



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

“Diferencias en la estabilidad en la triosafosfato isomerasa mutante E104D
de *T. cruzi* y *T. brucei*”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Yolanda Aguirre Fuentes

Tutor: Dr. Armando Gómez Puyou

Instituto de Fisiología Celular

Comité tutor: Dr. Diego González Halphen, Instituto de Fisiología Celular

Dr. Alejandro Fernández Velasco, Facultad de Medicina

México, D.F., septiembre del 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Miembros del Jurado

Presidente: Dr. Ruy Pérez Montfort

Secretario: Dr. Diego González Halphen

Vocal: Dr. Horacio Reyes Vivas

Vocal: Dr. Miguel Costas Basín

Vocal: Dra. Alejandra Hernández Santoyo

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou y al Dr. Armando Gómez Puyou

Dedicado también a:

Mi mamá Yolanda Fuentes Mendiola

Mis tíos Mario Aguirre Beltrán y Rosario Cobo González

Mi sobrino José Pablo Aguirre Morales

Mis primos Maura González Aguirre y Erick Cruz Terán

Dr. Diego González Halphen

Dr. Abel Moreno Cárcamo

Dr. Alfredo Osornio Rojo

Lic. Pedro García Urigüen

Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro

Lic. Cristina Fraustro de Aranda

Rocío Romualdo Martínez

Med. Valentín Mendoza Rodríguez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 104 oriente del departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México, con la tutoría del Dr. Armando Gómez Puyou.

Durante mis estudios de doctorado tuve una beca CONACYT con el número de registro 204718.

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Armando Gómez Puyou

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou

A los miembros del comité tutor

A los miembros del jurado

Agradecimientos en cada parte del proyecto:

Cristalografía de proteínas:

Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Dr. Alfredo Torres Larios

Dr. Pavel Afonine

Estudios de calorimetría diferencial de barrido:

Dr. Miguel Costas Basín

Bioquímica y Biología Molecular:

Biol. Nallely Cabrera González

Q.F.B. Concepción José Núñez

Q.F.B. Beatriz Aguirre López

Biol. Guadalupe Códiz Huerta

Unidad de cómputo:

Biol. Gerardo Coello Coutiño

Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo

Ing. Ivette Rosas Arciniega

Coordinación de enseñanza:

Sara Méndez Ibáñez

Rocío Romualdo Martínez

Rosario Villaseñor

Dr. Fernando López Casillas

Dra. Martha Contreras Zentella

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dra. Teresa Lara Ortiz

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Dra. Leticia Ramírez Silva

Biblioteca:

Mtra. Sandra Moncada Hernández

Javier Gallegos Infante

Brisa Robles Vidal

Nancy Rentería Santibañez

Patricia Morales de la Rosa

Agradecimientos a familiares y amigos

Gabriel Aguirre Fuentes, Noelle Morales de Aguirre, Zoila Aguirre Beltrán, Lourdes Aguirre Beltrán, Rosalía Aguirre Beltrán, Teresa Aguirre Beltrán, Cristina Aguirre Beltrán, Socorro Terán Beltrán, Diego Cruz Lara, Miroslava Cruz Terán, Karla Paola Muñoz Terán, Alejandra Robles Suastegui, Fredy Vega, Carlos Beltrán Palma, Carolina Andrade Aguirre, Ignacio Andrade Ayala, Genoveva García Aguirre, Miguel Angel Villar Aguirre, Silvia Fuentes Mendiola, Gonzalo Fuentes Mendiola, Melo Fuentes Mendiola, Arturo Fuentes Mendiola, Fátima Soto Hernández, Paulina Díaz Guzmán, Sandra Osorio, Rolando Berrío, Alexis Castañeda Pérez de Alejo, Williams Calero Calero, Edelmis Anoceto Vega, Islaín Calero Calero, Lailí Pérez Negrín, Alain Garrido Pérez, Lizbeth Ramírez Vidal, Aarón Hernández Cid, Igor Valencia Sánchez.

Índice general

Resumen	i
Abstract	ii
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	v
Abreviaturas	vi
Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1. La triosafosfato isomerasa	3
1.1.1. El barril TIM	3
1.1.2. Mecanismo catalítico en la interconversión de GAP ↔ DHAP	4
1.2. La deficiencia de la TIM en el humano	5
1.3. El ácido glutámico 104 y los residuos de la cavidad en la interfase del dímero	7
1.4. Características generales y ciclo evolutivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , y <i>Giardia lamblia</i>	8
1.4.1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.4.2. Ciclo celular de <i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.4.3. <i>Giardia intestinalis</i>	11
2. Objetivo general	14
3. Objetivos particulares	14
4. Materiales y métodos	15
4.1. Actividad enzimática	15
4.2. Mutagénesis sitio específica, expresión y purificación de las proteínas	15
4.2.1. TbTIM y TcTIM silvestre y mutante E104D	15
4.2.1. HsTIM y GlTIM silvestre y mutante E104D	16
4.3. Cristalización de las proteínas	17
4.4. Determinación de la estructura tridimensional	17

4.5. Calorimetría diferencial de barrido	18
5. Resultados	19
5.1. Cinética enzimática	19
5.2. Estudios de termoestabilidad	19
5.3. Sensibilidad al reactivo sulfhidrilo DTNB	24
5.3.1. Efectos cinéticos de derivatizantes de grupos sulfhidrilos	25
5.3.2. La mutante E104D de humano y su sensibilidad al DTNB	28
5.3.3. Derivatización de los residuos de cisteína por el DTNB en las TIMs de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>H. sapiens</i>	29
5.4. La desnaturalización térmica de las TIMs de <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i> , siguen el modelo irreversible de dos estados	33
5.4.1. Activación, desplegamiento, y contribución de las barreras de solvatación	42
5.5. Determinación de la estructura cristalográfica de las TIMs mutantes de tripanosomas	49
5.5.1. Estructura de la mutante E105D de la TIM de <i>T. cruzi</i>	49
5.5.2. Estructura de la mutante E104D de la TIM de <i>T. brucei</i>	49
5.5.3. El Glu 104	56
5.5.4. El residuo de Asp en la TIM de <i>H. sapiens</i>	56
5.5.5. El residuo de Asp en la TIM de <i>T. cruzi</i>	57
5.5.6. El residuo de Asp en la TIM de <i>T. brucei</i>	59
5.5.7. El puente salino en la interfase	62
6. Discusión y conclusiones	66
7. Perspectivas	72
8. Anexo	73
9. Referencias	80
10. Artículo publicado	86

Resumen

Los aminoácidos que existen en las enzimas homólogas por lo general corresponden a residuos que participan en la catálisis o son esenciales para el plegamiento y la estabilidad de las proteínas, sin embargo, no es muy clara la función de los residuos conservados que no son catalíticos. No se conoce si dichos residuos son de igual importancia o si tienen el mismo papel entre las diferentes enzimas homólogas. La mutación E104D en la triosafosfato isomerasa (TIM) de humano, es la mutación más frecuente y también la responsable de una enfermedad autosómica rara, que causa la deficiencia de la TIM en el humano. En este trabajo exploramos si la mutación E104D tiene el mismo impacto en las TIMs de cuatro organismos (*Homo sapiens*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*). Encontramos que la mutación no afectaba las propiedades catalíticas de las enzimas, sin embargo, si alteraba la velocidad y la proporción de los dímeros activos a partir de los monómeros desplegados de una manera diferente para cada enzima estudiada. También encontramos que su efecto en la velocidad de desnaturalización irreversible y la energía del estado de transición fueron muy dependientes del contexto molecular en cada TIM. Por ejemplo, los cambios en la energía de activación varían de 430 kJ mol⁻¹ en la HsTIM, a -78 kJ mol⁻¹ en la TcTIM.

Con nuestros resultados podemos concluir que el papel de los residuos conservados no catalíticos en las TIMs es dependiente de su contexto molecular. De acuerdo con esto, cada proteína tiene una secuencia particular y un grupo de interacciones distintivas, que le confieren una identidad única que ha evolucionado para optimizar la función y la estabilidad de su estructura de acuerdo al organismo al que pertenece.

Abstract

It is generally assumed that the amino acids that exist in all homologous enzymes correspond to residues that participate in catalysis, or that are essential for folding and stability. Although this holds for catalytic residues, the function of conserved noncatalytic residues is not clear. It is not known if such residues are of equal importance and have the same role in different homologous enzymes. In humans, the E104D mutation in triosephosphate isomerase (TIM) is the most frequent mutation in the autosomal diseases named “TPI deficiencies.” We explored if the E104D mutation has the same impact in TIMs from four different organisms (*Homo sapiens*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei*). The catalytic properties were not significantly affected by the mutation, but it affected the rate and extent of formation of active dimers from unfolded monomers differently. Scanning calorimetry experiments indicated that the mutation was in all cases destabilizing, but the mutation effect on rates of irreversible denaturation and transition-state energetics were drastically dependent on the TIM background. For instance, mutational changes in activation energy ranged from 430 kJ mol⁻¹ in HsTIM to -78 kJ mol⁻¹ in TcTIM. Thus, in TIM the role of a conserved noncatalytic residue is drastically dependent on its molecular background. Accordingly, it would seem that because each protein has a particular sequence, and a distinctive set of amino acid interactions, it should be regarded as a unique entity that has evolved for function and stability in the organisms to which it belongs.

Índice de figuras

Figura 1.	El barril TIM	3
Figura 2.	Mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa	5
Figura 3.	La mutación E104D perturba el grupo conservado de residuos y la red de agua	6
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 5.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	10
Figura 6.	Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i>	12
Figura 7.	Curva de inactivación térmica de la triosafosfato isomerasa silvestre y mutante de <i>T. cruzi</i>	20
Figura 8.	Curva de inactivación térmica de la triosafosfato isomerasa silvestre y mutante de <i>T. brucei</i>	21
Figura 9.	Curva de inactivación térmica de la triosafosfato isomerasa silvestre y mutante de <i>G. lamblia</i>	22
Figura 10.	Curva de la inactivación enzimática a una sola temperatura 48 °C en función del tiempo en las proteínas mutantes	23
Figura 11.	Reacción de Ellman	24
Figura 12.	Curva de inactivación enzimática en función de la concentración de DTNB	27
Figura 13.	Curva de inactivación de la enzima silvestre y mutante de humano	28
Figura 14.	Curva de absorbancia del anión 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB ²⁻) a una longitud de onda de 412 nm en la TIMs de <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>	30
Figura 15.	Curva de absorbancia del anión 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB ²⁻) a una longitud de onda de 412 nm, en las TIMs de humano	32
Figura 16.	Perfiles experimentales de la capacidad calorífica en función de la temperatura para la TIMs de <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i> .	34
Figura 17.	Perfiles experimentales de la capacidad calorífica en función de la temperatura para la TIMs de <i>H. sapiens</i> y <i>G. lamblia</i> .	35
Figura 18.	Gráfica de Arrhenius	36

Figura 19.	El efecto de la concentración de la urea en la temperatura máxima de la transición calorimétrica (T_m) para las TIMs estudiadas	40
Figura 20.	Correlación entre el cambio de la temperatura de desnaturalización (ΔT_m) y el cambio de la superficie de acceso al solvente durante el estado de transición ($\Delta(m^\ddagger/m_{EQ})$) para las TIMs estudiadas	41
Figura 21.	Representación de las barreras de solvatación/desolvatación en el proceso de desplegamiento/plegamiento, respectivamente	42
Figura 22.	Activación, solvatación y desplegamiento, contribuciones a la entalpía, entropía, y energía libre en función del grado fraccional del desplegamiento en el estado de transición, m^\ddagger/m_{EQ} en las TIMs estudiadas	46
Figura 23.	Efecto de la mutación E104D [$\Delta\Delta X = \Delta X (E104D) - \Delta X (wt)$] en la activación, desplegamiento, entalpía, entropía y energía libre en función del cambio de la superficie expuesta al solvente en el estado de transición [$\Delta(m^\ddagger/m_{EQ}) = m^\ddagger/m_{EQ}(E104D) - m^\ddagger/m_{EQ}(wt)$], en las TIMs estudiadas	47
Figura 24.	Efecto de la mutación E104D. Correlación entre el cambio de la activación y la energía del desplegamiento en función del cambio de temperatura en la desnaturalización, ΔT_m , en las TIMs estudiadas	48
Figura 25.	Estructura de la mutante E105D de la triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Figura 26.	Estructura de la mutante E105D de la triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>	53
Figura 27.	Comparación de la estructura de la mutante y la silvestre de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 28.	Superposición de los diferentes dímeros presentes en la unidad asimétrica de la mutante de <i>T. brucei</i>	55
Figura 29.	Un nuevo puente de hidrógeno se forma entre el Asp 105 y la Gly 95 en la mutante de <i>T. cruzi</i> .	58
Figura 30.	El puente salino en la interfase	64

Índice de tablas

Tabla 1.	Constantes cinéticas de las enzimas silvestres y mutantes E104D	19
Tabla 2.	Numeración de los residuos de cisteína en la secuencia primaria de las TIMs de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>H. sapiens</i>	25
Tabla 3.	Número de cisteínas derivatizadas en un monómero e inicio de la meseta o la agregación de las enzimas de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>H. sapiens</i> .	31
Tabla 4.	Energía de activación E_A (kJ mol ⁻¹), constante de velocidad de primer orden k (min ⁻¹) a 37°C, cinética de urea m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹) valor (m_{EQ}), urea m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹) valor de m en el desplegamiento al equilibrio (m_{EQ}), grados fraccionales de la exposición al solvente (~grados fraccionales del desplegamiento) en el estado de transición (m^\ddagger/m_{EQ}) para las TIMs silvestres y mutantes E104D	37
Tabla 5.	Estadística de la colecta y afinamiento de las estructuras de la mutante E105D de TcTIM y de la E104D de TbTIM	51
Tabla 6.	Contactos a distancia de puente de hidrógeno del Glu/Asp 104 en las enzimas de <i>H. sapiens</i>	57
Tabla 7.	Contactos a distancia de puente de hidrógeno del Glu/Asp 104 en las enzimas de <i>T. cruzi</i>	59
Tabla 8.	Contactos a distancia de puente de hidrógeno del Glu/Asp 104 en las enzimas de <i>T. brucei</i>	60
Tabla 9.	Distancia del puente salino de la interfase en las TIMs de <i>H. sapiens</i> , <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>	65

Abreviaturas

RMS	Valor cuadrático medio (del inglés: root mean square)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
NADH	Deshidrogenasa de nicotinamida adenina dinucleótido
TEA	Trietanolamina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
RPM	Revoluciones por minuto
TEV	Proteasa del virus del tabaco (del inglés: tobacco etch virus)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DTT	Ditiotreitol
V_{max}	Velocidad máxima
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_{cat}	Constante catalítica
PEG	Polietilenglicol
ASA	Área de superficie de acceso al solvente
α-GDH	α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani

Introducción

Uno de los conceptos que se han derivado del análisis de la secuencia de aminoácidos de numerosas proteínas, es la relación de un aminoácido conservado y su importancia en la función de la proteína. De acuerdo con este punto de vista, se espera que la mutación de un residuo conservado resulte en una enzima afectada en su función catalítica o en la disminución de la estabilidad estructural.

Se sabe que mutaciones de los residuos catalíticos afectan la actividad enzimática, sin embargo, la contribución y la función de otros residuos conservados a lo largo de la evolución, no se conoce completamente. Esto en parte se debe a que el plegamiento, la función y la estructura de las proteínas está determinada por una red de interacciones de los aminoácidos vecinos y distantes (1-6). Esto indica que inclusive en las proteínas con una alta identidad y similitud, los contactos directos y las interacciones a larga distancia no son las mismas en las enzimas homólogas, por lo tanto, un residuo conservado puede contribuir de manera diferente a las propiedades generales en las diferentes enzimas homólogas.

Para comprender más sobre este aspecto, en este trabajo estudiamos la mutación E104D en la triosafosfato isomerasa, una enzima ubicua que cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3 fosfato y la dihidroxiacetona fosfato (7, 8). La enzima es un homodímero que es activa solamente en su forma dimérica (9, 10). La mutación E104D es la más común y responsable de la deficiencia de la TIM en el humano, una enfermedad autosómica rara que resulta en la muerte prematura de los individuos homocigotos (11, 13). Se ha reportado que los individuos afectados muestran niveles reducidos de la actividad de la TIM, principalmente debido a una disminución en la estabilidad de la mutante (14). Sin embargo, no es muy claro cómo la mutación de un aminoácido conservado tiene un efecto tan diferente en la estabilidad de enzimas homólogas. Para examinar esta posibilidad, comparamos el efecto de la mutación E104D en las TIMs de cuatro organismos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Giardia lamblia*, y *Homo sapiens* (TcTIM, TbTIM, GITIM, y HsTIM, respectivamente).

Las cuatro enzimas silvestres tienen propiedades catalíticas comparables, todas comparten el barril estructural clásico (α/β)₈, y el RMS de sus estructuras cristalográficas es aproximadamente de 0.9 Å (14,17). Sin embargo, las cuatro enzimas difieren en el número de aminoácidos en sus respectivos monómeros: HsTIM y TbTIM tienen 250 residuos, TcTIM tiene 251 (un residuo extra al inicio de su secuencia) y la GITIM tiene 256 residuos (en relación a la secuencia de la HsTIM, tiene dos residuos extras en la posición 155 y 156, y cuatro residuos adicionales en el extremo carboxilo terminal).

En este trabajo, utilizamos la abreviatura E104D, para referirnos a la mutación correspondiente. Adicionalmente queremos destacar que la identidad entre TcTIM y TbTIM es del 73%, mientras que para TcTIM y TbTIM con la de HsTIM es de 49 y 52%, respectivamente. GITIM comparte 45% de identidad con HsTIM, y 47% y 45% con TcTIM y TbTIM, respectivamente. Por lo tanto, las cuatro enzimas son un buen modelo para comparar el efecto de la mutación E104D en los diferentes contextos moleculares.

Las propiedades catalíticas de las mutantes E104D fueron muy similares a las enzimas silvestres correspondientes, sin embargo, la mutación afectó de manera diferente la asociación de los monómeros desplegados para formar dímeros activos en las diferentes enzimas. Mediante el estudio de calorimetría diferencial de barrido (CDB), también se observaron diferencias en la termoestabilidad y en la estabilidad cinética. Los datos en general, muestran que el efecto de la mutación E104D depende del contexto molecular que ha sido seleccionado en las diferentes enzimas a través de la evolución.

1. Antecedentes

1.1. La triosafosfato isomerasa

1.1.1. El barril TIM

La enzima triosafosfato isomerasa es un homodímero formado por dos subunidades de aproximadamente 27 kDa, que corresponde a la clase de enzimas con estructura tipo barril (α/β)₈, un cilindro formado por ocho unidades repetidas. Cada región o unidad se compone por una hebra β y una α hélice, estos segmentos se ordenan de tal manera que la superficie interna del barril está recubierta por las hebras β mientras que la superficie externa corresponde a las α hélices.

Las hebras β y las α hélices se enumeran desde el extremo amino terminal, como β 1- β 8 y α 1- α 8, respectivamente (figura 1).

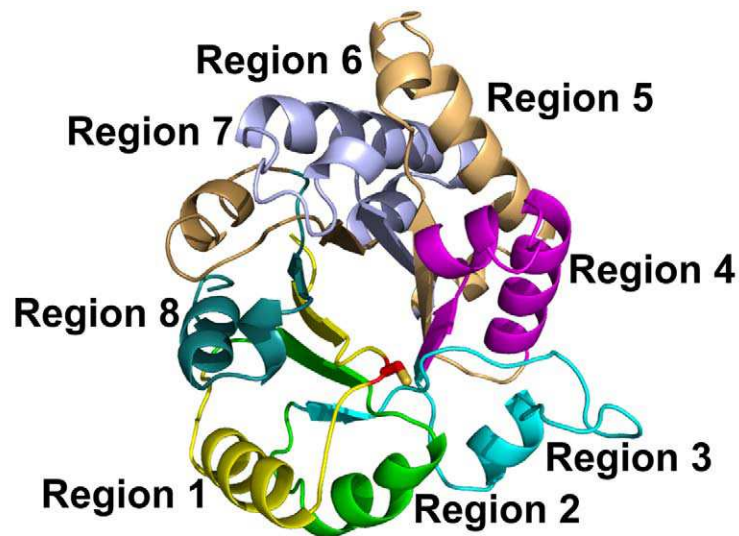


Figura 1. Muestra el motivo barril α/β de un monómero de la TIM, con las ocho regiones enumeradas en orden ascendente, desde el extremo amino al carboxilo terminal (3).

La TIM fue la primera proteína en la que se describió el motivo de barril α/β , por lo que también se le ha denominado “barril TIM” (47). Este motivo es el más común en la base “The Protein Data Bank” (PDB); una gran parte de las enzimas más eficientes desde el punto de vista catalítico comparten este motivo estructural.

1.1.2. Mecanismo catalítico en la interconversión de GAP \leftrightarrow DHAP

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima esencial, ubicua, que forma parte de la vía glucolítica, cataliza la reacción de interconversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP), a través del intermediario enediol. El grupo de Jeremy Knowles (7) ha demostrado que la TIM alcanza la perfección catalítica, esto significa que la velocidad de la reacción bimolecular de la enzima y el sustrato está limitada solamente por la difusión, y que tiene una K_{cat} de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La conversión de GAP hacia el intermediario enediol es catalizada por una base general, la cual extrae un protón del C2 de GAP y por un ácido general que protona el átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Mediante estudios de rayos-X, se reveló que la cadena lateral del Glu 165 se encuentra en una posición ideal para la extracción del protón del C2 de GAP (figura 2) y que la His 95 forma un puente de hidrógeno con el GAP, de tal manera que le permite la protonación del oxígeno del grupo carbonilo. Es posible que la carga positiva de la cadena lateral de la Lys12 estabilice electrostáticamente al intermediario enediol. En la conversión del intermediario enediol a DHAP el Glu 165 actúa como un ácido general y protona al C1, mientras que la His 95 se comporta como una base general, extrayendo el protón del grupo OH y restableciendo los grupos catalíticos a su estado original.

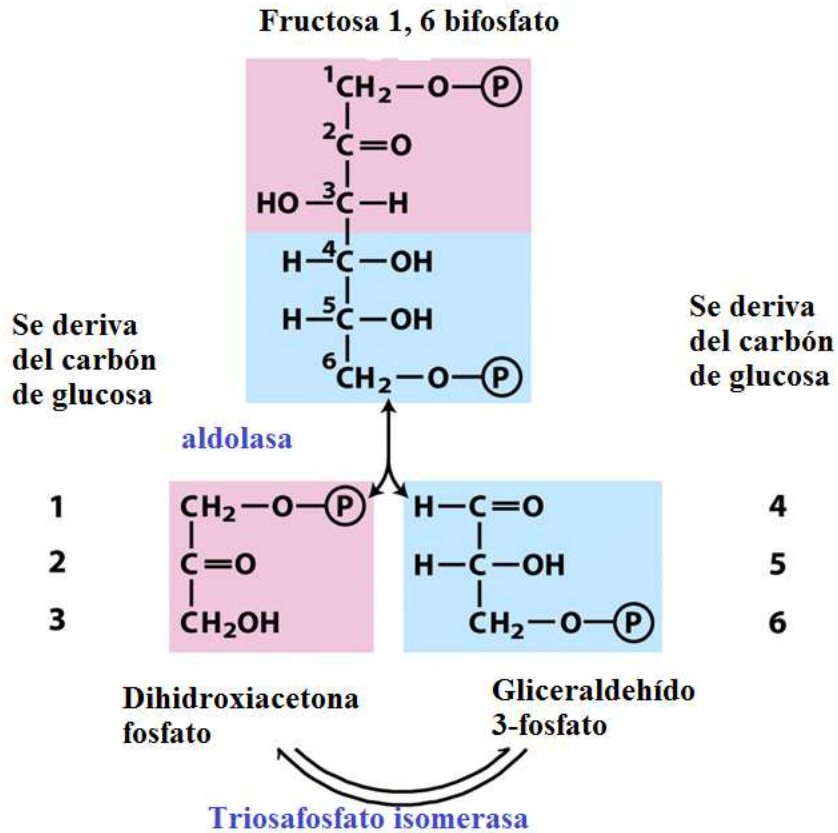


Figura 2. Mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa. Principios de Bioquímica de Lehninger, 5ª edición 2008.

1.2. La deficiencia de la TIM en el humano

La deficiencia de la TIM en el humano es una enfermedad autosómica rara que causa la muerte prematura en los individuos homocigotos. Se manifiesta clínicamente por una anemia hemolítica crónica, así como por alteraciones neurológicas, neuromusculares y cardiomiopatías. El cambio de un Glu por un Asp en la posición 104 es la mutación más frecuente y responsable de la deficiencia de la TIM en el humano; representa aproximadamente el 80% de los alelos mutantes (11).

La deficiencia de la TIM se caracteriza por una disminución de la actividad enzimática, que se acompaña por la elevación del sustrato DHAP. Este fenómeno es característico en los eritrocitos, ya que estas células carecen de un núcleo y de un sistema de endomembranas con

las enzimas necesarias para el metabolismo del DHAP, por lo que este sustrato resulta en un producto final que se acumula en el interior de la célula.

En un trabajo previo en el laboratorio (14), se determinó la estructura cristalográfica de la TIM mutante E104D de humano a una resolución de 1.85 Å. En la estructura se observó que el Glu 104 es parte de un grupo de diez residuos de aminoácidos en la interfase del dímero, con cinco correspondiendo a cada subunidad. Estos revisten la superficie de la cavidad que participa en la unión entre los dos monómeros. En la cavidad hay numerosas moléculas de agua que se ordenan a manera de una red y median las interacciones entre los residuos de ambas subunidades.

En la estructura de la mutante, se observó que la red de moléculas de agua estaba alterada, así como los contactos entre los residuos vecinos al Asp 104. El acortamiento de la cadena lateral por un grupo metilo (Glu-Asp), resulta en la pérdida de un contacto con la Arg 98 en la misma subunidad (figura 3) la cual a su vez, forma un puente salino con el Glu 77 de la otra subunidad.

