization of misincorporated cysteins during the unfolding reaction.

urea and Gdn-HCl in the enzyme of rabbit (53). In these studies, it was concluded that the segment (β/α) 4–8 corresponding to the C terminal of the barrel folds faster than the units (β/α) 1–4 located in the N-terminal region. This folding mechanism resembles the 4 + 4 model proposed for other TIM barrel protein (54) in which the population of the intermediate was observed only during refolding.

The TIM fold modularity has also been proposed after proteolysis and fragment complementation studies. The fragment complementation have been studied in five species and the overall observations show that the “nicked” enzymes of *S. cerevisiae* (55), rabbit (56), *Plasmodium falciparum* (57), and *T. brucei* (58) retained native-like structure and catalytic activity; surprisingly, after complete denaturation, the nicked enzymes of *S. cerevisiae* and *P. falciparum* were able to refold. On the other hand, the enzyme of *T. cruzi* is highly susceptible to digestion inducing their complete degradation (58). In chicken TIM, two fragments were independently expressed, thereafter they were unfolded; finally, a mix of these denaturated fragments were refolded and the resulting complex is catalytically competent (59). The observation that these enzymes remain active after disruptions at different positions in the primary structure, shows that the TIM barrel is a resistant fold.

VII. The Dimeric Intermediate

In the equilibrium unfolding of TIM from three different species, the presence of dimeric intermediates has been observed. In *P. falciparum* TIM, the dimeric intermediate is observed at low concentrations of Gdn-HCl (28); this intermediate is prone to aggregate and shows a decrease in the CD signal although it presents a slight increase in the intrinsic fluorescence (Table IV). In

TABLE IV
PROPERTIES OF THE DIMERIC INTERMEDIATE OBSERVED IN TIM DENATURATION

	Denaturant concentration (M) ^a	R_s (Å)	% of native FI	% of native CD	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ANS binding	Ref.
<i>P. falciparum</i>	0.8–1.2	nr	~105	~80	nr	nr	(28)
<i>T. brucei</i>	1.0	31	~100	~80	nd	No	(35)
<i>T. cruzi</i>	0.8	30.7	~100	~100	65.8	No	(36)

^aIn Gdn-HCl.

nr, Not reported; nd, not determined. The R_s of native dimer is 28.7 Å.

the case of *T. brucei* TIM (35), the dimeric intermediate was observed in concentrations of Gdn-HCl lower than 1.0 M (Table IV). This intermediate is not catalytically competent, and shows a small expansion in the R_g . In *T. cruzi* TIM, an expanded dimer is also observed at the same Gdn-HCl concentrations than the aforementioned species (36). This intermediate is characterized by an increase in fluorescence intensity and in the secondary structure (Table IV). Notably, this dimeric intermediate exhibits hyperactivity (40%) when compared with the native enzyme. Protein stability was only determined for the *T. cruzi* dimeric intermediate, showing a small contribution to the total ΔG . Finally, in the enzyme of *Thermotoga maritima* (39), an increase of the catalytic activity at low Gdn-HCl concentrations was observed, just like it was observed in *T. cruzi* TIM. These authors did not explore the oligomeric nature of this species, although this conformer is probably a dimeric intermediate.

VIII. Energetic of the TIM Unfolding

A. Stability

It is not easy to determine if the differences in the folding mechanisms observed for the currently analyzed TIM are due to particular properties of the proteins to the different experimental conditions employed. Even so, it is clear that conformational stability is enhanced upon association of the subunits, and that the last poses only marginal stability when compared with the native homodimer. From the available data, the total ΔG for the process is $86 \pm 25 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Table I). The ΔG for the association is $68 \pm 9 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Table I), which corresponds to 79% of the total free energy. On the other hand, the stability of the monomer is $13 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$, corresponding to 15% of the total energy. This low stability of the monomeric intermediate is probably the main reason of the absence of catalysis by the isolated monomer. Finally the stability of the dimeric intermediate was only determined for the enzyme of *T. cruzi* and it was of $4.5 \pm 1.1 \text{ kJ mol}^{-1}$, corresponding to 5% of the total energy of the process. Then, even when several steps could be found in the denaturation of TIM, the association of subunits is the main contribution to the stability of the protein.