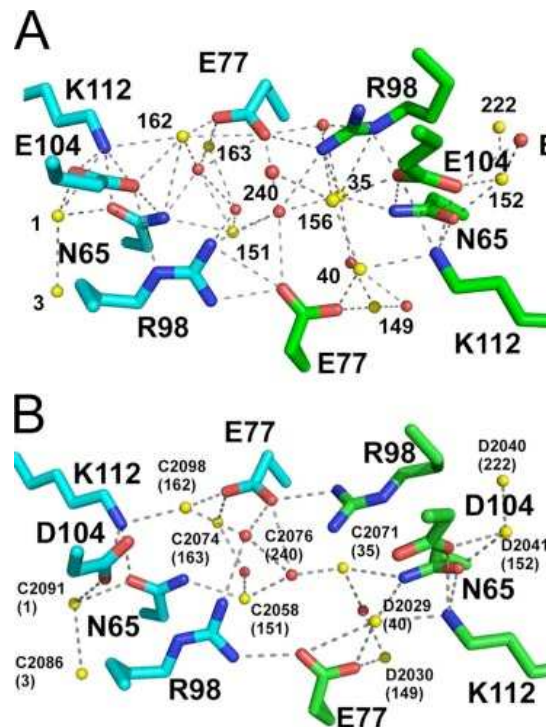


Figura 3. La mutación E104D perturba el grupo conservado de residuos y la red de agua. Se muestra la comparación entre la estructura de la enzima silvestre HsTIM (A) y la mutante HsTIM E104D (B). Las

líneas punteadas representan interacciones polares en la región, con una distancia máxima de 3.5 Å. Las moléculas de agua conservadas se muestran en esferas amarillas. Los valores en paréntesis en B, indican el número equivalente de la molécula de agua en la enzima silvestre (tabla SII, ref 14). Las moléculas de agua no conservadas se representan en esferas rojas. Los pares de moléculas de agua conservadas relacionadas por simetría en el dímero, son las siguientes: código pdb (1WYI) 1-152, 3-222, 35-151, 40-162 y 149-163. Los residuos de los dos diferentes monómeros se representan en cian y verde (14).

Rodríguez- Almazán *et al.* (14) demostraron mediante estudios bioquímicos que la asociación de los monómeros estaba afectada en la enzima mutante, igual que su estabilidad cuaternaria, ya que la mutante tiende a monomerizarse en condiciones en las que la enzima silvestre conserva su estado dimérico.

1.3. El ácido glutámico 104 y los residuos de la cavidad en la interfase del dímero

El ácido glutámico forma parte de la superficie de la cavidad en la interfase del dímero; los residuos que participan en el revestimiento de dicha cavidad, varían según el organismo al cual pertenece la TIM, sin embargo, existen 10 residuos conservados en todas las TIMs de eucariotas: Asn 65, Glu 77, Arg 98, Glu 104, Lys 112 (cinco residuos corresponden a cada subunidad). De estos residuos, solamente se conserva el Glu 104 en la secuencia de todas las TIMs de eucariotas y bacterias, lo que sugiere su importancia en la estabilidad del dímero.

Los diez residuos conservados en las TIMs de eucariotas, son sustituidos en las TIMs de arqueas por residuos polares sin carga y no polares, esto sugiere que la estabilidad de la estructura cuaternaria en estas proteínas está dada por otros arreglos en su arquitectura. Por ejemplo, la TIM de *Thermoproteus tenax* (48) forma un tetrámero, mediante la asociación de dos dímeros clásicos. Esta unión se establece mediante interacciones hidrofóbicas. Además de un estado oligomérico más complejo, otras de las estrategias que han desarrollado estas proteínas son: un incremento en los contactos entre subunidades, un mayor empaquetamiento de la estructura (acortamiento de las asas y una disminución del número de las cavidades en el interior de la proteína) (48).

1.4. Características generales y ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, y *Giardia lamblia*.

T. brucei y *T. cruzi* pertenecen a la clase Kinetoplastea, son protistas flagelados y se caracterizan por la presencia de una estructura prominente llamada cinetoplasto, una red de ADN localizado en el interior de una mitocondria única, ramificada por todo el cuerpo del protozoario (49).

La familia Trypanosomatidae incluye los siguientes géneros: Blastocrithidia, Crithidia, Endotrypanum, Herpetomonas, Leishmania, Leptomonas, Phytomonas y Trypanosoma. El género Trypanosoma es uno de los más importantes dentro de la familia Trypanosomatidae por incluir una serie de especies patógenas, como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, agentes causales de la enfermedad de Chagas y de la enfermedad del sueño, respectivamente.

1.4.1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* es muy complejo, con numerosas etapas de desarrollo en los vectores biológicos y en los hospederos. *T. cruzi* posee variaciones morfológicas y funcionales, alternando entre estadios que sufren la división binaria y las formas no replicativas e infectantes.

T. cruzi se transforma en epimastigote (forma replicativa) en el intestino posterior del insecto vector, donde también se diferencia en tripomastigote metacíclico (un proceso conocido como metaciclogénesis), estas formas son eliminadas a través de las heces y la orina del insecto vector.

El tripomastigote cíclico es la forma infectante del parásito, que puede invadir las mucosas o la piel en el hospedero vertebrado, mediante la picadura del insecto infectado (triatominae “chinche besucona”, que mientras pica deposita sus heces infectadas). En el sitio de entrada, el parásito infecta los primeros tipos celulares que encuentra: macrófagos, fibroblastos o células epiteliales. En el interior de la célula se transforma en amastigote y se multiplica por fisión binaria. Posteriormente se diferencia en tripomastigote, el cual, mediante la lisis celular, se libera al espacio intercelular. El tripomastigote cíclico viaja por el torrente

sanguíneo para invadir diferentes tipos celulares, como el sistema reticuloendotelial, el muscular y el sistema nervioso principalmente (figura 4).

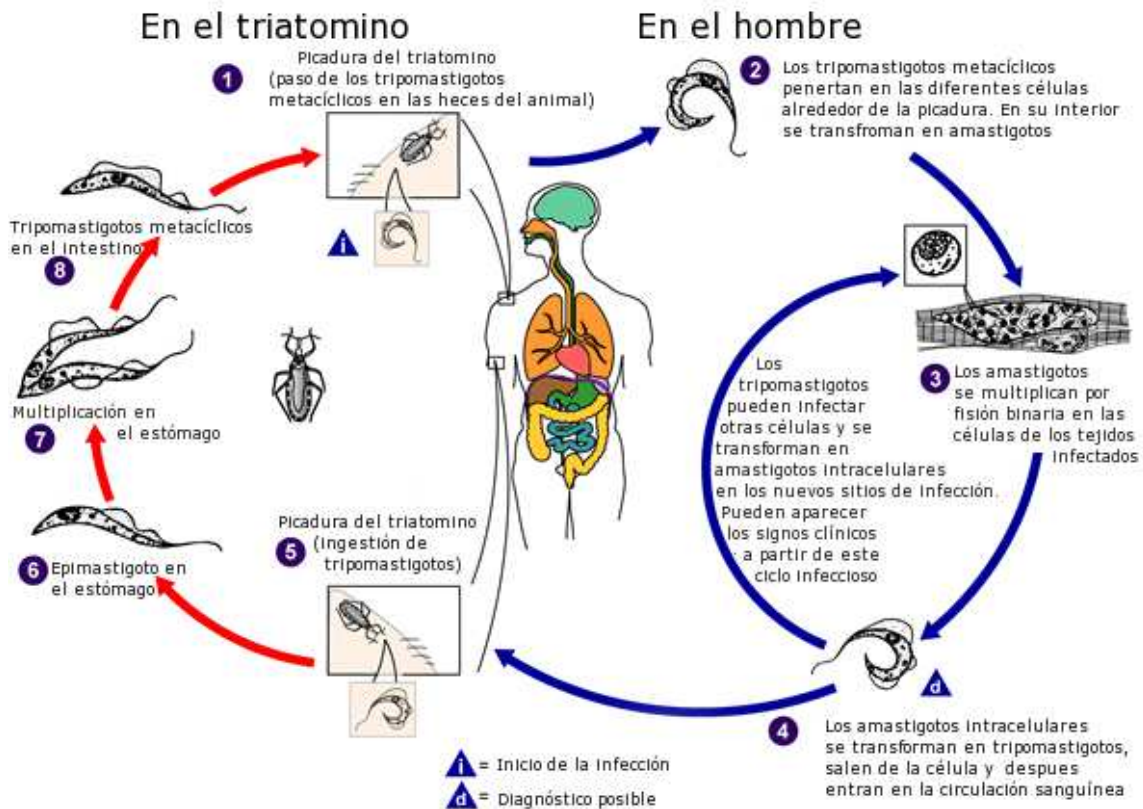


Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. En el hospedero invertebrado (6) formas epimastigotes se multiplican en el lumen del intestino. La diferenciación de tripomastigotes metacíclicos (8) ocurre en la porción final del intestino. Estas formas infectan al hospedero vertebrado (2). En la célula hospedera, los tripomastigotes se transforman en amastigotes esféricos (3), los cuales se replican por fisión binaria, y cuando éstos saturan el citoplasma celular, nuevamente se transforman en tripomastigotes flagelados. Los tripomastigotes inducen la lisis celular e invaden tejidos adyacentes, y se diseminan por el torrente sanguíneo y linfático a tejidos distantes, principalmente al tejido muscular (cardíaco, liso y esquelético) y a las células ganglionares, donde se multiplican (4). El ciclo se cierra cuando el individuo infectado es picado por el triatomino (ref. 50).

1.4.2. Ciclo celular de *Trypanosoma brucei*

La mosca tse tse (género *Glossina*), es el hospedero invertebrado de *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, estos parásitos proliferan en el intestino medio de la mosca y luego migran a las glándulas salivales del insecto. La mosca se alimenta de la sangre de mamíferos y mediante su picadura transmite la forma infectante de *T. brucei*: los tripomastigotes metacíclicos (figura 5). En el sitio de entrada, los tripomastigotes metacíclicos infectan a las células del sistema linfático y viajan por el torrente sanguíneo a diferentes órganos y tejidos.

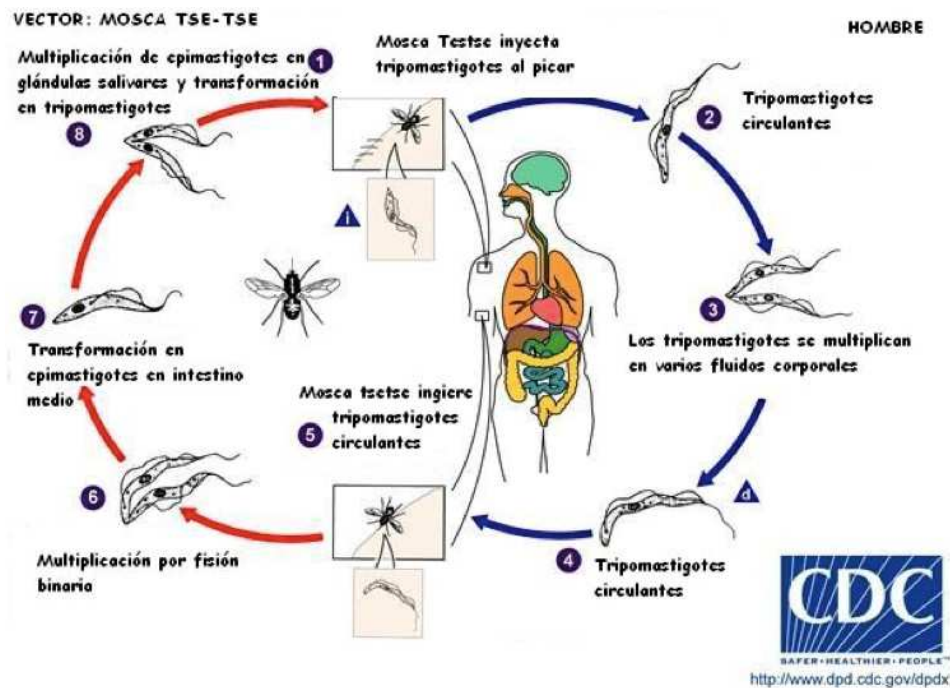


Figura 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. El parásito alterna un ciclo celular en el insecto vector y otro en el hospedero mamífero. Ambas especies: *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, son organismos extracelulares. La etapa de la infección humana, se le conoce como metacíclica, los tripanosomas se transforman en tripomastigotes (forma delgada y larga). En el sitio de entrada, los tripanosomas se multiplican por fisión binaria, e infectan a las células del sistema linfático y viajan por el torrente sanguíneo a diferentes órganos y tejidos.

1.4.3. *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis es un protozoo flagelado que pertenece a la clase de Zoomastigophorea y a la orden Diplomonadina (géneros: *Giardia*, *Spironucleus*, *Trepomonas*, y *Hexamita*) representan formas de vida muy temprana, las primeras ramificaciones del linaje eucariota. Se les describe como “fósiles biológicos”, ya que tienen características muy peculiares (dos núcleos, diferente código genético, y carecen de mitocondrias) también conservan propiedades de arqueas y bacterias.

Giardia intestinalis (también conocida como *Giardia lamblia* y *Giardia duodenalis*) es el protozoo entérico más común en el humano. En los países en vías de desarrollo, alrededor de 200 millones de personas presentan giardiasis sintomática y cada año se reportan 500,000 casos nuevos (51).

G. intestinalis tiene un ciclo evolutivo bifásico (figura 6): a) *exquistación*, el parásito forma una cápsula (la pared está constituida en un 60 % por carbohidratos y un 40 % de proteínas), que lo protege del medio ambiente. Es la forma latente del parásito. El quiste es ingerido, y su metabolismo se activa mediante los ácidos gástricos y sales biliares del estómago del hospedero. Los quistes liberan trofozoítos móviles, los cuales mediante su disco adhesivo se anclan al epitelio del intestino delgado; b) *enquistación*, es un largo proceso de diferenciación, y consiste en la transformación del trofozoíto móvil al quiste infectante; este proceso se induce en respuesta a factores del hospedero, como el incremento de sales biliares, bajo nivel de colesterol, y un pH básico (51).

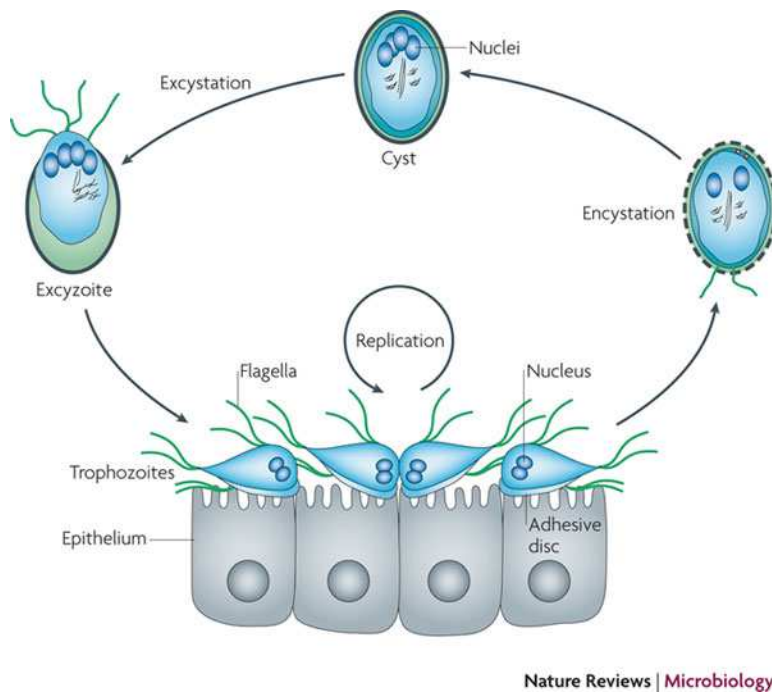


Figura 6. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*. *Excystation*: los quistes de giardia se exponen al ácido gástrico durante su paso en el estómago del hospedero, esto induce una rápida diferenciación de los quistes en trofozoítos vegetativos, el denominado esquizonte. Éste no tiene un disco adhesivo ensamblado y contiene un núcleo tetraploide. El esquizonte se divide dos veces, sin la replicación del ADN, originando cuatro trofozoítos que contienen dos núcleos diploides cada uno. Los trofozoítos se adhieren al epitelio intestinal, mediante su disco adhesivo, con un ciclo replicativo de 6-12 horas *in vitro*. Los trofozoítos comienzan a enquistarse *in vivo*, cuando transitan hacia la parte baja del intestino delgado. La *enquistación* puede dividirse en una fase temprana y una tardía. En la fase temprana, los trofozoítos forman vesículas, que contienen las proteínas necesarias para la síntesis de la pared celular, también durante esta etapa el disco adhesivo se desarmega. Los trofozoítos replican su ADN, pero salen del ciclo celular en la etapa G2, para originar una célula con dos núcleos tetraploides. Durante la enquistación tardía, el núcleo se divide (originando cuatro núcleos diploides) y el ADN se replica, generando quistes con 4 núcleos (haploides 16n). Nuevamente en la etapa tardía de la enquistación, este núcleo se divide y el ADN nuevamente se replica. Los quistes tienen un metabolismo muy bajo y los trofozoítos son muy resistentes a los factores ambientales, tanto que pueden sobrevivir varias semanas en agua fría, fuera del hospedero (51).

Los ciclos celulares de los tripanosomas y de *G. lamblia* son más complejos en comparación con los ciclos de las células humanas. Estos parásitos presentan diversos estadios a lo largo de su vida, y se adaptan a diferentes ambientes como cambios bruscos de pH, concentración de oxígeno y de iones; por lo que las proteínas de estos organismos han adquirido características estructurales necesarias para adaptarse a los diferentes ambientes donde viven estos organismos.

En el presente trabajo, estudiamos el efecto del cambio de un aminoácido conservado en la estructura y función de cuatro proteínas homólogas, comparando el efecto en los diferentes contextos moleculares, en las TIMs pertenecientes a *H. sapiens*, *T. brucei*, *G. lamblia* y *T. cruzi*.

2. Objetivo general

Comparar el efecto de la mutación E104D en la actividad catalítica y en la estabilidad cuaternaria de la triosafosfato isomerasa perteneciente a cuatro organismos: *H. sapiens*, *T. brucei*, *G. lamblia* y *T. cruzi*.

3. Objetivos particulares

- Caracterizar enzimáticamente a las mutantes.
- Estudiar la termoestabilidad de las mutantes mediante estudios bioquímicos y calorimetría diferencial de barrido (CDB)
- Determinar la sensibilidad de las mutantes al agente sulfhidrilo DTNB.
- Determinar la estructura tridimensional de las mutantes mediante cristalografía de rayos -X.

4. Materiales y métodos

4.1. Actividad enzimática

La actividad enzimática se midió en dirección del gliceraldehído 3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), a 25°C. La mezcla de reacción contiene: 100 mM TEA, 10 mM EDTA, pH 7.4, 1 mM GAP, 0.2 mM NADH y 0.9 unidades de α - glicerofosfato deshidrogenasa. La reacción se inicia con la adición de 5 ng/ml de proteína. La oxidación de NADH se monitorea a 340 nm en un espectrofotómetro Hewlett-Packard. Para calcular los parámetros cinéticos, se utilizaron concentraciones de GAP en un intervalo de 0.06 a 2 mM.

4.2. Mutagénesis sitio específica, expresión y purificación de las proteínas

4.2.1. TbTIM y TcTIM silvestre y mutante E104D

Las mutantes E104DTbTIM y E105DTcTIM, fueron construidas a partir de plásmidos que contenían el gen silvestre de TbTIM y TcTIM, respectivamente (18, 19). Los codones GAG y GAA que codifican para el residuo de Glu, en la posición 104 en la TbTIM y 105 en la TcTIM, respectivamente, fueron cambiados por el triplete GAT, que codifica para un Asp. Esto se realizó con el método de Quick-Change (Stratagene) y con la reacción de la DNA polimerasa Vent (New England Biolabs) y los oligonucleótidos fueron: *sentido*: 5'-CGCGCATACTATGGT**GAT**ACAAACGAGATTGTTGCG-3' y *reverso*: 5'-CGCAACAATCTCGTTTGTAT**CACC**ATAGTATGCGCG-3' para la E104DTbTIM, y *sentido*: 5'-GTTTGTACTACGGC**GAT**ACGAACGAAATCGTTGC-3' y *reverso*: 5'-GCAACGATTTTCGTTTCGTAT**CGCC**GTAGTACAAAC-3' para E105DTcTIM.

La cepa de *E. coli* que utilizamos para la sobreexpresión de las mutantes de tripanosomas fue la BL21 (DE3), y para la mutante de humano la BL21-codon plus (-DE3) RIL (Stratagene). Las células se cultivaron a una temperatura de 37° C, en un medio de LB con ampicilina, y se le añadió 0.4 mM de IPTG (cuando el cultivo celular a A₆₀₀ nm tuvo una

densidad óptica de 0.8- 1.2). Las proteínas recombinantes fueron purificadas de acuerdo al protocolo de García Torres, *et al.* (3).

4.2.2. HsTIM y GITIM silvestre y mutante E104D

La enzima recombinante y silvestre de humano se purificaron como se describe en el trabajo de Rodríguez- Almazán *et al* (14), la enzima C202AGITIM (en este trabajo se refiere como GITIM) como describe Enríquez-Flores *et al.* (20). Los experimentos con la TIM de *G. lamblia* se realizaron con la mutante C202A, la mutante presenta parámetros cinéticos muy similares a la enzima silvestre y forma dímeros estables. La mutante E105DC202AGITIM, en el presente proyecto se refiere como E104D GITIM, se fabricó mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR, a partir del plásmido de la mutante C202AGITIM. Los oligonucleótidos de la reacción son los siguientes: *sentido*: 5'-AAGACGCAGAATCATGGGGGATACCGACGAGCAAAGCGCC-3', y *reverso*: 5'-GGCGCTTTGCTCGTCGGTATCCCCCATGATTCTGCGTCTT-3'.

La expresión y la purificación se realizaron como se describe en un trabajo previo (14,18-20). La cepa de *E. coli* BL21 (DE3)- pLysS, se transformó con el plásmido de la mutante E105D GITIM, y el cultivo celular creció a una temperatura de 37° C en un medio LB, con una concentración de ampicilina de 100 mg/ml. La inducción del cultivo se hizo con 0.4 mM de IPTG a una temperatura de 30 ° C, durante toda la noche. En la mañana siguiente, las células se cosecharon y suspendieron en un amortiguador de lisis que contenía 50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl y 10 mM de imidazol a un pH de 8.0.

Las células se sonicaron y se centrifugaron a una velocidad de 45, 000 RPM en un rotor 60 Ti (Beckman) durante una hora. El sobrenadante se cargó a una columna de His Trap HP (GE Healthcare) y la proteína se eluyó mediante un gradiente de imidazol (0-500 mM). La proteína se pasó por una segunda columna Hi Prep 26/10 Desalting column, para intercambiar la solución amortiguadora, necesaria para la actividad de la proteasa TEV: 50 mM Tris HCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0. La proteína recombinante eluída, se incubó durante toda la noche con la TEV, en una relación 20 GITIM/ 1 TEV a 30° C.

Por último, la proteína digerida con TEV se pasó por una tercera columna His Trap HP column (GE Healthcare), para eliminar la etiqueta de histidinas y la proteasa TEV. La enzima silvestre y la mutante de *G. intestinalis* se concentraron a 8 mg/ml en una solución amortiguadora de 100 mM TEA, 10 mM EDTA y 1 mM de DTT.

4.3. Cristalización de las proteínas

La cristalización de las proteínas mutantes se realizó utilizando el método de difusión de vapor en gota sedente. Las gotas contenían una mezcla de la proteína recombinante (35 mg/mL en un amortiguador de trietanolamina 20 mM, 10 mM EDTA, pH 7.4) y el agente precipitante (polietilenglicol monometil éter 2000 al 20% en 0.1 M de Tris pH 8.5, 0.01 M cloruro de níquel hexahidratado) en una relación 1:1 (v/v). Los cristales crecieron después de dos semanas de incubación a 8 °C. Una vez formados los cristales, estos se crioprotegieron mediante el incremento en la concentración del agente precipitante (polietilenglicol monometil éter 2000) hasta llegar al 30%. Para coleccionar los datos de difracción, los cristales se congelaron con nitrógeno líquido. La colecta se realizó con radiación de sincrotrón en el laboratorio nacional de Argon (Southeast Regional Collaborative Access Team (SER-CAT) 22-ID beamline at the Advanced Photon Source) utilizando un detector Mar Mosaic MX-300. Los datos fueron procesados con XDS (21) y escalados con SCALA (22,23).

4.4. Determinación de la estructura tridimensional

La determinación de las fases iniciales para ambas mutantes se realizó mediante el método de reemplazo molecular utilizando las coordenadas atómicas de las estructuras nativas de TcTIM (código PDB, 1TCD) y TbTIM (código PDB, 2J27) como modelos y el programa Phaser (25) incluido en PHENIX (26). Todas las etapas del afinamiento de los modelos se realizaron con el programa PHENIX. La construcción y corrección del modelo se realizó con COOT (27). En las primeras etapas del modelo obtenido se realizó un afinamiento de cuerpo rígido, posteriormente se realizaron afinamientos incluyendo la simetría no cristalográfica (SNC). Después de varios ciclos de afinamiento, visualización y corrección del modelo, en las etapas finales se liberó la SNC y se añadieron las moléculas de agua manualmente. La

validación de los modelos finales se realizó utilizando el programa Molprobit (58). El análisis de las interfases se realizó con el servidor PISA (29), los alineamientos con 3d-SS (60) y el análisis de las cavidades con CASTp (59). La existencia de la mutación se confirmó mediante mapas de diferencia de Fourier utilizando la estructura nativa.

4.5. Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido, se realizaron con un calorímetro capilar VP-DSC (GE Healthcare) (30, 31). Las proteínas se dializaron en una solución amortiguadora de 100 mM TEA, 10 mM EDTA y 1 mM DTT (pH 7.4). La concentración de las proteínas se determinó mediante la absorbancia a 280 nm (30, 31) y utilizando los coeficientes de extinción molar $36\,440\text{ M}^{-1}$ para las enzimas de *T. cruzi*, $34\,950\text{ M}^{-1}$ para las enzimas de *T. brucei*, $40\,450\text{ M}^{-1}$ para las enzimas de *H. sapiens*, y $26\,470\text{ M}^{-1}$ para las enzimas de *G. lamblia*.

5. Resultados

5.1. Cinética enzimática

Con el objetivo de analizar si el cambio de un Glu por un Asp en la posición 104 afectaba la función catalítica en las TIMs de tripanosomas, se midió la actividad enzimática de las mutantes, en dirección del gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona 3-fosfato. Como se muestra en la tabla 1, la mutación E104D no afecta la función catalítica, ya que los parámetros cinéticos de las mutantes son muy similares a los de sus enzimas silvestres correspondientes.

Tabla 1.

Constantes cinéticas de las enzimas silvestres y mutantes E104D

TIM	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}mM)
TcTIM	3581 \pm 54	0.39 \pm 0.03	1.9 x 10⁵ \pm 2.5 x 10 ³	4.8 x 10⁵ \pm 4.0 x 10 ⁴
TcTIM E104D	3913 \pm 82	0.65 \pm 0.11	2.1 x 10⁵ \pm 4.5 x 10 ³	3.3 x 10⁵ \pm 5.0 x 10 ⁴
TbTIM	3623 \pm 485	0.38 \pm 0.08	1.9 x 10⁵ \pm 1.9 x 10 ⁴	5.2 x 10⁵ \pm 4.7 x 10 ⁴
TbTIM E104D	3729 \pm 439	0.69 \pm 0.28	1.9 x 10⁵ \pm 2.1 x 10 ⁴	2.9 x 10⁵ \pm 4.6 x 10 ⁴
GitIM	3188 \pm 53	0.59 \pm 0.06	1.7 x 10⁵ \pm 3.0 x 10 ³	2.9 x 10⁵ \pm 3.3 x 10 ⁴
GitIM E104D	4167 \pm 543	0.63 \pm 0.09	2.2 x 10⁵ \pm 2.9 x 10 ⁴	3.5 x 10⁵ \pm 5.7 x 10 ³
HsTIM^a	7080 \pm 415	0.74 \pm 0.10	3.9 x 10⁵ \pm 5.2 x 10 ³	5.7 x 10⁵ \pm 8.7 x 10 ³
HsTIM E104D^a	6600 \pm 354	0.70 \pm 0.15	3.7 x 10⁵ \pm 7.5 x 10 ³	5.2 x 10⁵ \pm 4.5 x 10 ³

^a Rodríguez-Almazán *et al* (12).

5.2. Estudios de termoestabilidad

La triosafosfato isomerasa es activa solamente en su forma dimérica (9,10) por lo que la pérdida de su estado oligomérico puede seguirse midiendo su actividad enzimática a diferentes temperaturas en función del tiempo.

Las proteínas silvestres y mutantes E104D se incubaron a diferentes temperaturas, en un intervalo de 30 a 48 °C y se tomó una alícuota de la mezcla a distintos tiempos para medir la

actividad. En la figura 7 y 8 se muestran las gráficas de la termoestabilidad en función del tiempo.

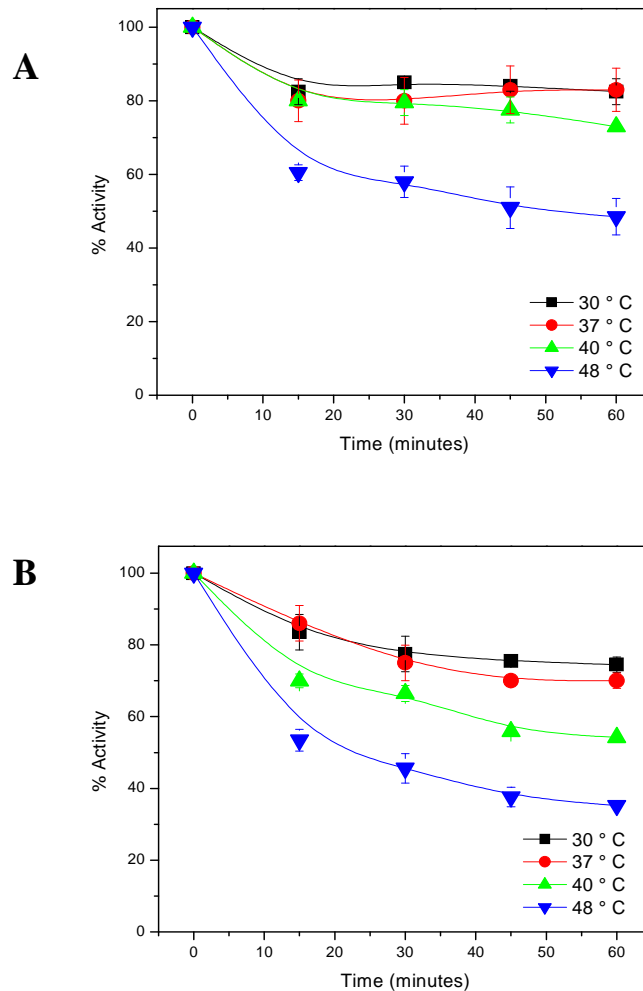


Figura 7. Panel A se observa el porcentaje de la actividad enzimática en función del tiempo en la enzima silvestre de *T. cruzi*. La actividad enzimática en un intervalo de 30 a 40 °C no varía significativamente, con una actividad residual aproximada de un 80% después de una hora de incubación a las distintas temperaturas, sin embargo a 48 °C, la actividad disminuye desde los primeros minutos y al término de una hora su actividad es de aproximadamente un 50%. **El panel B** corresponde a la mutante E104D de *T. cruzi*. A diferencia de la enzima silvestre, su actividad residual es aproximadamente de un 60 y un 40% después de una hora de incubación a 40 y 48 °C, respectivamente.

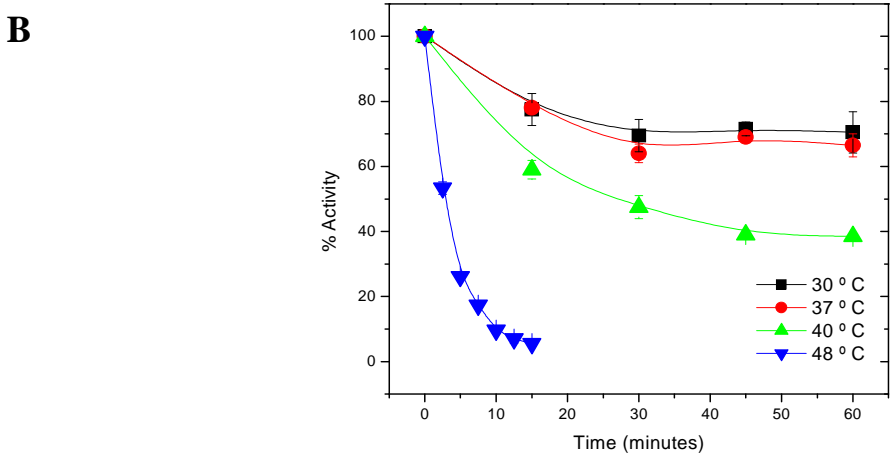
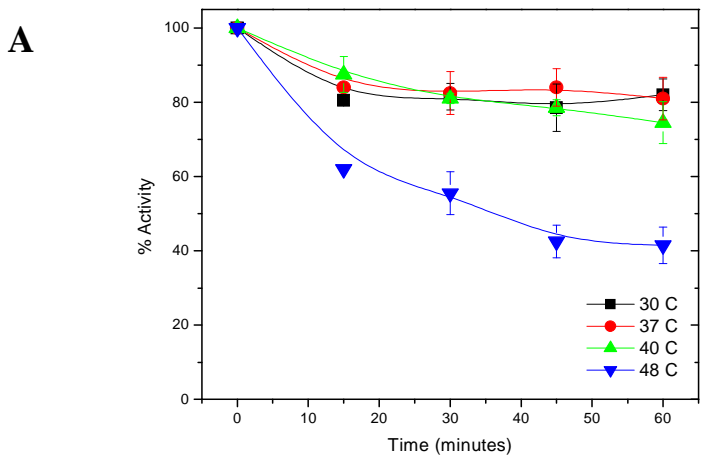


Figura 8. Panel A. La actividad de la enzima silvestre de *T. brucei* es muy similar en un intervalo de temperatura de 30 a 40 °C, con una actividad residual aproximada de un 80% después de una hora de incubación a esas temperaturas, sin embargo, tiene una actividad residual de ~40% después de una hora de incubación a 48°C. **Panel B** La mutante E104D de *T. brucei* muestra actividades muy diferentes dentro del mismo intervalo de temperatura en comparación con la enzima silvestre. La diferencia más importante es a la temperatura de 48 °C, en la que pierde la totalidad de su actividad enzimática durante los primeros quince minutos.

La actividad enzimática en las TIMs de tripanosomas se mantiene constante en un intervalo de 30 a 40 °C con una actividad residual aproximada de un 80%, sin embargo, la termoestabilidad de las mutantes E104D es muy variable, la mutante de *T. cruzi* muestra una pérdida de la actividad de un 60 y 40% a 40 y 48 °C respectivamente, en cambio, la mutante de *T. brucei* pierde la totalidad de su actividad enzimática durante los primeros quince minutos a 48 °C (figura 7 y 8).

Mediante los estudios de termoestabilidad, observamos como la misma mutación afecta de manera distinta a la estabilidad de dos proteínas con una alta identidad en su secuencia primaria (73 %) y pertenecientes a una misma familia.

5.2.1. Termoestabilidad en la TIM de *Giardia lamblia*

Se evaluó la termoestabilidad a 48 °C en la proteína silvestre y mutante E104D de *G. lamblia* y como se observa en la figura 10 la actividad residual después de una hora de incubación es aproximadamente de un 60 y un 10% en la enzima silvestre y mutante, respectivamente.

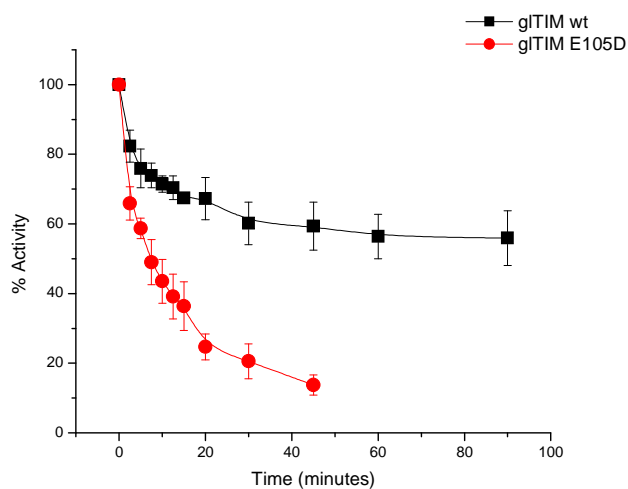


Figura 9. Curva de inactivación térmica a 48 °C de la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* silvestre (■) y mutante E104D (●). La actividad residual aproximada después de cuarenta minutos de incubación fue de 60 y 10% en la enzima silvestre y mutante, respectivamente.

En la figura 10 se muestra la termoestabilidad a una sola temperatura a 48 °C en las distintas mutantes. La actividad residual al término de una hora de incubación es mayor en la mutante de *T. cruzi*, seguida de *G. lamblia* y por último la mutante de *T. brucei*, con un porcentaje de actividad residual de un 50, 10 y 0% respectivamente. Mediante esta gráfica comparativa, observamos que la mutante de *G. lamblia* tiene una estabilidad intermedia entre las mutantes de *T. cruzi* y *T. brucei*.

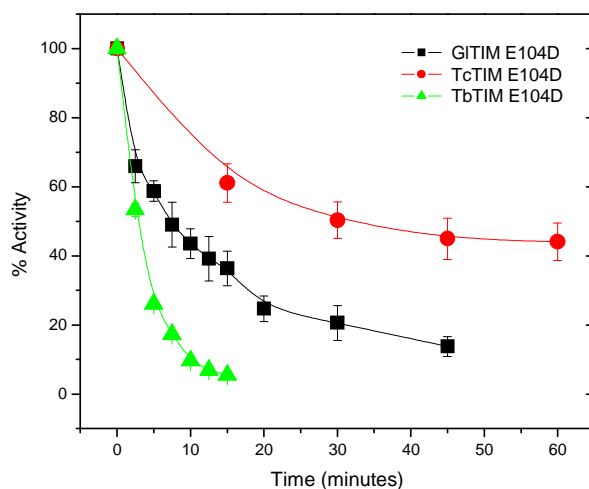


Figura 10. Curva de la inactivación enzimática a una sola temperatura 48 °C en función del tiempo en las enzimas mutantes. Como se observa en la gráfica la actividad residual al término de una hora de incubación es mayor en la mutante de *T. cruzi*, seguida de *G. lamblia* y por último la mutante de *T. brucei*, (según la numeración de la secuencia de *T. brucei*) con un porcentaje de actividad residual de un 50, 10 y 0% respectivamente.

5.3. Sensibilidad al reactivo sulfhidrilo DTNB

El DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico), también llamado reactivo de Ellman, es un disulfuro aromático que reacciona con los grupos tiol de los residuos de cisteína, formando un enlace disulfuro con la proteína y reaccionando estequiométricamente en una relación de un mol de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico por cada mol de grupo sulfhidrilo en la proteína. El DTNB por si solo tiene muy poca absorbancia, pero cuando reacciona con grupos -SH en las proteínas en condiciones alcalinas (pH 7-8), el anión 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB²⁻) tiene un color amarillo con un máximo de absorbancia a 412 nm (52).

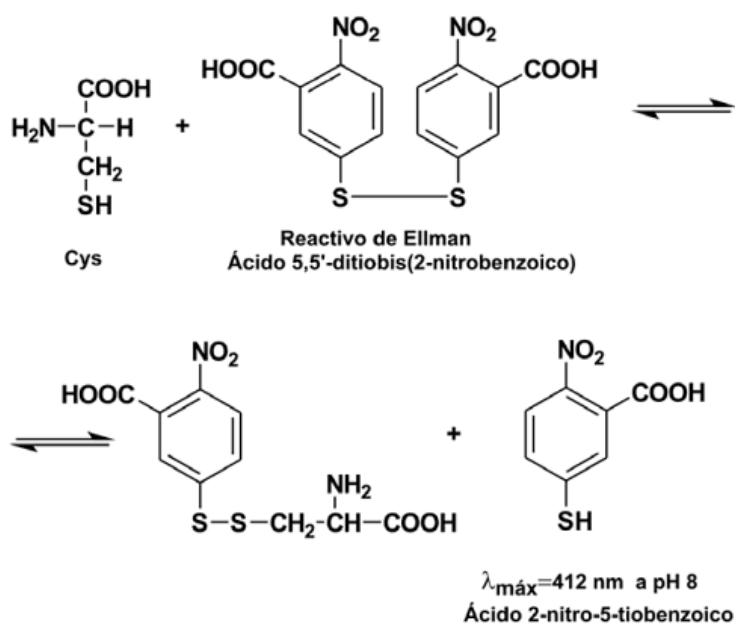


Figura 11. Reacción de Ellman, el marcaje con DTNB se emplea para determinar el número de cisteínas libres en una proteína. Los grupos tiol libres reaccionan con el reactivo de Ellman con una estequiometría 1:1 y se libera ácido 2-nitro-5-tiobenzoico, cuya concentración puede calcularse espectrofotométricamente a 412 nm (52).

5.3.1. Efectos cinéticos de derivatizantes de grupos sulfhidrilos

Garza Ramos *et al.* (53) demostraron que la TIM de *T. cruzi* es 100 veces más sensible al reactivo DTNB que su homóloga de *T. brucei*; estos autores realizaron estudios de mutagénesis dirigida con el fin de explorar si la presencia de una cisteína adicional en la TIM de *T. cruzi* era la responsable de su mayor sensibilidad a los reactivos tiol. La TIM de *T. cruzi* tiene una cisteína adicional en la posición 117 (tabla 2) y esta cisteína se alinea con una valina en la secuencia primaria de *T. brucei*. Se intercambiaron estos residuos en las TIMs de tripanosomas (*T. cruzi* Cys117Val y *T. brucei* Val117Cys) y no se observó un cambio en la sensibilidad a los reactivos tiol, lo que demostró que la Cys 117 en la estructura de la TIM de *T. cruzi* no era la responsable de la mayor sensibilidad de la enzima a los reactivos sulfhidrilos.

Tabla 2. Numeración de los residuos de cisteína en la secuencia primaria de las TIMs de *T. cruzi*, *T. brucei* y *H. sapiens*.

<i>T. cruzi</i>	14, 40, 117, 126
<i>T. brucei</i>	14, 40, 126
<i>H. sapiens</i>	41, 66, 86, 126, 217

Gómez-Puyou *et al.* (54) mediante estudios de mutagénesis sitio específica demostraron que la Cys 14 de la interfase era la principal responsable de la sensibilidad al reactivo metil metano tiosulfonato (MMTS). En ese trabajo cambiaron la Cys 14 de la interfase por una Leu en la TIM de *T. brucei* y observaron la pérdida de la sensibilidad al reactivo tiol. Las TIMs que no tienen una cisteína en la posición 14 son insensibles al MMTS, como ocurre en la TIM de humano, levadura y *Mycoplasma pneumoniae*; estas proteínas tienen en esa misma posición una metionina, leucina y treonina, respectivamente. García-Torres *et al.* (3) mediante el diseño de quimeras proteicas, intercambiaron regiones de las TIMs de *T. cruzi* y *T. brucei*, y observaron que la susceptibilidad al MMTS no se debía a los residuos cercanos a la Cys de la interfase, sino a regiones distantes a la interfase del dímero.

Con estos antecedentes quisimos evaluar si el cambio del Glu 104 afectaba la reactividad de las Cys distantes al sitio de la mutación. Como se observa en la figura 12, la pérdida de la actividad enzimática depende de la concentración de DTNB y es idéntica en la enzima mutante y en la silvestre de *T. cruzi*; a una concentración de 5 μM de DTNB ambas enzimas tienen una actividad residual menor al 40% y una pérdida total de la actividad a una concentración de 20 μM . Por otra parte, la mutante de *T. brucei* muestra una inactivación más rápida que la enzima silvestre, a 100 μM la mutante tiene una actividad residual menor al 60% en comparación con la silvestre que mantiene aproximadamente un 90% de la actividad. La diferencia en la pérdida de la actividad en las enzimas de *T. brucei* es evidente desde las primeras concentraciones de DTNB y a 250 μM esta diferencia es más significativa con un 70 y 20% de actividad residual en la enzima silvestre y mutante, respectivamente.

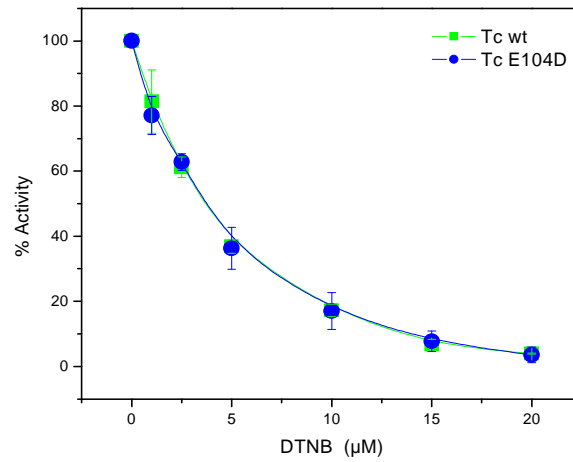
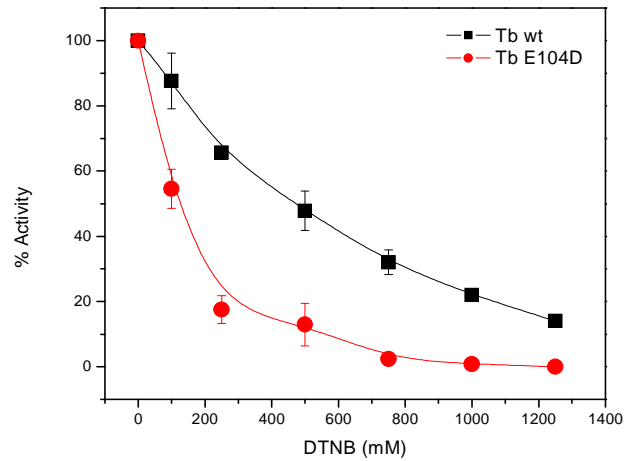
A**B**

Figura 12. Curva de inactivación enzimática en función de la concentración de DTNB. En el **panel A** se representa en ■ y ● a la enzima silvestre y mutante de *T. cruzi*, respectivamente, en un intervalo de concentración de 0 a 20 µM. El **panel B** muestra las enzimas silvestre y mutante de *T. brucei* en ■ y ●, respectivamente, en un intervalo de concentración de 0 a 1400 µM de DTNB.

5.3.2. La mutante E104D de humano y su sensibilidad al DTNB

La TIM de humano tiene una metionina en la posición 14 y es insensible al reactivo MMTS (54), sin embargo es sensible al DTNB (que tiene un peso molecular mayor 396.3 y está cargado negativamente). La sensibilidad al reactivo DTNB en la TIM del humano es diferente a la de sus homólogos de tripanosomas, ya que muestra una inhibición gradual en función de la concentración del reactivo, aunque en ella no ocurre un desarreglo estructural general que resulte en la agregación de la enzima (53).

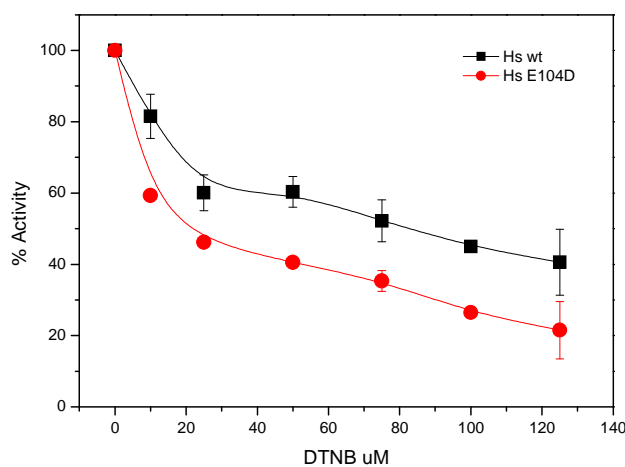


Figura 13. Curva de inactivación de la enzima silvestre y mutante de humano, se utilizaron concentraciones de DTNB en un intervalo de 0 a 250 μM . La gráfica muestra una pérdida gradual de la actividad en dependencia de la concentración de DTNB, a concentraciones pequeñas de DTNB la diferencia entre silvestre y mutante no es muy significativa y conforme se incrementa la concentración hasta 250 μM , se obtiene una actividad residual de ~40 y 20% en la enzima silvestre y mutante, respectivamente.

5.3.3. Derivatización de los residuos de cisteína por el DTNB en las TIMs de *T. cruzi*, *T. brucei* y *H. sapiens*

Con el fin de comparar el número de Cys derivatizadas en las enzimas homólogas, se realizó un curso temporal de la derivatización de las Cys a una misma concentración de DTNB (1mM) y de proteína (200 µg) y se midió la absorbancia del anión 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB²⁻) a una longitud de onda de 412 nm.

Como se ilustra en la figura 14 y 15, las curvas de absorbancia del (TNB²⁻) en cada una de las enzimas estudiadas muestran trazos diferentes. La curva de absorbancia en función del tiempo en las enzimas de *T. cruzi* incrementa de manera muy similar hasta alcanzar un punto de inflexión que refleja el inicio de agregación de la enzima (53), los tiempos difieren solamente 8 minutos entre ambas enzimas y el número de residuos derivatizados no cambia. En las enzimas de *T. brucei*, el curso de la derivatización de las cisteínas es más lenta en comparación con su homóloga de *T. cruzi*, con una diferencia de 26 minutos en el inicio de la agregación entre la enzima silvestre y mutante de *T. brucei* y la diferencia en el número de Cys derivatizadas es de 0.4. En la tabla 3 se muestra el número de residuos de cisteína derivatizadas por DTNB.

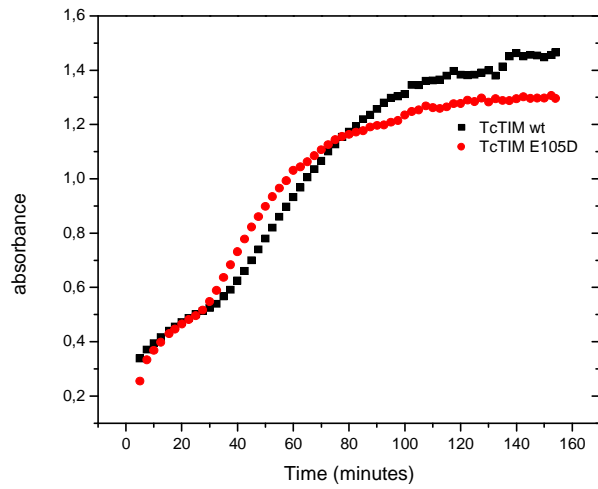
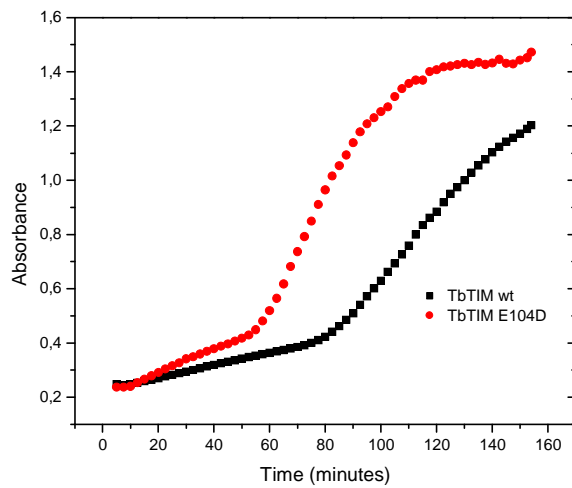
A**B**

Figura 14. Panel A. Curva de absorbancia del anión 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB^{2-}) a una longitud de onda de 412 nm en la TIM de *T. cruzi* silvestre (●) y mutante (■). Panel B. Curva de absorbancia en la TIM de *T. brucei* silvestre (■) y mutante (●).

Tabla 3. Número de cisteínas derivatizadas en un monómero e inicio de la meseta o la agregación de las enzimas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *H. sapiens*.

Triosafosfato isomerasa	Agregación (minutos)	Cys/mon
<i>T. cruzi</i>	31	2.6
<i>T. cruzi</i> E104D	23	2.5
<i>T. brucei</i>	76	1.6
<i>T. brucei</i> E104D	50	2.0
<i>H. sapiens</i>	77	2.4
<i>H. sapiens</i> E104D	200	4.3

La TIM de humano no tiene la Cys 14 de la interfase y la derivatización de los residuos de cisteína no induce la agregación de la enzima. El trazo de la curva alcanza una meseta, ésta puede indicar la saturación de la derivatización de las cisteínas susceptibles y no necesariamente es un índice de agregación. Como se muestra en la figura 16, la curva de absorbancia en las TIMs de humano incrementa conforme avanza el tiempo hasta alcanzar una meseta al minuto 77 y 200 en la enzima silvestre y mutante, respectivamente (tabla 3), con una diferencia de 133 minutos en su inicio. Por su parte, el número de residuos de cisteína derivatizados es de 4.3 y 2.4 en la mutante y silvestre, respectivamente.