B. Kinetics

The kinetic characterization of the folding pathway was studied in four TIMs from different species. Kinetic constants have been calculated for the three-state unfolding and refolding of the enzymes of yeast and rabbit (Fig. 2) and for the four state refolding of the enzymes of *T. cruzi* and *T. brucei* (Fig. 2). Even when variation in the reported rates exist, the monomer folding is a fast

process (46.8 s^{-1} , is the mean value of the data reported in Fig. 2). On the other hand, the association rates of TIM subunits are in the range of $0.2\text{--}6.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 2). For the yeast enzyme (48) it was also found that the association and dissociation rates were inversely proportional to the solvent viscosity, suggesting that this step is diffusion controlled.

IX. Final Remarks

The first protein folding studies with homologous proteins suggested that the folding pattern was conserved throughout evolution; however, in the literature different folding pathways for homologous proteins with the same denaturant condition have been reported. In this context, TIM is one of the most studied proteins (36). The reasons for the selection of TIM from different species to perform folding and stability studies includes: (i) due to their efficient catalysis, this enzyme has been called “perfect catalyst (60),” (ii) this enzyme is the prototype of the TIM barrel, a widely observed scaffold, about 10% of the known three-dimensional structures of proteins belong to this folding (61, 62), and (iii) by their oligomeric nature, because in the analyzed TIMs from mesophile organisms, it is always a homodimeric protein, being the simplest model of oligomerization, and because it is not clear at all why TIM presents a quaternary structure, if catalytic residues reside in the individual monomers. This fact is interesting because other monomeric TIM barrel proteins carrying different catalytic activities exist in nature.

TIM ensures the net production of ATP in the conversion of glucose to pyruvate, and hence, it is essential for maintaining life under anaerobic conditions. These facts make TIM a target for drug design against human anaerobic parasites (63, 64). The extent of amino acid sequence conservation in TIM throughout evolution is remarkable, for example, the sequence around the active site residue (the glutamic acid 168) is totally conserved. The crystallographic structures of wild-type TIMs and engineered mutants have been determined for several species. All these observations eventually will be correlated with the stability studies.

The denaturation pattern of the wild-type TIM has been studied with urea, Gdn-HCl, temperature, and pressure. In a few cases, the process is reversible while in others unspecific aggregation appears. The unfolding is described by a two-state transition for some species, while in others, intermediates have been observed, these differences occur also when the identity in the primary sequence is as high as 74% (65). Possibly the folding intermediates are responsible for the aggregation and irreversibility observed during folding experiments *in vitro* and show two states of oligomerization: a dimeric intermediate, which is

catalytically competent and less frequently found than the other state, a monomeric intermediate, always inactive. Even all the discussed information is available for TIM, many questions about this enzyme remain to be answered.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grants 41328Q and 46168-M from CONACyT and UAM acuerdos 11 y 13/07 del Rector General. F.Z.P. is the recipient of a PhD fellowship from CONACyT.

REFERENCES

1. Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350**, 121–124.
2. Branden, C. I., and Tooze, J. (1991). *Introduction to Protein Structure*. Garland, New York.
3. Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., and Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: A small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **306**, 745–757.
4. Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, B., Tjaden, B., and Hensel, R. (2004). Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* **342**, 861–875.
5. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Dao Thi, M. H., Backmann, J., Martial, L., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of 10 different TIM structures. *Proteins* **37**, 441–453.
6. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. J. (1998). Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *Biol. Chem.* **273**, 2199–2206.
7. Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C., and Martial, J. A. (1993). Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **D49**, 403–417.
8. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* **4**, 2594–2604.
9. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **29**, 6609–6618.
10. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, A. J., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975). Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**, 609–614.
11. Aparicio, R., Ferreira, S. T., and Polikarpov, I. J. (2003). Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: Evidence of conformational heterogeneity. *J. Mol. Biol.* **334**, 1023–1041.
12. Contreras, C. F., Canales, M. A., Alvarez, A., De Ferrari, G. V., and Inestrosa, N. C. (1999). Molecular modeling of the amyloid-beta-peptide using the homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid *in vitro*. *Protein Eng.* **12**, 959–966.

13. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., and Hol, W. G. J. (1991). Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* **220**, 995–1015.
14. Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., and Murthy, M. R. N. (1997). Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: The crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **5**, 751–761.
15. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **283**, 193–203.
16. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vried, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambeir, A. M., and Wierenga, R. K. (1999). Structural and mutagenesis studies of *Leishmania* triosephosphate isomerase: A point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* **12**, 243–250.
17. Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Del Pozo-Yauner, L., Kornhauser, A., and Fernández-Velasco, D. A. (2002). Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**, 669–675.
18. Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., and Hol, W. G. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase related human genetic disorders and comparison with the tripanosomal enzyme. *Protein Sci.* **3**, 810–821.
19. Farber, G. K., and Petsko, G. A. (1990). The evolution of α/β barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 228–234.
20. Reardon, D., and Farber, G. K. (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* **9**, 497–503.
21. Francisco Zárate-Pérez, and Edgar Vázquez Contreras (2008). The oligomeric nature of triosephosphate isomerase. Studies of monomerization. *AIP Conf. Proc.* **978**, 75–86.
22. Wierenga, R. K., Borchert, T. V., and Noble, M. E. M. (1992). Crystallographic binding studies with triosephosphate isomerases: Conformational changes induced by substrate and substrate-analogues. *FEBS Lett.* **307**, 34–39.
23. Contreras, Edgar Vázquez, Rodríguez, Priscilla Ibarra, Castillo-Sánchez, Víctor, and Chánez Cárdenas, María Elena (2008). The unfolding of proteins induced by different denaturants. In *Advances in Protein Physical Chemistry*, (García-Hernández, E., Fernández-Velasco, D. A., Eds.). Transworld Research Network, India, pp. 169–192.
24. Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996). Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110–4117.
25. Rietveld, A. W., and Ferreira, S. T. (1996). Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: Persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry* **35**, 7743–7751.
26. Moreau, V. H., Rietveld, A. W. M., and Ferreira, S. T. (2003). Persistent conformational heterogeneity of triosephosphate isomerase: Separation and characterization of conformational isomers in solution. *Biochemistry* **42**, 14831–14837.
27. Pan, H., Raza, A. S., and Smith, D. L. (2004). Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **336**, 1251–1263.
28. Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H., and Balaram, P. (1999). Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: Evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* **38**, 423–431.

29. Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernandez, G., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2000). Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: A monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* **7**, 57–64.
30. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y., and Dobson, C. M. (2000). A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **300**, 11–16.
31. Najera, H., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**, 785–792.
32. Vázquez-Perez, A. R., and Fernandez-Velasco, D. A. (2007). Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: The monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry* **46**, 8624–8633.
33. Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A., and Hernandez-Arana, A. (2001). Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence of Dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**, 9049–9058.
34. Lambert, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V., and Wierenga, R. K. (2000). The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2516–2524.
35. Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., and Perez-Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 117–129.
36. Cháñez-Cárdenas, M. E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B. G., Costas, M., and Vázquez-Contreras, E. (2005). The reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* **44**, 10883–10892.
37. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* **257**, 441–456.
38. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. (1998). Triose-phosphate Isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2199–2206.
39. Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., and Jaenicke, R. (1997). Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Sci.* **6**, 2159–2165.
40. Rietveld, A. W., and Ferreira, S. T. (1998). Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: The importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* **37**, 933–937.
41. Garza-Ramos, G., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., and Gracy, R. W. (1992). Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* **208**, 389–395.
42. Zabori, S., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1980). Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch [C]* **35**, 999–1004.
43. Waley, S. G. (1973). Refolding of Triose Phosphate Isomerase. *Biochem J.* **135**, 165–172.
44. Najera, H., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: Insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J.* **370**, 785–792.

45. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y., and Dobson, C. M. (2000). A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **300**, 11–16.
46. Vázquez Contreras, E., Pérez Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B. G., and Cháñez-Cárdenas, M. E. (2005). The unfolding and refolding reactions of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* follow similar pathways. guanidinium hydrochloride studies. *AIP-Conf.Proc.* **757**, 156–167.
47. Zomosa-Signoret, V., Hernandez-Alcantara, G., Reyes-Vivas, H., Martinez-Martinez, E., Garza-Ramos, G., Perez-Montfort, R., Tuena De Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (2003). Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* **42**, 3311–3318.
48. Nájera, H., Dagdug, L., and Fernández-Velasco, D. A. (2007). Thermodynamic and kinetic characterization of the association of triosephosphate isomerase: The role of diffusion. *Biochimica et Biophysica Acta* **1774**, 985–994.
49. Vázquez-Contreras, E., Brenda Guadalupe Sánchez-Rebollar, B. G., and Cháñez-Cárdenas, M. E. (2004). "The equilibrium folding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* is a four state process. Intrinsic fluorescent studies". *J. Mex. Chem. Soc.* **48**, 296–299.
50. Fernandez-Velasco, D. A., Sepulveda-Becerra, M., Galina, A., Darszon, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1995). Water requirements in monomer folding and dimerization of triosephosphate isomerase in reverse micelles. Intrinsic fluorescence of conformers related to reactivation. *Biochemistry* **34**, 361.
51. Silverman, J. A., and Harbury, P. B. (2002). The equilibrium unfolding pathway of a (β/α)₈ barrel. *J. Mol. Biol.* **324**, 1031–1040.
52. Zitzewitz, J. A., and Matthews, C. R. (1999). Molecular dissection of the folding mechanism of the alpha subunit of tryptophan synthase: An amino-terminal autonomous folding unit controls several rate-limiting steps in the folding of a single domain protein. *Biochemistry* **38**, 10205–10214.
53. Pan, H., Raza, A. S., and Smith, D. L. (2004). Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **336**, 1251–1263.
54. Hocker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., Lustig, A., and Sterner, R. (2001). Dissection of a ($\alpha\beta$)₈-barrel enzyme into two folded halves. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 32–36.
55. Sun, A. Q., Yuksel, K. U., and Gracy, R. W. (1993). Limited proteolysis of triose-phosphate isomerase and characterization of the catalytically active peptide complex. *J. Biol. Chem.* **268**, 26872–26878.
56. Vogel, K., and Chmielewski, J. (1994). Rapid and efficient resynthesis of proteolyzed triose phosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11163–11164.
57. Ray, S. S., Balam, H., and Balam, P. (1999). Unusual stability of a multiply nicked form of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* **6**, 625–637.
58. Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Mendoza-Hernández, G., López-Velázquez, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (2002). Susceptibility to Proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins* **48**, 580–590.
59. Bertolaet, B. L., and Knowles, J. R. (1995). Complementation of fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry* **34**, 5736–5743.
60. Knowles, J. R., and Albery, W. J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: The energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* **10**, 105–111.
61. Farber, G. K., and Petsko, G. A. (1990). The evolution of β/α barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 228–234.

62. Reardon, D., and Farber, G. K. (1995). The structure and evolution of β/α barrel proteins. *FASEB J.* **9**, 497–503.
63. Tellez-Valencia, A., Avila-Rios, S., Perez-Montfort, R., Rodriguez-Romero, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., Lopez-Calahorra, F., and Gomez-Puyou, A. (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 958–963.
64. Tellez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernandez-Santoyo, A., Perez-Montfort, R., Costas, A., Rodriguez-Romero, A., Lopez-Calahorra, F., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (2004). Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* **341**, 1355–1365.
65. Chánez-Cárdenas, M. E., and Vázquez-Contreras, E (2002). “Two notably similar proteins follow different unfolding pathways”. *J. Mex. Chem. Soc* **46**, 219–222.