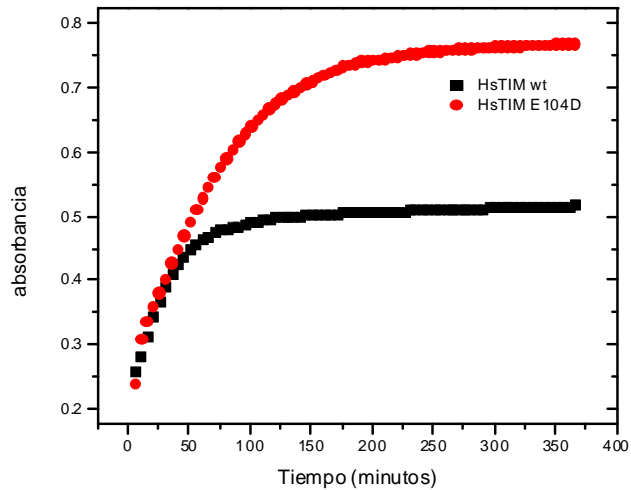


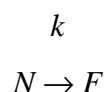
Figura 15. Curva de absorbancia del anión 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB^{2-}) a una longitud de onda de 412 nm, en la TIM de humano silvestre (■) y mutante (●).

Mediante esta prueba bioquímica comparamos la susceptibilidad al reactivo DTNB de las enzimas silvestres y mutantes. Las proteínas de *T. cruzi* no muestran cambios en la sensibilidad al reactivo tiol, mientras que las mutantes de *T. brucei* y *H. sapiens* ofrecen menor resistencia al flujo del reactivo sulfhidrilo al interior de su estructura, lo que indica que la mutación E104D afecta la sensibilidad de residuos de Cys distantes al sitio de la mutación. Sin embargo, se requiere de un estudio más detallado para conocer los cambios estructurales que afectan la sensibilidad de las Cys en las mutantes.

5.4. La desnaturalización térmica de las TIMs de *T. cruzi* y *T. brucei*, siguen el modelo irreversible de dos estados.

En el presente trabajo, se obtuvo el perfil de la desnaturalización térmica de las enzimas silvestres y mutantes de *T. cruzi*, *T. brucei*, *G. lamblia* y *H. sapiens*. En todos los casos, las transiciones calorimétricas fueron irreversibles, y dependientes de la velocidad de barrido, indicando que el proceso de desnaturalización está bajo control cinético (figura 16 y 17).

La forma de la transición calorimétrica, puede ajustarse al modelo irreversible de dos estados (35):



N es el estado nativo de la proteína (las TIMs estudiadas, se encuentran en estado dimerico en la naturaleza), F representa el estado final, desnaturalizado. La conversión del estado nativo al desnaturalizado, se describe mediante una constante de velocidad de primer grado, que varía con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius.

$$k = \exp \left[- E_A / R (1/T - 1/T^*) \right]$$

E_A es la energía de activación, T^* es la temperatura a la cual la constante de velocidad equivale a 1 min^{-1} .

La energía de activación E_A en las proteínas estudiadas se obtuvo mediante la gráfica de Arrhenius (figura 18), los valores de la E_A se muestran en la tabla 4. Como se observa, existe un intervalo muy amplio en los valores de E_A en las enzimas estudiadas, tanto en las proteínas silvestres ($\sim 350\text{-}800 \text{ kJ mol}^{-1}$), como en las mutantes ($\sim 480\text{-}800 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Comparando la E_A entre una enzima silvestre y su mutante correspondiente se observan diferencias, por ejemplo, en la enzima de humano hay una diferencia de 430 kJ mol^{-1} , mientras

que en la enzima de *T. cruzi* solamente es de -78 kJ mol^{-1} . Esto sugiere que la mutación E104D afecta de manera distinta la energía del estado de transición, en el proceso de desnaturalización en las TIMs estudiadas.

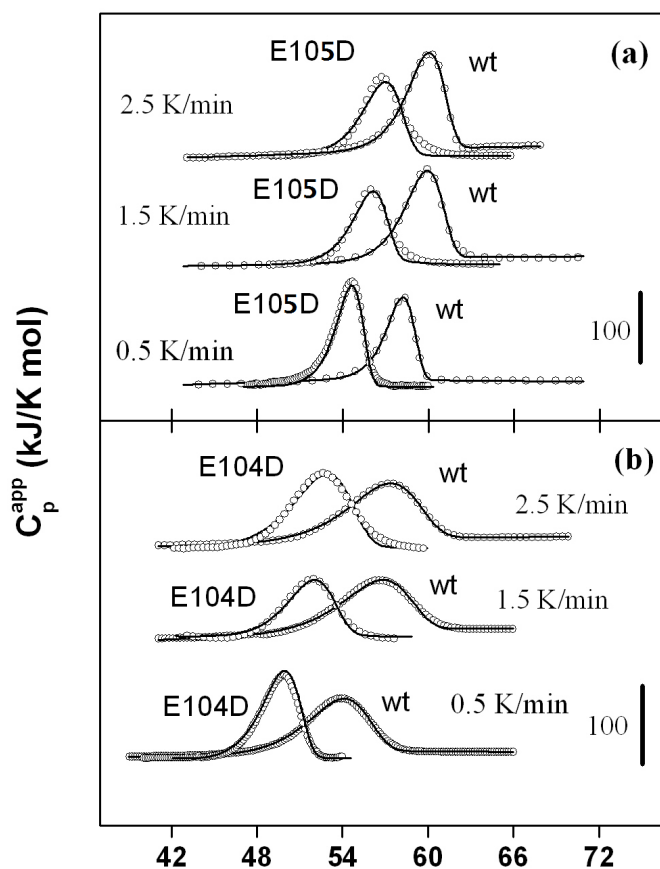


Figura 16. Perfiles experimentales de la capacidad calorífica en función de la temperatura para la TcTIM y TcTIM E105D (a) y para TbTIM y TbTIM E104D (b), a las velocidades de barrido indicadas. Los termogramas para las enzimas silvestres TcTIM y TbTIM, se tomaron del trabajo de Costas *et al* ³⁰.

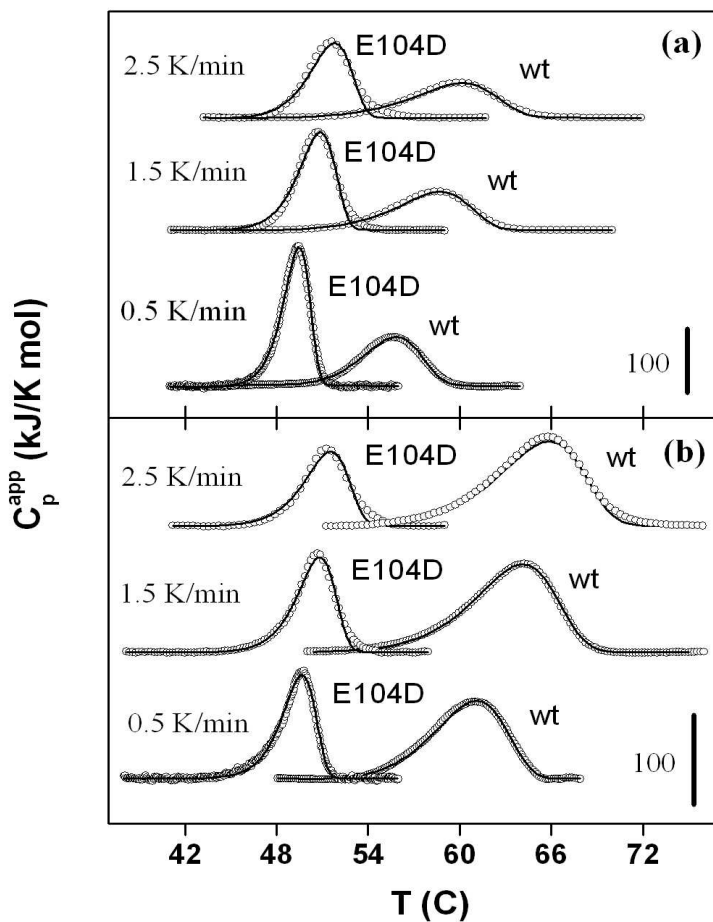


Figura 17. Perfiles experimentales de la capacidad calorífica en función de la temperatura de la GITIM y su mutante E104D (a) y de la HsTIM y HsTIM E104D (b), a las velocidades de barrido indicadas. Los perfiles experimentales a otras velocidades de barrido fueron cualitativamente similares. Los símbolos representan los datos experimentales de la capacidad calorífica aparente y las líneas continuas el ajuste al modelo irreversible de dos estados. Para mayor claridad los perfiles no se muestran superpuestos.

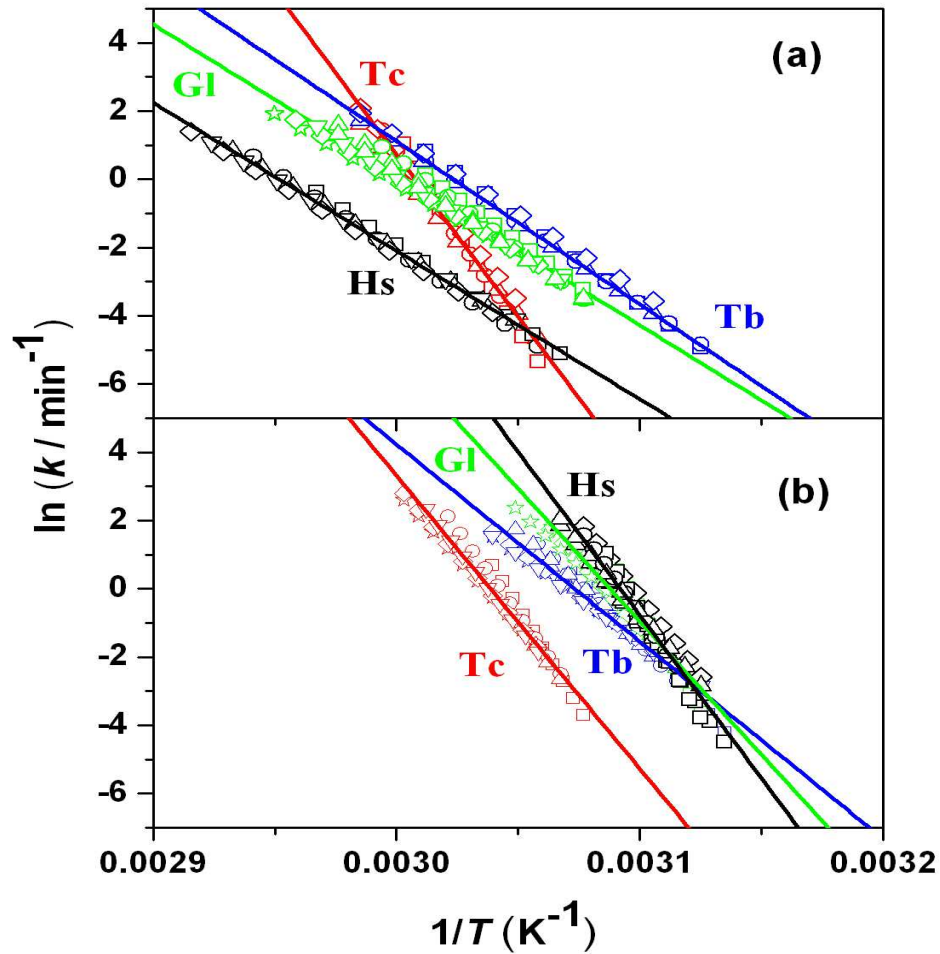


Figura 18. Gráfica de Arrhenius que muestra la desnaturalización térmica irreversible de las enzimas silvestres (a) y las mutantes E104D (b). Los datos de las enzimas silvestres se tomaron del trabajo de Costas *et al*³⁰. La concentración de las proteínas fue de 0.4 mg mL⁻¹. Los diferentes símbolos corresponden a las diferentes velocidades de barrido utilizadas en los experimentos de CDB (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 K min⁻¹). Las líneas representan el mejor ajuste a la ecuación de Arrhenius $k = \exp[-E_A/R(1/T-1/T^*)]$. Los valores de la energía de activación E_A se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Energía de activación E_A (kJ mol⁻¹), constante de velocidad de primer orden k (min⁻¹) a 37°C, cinética de urea m (kJ mol⁻¹ M⁻¹) valor (m_{EQ}), urea m (kJ mol⁻¹ M⁻¹) valor de m en el desplegamiento al equilibrio (m_{EQ}), grados fraccionales de la exposición al solvente (m^\ddagger ~grados fraccionales del desplegamiento) en el estado de transición (m^\ddagger/m_{EQ}) para las TIMs silvestres y mutantes E104D.

	Tc TIM ^a	Tc TIM E104D	Tb TIM ^a	Tb TIM E104D	GI TIM	GI TIM E104D	Hs TIM	Hs TIM E104D
E_A	792.8 ± 17.6	714.7 ± 14.6	397.9 ± 4.6	480.6 ± 11.0	366.6 ± 7.0	647.0 ± 20.3	361.2 ± 3.8	795.5 ± 20.7
k	1.1 x 10 ⁻⁹	1.2 x 10 ⁻⁷	6.7 x 10 ⁻⁵	1.6 x 10 ⁻⁴	5.8 3 1025	2.4 x 10 ⁻⁵	7.2 x 10 ⁻⁶	3.2 x 10 ⁻⁶
m^\ddagger	8.34 ± 0.12	9.48 ± 0.15	1.69 ± 0.20	4.23 ± 0.22	3.94 ± 0.44	11.00 ± 0.12	2.77 ± 0.05	13.55 ± 0.62
m_{EQ}^b	30.67	30.67	30.35	30.35	30.02	30.02	30.09	30.09
m^\ddagger/m_{EQ}	0.272 ± 0.01	0.309 ± 0.01	0.056 ± 0.008	0.140 ± 0.01	0.131 ± 0.02	0.367 ± 0.01	0.092 ± 0.002	0.451 ± 0.05

^aCostas *et al.* ³⁰

^bSe calculó mediante una correlación descrita por Myers *et al.* ³⁶

El área de superficie de acceso al solvente se calculó a partir de archivos depositados en el *Protein Data Bank* PDB³⁰

Las diferencias en la E_A en las TIMs estudiadas pueden relacionarse con las diferentes velocidades de desnaturalización a la temperatura en la que cada organismo vive, por lo que se consideró importante comparar la estabilidad cinética de las enzimas silvestres y mutantes a una misma temperatura 37° C, mediante una extrapolación de la gráfica de Arrhenius a 37° C (figura 18). Los valores de k se muestran en la tabla 4. Como se observa, las proteínas de *T. cruzi* mostraron valores de k con varios órdenes de magnitud menor que el resto de las proteínas, indicando que la estabilidad cinética de las TIMs de *T. cruzi* es mayor en comparación con las otras TIMs estudiadas.

El efecto de la concentración del desnaturalizante en el cambio de la energía libre, y el cambio de la superficie de acceso al solvente ha sido estudiada (35) y se representa por los valores de m . La desnaturalización proteica por agentes químicos, nos permite explorar la estabilidad conformacional de las proteínas y compararla con sus mutantes, sin embargo, no se conoce el mecanismo molecular exacto mediante el cual interactúan estos agentes desnaturalizantes (urea, Gdn HCl) con la superficie de la proteína (55). Tanford *et al.* (56) mediante experimentos de solubilidad con compuestos modelos, demostraron que la interacción de la urea y Gdn HCl con los grupos constituyentes de las proteínas, es más favorable que la interacción de estos grupos con las moléculas de agua.

Estos agentes desnaturalizantes alteran el equilibrio entre el estado nativo (plegado F) y el estado desnaturalizado de la proteína (desplegado U).



La energía libre de desplegamiento y la concentración de estos agentes desnaturalizantes muestran una relación lineal, esta dependencia es más evidente a concentraciones medianas y grandes de urea y Gdn HCl (35). Mediante esta correlación se pueden obtener dos parámetros: la energía libre de desplegamiento a la concentración cero del desnaturalizante (el intercepto ΔG^{H2O}) y la dependencia de la energía libre con respecto a la concentración del agente desnaturalizante (la pendiente, m).

$$\Delta G = \Delta G^{H2O} - m [\text{desnaturalizante}]$$

Myers *et al* (35) demostraron que los valores de m se relacionan con la superficie de la proteína expuesta al solvente en el estado de transición. Los cambios de la superficie de acceso al solvente ΔASA , los obtuvieron mediante la diferencia en la superficie de acceso al solvente en el estado nativo (tomado de la estructura cristalográfica de 45 proteínas depositadas en el *Protein Data Bank* PDB) y la superficie de la proteína en su forma desplegada (modelada como una cadena polipeptídica extendida). Myers *et al.* demostraron que la concentración del agente desnaturizante m en el desplegamiento y el ΔASA tienen un coeficiente de correlación de $R=0.9$. La denominada m^\ddagger cinética, $m^\ddagger = -\delta\Delta G^\ddagger/\delta [\text{urea}]$, se deriva de la concentración del desnaturizante en la transición máxima del CDB y utilizando la energía de activación³¹:

$$m^\ddagger = -\frac{E_A}{T_m} \left(\frac{dT_m}{d[\text{urea}]} \right) - RT_m \left(\frac{d \ln(E_A/RT_m^2)}{d[\text{urea}]} \right) \quad (1)$$

El segundo término de la ecuación (1) es muy pequeño, contribuye en un 15% al total del m^\ddagger en las proteínas estudiadas, por lo que el valor de m^\ddagger (tabla 4) está dado principalmente por la relación de $dT_m/d [\text{urea}]$, (la concentración de urea en la transición máxima del CDB T_m) (figura 19).

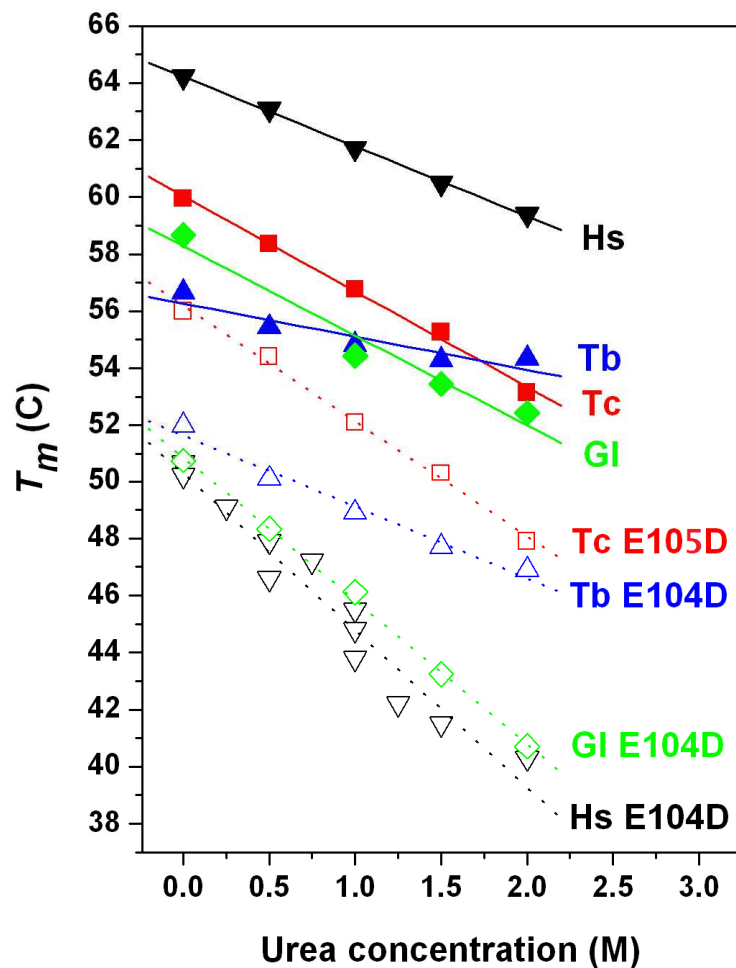


Figura 19. El efecto de la concentración de la urea en la temperatura máxima de la transición calorimétrica (T_m) para las TIMs estudiadas. Los datos de las enzimas silvestres de TcTIM y TbTIM son de Costas *et al*³⁰. Las líneas rectas representan el mejor ajuste de los datos experimentales (símbolos). Las concentraciones de las proteínas fueron de 0.4 mg mL⁻¹. Los valores de T_m , corresponden a la CDB a una velocidad de barrido de 1.5 K min⁻¹, sin embargo, los valores de T_m a otras velocidades de barrido, mostraron una dependencia muy similar, dando el mismo valor para la pendiente.

Los valores de la m^\ddagger cinética pueden transformarse en valores fraccionales del desplegamiento (exposición al solvente) en el estado de transición, mediante la relación m^\ddagger/m_{EQ} , donde m_{EQ} es el valor de la concentración de urea en la desnaturalización al equilibrio (35).

La relación m^\ddagger/m_{EQ} , (tabla 4), es mayor en las mutantes E104D que en las correspondientes TIMs silvestres, lo que indica una mayor exposición al solvente durante el estado de transición en las mutantes. En las enzimas estudiadas hay grandes diferencias, por ejemplo, la mutación en la TIM de humano resultó en un incremento de cinco veces la relación m^\ddagger/m_{EQ} , mientras que en las enzimas de *T. cruzi*, la relación es de 1:1. La figura 20 muestra el efecto de la mutación E104D en la temperatura de la desnaturalización, $\Delta T_m = T_m(\text{E104D}) - T_m(\text{wt})$, en relación con el cambio de la superficie de acceso al solvente $m^\ddagger/m_{EQ}(\text{E104D}) - m^\ddagger/m_{EQ}$. Por lo tanto, el efecto la mutación E104D se relaciona con la estabilidad cinética y el estado de transición de las proteínas.

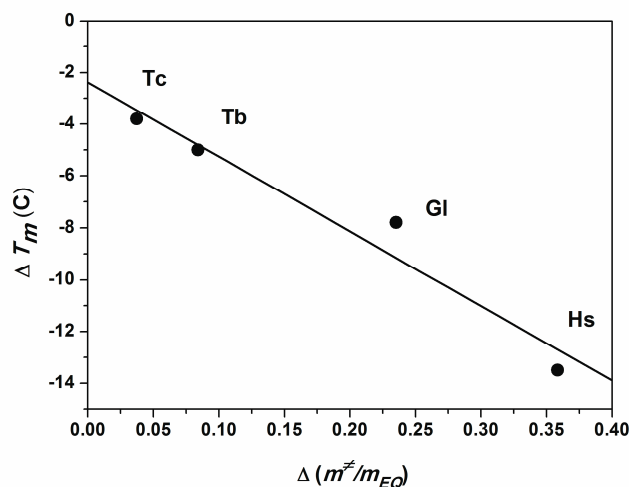


Figura 20. Efecto de la mutación E104D. Correlación entre el cambio de la temperatura de desnaturalización [$\Delta T_m = T_m(\text{E104D}) - T_m(\text{wt})$] y el cambio de la superficie de acceso al solvente durante el estado de transición [$\Delta(m^\ddagger/m_{EQ}) = m^\ddagger/m_{EQ}(\text{E104D}) - m^\ddagger/m_{EQ}(\text{wt})$] para las TIMs estudiadas. El ΔT_m se calculó a partir de los valores de T_m obtenidos del CDB a una velocidad de barrido de 1.5 K min^{-1} .

5.4.1. Activación, desplegamiento, y contribución de las barreras de solvatación.

La energía de activación obtenida por datos experimentales (tabla 4), no puede explicarse solamente en términos del estado de transición durante el proceso de desplegamiento; también es necesario incluir otras contribuciones al cambio de energía, uno de ellos, es la contribución de la barrera de solvatación. Desde el punto de vista del desplegamiento de una proteína, la barrera de solvatación resulta de la asincronía entre la penetración de moléculas de agua y la ruptura de interacciones internas entre los residuos de la proteína (32).

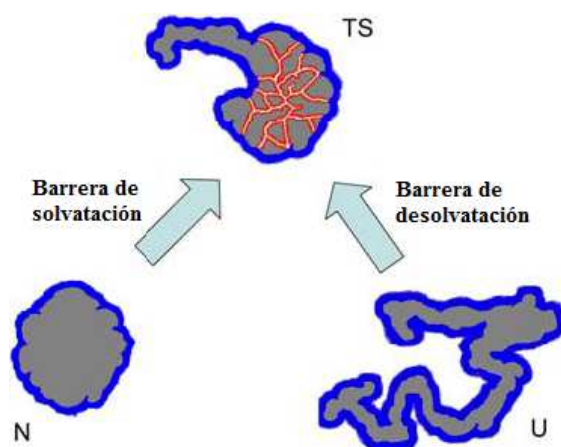


Figura 21. Representación de las barreras de solvatación/desolvatación en el proceso de desplegamiento/plegamiento, respectivamente. La superficie expuesta al solvente en los diferentes estados (nativo, estado de transición y desnaturalizado) se delinea en azul. La red roja representa el estado de transición, y la ruptura de los contactos internos en la proteína, que todavía no son accesibles a las moléculas de agua (32)

Para calcular el impacto de la mutación E104D en la activación, desplegamiento, la contribución de la barrera de solvatación, así como la entalpía y la entropía del proceso, se utilizó el método citado en el trabajo de Costas y colaboradores (30). La energía de activación

E_A (o entalpía $E_A \sim \Delta H^\ddagger$ a presión atmosférica) a la T_m correspondiente puede calcularse a partir de la temperatura de referencia 335.15 K (30), utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta H^\ddagger(T_0) = E_A + \Delta C_p^\ddagger \cdot (T_0 - T_m) \quad (2)$$

Considerando que la capacidad calorífica de activación (ΔC_p^\ddagger), es igual a la capacidad calorífica total, en términos de la accesibilidad (el grado de exposición al solvente durante el estado de transición (m^\ddagger/m_{EQ})) y asumiendo que no hay contribución de la barrera de solvatación ($\Delta C_p^\ddagger = 0$).

$$\Delta C_p^\ddagger = \Delta C_{p,EQ} \cdot \left(\frac{m^\ddagger}{m_{EQ}} \right) \quad (3)$$

Donde $\Delta C_{p,EQ}$ es el cambio de la capacidad calorífica en el desplegamiento al equilibrio, y se puede calcular mediante la correlación entre la entalpía del desplegamiento y el número de residuos en la proteína (36).

En la teoría del estado de transición, la relación entre la constante de velocidad k del desplegamiento y los parámetros termodinámicos de la activación son:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (5)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (6)$$

Utilizando estas dos ecuaciones, la entropía de activación a un valor dado de T_m , se calcula mediante:

$$\Delta S^\ddagger(T_m) = \frac{\Delta H^\ddagger(T_m)}{T_m} - \frac{\Delta G^\ddagger(T_m)}{T_m} = \frac{E_{act}}{T_m} + R \ln k_m - R \ln k_0 \quad (7)$$

y considerando la temperatura de referencia T_0 :

$$\Delta S^\ddagger(T_0) = \Delta S^\ddagger(T_m) + \Delta C_p^\ddagger \cdot \ln\left(\frac{T_0}{T_m}\right) \quad (8)$$

la entropía de activación a T_0 , está dada por:

$$\Delta S^\ddagger(T_0) = \frac{E_{act}}{T_m} + R \ln k_m - R \ln k_0 + \Delta C_{p,EQ} \left(\frac{m^\ddagger}{m_{EQ}}\right) \ln\left(\frac{T_0}{T_m}\right) \quad (9)$$

donde $R \ln k_0 = 0.207 \text{ kJ/K mol}$ (30). La energía libre de activación a T_0 , se obtiene mediante:

$$\Delta G^\ddagger(T_0) = \Delta H^\ddagger(T_0) - T_0 \Delta S^\ddagger(T_0) \quad (10)$$

Para obtener la contribución de la barrera de solvatación y el desplegamiento a T_0 , se considera lo siguiente: a) la energía del estado de transición durante el proceso de desnaturalización (ΔX_{unf}), (escalado con la accesibilidad y con un coeficiente igual al cambio total del desplegamiento), b) la contribución de la solvatación (ΔX^*), la cual es constante para las enzimas silvestres y mutantes, por lo tanto:

$$\Delta H^\ddagger = \Delta H^* + \Delta H_{unf} = \Delta H^* + \Delta H_{EQ} \cdot \left(\frac{m^\ddagger}{m_{EQ}}\right) \quad (11)$$

$$\Delta S^\ddagger = \Delta S^* + \Delta S_{unf} = \Delta S^* + \Delta S_{EQ} \cdot \left(\frac{m^\ddagger}{m_{EQ}}\right) \quad (12)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G^* + \Delta G_{unf} = \Delta G^* + \Delta G_{EQ} \cdot \left(\frac{m^\ddagger}{m_{EQ}} \right) \quad (13)$$

Las gráficas de ΔX^\ddagger vs m^\ddagger / m_{EQ} , nos dan la contribución de la barrera de solvatación y el desplegamiento. La figura 22 muestra la relación lineal entre ΔX^\ddagger y la accesibilidad y muestra la contribución de ΔX^* , ΔX_{unf} .

El efecto de la mutación E104D en la entalpía, entropía y la contribución de la energía de activación y el desplegamiento (considerando un valor de cero a la contribución de la barrera de solvatación), se puede obtener de $\Delta \Delta X = \Delta X$ (E104D) - ΔX (wt) y se muestran en la figura 23, como la función del cambio en la accesibilidad a causa de la mutación, $\Delta(m^\ddagger / m_{EQ}) = m^\ddagger / m_{EQ}$ (E104D) - m^\ddagger / m_{EQ} (wt). La figura 24 muestra la correlación entre $\Delta \Delta G^\ddagger$ y $\Delta \Delta G_{unf}$ y el efecto de la mutación E104D en la transición máxima de la CDB, ΔT_m . Esto indica que la disminución en la termoestabilidad (valores de T_m) se correlacionan con el aumento de la exposición al solvente durante el estado de transición (figura 20), que a su vez, se refleja en la energía de activación y del desplegamiento (figura 24). Como se observa en esta última figura, estos efectos son pequeños para la TcTIM y mayores para la HsTIM.

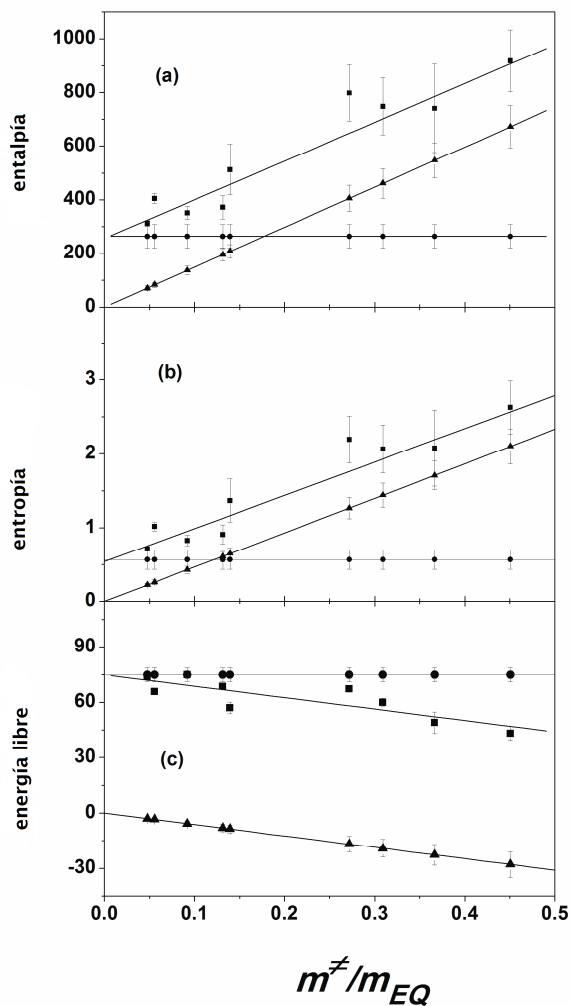


Figura 22. Activación (■), solvatación (●) y desplegamiento (▲), contribuciones a la entalpía (a), entropía (b), y energía libre (c) en función del grado fraccional del desplegamiento (exposición al solvente) en el estado de transición, m^\ddagger/m_{EQ} en las TIMs estudiadas de acuerdo a las ecuaciones (11-13). Los datos de la TIM de *Leishmania mexicana* se tomaron de Costas *et al*³⁰. Las líneas representan el mejor ajuste de los datos experimentales a una línea recta. Las unidades de entalpía y de energía libre son kJ mol⁻¹ y kJ K⁻¹ mol⁻¹, respectivamente.

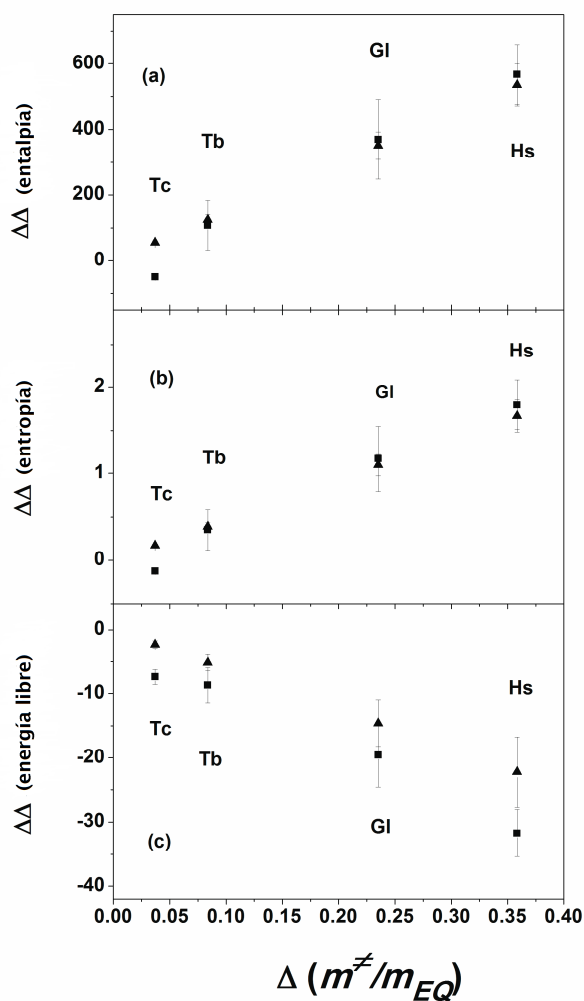


Figura 23. Efecto de la mutación E104D [$\Delta\Delta X = \Delta X$ (E104D) - ΔX (wt)] en la activación (■), desplegamiento (▲), entalpía (a), entropía (b) y energía libre (c), en función del cambio de la superficie expuesta al solvente en el estado de transición [$\Delta(m^{\ddagger}/m_{EQ}) = m^{\ddagger}/m_{EQ}$ (E104D) - m^{\ddagger}/m_{EQ} (wt)], en las TIMs estudiadas. Las unidades de entalpía y energía libre son kJ mol⁻¹ y kJ K⁻¹ mol⁻¹, respectivamente.

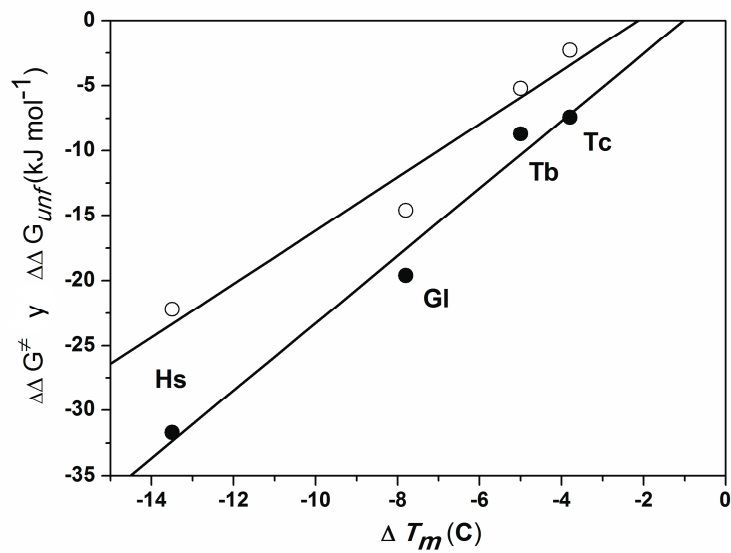


Figura 24. Efecto de la mutación E104D. Correlación entre el cambio de la activación (●) y la energía del desplegamiento (○) en función del cambio de temperatura en la desnaturalización, ΔT_m , en las TIMs estudiadas. El ΔT_m se obtuvo a partir de la CDB a una velocidad de barrido de $1.5 K min^{-1}$.

5.5. Determinación de la estructura cristalográfica de las TIMs mutantes de tripanosomas

5.5.1. Estructura de la mutante E105D de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM)

Los cristales de la mutante de TcTIM difractaron a 1.5 Å de resolución. El patrón de difracción mostró que el cristal pertenece al grupo espacial triclínico (P1) con dimensiones de celda $a=38.72$ Å, $b=44.46$ Å, $c=69.04$ Å, $\alpha=95.02^\circ$, $\beta=96.08^\circ$, $\gamma=114.69^\circ$. El coeficiente de Matthews (61,62) para un dímero en la unidad asimétrica fue de 2.32 Å³ Da⁻¹ con un contenido de disolvente del 47 %. La estructura afinada contiene un dímero y cada monómero consta de 251 residuos y 236 moléculas de agua con un R_{work} y R_{free} finales de 16.71 y 19.63, respectivamente. Los detalles de la colecta y afinamiento de la estructura se muestran en la tabla 5. En la figura 25 se ilustra la estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa con su motivo barril $(\alpha/\beta)_8$ característico.

5.5.2. Estructura de la mutante E104D de la triosafosfato isomerasa de *T. brucei* (TbTIM)

Los cristales de la mutante de TbTIM difractaron a 2.3 Å de resolución. El patrón de difracción mostró que el cristal pertenece al grupo espacial monoclinico (P 1 21 1) con dimensiones de celda $a=88.09$ Å, $b=89.78$ Å, $c=181.72$ Å, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=101.61^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$. El coeficiente de Matthews para seis dímeros en la unidad asimétrica fue de 2.18 Å³ Da⁻¹ dando un contenido de disolvente de 43.69 %. La estructura afinada mostró un R_{work} y R_{free} finales de 21.0 y 26.1 respectivamente. Los detalles de la colecta y afinamiento de la estructura se muestra en la Tabla 5. En la figura 26 se muestra la estructura final de los dímeros de la mutante de TbTIM

En ambas estructuras se demostró la presencia de la mutación analizando los mapas de densidad electrónica $2fo-fc$ a 1σ . En éstos se observó una densidad electrónica que corresponde a un Glu en la proteína silvestre y a un Asp en la estructura de la mutante (Figuras 25 B y C y 26 B y C). En la figura 27 se ilustra la superposición de la estructura general de la enzima mutante y silvestre de *T. cruzi*, con un RMSD general de 0.4110.

En la figura 28 panel A, se ilustra la superposición de los seis dímeros de la mutante de *T. brucei*, se utilizó al dímero A-B como molécula templado y al resto de los dímeros (CD, EF, GH, IJ y KL) como estructuras móviles, los valores de RMSD indican que la estructura general entre los diferentes dímeros no varía significativamente. En el panel B se muestra la superposición de la enzima silvestre (código PDB 2J27) y los seis dímeros presentes en la unidad asimétrica de la mutante. Como indican los valores de RMSD la estructura general de las mutantes no varía significativamente en relación a la enzima silvestre.

Tabla 5. Estadística de la colecta y afinamiento de las estructuras de la mutante E105D de TcTIM y de la E104D de TbTIM.

<i>Proteína</i>	TcTIM	TbTIM
<i>Colecta de datos</i>		
Grupo espacial	P1	P1 21 1
Dimensiones de la celda (Å)	a=38.72, b=44.46, c=69.04 $\alpha=95.02, \beta=96.08, \gamma=114.69$	a=88.09, b=89.78, c=181.72 $\alpha=90.00, \beta=101.61, \gamma=90.00$
Temperatura (°K)	100	100
Longitud de onda (Å)	0.9791	0.9791
Límites de resolución (Å)	39.97-1.5	89.78-2.3
Reflexiones colectadas	136044 (19064)	368306 (49325)
Reflexiones únicas ^a	63005(8958)	122434 (17590)
R ^b _{merge}	0.089 (0.25)	0.066 (0.264)
I/ σ I	5.7 (2.6)	8.1 (2.8)
Integridad (%)	95.6 (92.9)	99.6 (98.3)
Multiplicidad	2.2 (2.2)	3.0 (2.8)
Factor B de Wilson (Å ²)	14.19	36.51
<i>Afinamiento</i>		
R ^c _{work} /R _{free} (%)	16.71/19.63	21.00/26.10
No. de átomos de		
proteína/disolvente	3919/428	22464/594
SO ₄ /Glicerol/PEG	1/2/0	5/0/5
Valor B promedio (Å ²)	18.3	35.50
<i>R.m.s.d.</i> del ideal		
Longitud del enlace (Å)	0.008	0.009
Ángulo del enlace (°)	1.14	1.13
Ramachandran permitido (%)	98.0	97.0
Ramachandran no permitido	0	0
Código PDB	4HHP	4JEQ

^aValores en paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

^bR_{merge} = $\sum_j \sum_h (|I_{j,h} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h (\langle I_h \rangle)$, donde h es el índice de reflexión única, $I_{j,h}$ es la intensidad de la reflexión relacionada por simetría y $\langle I_h \rangle$ es la intensidad media.

^cR = $\sum_h |F_{o/h} - |F_{c/h}| / \sum_h |F_{o/h}|$ para todas las reflexiones, donde F_o y F_c son los factores de estructura observados y calculados respectivamente, y h define reflexiones únicas. R_{free} se calcula de manera análoga, estas reflexiones se seleccionan aleatoriamente y se excluyen del afinamiento.

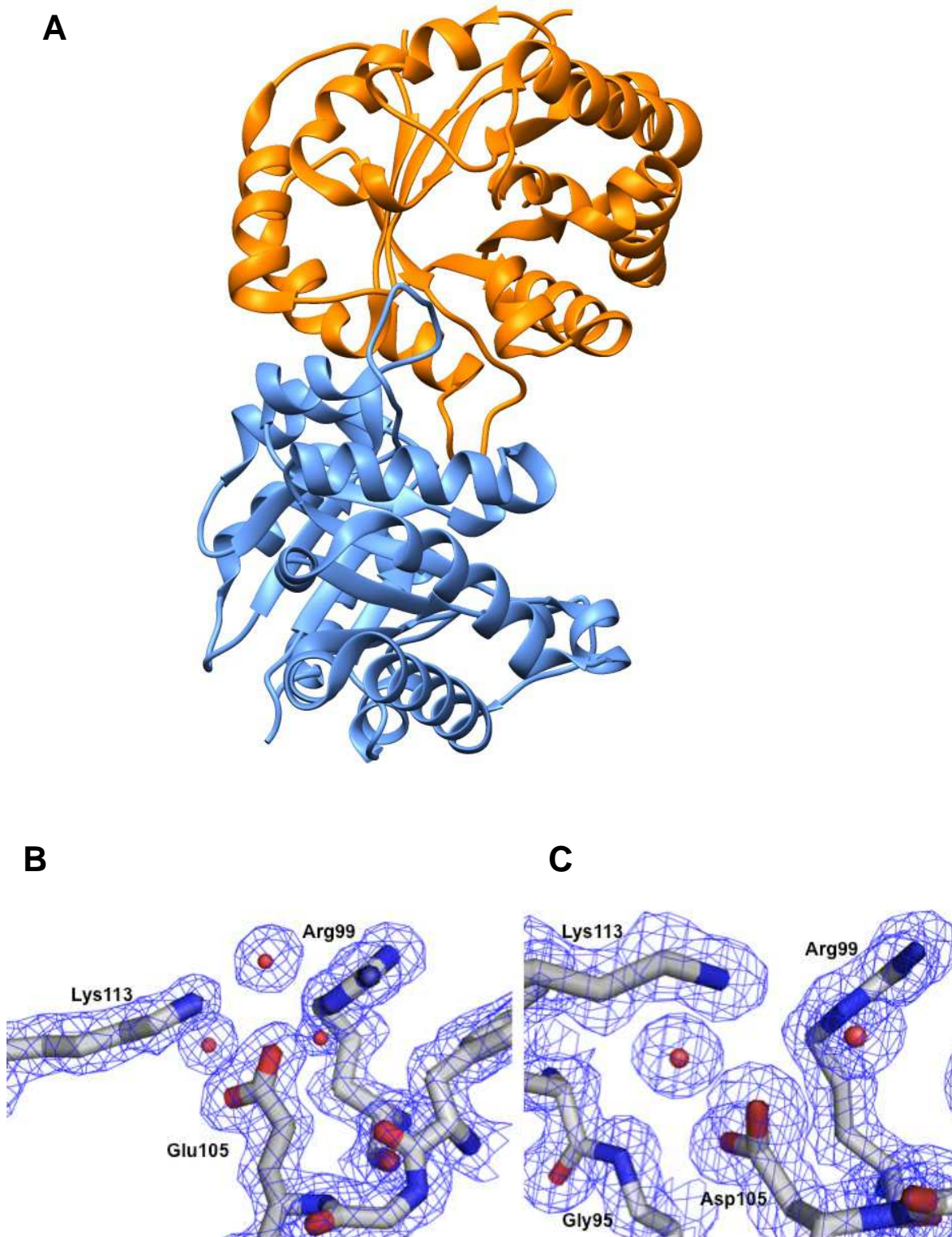


Figura 25. Panel A. Estructura de la mutante E105D de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, la figura muestra el plegamiento de barril $(\alpha\beta)_8$ característico de las TIMs. **Panel B** y **C.** Mapas $2fofc$ a 1σ en la región del Glu y Asp 105 en la enzima silvestre y mutante E105D, respectivamente.

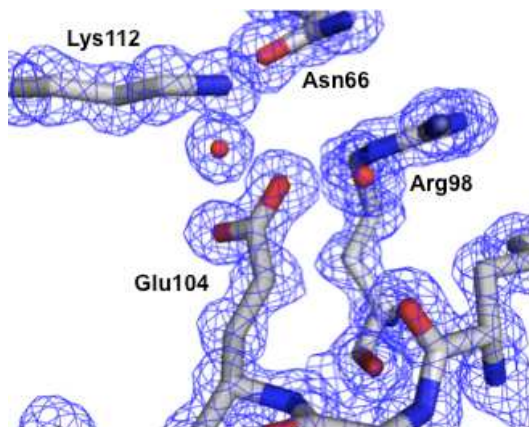
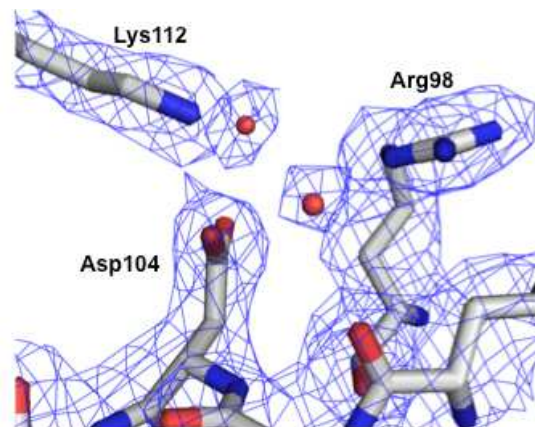
A**B****C**

Figura 26. **Panel A** Estructura de la mutante E104D de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, donde se muestran los seis dímeros presentes en la unidad asimétrica. **Panel B y C** Mapas 2fo-fc a 1σ en la región del Glu y Asp 104 en la enzima silvestre y mutante, respectivamente.

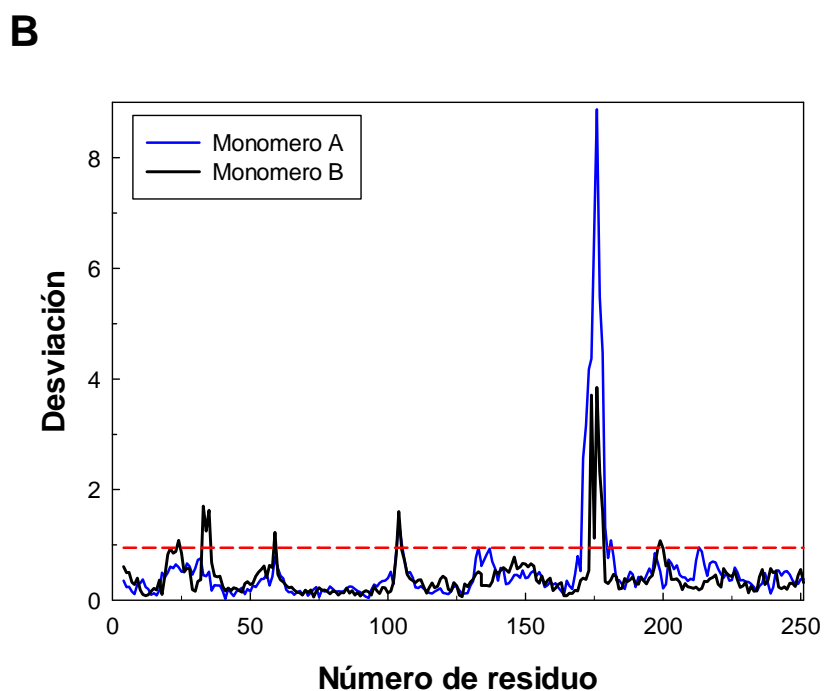
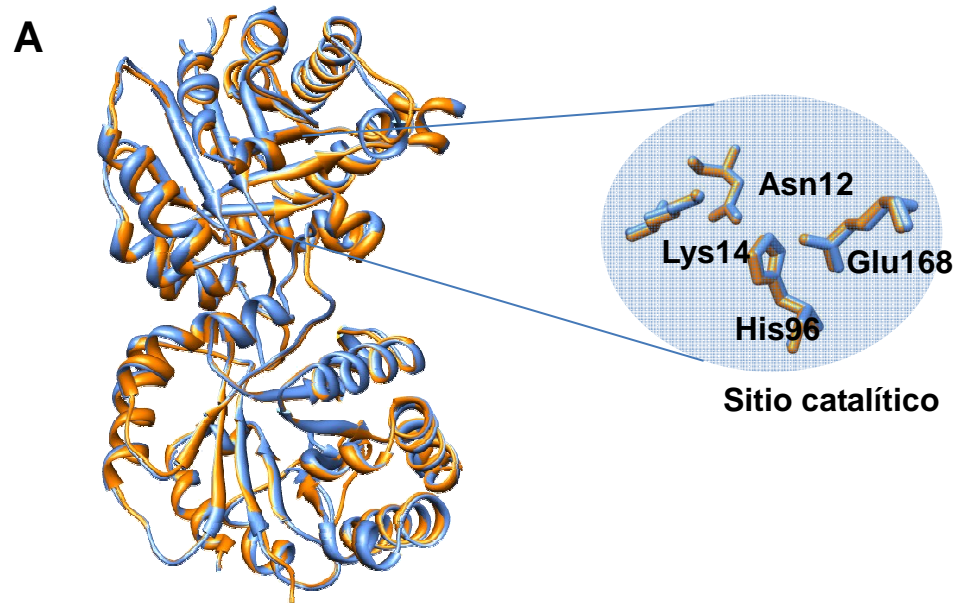
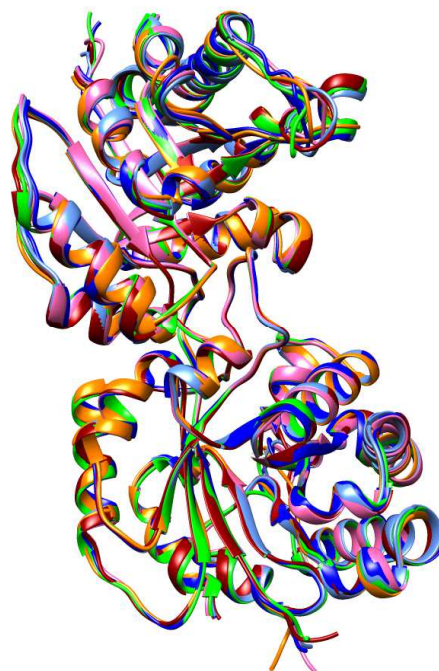


Figura 27. Comparación de la estructura de la mutante y la silvestre de *T. cruzi*. **Panel A** Superposición de la estructura general de la enzima silvestre y mutante, en un acercamiento observamos que la conformación de los residuos catalíticos no cambia. **Panel B** RMSD calculados entre el monómero A y B de la mutante con los respectivos monómeros de la enzima silvestre (RMSD general 0.4110). La región más diferente corresponde al asa catalítica (residuos 172-181), el monómero A de la enzima mutante presenta la conformación abierta.

A. Superposición de dímeros de la mutante E104D de *T. brucei* :

	rmsd
AB vs CD	0.504
vs EF	0.291
vs GH	0.543
vs IJ	0.466
vs KL	0.437



B. Superposición de dímeros:

	rmsd
2J27 vs AB	0.457
vs CD	0.496
vs EF	0.502
vs GH	0.510
vs IJ	0.504
vs KL	0.560



Figura 28. Panel A. Superposición de los diferentes dímeros presentes en la unidad asimétrica con respecto al dímero A-B. Los valores de RMSD muestran que la estructura general de los dímeros no difieren significativamente. **Panel B.** Superposición de los dímeros de la mutante de *T. brucei* con la enzima silvestre (código PDB 2J27).

5.5.3. El Glu 104

Rodríguez- Almazán *et al* (14) observaron que el Glu 104 forma parte de una cavidad en la interfase del dímero. Las superficies que forman la interfase del dímero en la TIM son complementarias, sin embargo en su arreglo estructural hay una cavidad entre las superficies. Los residuos que revisten la cavidad son diferentes en cada una de las enzimas estudiadas como se muestra en la tabla 1 y en la figura 1 del anexo, sin embargo, se conservan diez residuos en la cavidad de las TIMs de eucariotas: el Asn 67, Glu 77, Arg 98, Glu 104 y Lys 112 (utilizando la numeración de la secuencia de la TIM de humano). Estos residuos interactúan con los cinco residuos correspondientes del otro monómero mediante moléculas de agua que se disponen a manera de una red en el interior de la cavidad y solamente dos residuos están en contacto directo formando un puente salino en la interfase, la Arg 98 de una subunidad con el Glu 77 de la otra subunidad.

5.5.4. El residuo de Asp en la TIM de *H. sapiens*

Para comparar los contactos establecidos entre los residuos de Glu y Asp en la enzima silvestre y mutante, respectivamente; medimos los contactos a una distancia igual o menor a 3.5 Å en ambas TIMs. El Glu 104 en la proteína silvestre tiene 11 interacciones electrostáticas: 2 puentes salinos y 9 puentes de hidrógeno (como se enlista en la tabla 6) y en la mutante las interacciones disminuyen a 8: un puente salino y 7 puentes de hidrógeno. Estos cambios en la región de la mutación, se relacionan con la pérdida del puente salino en la interfase, como se discutirá en un apartado posterior.

Tabla 6. Contactos a distancia de puente de hidrógeno del Glu/Asp 104 en las enzimas de *H. sapiens* (14).

Proteína	Átomo	Distancia (Å)	Átomo
HsTIM Silvestre	OE2-Glu104	3.47	ND2Asn65
		3.35	NH2Arg98
		2.91	NE-Arg98
		3.04	NZ-Lys112
		3.48	O-Agua2060
		2.69	O-Agua2077
	OE1-Glu104	2.87	NZ-Lys112
		2.86	O-Agua2076
	N-Glu104	3.10	O-Arg98
		3.23	O-Phe102
	O-Glu104	2.67	O-Agua2078
	HsTIM Mutante E104D	OD2-Asp104	2.80
2.71			O-Agua2074
3.24			O-Agua2070
OD1-Asp104		2.63	O-Agua2070
		3.12	O-Agua2076
O-Asp104		2.66	O-Agua2075
N-Asp104		2.80	O-Arg98
		3.39	O-Phe102

5.5.5. El residuo de Asp en la TIM de *T. cruzi*

Comparando la región del Glu/Asp en las enzimas de *T. cruzi*, observamos que ambos residuos tienen el mismo número de interacciones, sin embargo, el tipo de contactos son diferentes, el Glu 105 establece 7 interacciones electrostáticas: 2 puentes salinos y 5 puentes de hidrógeno (tabla 7), mientras que el residuo de Asp forma un nuevo puente de hidrógeno y a su

vez, pierde la interacción de puente salino con la Arg 99 en la misma subunidad. El nuevo puente de hidrógeno se forma entre el OE2 de la cadena lateral del Asp y el N de la Gly 95 en la misma subunidad.

La formación de este nuevo contacto se asocia al desplazamiento del asa 4 donde reside el Asp 105; comparando los residuos que conforman la cavidad de la interfase, observamos que la cadena principal del asa 4 en la mutante de *T. cruzi* está desplazada en relación a la enzima silvestre; como lo muestran los valores de RMSD en la tabla 2 del anexo. El carbono α del Asp 105 tiene un valor de RMSD de 1.12 Å en relación al Glu, y este cambio en su cadena principal le permite formar una nueva interacción con la Gly 95 como lo ilustra la figura 29.

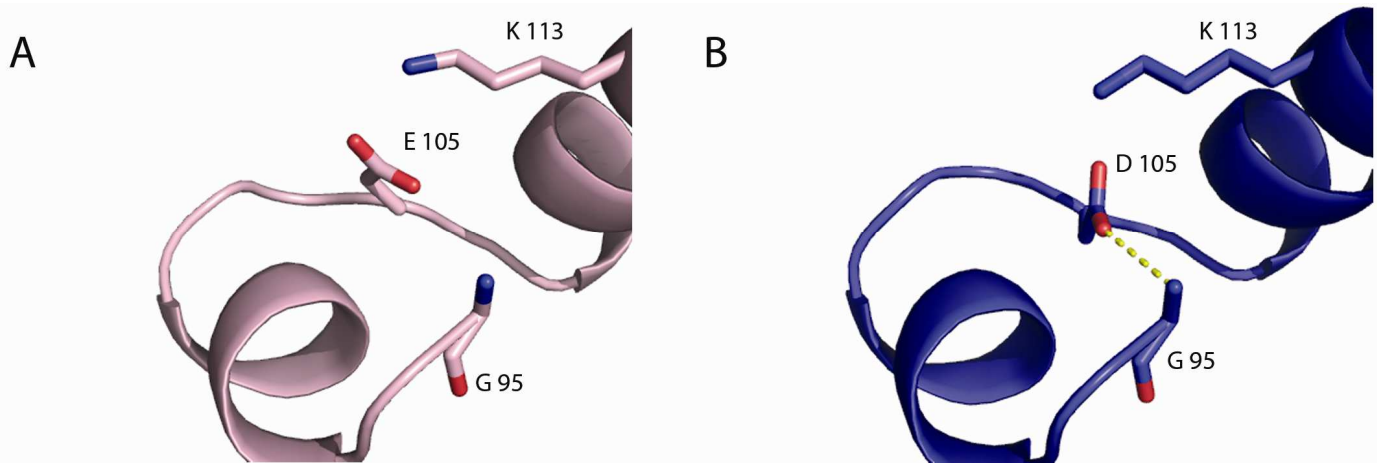


Figura 29. Un nuevo puente de hidrógeno se forma entre el Asp 105 y la Gly 95 en la mutante de *T. cruzi*. **Panel A.** Representación en listón de la región del Glu 105 en la enzima silvestre. **Panel B.** El residuo de Asp 105 forma un nuevo puente de hidrógeno con el N de la Gly 95 en la misma subunidad, esta interacción se asocia al desplazamiento del asa 4 donde reside el Asp 105.

Tabla 7. Contactos a distancia de puente de hidrógeno del Glu/Asp 105 en las enzimas de *T. cruzi*.

Proteína	Átomo	Distancia (Å)	Átomo
TcTIM Silvestre Monómero A	OE2-Glu105	2.96	NZ-Lys113
		3.42	Agua301
		2.84	NE-Arg99
		2.18	O-Agua289
	OE1-Glu105	2.64	O-Agua257
	N-Glu105	3.42	O-Arg99
3.14		O-Tyr103	
TcTIM Mutante Monómero A	OD2-Asp105	2.56	O-Agua401
		3.47	N-Gly95
	OD1-Asp105	2.66	O-Agua424
		2.82	NZ-Lys113
	O-Asp105	2.76	O-Agua423
	N-Asp105	3.12	O-Arg99
		3.44	O-Tyr103

5.5.6. El residuo de Asp en la TIM de *T. brucei*

El residuo de Glu 104 en la enzima silvestre establece diez interacciones electrostáticas (dos de ellas son puentes salinos), su cadena lateral tiene contactos con la Asn 66, Arg 98, Lys 112 y 3 moléculas de agua, mientras que la cadena principal forma puentes de hidrógeno con la Arg 98, la Tyr 102 y dos moléculas de agua (tabla 8). Analizando la región de la mutación en los seis dímeros presentes en la unidad asimétrica, observamos que los contactos del Asp 104 difieren en cada una de las enzimas, por ejemplo, el residuo de Asp tiene seis interacciones en el monómero C y D, mientras que los monómeros J y K exhiben solamente tres contactos. La posibilidad de estudiar la estructura de las seis enzimas mutantes nos brinda una mayor información de los cambios estructurales en la región de la mutación; con una pérdida variable

de los contactos del Asp 104 que posiblemente se relacionen con la disociación del dímero en monómeros inactivos, como lo demuestran los datos bioquímicos.

Tabla 8. Contactos a distancia de puente de hidrógeno del Glu/Asp 104 en las TIMs de *T. brucei*.

Proteína	Átomo	Distancia (Å)	Átomo
TbTIM Silvestre Monómero A	OE1-Glu104	2.68	O-Agua 2193
	OE2-Glu104	3.33	O-Agua2193
		3.49	OD1-Asn66
		2.92	NE-Arg98
		2.66	O-Agua2192
		2.76	NZ-Lys112
	N-Glu104	3.42	O-Agua2181
		3.30	O-Arg98
		3.32	O-Tyr102
	O-Glu104	2.74	O-Agua2194
TbTIM Mutante Monomer A	OD1-Asp104	2.72	NZ-Lys112
		2.56	O-Agua414
	OD2-Asp104	2.62	O-Agua408
	N-Asp104	3.37	O-Arg98
		3.37	O-Tyr102
O-Asp104	2.73	O-Agua409	
TbTIM Mutante Monomer B	OD1-Asp104	2.82	NZ-Lys112
		2.29	O-Agua472
	OD2-Asp104	2.29	O-Agua404
	N-Asp104	3.28	O-Arg98
3.16		O-Tyr102	
	OD1-Asp104	3.05	NZ-Lys112

TbTIM Mutante Monomer C		2.59	O-Agua404
	OD2-Asp104	2.78	O-Agua402
	N-Asp104	3.24	O-Arg98
		3.28	O-Tyr102
	O-Asp104	2.75	O-Agua454
TbTIM Mutante Monomer D	OD1-Asp104	2.70	O-Agua440
		2.89	NZ-Lys112
	OD2-Asp104	2.56	O-Agua404
	N-Asp104	3.27	O-Arg98
		3.44	O-Tyr102
O-Asp104	2.73	O-Agua429	
TbTIM Mutante Monomer E	OD1-Asp104	3.17	NZ-Lys112
	OD2-Asp104	2.82	O-Agua404
	N-Asp104	3.26	O-Arg98
		3.45	O-Tyr102
	O-Asp104	2.78	O-Agua444
TbTIM Mutante Monomer F	OD1-Asp104	2.81	NZ-Lys112
		3.10	O-Agua337
	N-Asp104	3.11	O-Tyr102
		3.08	O-Arg98
	O-Asp104	2.53	O-Agua301
TbTIM Mutante Monomer G	OD1-Asp104	2.98	NZ-Lys112
	OD2-Asp104	2.71	O-Agua305
	N-Asp104	3.25	O-Arg98
		3.27	O-Tyr102
	OD1-Asp104	3.24	NZ-Lys112
		2.63	O-Agua401

TbTIM Mutante Monomer H	OD2-Asp104	2.53	O-Agua420
	N-Asp104	3.14	O-Arg98
		3.32	O-Tyr102
TbTIM Mutante Monomer I	OD1-Asp104	2.92	NZ-Lys112
	OD2-Asp104	2.64	O-Agua311
	N-Asp104	3.24	O-Arg98
		3.31	O-Tyr102
	O-Asp104	2.82	O-Agua302
TbTIM Mutante Monomer J	OD1-Asp104	3.47	O-Tyr102
	N-Asp104	3.11	O-Arg98
		3.28	O-Tyr102
TbTIM Mutante Monomer K	OD1-Asp104	3.25	NZ-Lys112
	N-Asp104	2.97	O-Arg98
		3.34	O-Tyr102
TbTIM Mutante Monomer L	OD1-Asp104	3.18	NZ-Lys112
	OD2-Asp104	2.45	O-Agua305
	N-Asp104	3.05	O-Arg98
		3.24	O-Tyr102

5.5.7. El puente salino en la interfase

Como se describió previamente, los residuos de la cavidad forman puentes de hidrógeno a manera de una red con las moléculas de agua que hay en el interior de la cavidad y solamente dos residuos están en contacto directo, formando un puente salino en la interfase: la Arg 98 de una subunidad con el Glu 77 de la otra subunidad (según la numeración de la TIM de *H. sapiens*). Este puente salino está conservado en todas las TIMs de eucariotas y algunas de ellas comparten otro puente salino en la interfase: la Lys 18 y el Asp 48 como ocurre en la estructura de la TIM de *H. sapiens*. Analizando la estructura cristalográfica de las TIM depositadas en el PDB encontramos que las TIMs de bacterias tienen una gran variedad de puentes salinos en la

interfase, por ejemplo, la TIM de *Vibrio marinus* (63) una bacteria psicrófila y la de *E. coli* (64) tienen diez y ocho puentes salinos, respectivamente. La presencia de un número mayor de puentes salinos en la interfase de la TIM de bacterias, sugiere que estas interacciones contribuyen a la estabilidad del dímero, una estrategia estructural adquirida por las proteínas de estos organismos que viven en diferentes medios ambientes.

Por otra parte, la estructura cristalográfica de la mutante de humano (14) reveló que el cambio de un Glu/Asp resulta en la pérdida de dos contactos con la Arg 98, la cual a su vez pierde una interacción salina con el Glu 77 de la otra subunidad. En las estructuras de las mutantes de tripanosomas (figura 30), la Arg 98 (según la numeración de la secuencia de la TIM de *H. sapiens*) sustituye la interacción con el Glu/Asp por puentes de hidrógeno con moléculas de agua vecinas; posiblemente este arreglo estructural le permite a la Arg 98 mantener la conformación necesaria para establecer el puente salino de la interfase. Como ilustra la figura 30, el patrón de puentes de hidrógeno es muy similar en ambas mutantes de tripanosomas. En la tabla 9 se enlistan las distancias del puente salino de la interfase en las enzimas estudiadas.

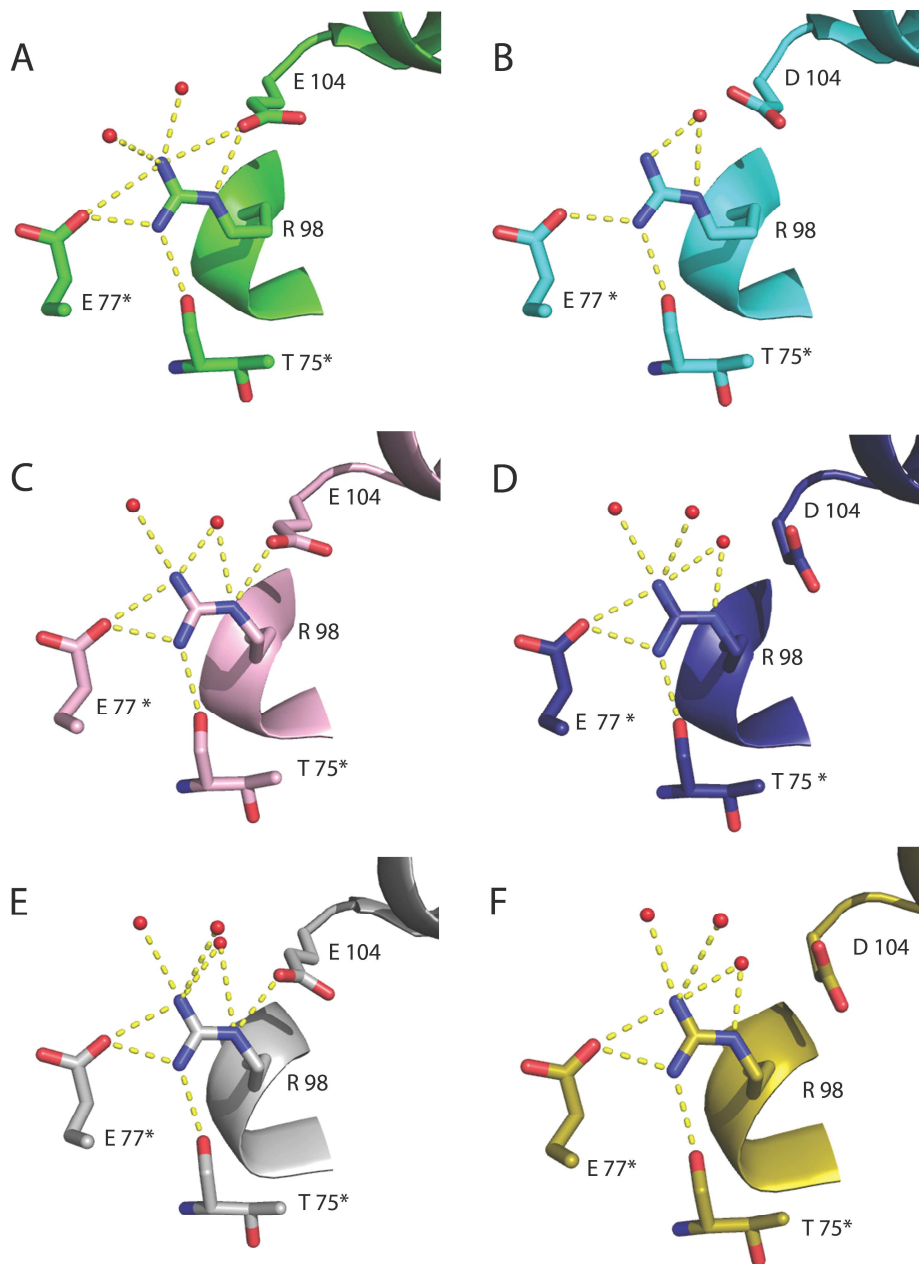


Figura 30. Puente salino en la interfase. Representación en "varilla" de los residuos que participan en la formación del puente salino E77 y R98 (los residuos marcados con asterisco corresponden a la subunidad B). **A** HsTIM wt (código pdb 2JK2), **B** HsTIM E104D (código pdb 2VOM), **C** TcTIM wt (código pdb 1TCD), **D** TcTIM E104D (código pdb 4HHP), **E** TbTIM wt (código pdb 2J24), **F** TbTIM E104D (código pdb 4JEQ). Las distancias de puente de hidrógeno entre los átomos de los residuos se marcan en líneas punteadas de color amarillo y las esferas en rojo representan moléculas de agua.

Tabla 9. Distancia del puente salino de la interfase en las TIMs de *H. sapiens*, *T. cruzi* y *T. brucei*.

Residuo	Átomo	Distancia Å	Residuo	Átomo	Residuo	Átomo	Distancia Å	Residuo	Átomo
HsTIM wt					HsTIM E104D				
Arg 98/A	NH1	2.79	Glu 77/B	OE2	Arg 98/A	NH1	2.87	Glu 77/B	OE2
Arg 98/A	NH2	3.5	Glu 77/B	OE2	Arg 98/A	NH2	3.73	Glu 77/B	OE2
TcTIM wt					TcTIM E104D				
Arg 98/A	NH1	2.78	Glu 77/B	OE2	Arg 98/A	NH1	2.87	Glu 77/B	OE2
Arg 98/A	NH2	3.11	Glu 77/B	OE2	Arg 98/A	NH2	3.08	Glu 77/B	OE2
TbTIM wt					TbTIM E104D				
Arg 98/A	NH1	2.82	Glu 77/B	OE2	Arg 98/A	NH1	2.83	Glu 77/B	OE2
Arg 98/A	NH2	3.14	Glu 77/B	OE2	Arg 98/A	NH2	3.18	Glu 77/B	OE2

El puente salino se forma por los átomos NH1 y NH2 de la Arg 98 de una subunidad (A), con el átomo OE2 del Glu 77 de la otra subunidad (B). En las mutantes de tripanosomas se conserva la distancia óptima de puente salino, en cambio en la de humano se pierde el contacto entre el NH2 de la Arg 98 y el OE2 del Glu 77, la distancia es mayor a 3.5 Å.

6. Discusión y conclusiones

El Glu 104 y la TIM de *H. sapiens*

En el presente trabajo estudiamos el efecto de la mutación Glu/Asp 104 sobre la estructura y función de la TIM perteneciente a cuatro organismos: *T. brucei*, *T. cruzi*, *G. lamblia* y *H. sapiens*. El Glu 104 forma parte de una cavidad en la interfase del dímero y los residuos que revisten la superficie de una cavidad generalmente tienen un carácter polar (67), esta propiedad les permite formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que residen en el interior de dicha cavidad.

El cambio de un Glu por un Asp en la posición 104 es la mutación más frecuente (~80%) y responsable de la deficiencia de la TIM en el humano, que da lugar a una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por una disminución de la actividad enzimática y una elevación de la concentración del sustrato DHAP. Se manifiesta clínicamente por anemia hemolítica y trastornos neurodegenerativos y musculares que causan la muerte prematura del paciente (13). Se han diseñado varios modelos de estudio para entender las bases moleculares de esta enfermedad, por ejemplo, el grupo de Markus *et al* (65) mediante ensayos *in vivo* en levadura, observaron que las células transformadas con las TIMs mutantes de humano eran viables en un medio rico en glucosa comparable con la enzima silvestre, lo que demostraba que la actividad catalítica de las enzimas mutantes no estaba alterada.

Por otra parte, la determinación de la estructura cristalográfica de la TIM mutante de humano a una resolución de 1.85 Å (14) reveló que la arquitectura del sitio catalítico estaba conservada, y los ensayos bioquímicos *in vitro* demostraron que la actividad enzimática es muy similar entre la proteína silvestre y la mutante. Estos datos indicaron que la disminución de la actividad en extractos de cultivos celulares de pacientes con la TIM E104D, no se debía a una alteración del sitio catalítico *per se*, sino a cambios estructurales en la región de la interfase del dímero, que favorecían la disociación de la enzima en monómeros inactivos.

El efecto del cambio de un Glu por un Asp en la posición 104 y 105 en la estructura y función de la TIM de *T. brucei* y *T. cruzi*, respectivamente

El residuo de Glu en la posición 104 (considerando la numeración de la secuencia de la TIM de *T. brucei*) está conservado en la secuencia de las TIMs de eucariotas y bacterias y forma parte de un grupo de residuos conservados en la cavidad de la interfase del dímero. La mutación E104D da lugar a una enzima termolábil, como lo demostró el grupo de O. Daar (33) midiendo la actividad enzimática de la TIM proveniente de cultivos de fibroblastos de pacientes. Estos autores observaron la desaparición de la actividad catalítica después de 40 min de incubación a una temperatura de 52 °C. En contraste con una actividad residual del 17% de la TIM de pacientes sin la mutación, a esa misma temperatura.

En el presente trabajo realizamos ensayos de actividad enzimática a diferentes temperaturas, y observamos una diferencia significativa entre las enzimas mutantes y silvestres a una temperatura de 48 °C. La sensibilidad a esa temperatura fue más evidente en la estructura de la mutante de *T. brucei*, quien presentó una pérdida total de su actividad en los primeros quince minutos de incubación. En contraste, la enzima mutante de *T. cruzi* conservó un 40% de su actividad después de una hora de incubación a esa misma temperatura y presentó una pérdida de la actividad muy similar a la enzima silvestre (~50%). Con estos resultados concluimos que el cambio de un residuo conservado tiene un efecto diferente en la termoestabilidad de dos proteínas homólogas. Las enzimas de tripanosomas comparten una alta identidad en su secuencia primaria (~73%) y sus estructuras cristalográficas se superponen con un RMS de 0.96 Å (3).

En relación a la energía de activación (E_A) por calorimetría de barrido, se obtuvieron valores en un intervalo muy amplio tanto en las proteínas silvestres (~350-800 kJ mol⁻¹) como en las mutantes (~480-800 kJ mol⁻¹) y comparando la E_A entre una enzima silvestre y su mutante correspondiente observamos que en las enzimas de humano y *T. cruzi* las diferencias son de 430 y -78 kJ mol⁻¹, respectivamente, lo que indica que la mutación E104D afecta de manera distinta la energía del estado de transición en el proceso de desnaturalización. También se evaluó la estabilidad cinética de las enzimas a una misma temperatura (37 °C) y se observó que los valores de k obtenidos mediante una extrapolación de la gráfica de Arrhenius eran

varios órdenes de magnitud menor en las enzimas de *T. cruzi* silvestre y mutante en comparación con las otras proteínas (de *H. sapiens*, *T. brucei* y *G. lamblia*), lo que indicaba una mayor estabilidad cinética.

Como muestran los datos de DSC y los ensayos enzimáticos a diferentes temperaturas, las proteínas estudiadas exhiben diferencias en su susceptibilidad a la mutación E104D, estos resultados indican que el cambio de un aminoácido conservado no contribuye de igual manera a las propiedades globales en las enzimas homólogas.

Por otra parte, los ensayos de sensibilidad al reactivo DTNB mostraron que la accesibilidad al agente sulfhidrilo difiere entre las enzimas silvestres y mutantes. Las TIMs de tripanosomas tienen una Cys en la interfase rodeada por el asa 3 de la otra subunidad; la derivatización de este residuo induce cambios conformacionales en grado variable en cada una de las enzimas. Se ha demostrado que el efecto de la derivatización se relaciona con la longitud del asa 3, a mayor número de residuos son menores los cambios estructurales inducidos por el agente sulfhidrilo (20, 53). También se ha reportado (3) que la reactividad de la Cys depende de la presencia de aminoácidos distantes a la región de la interfase.

Comparando el número de Cys derivatizadas entre las proteínas silvestres y las mutantes, observamos que la sensibilidad al DTNB es muy similar entre las enzimas de *T. cruzi* a diferencia de la mutantes de *T. brucei* y *H. sapiens* que muestran una mayor susceptibilidad al reactivo. Sin embargo, se requiere de un estudio más detallado de los cambios estructurales que favorecen un acceso mayor del reactivo sulfhidrilo al interior de las enzimas mutantes. Estos ensayos bioquímicos muestran que el cambio de un aminoácido conservado también afecta las propiedades químicas de residuos distantes al sitio de la mutación.

La estructura cristalográfica de las mutantes de tripanosomas

La estructura cristalográfica de las mutantes de tripanosomas también reveló que la conformación de los residuos catalíticos no cambia. Este hallazgo cristalográfico correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos bioquímicos de las enzimas recombinantes, que nos

mostraron parámetros cinéticos muy similares entre las enzimas silvestres y sus respectivas mutantes.

Con la obtención de las estructuras cristalográficas pudimos comparar el efecto de la mutación E104D a nivel atómico en las enzimas homólogas. Primero medimos las interacciones electrostáticas del Glu 104 en las enzimas silvestres y observamos que en la TIM de *H. sapiens* el residuo de Glu 104 establece un número mayor de puentes de hidrógeno con los residuos vecinos en comparación con las proteínas de tripanosomas. Con el cambio de un Glu/Asp (el acortamiento de un grupo metilo en la cadena lateral) el arreglo estructural en la región de la mutación varía al comparar las diferentes enzimas. El Asp 104 en la mutante de *H. sapiens* pierde tres interacciones, dos de ellas con la Arg 98 (la cual a su vez establece el puente salino en la interfase: el Glu 77 de una subunidad con la Arg 98 de la otra subunidad). La pérdida de estos puentes de hidrógeno induce un cambio conformacional en la cadena lateral de la Arg 98, de tal manera que ya no tiene una distancia óptima para formar el puente salino en la interfase (figura 30). Estos cambios estructurales se relacionan con una enzima termolábil (14).

Por otra parte, la presencia de seis dímeros en la unidad asimétrica del cristal de la mutante de *T. brucei* nos permitió observar cambios estructurales variables en la región de la mutación. Los monómeros C y D pierden 5 interacciones y los monómeros J y K solamente conservan 3 de las 10 interacciones electrostáticas formadas por el Glu 104, sin embargo estos cambios estructurales no conllevan a la pérdida del puente salino intermonomérico. Un dato cristalográfico común en ambas estructuras de tripanosomas, es la presencia de moléculas de agua en sitios equivalentes cercanos a la mutación. Los puentes de hidrógeno establecidos entre el Glu 104 y la Arg 98 son sustituidos por interacciones entre la Arg 98 y moléculas de agua, formando una geometría de puentes de hidrógeno muy parecida en ambas estructuras, lo que sugiere que estas interacciones contribuyen a mantener una conformación necesaria de la Arg 98 para establecer el puente salino.

Por otra parte, la pérdida de las interacciones entre los residuos que delinean la cavidad se relacionan con la disociación del dímero en monómeros inactivos (14), como indican los ensayos bioquímicos en las mutantes, que muestran un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de los monómeros inactivos, así como una alteración en el replegamiento de los monómeros desnaturalizados con GdnHCl, siendo más evidente en la estructura de las mutantes de *T. brucei* y *H. sapiens*. Estos datos se relacionan con un trabajo previo de Markus *et al* (65),

en el que se demuestra mediante el sistema de doble híbrido en levadura que la asociación de los monómeros de la mutante de humano E104D se encuentra afectada.

La estructura de la mutante de *T. cruzi* reveló que el Asp 105 (según la numeración de la TIM de *T. cruzi*) mantiene el mismo número de interacciones electrostáticas que el Glu 105, sin embargo estas interacciones son diferentes. El Glu 105 forma dos puentes salinos: uno con el NZ de la Lys 113 y el otro con el NE de la Arg 99, a diferencia del Asp 105 que pierde la interacción con la Arg 99 y establece un nuevo puente de hidrógeno con el N de la Gly 95 en la misma subunidad. El arreglo estructural se asocia con un desplazamiento del asa 4 donde reside el Asp 105. Esta plasticidad estructural solamente se observó en la mutante de *T. cruzi* y posiblemente se relacione con una estructura más dinámica que compense el cambio de un Glu/Asp, como lo demuestran los datos bioquímicos y de DSC.

En las TIMs estudiadas, observamos que la mutación E104D afecta la formación del dímero y la estabilidad cinética, sin embargo, las enzimas exhiben diferencias en la susceptibilidad a la mutación E104D, indicando que los aminoácidos conservados no contribuyen de igual manera a las propiedades globales en las enzimas homólogas, estos hallazgos indican que la importancia funcional de un aminoácido depende del contexto estructural general de la enzima.

Las enzimas homólogas tienen diferente composición de aminoácidos y se puede asumir que adquieren características estructurales propias como una adaptación al medio ambiente donde viven los organismos a los que pertenecen. Por ejemplo, *T. cruzi* y *T. brucei* tienen un complejo ciclo celular (44), son capaces de desarrollarse en medios extra e intracelulares, y pueden tener diferentes hospederos. A lo largo de su vida, estos parásitos resisten de manera exitosa a los cambios bruscos de pH, concentración de oxígeno y composición de iones, por mencionar algunas condiciones. El ciclo celular de *G. lamblia* es relativamente simple en comparación con el de los tripanosomas, ya que este parásito vive en el tracto intestinal de los mamíferos hasta ser excretada en su forma quística. En contraste con la vida de los parásitos, las células de *H. sapiens* subsisten en condiciones constantes. Esto sugiere que la estabilidad cinética de las proteínas se relaciona con las condiciones de vida de los organismos a los que

pertenecen. La proteína de humano es más susceptible a la mutación E104D y por otra parte la mutante de *T. cruzi* mostró una mayor estabilidad cuaternaria en comparación a las otras enzimas estudiadas. Coincidentemente el *Trypanosoma cruzi* es el organismo que tiene el ciclo celular más variado de todos los organismos estudiados. Podemos asumir que la estabilidad cinética de cada enzima depende de su contexto molecular, que cada proteína homóloga tiene una secuencia particular, y establece grupos de interacciones distintivas que le confieren una identidad única que ha evolucionado para contribuir a la función y estabilidad del organismo al que pertenece.

7. Perspectivas

7.1. En relación a la susceptibilidad al DTNB en las enzimas mutantes

- Estudiar los cambios en las interacciones locales en cada una de las Cys presentes en las estructuras de las mutantes E104D.

7.2. En relación al análisis de la estructura cristalográfica de las mutantes

- Comparar el cambio en el volumen de la cavidad de la interfase entre las enzimas silvestres y mutantes. Estudiar los cambios en el área de superficie expuesta y oculta de los residuos que conforman la cavidad.
- Estudiar los cambios en las interacciones hidrofóbicas en la interfase del dímero en la estructura de las mutantes.
- Analizar las conformaciones del asa 4 en las estructuras de las TIMs depositadas en el *Protein Data Bank*.

7.3. En relación a los estudios de calorimetría diferencial de barrido

- Realizar estudios de calorimetría diferencial de barrido en las TIMs pertenecientes a otros organismos, que vivan en ambientes con variaciones en el pH, temperatura, composición iónica.

8. Anexo

Tabla 1. Residuos que forman la superficie de la cavidad en la interfase del dímero en las enzimas estudiadas. La identificación de los residuos se realizó mediante el programa CASTp (59). Solamente se muestran los residuos de la unidad A, que a manera de un espejo interactúan con los residuos de la otra subunidad. En verde se somborean los residuos que conforman la cavidad en las enzimas silvestres y en cian los residuos en las enzimas mutantes. En las secuencias de las TIMs de eucariotas solamente se conservan los residuos de Asn 66, Glu 77, Arg 98, Glu 104 y Lys 112 (según la numeración de la HsTIM).

Hs TIM wt subunidad A				
2- SKPQP1AAAN	WKCNGSQQSL	SELIDLFNST	SINHVDVQCVV	ASTFVHLAMT
52- KERLSHPKFV	IAAQNAIAKS	GAFTGEVSLP	ILKDFGVNWI	VLGHSEERRAY
102- YGDTNEIVAD	KVAAAVASGF	MVIACIGETL	QERESGRTAV	VVLTQIAAIA
152- KKLKKADWAK	VVIAIYEPVWA	IGTGKVATPQ	QAQEAHALIR	SWVSSKIGAD
202- VAGELRILYG	GSVNGKNART	LYQQRDVNGF	LVGGASLKPE	FVDIHKATQ
Hs TIM E104D subunidad B				
1- MSKPQP1AAA	NWKCNGSQQS	LSELIDLFNS	TSINHVDVQCV	VASTFVHLAM
51- TKERLSHPKF	VIAAQNAIAK	SGAFTGEVSL	PILKDFGVNW	IVLGHSEERRA
101- YYGDTNEIVA	DKVAAAVASG	FMVIACIGET	LQERESGRTA	VVLTQIAAI
151- AKKLKKADWA	KVVIAIYEPVW	AIGTGKVATP	QQAQEAHALI	RSWVSSKIGA
201- DVAGELRILY	GGSVNGKNAR	TLYQQRDVNG	FLVGGASLKP	EFVDIHKATQ

Tb TIM wt subunidad A				
2- RKFFVGGNWK	MNGRKQSLGE	LIGTLNAAKV	PADTEVVCAP	P T AYIDFARQ
54- KLDPKIAVAA	Q NC YKVTNGA	FT GE ISPGMI	KDCGATWVVL	GHSE RRHVFG
104- E SDE L IG Q K V	AHALAEGLV	IACIGEKLDE	REAGITEKVV	FEQTKVIADN
154- VKDWSKVVLA	YEPVWAIGTG	KTATPQQAQE	VHEKLRGWLK	SNVSDAVAQS
204- TRIIYGGSVT	GATCKELASQ	PDVDGFLVGG	ASLKPEFVDI	INAKQ
Tb TIM E104D subunidad A				
4- RKFFVGGNWK	MNGRKQSLGE	LIGTLNAAKV	PADTEVVCAP	P T AYIDFARQ
54- KLDPKIAVAA	Q NC YKVTNGA	FT GE ISPGMI	KDCGATWVVL	GHSE RRHVFG
104- D SDE L IG Q K V	AHALAEGLV	IACIGEKLDE	REAGITEKVV	FEQTKVIADN
154- VKDWSKVVLA	YEPVWAIGTG	KTATPQQAQE	VHEKLRGWLK	SNVSDAVAQS
204- TRIIYGGSVT	GATCKELASQ	PDVDGFLVGG	ASLKPEFVDI	INAKQ

Tc TIM wt subunidad A				
4- KPQPIAAANW	KCNGSESLLV	PLIETLNAAT	FDHDVQCVVA	PTFLHIPMTK
54- ARLTNPKEFQI	AAQNAITRSG	AFTGEVSLQI	LKDYGISWVW	LGHSERRLYY
103-GETNEIVAEK	VAQACAAGFH	VIVCVGETNE	EREAGRRTAAV	VLTQLAAVAQ
153-KLSKEAWSRV	VIAAYEPVWAI	GTGKVATPQQ	AQEVHELLRR	WVRSKLGTDI
203-AAQLRILYGG	SVTAKNARTL	YQMRDINGFL	VGGASLKPEF	VEIIEATK
Tc TIM E104D subunidad B				
3- SKQP1AAAN	WKCNGSESLV	VPLIETLNAA	TFDHDVQCVV	APTFLHIPMT
53- KARLTNPKEFQ	IAAQNAITRS	GAFTGEVSLQ	ILKDYGISWV	VLGHSERRLY
103-YGD TNEIVAE	KVAQACAAGF	HVIVCVGETN	EEREAGRRTAA	VVLTQLAAVA
153-QKLSKEAWSR	VVIAAYEPVWA	IGTGKVATPQ	QAQEVHELLR	RWVRSKLGTD
203-IAAQLRILYG	GSVTAKNART	LYQMRDINGF	LVGGASLKPE	FVEIIEATK

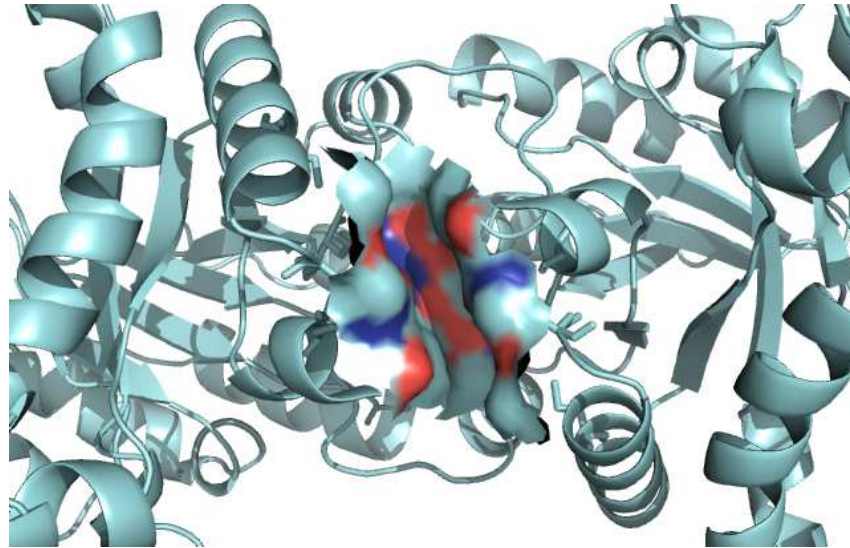


Figura 1. Representación de la cavidad en la interfase del dímero mediante el programa CASTp (59), se ilustra la superficie de los residuos que delinean la cavidad y se colorean según los elementos (rojo- oxígeno, azul-nitrógeno y en cian-carbono). La figura muestra la estructura de la enzima silvestre de *T. cruzi* (código PDB 1TCD).

Tabla 2. Residuos de la cavidad del dímero en la TIM de *Trypanosoma cruzi*, con los valores de RMSD, factores β y la región de la estructura a la que pertenecen.

Residuo		XYZ diferencia wt/E104D		Factores β wt		Factores β E104D		Estructura secundaria/asa	Región
		sub A	sub B	sub A	sub B	sub A	sub B		
Phe	46	0.17	0.29	14.10	7.90	11.70	7.80	hélice	2
Asn	67	0.19	0.14	15.10	14.60	7.00	7.10	asa	3
Ala	68	0.20	0.19	16.20	18.20	7.40	8.60	asa	3
Ile	69	0.16	0.13	16.80	12.90	7.50	8.70	asa	3
Thr	70	0.18	0.07	19.30	17.40	12.50	14.70	asa	3
Arg	71	0.11	0.19	39.10	34.30	17.90	28.90	asa	3
Phe	75	0.12	0.41	16.00	17.00	9.10	12.50	asa	3
Gly	77	0.16	0.16	12.60	15.80	7.10	6.60	asa	3
Glu	78	0.17	0.13	15.40	12.00	7.60	8.80	asa	3
Val	79	0.24	0.14	15.20	11.90	7.30	7.70	asa	3
Arg	99	0.41	0.21	17.40	14.50	9.20	7.80	hélice	4
Tyr	103	1.00	0.89	21.10	26.30	13.20	12.50	asa	4
Gly	104	1.43	1.67	24.20	25.40	11.90	11.30	asa	4
Glu/Asp	105	1.12	0.97	19.10	18.80	13.40	13.20	asa	4
Ile	109	0.40	0.28	17.20	16.90	12.50	10.60	hélice	4
Lys	113	0.18	0.21	14.40	14.30	8.10	7.80	hélice	4

Tabla 2. Residuos de la cavidad de la TIM de *Homo sapiens*, con los valores de RMSD, factores β y la región de la estructura a la que pertenecen.

Residuo		XYZ diferencia wt/E104D		Factores β wt		Factores β E104D		Estructura secundaria/ asa	Región
		sub A	sub B	sub A	sub B	sub A	sub B		
Thr	45	0.20	0.19	8.70	9.10	14.20	15.00	hélice G	2
Asn	65	0.19	0.09	8.40	8.50	13.30	14.30	asa	3
Cys	66	0.23	0.12	8.50	8.90	14.90	14.50	asa	3
Gly	76	0.07	0.20	8.20	7.60	14.20	14.80	asa	3
Glu	77	0.18	0.12	9.80	9.20	15.70	16.70	asa	3
Ile	78	0.21	0.13	8.70	8.20	14.70	13.20	asa	3
Arg	98	0.19	0.09	13.30	13.20	19.20	20.30	hélice	4
Val	101	0.32	0.27	16.20	16.70	25.30	24.90	asa	4
Phe	102	0.46	0.25	15.90	16.30	23.50	23.70	asa	4
Gly	103	0.60	0.62	16.10	17.00	24.50	25.80	asa	4
Glu/Asp	104	0.50	0.52	15.60	16.10	26.20	27.00	asa	4
Leu	108	0.05	0.09	14.70	14.50	19.40	19.20	hélice	4
Lys	112	0.23	0.14	9.60	8.90	13.90	12.80	hélice	4

Tabla 2. Residuos de la cavidad de la interfase del dímero de la TIM de *Trypanosoma brucei* con los valores de RMSD, factores β y la región de la estructura a la que pertenecen.

Residuo		XYZ diferencia wt/E104D		Factores β wt		Factores β E104D		Estructura secundaria/ asa	Región
		sub A	sub B	sub A	sub B	sub A	sub B		
Phe	45	0.19	0.13	6.50	5.70	11.60	12.80	hélice G	2
Asn	66	0.26	0.11	6.50	7.30	12.60	11.00	asa	3
Ala	67	0.47	0.08	6.10	5.80	12.90	9.00	asa	3
Ile	68	0.39	0.25	5.90	5.90	11.70	10.30	asa	3
Gly	76	0.53	0.20	3.80	4.40	12.20	10.60	asa	3
Glu	77	0.54	0.15	5.00	5.00	13.80	14.60	asa	3
Val	78	0.50	0.21	4.10	5.20	11.10	10.30	asa	3
Arg	98	0.51	0.35	8.60	7.30	12.80	14.60	hélice	4
Tyr	101	0.59	0.29	8.30	8.90	24.90	25.70	hélice	4
Tyr	102	0.69	0.39	6.70	6.30	16.10	17.90	asa	4
Gly	103	0.68	0.66	7.50	6.50	18.00	23.90	asa	4
Glu/Asp	104	0.87	0.86	7.40	6.50	18.20	20.00	asa	4
Ile	108	0.26	0.38	8.70	9.20	15.50	18.10	hélice	4
Lys	112	0.13	0.28	4.80	5.70	12.70	15.80	hélice	4
Ile	109	0.40	0.28	17.20	16.90	12.50	10.60	hélice	4
Lys	113	0.18	0.21	14.40	14.30	8.10	7.80	hélice	4

9. Referencias

1. Minor DL, Kim PS. Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature* 1996;380:730-734.
2. Lockless SW, Ranganathan R. Evolutionary conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science* 1999;286:295-299.
3. García-Torres I, Cabrera N, Torres-Larios A, Rodríguez-Bolaños M, Díaz-Mazariegos S, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *PLoS ONE* 2011;6:e1879.
4. Freire E. The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: and analysis of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:10118-10122.
5. Halabi N, Rivoire O, Leibler S, Ranganathan R. Protein sectors: evolutionary units of three-dimensional structure. *Cell* 2009;138:774-786.
6. Hey Y, Chen Y, Alexander P, Bryan PN, Orban J. NMR structure of two designed proteins with high sequence similarity, but different folds and function. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:14412-14417.
7. Knowles JR. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 1991;350:121-124.
8. Wierenga RK, Kapetaniou EG, Venkatesan R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:3961-3982.
9. Waley SG. Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem J.* 1973;135:165-172.
10. Zomosa-Signoret V, Hernández-Alcántara G, Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Garza-Ramos G, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. Control of reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* 2003;42:3311-3318.
11. Schneider AS. Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol* 2000;13:119-140.
12. Orosz F, Oláh J, Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency facts and doubts. *IUBMB Life* 2006;58:703-715.
13. Orosz F, Oláh J, Ovadi, J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1168-1174.

14. Rodríguez-Almazán C, Arreola R, Rodríguez-Larrea D, Aguirre-López B, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R, Costas M, Gómez-Puyou A, Torres-Larios A. Structural basis of triosephosphate isomerase deficiency: Mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem* 2008;283:23254-23263.
15. Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. Refined 1.83 Å 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*. 1991;220:995-1015.
16. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol* 1998;283:193-203.
17. Reyes-Vivas H, Díaz A, Peón J, Mendoza-Hernández G, Hernández-Alcántara G, De la Mora-de la Mora I, Enriquez-Flores S, Domínguez-Ramírez L, López-Velarde G. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol* 2007;365:752-763.
18. Borchert TV, Pratt K, Zeelen JP, Callens M, Noble ME, Opperdoes FR, Michels PA, Wierenga RK. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* 1993;211:703-710.
19. Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* 1997;244:700-705.
20. Enriquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, De la Mora de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Mendez ST, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velazquez G, Reyes-Vivas H. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: A study for antiparasitic drug design. *Proteins* 2011;79:2711-2724.

21. López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H. An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins* 2004;55:824-834.
22. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr* 2010;66:125-132.
23. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* 1994;50:760-763.
24. Evans P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr* 2006; 62:72-82.
25. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 2007;40:658-674.
26. Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung L-W, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC. PHENIX: Building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr*. 2002; 58:1948-1954.
27. Emsley P, Cowtan K. COOT: Model-Building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr*. 2004;60:2126-2132.
28. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*. 1993;26:283-291.
29. Krissinel E, Henrick KJ. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol*. 2007; 372(3):774-797.
30. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>
31. Costas M, Rodríguez-Larrea D, De Maria L, Borchert T, Gómez-Puyou A, Sánchez-Ruiz JM. Between species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol* 2009;385:924-937.
32. Rodríguez-Larrea D, Minning S, Borchert TV, Sanchez-Ruiz JM. Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *J Mol Biol* 2006;360:715-724.
33. Daar IO, Artymiuk PJ, Phillips DC, Maquat LE. Human triose-phosphate isomerase deficiency: A single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:7903-7907.
34. Repiso A, Boren J, Ortega F, Pujades A, Centelles J, Vives-Corróns JL, Climent F, Cascante M, Carreras J. Triosephosphate isomerase deficiency. genetic, enzymatic

- and metabolic characterization of a new case from Spain. *Haematologica* 2002;87:ECR12
35. Sánchez-Ruíz JM. Theoretical analysis of the Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J* 1992;61:921-935.
 36. Myers JK, Pace CN, Scholtz JM. Denaturant *m* values and heat capacity changes in accessible surface areas of protein folding. *Protein Sci* 1995;4:2138-2148.
 37. Robertson AD, Murphy KP. Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem Rev* 1997;97:1251-1268.
 38. Axe DD. Extreme functional sensitivity in conservative amino acid changes on enzyme exteriors. *J Mol Biol* 2000;301:585-596.
 39. Yanofsky C, Horn V, Thorpe D. Protein structure relationships revealed by mutational analysis. *Science* 1964;146:1593-1594.
 40. Davis BH, Poon AFY, Whitlock MC. Compensatory mutations are repeatable and clustered within proteins. *Proc R So. B* 2009;276:1823-1827.
 41. Poon A, Davis BH, Chao L. The coupon collector and the suppressor mutation: Estimating the number of compensatory mutations by maximum likelihood. *Genetics* 2005;170:1323-1332.
 42. Oria-Hernandez J, Rivero-Rosas H, Ramírez-Silva L. Dichotomic phylogenetic tree of the pyruvate kinase family: K⁺-dependent and ⁻independent enzymes. *J Biol Chem* 2006;281:30717-30724.
 43. Saab-Rincón G, Olvera L, Olvera M, Rudiño-Piñera E, Benites E, Soberón X, Morett E. Evolutionary walk between (β/α)₈ barrels : Catalytic migration from triosephosphate isomerase to thiamine phosphate synthase (2012). *J Mol Biol* 2012 416, 255-270.
 44. Gilles HM. *Protozoan Diseases*. New York. Oxford University Press; 1999.
 45. Sanchez-Ruiz JM. On promiscuity, changing environments and the possibility of replaying the molecular tape of life. *Biochem J* 2012;445:e1-e3.
 46. Breen S, Kemena C, Vlasov PK, Notredame C, Kondrashov FA. Epistasis as the primary factor en molecular evolution. *Nature* 2012;490:533-538.
 47. Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* (1975) **255**:609-614.

48. Helen Walden, Garry L. Taylor, Esben Lorentzen, Ehmke Pohl, Hauke Lilie, Alexander Schramm, Thomas Knura, Kim Stubbe, Britta Tjaden, Reinhard Hensel. Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* (2004) 342, 861-875.
49. Momen, H., 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a comentary on characterization and nomeclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 181-184.
50. Anis Rass, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet* 2010; 375:1388-1402.
51. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8:413-422.
52. Habeeb, A.F.S.A., *Methods in Enzymology*, 25, 457 (1972).
53. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Pérez- Montfort R, Gómez-Puyou A. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity, Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem* 1998; 253:684-691.
54. Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga R, Rojo-Domínguez A, Pérez- Montfort R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action, studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology* 1995; 2:847-855.
55. Pace CN. Determiration and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymology* 1986; 13/:266-280
56. Tanford C. Protein denaturation part C : Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv Protein Chem* 1970;24:1-95.
57. Krissinel E, Henrick K. Detection of protein assemblies in crystals. *Computational Life Sciences* 2005; 3695: 163-174.
58. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS and Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* 2010; D66:12-21
59. Joe Dundas, Zheng Ouyang, Jeffery Tseng, Andrew Binkowski, Yaron Turpaz, and Jie Liang. CASTp: computed atas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. 2006 *Nucleic. Acids Res* 2006; 34:W116-W118.

60. Sumathi K, Ananthalakshmi P, Roshan MN and Sekar K. 3dSS: 3D structural superposition. Nucl. Acids Res. 2006; 34:W128-W132.
61. Matthews BW. 1968. Solvent content of protein crystals. J Mol Biol 1968; 33:491-497.
62. Kantardjieff KA, Rupp B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. Protein Science 2003; 12:1865-1871.
63. Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK; Maes D. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. J Mol Biol 1998; 273 (4):2199-206.
64. Noble ME, Zeelen JP, Wierenga RK, Mainfroid V, Goraj K, Gohimont AC, Martial JA. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. Acta Crystallogr., Sect. D 1993; 49: 403-417.
65. Markus R, Heeren G, Breitenbach M, Lehrach H, Krobitsch S. Triosephosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization, non catalytic inactivity of the mutant enzymes. Plos One 2006 1: e30.
66. Merkle S and Pretsch W. Characterization of triosephosphate isomerase mutants with reduced enzyme activity in *Mus musculus*. Genetics 1989; 123: 837-844.

10. Artículo publicado

Different contribution of conserved amino acids to the global properties of triosephosphate isomerases

Yolanda Aguirre,¹ Nallely Cabrera,¹ Beatriz Aguirre,¹ Ruy Pérez-Montfort,¹ Alejandra Hernandez-Santoyo,² Horacio Reyes-Vivas,³ Sergio Enríquez-Flores,³ Marietta Tuena de Gómez-Puyou,¹ Armando Gómez-Puyou,^{1*} Jose M. Sanchez-Ruiz,^{4*} and Miguel Costas^{5*}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F, México

² Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F, México

³ Laboratorio de Bioquímica-Genética, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, 04530, México, D.F, México

⁴ Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain

⁵ Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F, México

ABSTRACT

It is generally assumed that the amino acids that exist in all homologous enzymes correspond to residues that participate in catalysis, or that are essential for folding and stability. Although this holds for catalytic residues, the function of conserved noncatalytic residues is not clear. It is not known if such residues are of equal importance and have the same role in different homologous enzymes. In humans, the E104D mutation in triosephosphate isomerase (TIM) is the most frequent mutation in the autosomal diseases named “TPI deficiencies.” We explored if the E104D mutation has the same impact in TIMs from four different organisms (*Homo sapiens*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei*). The catalytic properties were not significantly affected by the mutation, but it affected the rate and extent of formation of active dimers from unfolded monomers differently. Scanning calorimetry experiments indicated that the mutation was in all cases destabilizing, but the mutation effect on rates of irreversible denaturation and transition-state energetics were drastically dependent on the TIM background. For instance, the E104D mutation produce changes in activation energy ranging from 430 kJ mol⁻¹ in HsTIM to -78 kJ mol⁻¹ in TcTIM. Thus, in TIM the role of a conserved noncatalytic residue is drastically dependent on its molecular background. Accordingly, it would seem that because each protein has a particular sequence, and a distinctive set of amino acid interactions, it should be regarded as a unique entity that has evolved for function and stability in the organisms to which it belongs.

Proteins 2014; 82:323–335.
© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: kinetic stability; transition-state plasticity; protein denaturation; free-energy barriers; homologous enzymes.

INTRODUCTION

One of the concepts that have derived from the analysis of amino acid sequence of numerous proteins is that the conservation of an amino acid or an amino acid sequence in homologous proteins is related to its functional importance. According to this view, it is expected that a mutation of a conserved residue would yield an enzyme with impaired catalytic activity or low stability. Although modifications of catalytic residues indeed affect enzyme catalysis, the function and contribution of other residues that are conserved throughout the biological scale to the global properties of proteins are not entirely

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

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT); grant numbers: 99844-Q (to M.C.); 167823 (to R.P.M.); Grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-UNAM); grant numbers: IN221812 (to R.P.M.); IN112813 (to M.C.); Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Innovation; grant numbers: BIO2012-34937; CSD2009-00088; Grant sponsor: FEDER Funds (to J.M.S.-R.).

*Correspondence to: Armando Gómez-Puyou, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. E-mail: apuyou@ifc.unam.mx (or) Jose M. Sanchez-Ruiz, Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain. E-mail: sanchezr@ugr.es (or) Miguel Costas, Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. E-mail: costasmi@unam.mx

Received 11 March 2013; Revised 30 July 2013; Accepted 14 August 2013
Published online 22 August 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/prot.24398

clear. This is because the folding, function, and structure of proteins are determined by a network of interactions of each amino acid with neighboring and distant residues,^{1–6} indicating that even in proteins with a high level of identity and similarity, the direct contacts and long-range interactions that a conserved amino acid establishes may not be the same in distinct homologous enzymes. Hence, a conserved residue may contribute differently to the overall properties of different homologous enzyme.

To gain insight into this issue, we have studied the E104D mutation in triosephosphate isomerase (TIM), a ubiquitous enzyme that catalyzes the interconversion between glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate.^{7,8} The enzyme is a homodimer that is catalytically active only in its dimeric form.^{9,10} Although seemingly innocuous, the E104D mutation is the most frequent mutation responsible for human TIM deficiency, a rare autosomal disease that leads to premature death in homozygotes.^{11–13} In this respect, it has been reported that affected individuals display reduced levels of TIM activity, most likely caused by the strongly decreased stability of the E104D mutant.¹⁴ However, it is not at all clear how a mutation involving two very similar amino acids can have such a dramatic effect on TIM stability. In fact, it could be that the strong effect of the mutation in human TIM (HsTIM) is linked to the particular molecular structure of the human TIM. To examine this possibility, we compared the effect of E104D mutation on the characteristics of TIMs of four organisms that are either close or far in the evolutionary scale: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Giardia lamblia* (TcTIM, TbTIM, and GitIM, respectively), and HsTIM. The wild types of the four enzymes have comparable catalytic properties, share the classical $(\alpha/\beta)_8$ barrel structure, and the RMS between their crystal structures is around 0.9 Å.^{14–17} However, the four enzymes differ in the number of amino acids in their respective monomers: HsTIM and TbTIM have 250 residues, TcTIM has 251 (the extra residue being at the beginning of the sequence), and GitIM has 256 residues (relative to HsTIM, it has two extra residues at positions 155 and 156, and four additional amino acids in its C-terminal region). For simplicity, in this work all mutants are referred to as E104D. In addition, it is noted that the amino acid identity between TcTIM and TbTIM is 73%, whereas those of TcTIM and TbTIM with HsTIM are 49 and 52%, respectively. GitIM is 45% identical with HsTIM, and 47% and 45% with TcTIM and TbTIM, respectively. Thus, the four enzymes provide a good model to ascertain the effect of the E104D mutation on distinct molecular contexts.

The catalytic properties of the E104D mutants were similar to those of the respective wild type. However, in the four enzymes the mutation affected dimer formation from unfolded monomers, albeit to different extents. The

thermal stabilities of the enzymes and mutants were examined by differential scanning calorimetry (DSC). In all cases, the mutation caused destabilization, but it was also found that the mutation affected the kinetic stability of the four enzymes. It is relevant, however, that the effect of the mutation was drastically different in each of the four enzymes. The overall data thus show that the impact of the E104D mutation depends on the particular molecular settings that arose in the course of evolution of the $(\alpha/\beta)_8$ barrel structure.

MATERIALS AND METHODS

Site-directed mutagenesis, protein expression, and purification

The mutants E104DTbTIM and E105DTcTIM were constructed from the wild-type plasmids containing TbTIM and TcTIM, respectively.^{18,19} Codons GAG and GAA coding for a Glu residue in positions 104 of TbTIM and 105 of TcTIM, respectively, were changed to the GAT triplet, coding for Asp, by means of the Quik-Change protocol (Stratagene) using Vent DNA polymerase (New England Biolabs) and the sequences: forward: 5'-CGCGCATACTATGGT GATACAAACGAGATTGTTGC G-3' and reverse: 5'-CGCAACAATCTCGTTTGTATCAC-CATAGTATGCGCG-3' for E104DTbTIM and forward: 5'-GTTTGTACTACGGCGATACGAACGAAATCGTTGC-3' and reverse: 5'-GCAACGATTTCGTTTCGTATCGCCGTAGTACAAAC-3' for E105DTcTIM.

The plasmids were transformed into *Escherichia coli* strain BL21(DE3) pLys (Novagen). The plasmid with HsTIM was transformed into BL21-CodonPlus (-DE3) RIL (Stratagene). Cells were grown at 37°C in LB medium containing ampicillin until reaching an $A_{600\text{ nm}}$ of 0.8–1.2. At that time, they were induced overnight with 0.4 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. The recombinant wild-type and mutant proteins were purified according to Garcia-Torres *et al.*³

The recombinant mutant enzyme E104DHsTIM, and HsTIM were produced and purified as described in Rodríguez-Almazán *et al.*¹⁴ The enzyme C202AGITIM (referred in this article as GitIM) was prepared as described by Enriquez-Flores *et al.*²⁰ The GitIM experiments were conducted with the C202A mutant that forms stable dimers. The C202A mutation does not have appreciable effects on the catalytic properties,¹⁷ and is located on the surface of enzyme and at 27.6 Å of the E104 residue (distance between C_α). Therefore, no appreciable contacts between these two residues were observed.¹⁷ E105DC202AGITIM (referred in this article as E104DGitIM) was constructed by site directed PCR mutagenesis using as template mutant C202AGITIM. The mutagenic oligonucleotides were forward: 5'-AAGACG CAGAATCATGGGGGATACCGACGAGCAAAGCGCC-3'

and reverse: 5'-GGCGCTTTGCTCGTTCGGTATCCCC-CATGATTCTGCGTCTT-3'. The external oligonucleotides were T7 promoter and T7 terminator (Novagen). The mutation was introduced using the following PCR protocol: 94°C for 4 min, 25 cycles for 1 min at 94°C, 1 min at 57°C, 1 min at 72°C, and 10 min at 72°C. Automated DNA sequencing of the complete genes confirmed successful mutagenesis. The PCR products were cloned into the pET-HisTEVP plasmid after digestion with *NdeI* and *BamHI*, which introduces a (His)₆-tag and a tobacco etch virus protease (TEVP) recognition sequence at the amino-terminal portion of the protein.

Protein expression and purification were performed as described previously,^{14,18–20} with some modifications. Briefly, BL21(DE3)-pLysS cells with the corresponding pET-HisTEVP-TIM plasmid were grown at 37°C in LB medium plus 100 mg/L ampicillin until an OD_{600 nm} of 0.6 was reached. Expression was induced overnight with 0.4 mM isopropyl β-D-galactopyranoside at 30°C. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazole, pH 8.0. Cells were maintained at 4°C, disrupted by sonication and centrifuged at 45,000 RPM for 1 h. The supernatant was added to a 5 × 5 mL His Trap HP column (GE Healthcare) and eluted with an imidazole gradient (0–500 mM). The eluted protein was added to a Hi Prep 26/10 Desalting column (GE Healthcare) in 50 mM Tris HCl, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), pH 8, which is the appropriate buffer for the TEVP enterokinase activity. The eluted enzyme was incubated overnight at 30°C with TEVP at a ratio of 20 GITIM/1 TEVP (w/w). The digested proteins were then added to a Hi Prep 26/10 Desalting column (GE Healthcare) in a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazole, pH 8.0 and the eluted sample separated in the His Trap HP column (GE Healthcare). This last step removes the (His)₆-tag from the GITIMs (wild type or mutant), as well as the (His)₆-TEVP. The wild type and the mutants were concentrated to 8 mg/mL with Amicon Ultra filters 30,000 MWCO (Millipore) and dialyzed overnight in 100 mM triethanolamine (TEA), 1 mM EDTA, and 1 mM DTT. The yield for the various enzymes ranged from 20 to 35 mg/L.

Enzyme activity

Enzyme activity was measured in the direction of glyceraldehyde-3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate, at 25°C. The reaction mixture had 100 mM TEA, 10 mM EDTA, pH 7.4, 1 mM glyceraldehyde-3-phosphate, 0.2 mM NADH, and 0.9 units of α-glycerophosphate dehydrogenase. The reaction was initiated by addition of 5 ng/mL of protein. NADH oxidation was monitored at 340 nm in a Hewlett-Packard spectrophotometer.

To calculate the kinetic parameters, glyceraldehyde-3-phosphate concentration was varied between 0.06 and 2 mM.

Reactivation of the enzymes

The enzymes were denatured by incubation with 6M guanidinium hydrochloride (GdnHCl) for 1 h at 25°C at a concentration of 500 μg/mL in a buffer containing 100 mM TEA and 10 mM EDTA (pH 7.4). For reactivation of the enzymes, aliquots of the latter mixture were diluted 100-fold into media that contained 100 mM TEA, 10 mM EDTA, and 1 mM DTT, pH 7.4. After dilution, aliquots were withdrawn at different times and added to the reaction mixture for activity measurements.

Crystallization conditions

Drops were mixed in a 1:1 volume ratio (v/v) of the recombinant enzyme (3.5 mg/mL in a buffer solution containing 20 mM TEA, 10 mM EDTA, pH 7.4) and the precipitant solutions (0.01M nickel (II) chloride hexahydrate, 0.1M Tris pH 8.6, 25% w/v PEG monomethyl ether 2000) from condition H9 of Crystal screen I (Hampton ResearchTM). The crystals were obtained in drops incubated for 2 weeks. Data were collected at the Southeast Regional Collaborative Access Team (SER-CAT) 22-ID beamline at the Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory), using a MarMosaic MX-300 detector. The dataset were indexed and integrated with XDS²¹ and scaled with SCALA.^{22,23}

Structure determination and refinement

Initial phases for the TcTIM E104D and TbTIM E104D structures were determined by the molecular replacement method with the program Phaser v.2.1,²⁴ using the atomic coordinates of the native TcTIM (PDB code: 1TCD) and TbTIM (PDB code: 2J27) as search models. All the refinement steps were performed using PHENIX.²⁵ The initial molecular replacement solutions were refined using rigid-body refinement and then non-crystallographic symmetry (NCS) restraints were applied. The resulting models underwent iterative cycles of refinement and manual rebuilding with Coot.²⁶ At the final stages of the refinement process, NCS restraints were removed from the protocol. Water molecules were added to the model near the end of the refinement by a search procedure based on peaks observed in the difference maps and bond distance criteria. Final structures satisfied the Molprobit criteria²⁷ at the corresponding resolutions. A summary of data collection and structure refinement statistics is shown in Table I.

Structural analysis

Contact distances between residues were analyzed using the program CONTACT from the CCP4 suite.²²

Table 1
Data Collection and Structure Refinement Statistics

Data collection		
Protein	TcTIM E104D	TbTIM E104D
Space group	P 1	P 1 21 1
Cell dimensions (Å)	$a = 38.72, b = 44.46, c = 69.04$ $\alpha = 95.02, \beta = 96.08, \gamma = 114.69$	$a = 88.09, b = 89.78, c = 181.72$ $\alpha = 90.00, \beta = 101.60, \gamma = 90.00$
Temperature (K)	100	100
Wavelength (Å)	0.9791	0.9791
Resolution limit (Å)	39.97–1.5	89.78–2.3
Reflection collected	136,044 (19,064)	368,306 (49,325)
Unique reflections ^a	63,005 (8958)	122,434 (17,590)
R_{merge}^b	0.089 (0.25)	0.066 (0.264)
Mean $I/\sigma I$	5.7 (2.6)	8.1 (2.8)
Completeness (%)	95.6 (92.9)	99.6 (98.3)
Multiplicity	2.2 (2.2)	3.0 (2.8)
Wilson B-factor (Å ²)	14.19	36.51
Refinement		
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%) ^c	16.71/19.63	20.71/26.14
No. atoms of protein/	3919/	22464/
Solvent/SO ₄ /glycerol/PEG	428/1/2/0	594/5/0/5
Average B-value (Å ²)	18.3	35.50
<i>R.m.s.d.</i> from ideal		
Bond lengths (Å ²)	0.008	0.009
Bond angles (°)	1.14	1.13
Ramachandran favored (%)	98.0	97.0
Ramachandran outliers (%)	0	0
PDB code	4HHP	4JEQ

^aValues in parentheses correspond to the last resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_h (|I_{jh} - \langle I_h \rangle|) / \sum_i \sum_h (\langle I_h \rangle)$, where h is the unique reflection index, I_{jh} is the intensity of the symmetry-related reflection, and $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity.

^c $R = \sum_h |F_o|_h - |F_c|_h| / \sum_h |F_o|_h$ for all reflections, where F_o and F_c are observed and calculated structure factors, respectively, and h defines unique reflections. R_{free} is calculated analogously for the test reflections, randomly selected, and excluded from refinement.

Structural analysis of the interfaces was performed using the PISA server,²⁸ and molecular graphic representations were drawn using PyMOL.²⁹

Differential scanning calorimetry

DSC experiments were performed using a VP-DSC capillary calorimeter (GE Healthcare). Protein solutions were prepared by exhaustive dialysis against 100 mM TEA, 10 mM EDTA, and 1 mM DTT (pH 7.4). For experiments in the presence of urea, an adequate amount of a stock urea solution in the same buffer was added. Protein concentrations were determined from the absorbance at 280 nm, and urea concentrations were determined from refractive index measurements. Further details on the DSC experiments and the fitting of the calorimetric profiles with the two-state irreversible model can be found in previous publications.^{30,31}

Calorimetric enthalpies for the irreversible thermal denaturation of the studied TIM proteins show significant variability, possibly reflecting differences in the irreversibly-denatured states. This, however, does not have any effect on the kinetic analysis of the DSC transitions, which ultimately depend only on the shape of the transitions. Note also that, when a defined value for the native to unfolded enthalpy change is needed (estimation

of the unfolding and solvation-barrier contributions) we used the value predicted for TIM proteins by known structure-energetics relationships (see below).

RESULTS

Catalytic competence

After their expression in *E. coli*, the E104D TIM mutants of *T. cruzi*, *T. brucei*, *G. lamblia*, and *H. sapiens* were purified from extracts of the bacterial cells in which the enzymes were expressed. The properties of the enzymes were determined and compared to those of the respective wild types. The four mutants were catalytically competent, and, in relation to their respective wild types, there were no important differences in the kinetics of the conversion of glyceraldehyde-3-phosphate to dihydroacetone phosphate at various substrate concentrations (Table II).

Reactivation of the E104D mutants

It was previously reported¹⁴ that the E104D mutation hinders the formation of active dimers of HsTIM from GdnHCl unfolded monomers. We explored this phenomenon in the wild type and mutants (Fig. 1). To this end,

Table II

Kinetic Constants of Wild-Type and Mutant E104D TIMs

TIM	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}$)
TcTIM	3581 ± 54	0.39 ± 0.03	$1.9 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^3$	$4.8 \times 10^5 \pm 4.0 \times 10^4$
TcTIM E104D	3913 ± 82	0.65 ± 0.11	$2.1 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^3$	$3.3 \times 10^5 \pm 5.0 \times 10^4$
TbTIM	3623 ± 485	0.38 ± 0.08	$1.9 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^4$	$5.2 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^4$
TbTIM E104D	3729 ± 439	0.69 ± 0.28	$1.9 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$
GITIM	3188 ± 53	0.59 ± 0.06	$1.7 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^3$	$2.9 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^4$
GITIM E104D	4167 ± 543	0.63 ± 0.09	$2.2 \times 10^5 \pm 2.9 \times 10^4$	$3.5 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^3$
HsTIM ^a	7080 ± 415	0.74 ± 0.10	$3.9 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^3$	$5.7 \times 10^5 \pm 8.7 \times 10^3$
HsTIM E104D ^a	6600 ± 354	0.70 ± 0.15	$3.7 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^3$	$5.2 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^3$

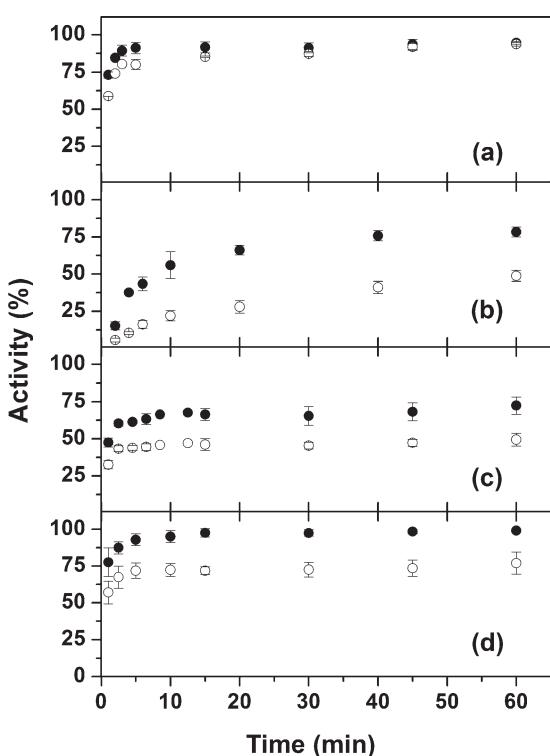
^aFrom Rodriguez-Almazan *et al.*¹⁴

the enzymes and the E104D mutants were denatured in 6M GdnHCl; afterward, the mixture was diluted 100-fold and the appearance of activity was followed throughout time. In all the wild-type TIMs studied, dilution of the denaturant brought about the progressive appearance of activity, because, since TIM monomers are inactive,^{9,10} the appearance of activity reflects association of the monomers. There were significant differences in the rate and extent of reactivation of the four wild types, which is in agreement with previous data on TcTIM and TbTIM.¹⁰ The E104D mutants of the four TIMs also

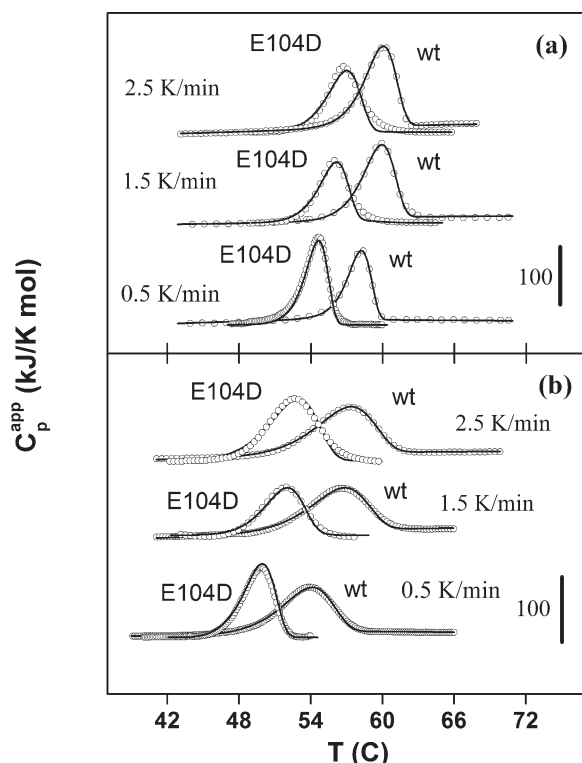
underwent reactivation, but it is relevant to note that the impact of the mutation was strikingly different in each of the four enzymes. The mutation induced rather small changes in the rate and extent of reactivation of TcTIM [Fig. 1(a)], whereas in the other TIMs, the mutation brought about significant decreases in the rate and extent at which the enzymes reactivated. In GITIM, the effect was mainly on the extent of reactivation [Fig. 1(c)], whereas in TbTIM and HsTIM [Fig. 1(b,d), respectively], the effect was on both, the rate and extent of reactivation.

Thermal denaturation

It has been reported that the incubation at 48°C of cell extracts of patients that have the E104D mutation^{32,33} or that of recombinant E104D HsTIM¹⁴ brings about a decrease in activity that is much more rapid than that of the controls. It is also relevant to point out that the thermal denaturation profile of TcTIM and TbTIM was previously studied by DSC.³⁰ Here, we extended the studies to HsTIM and GITIM and the E104D mutants of the four enzymes. In all cases, the calorimetric transitions were irreversible as indicated by the lack of thermal effect in reheating runs; however, the transitions were strongly dependent on the scanning rate (Figs. 2 and 3), implying that the denaturation process is under kinetic control. The calorimetric traces are adequately described by the two-state irreversible model,^{30,34} whereupon heating, the native protein (*N*) undergoes a transition to a final state (*F*) unable to fold back to the native state. The kinetic conversion between these two states ($N \rightarrow F$) is described by a first-order rate constant that changes with temperature according to the Arrhenius equation. The fits of this model to the heat capacity profiles were excellent (Figs. 2 and 3). The compliance of these profiles with the model indicates that the kinetically relevant transition state is dimeric, which is consistent with the fact that we did not observe a significant effect of protein concentration on the calorimetric transitions (the maximum of DSC transitions, T_m , shifted only one degree on going from a protein concentration of 0.4–2 mg/mL, data not shown).

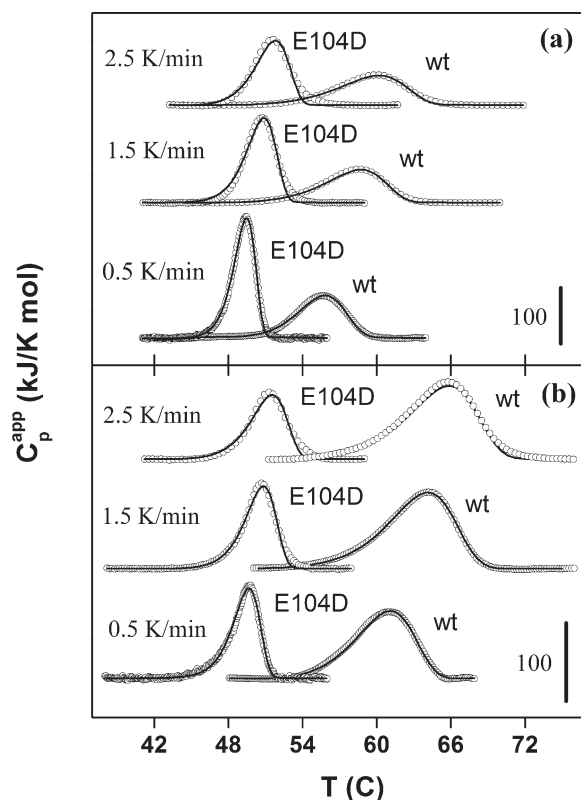
**Figure 1**

Reactivation of wild-type (closed symbols) and E104D mutants (open symbols) for TIM enzymes from *Trypanosoma cruzi* (a), *Trypanosoma brucei* (b), *Giardia lamblia* (c), and *Homo sapiens* (d).

**Figure 2**

Illustrative examples of experimental DSC thermograms for TcTIM and its E104D mutant (a) and for TbTIM and its E104D mutant (b) at the indicated scan rates. The thermograms for wild-type TcTIM and TbTIM are from Costas *et al.*³⁰ The profiles at other scan rates were qualitatively similar. Symbols represent experimental apparent heat capacity data, and continuous lines are the best fits of the two-state irreversible model. Note that, for clarity, the profiles have been shifted in the y -axis.

The activation energies (E_A) for thermal denaturation of the four enzymes and their mutants as obtained from the Arrhenius plots (Fig. 4) are reported in Table III. There is a huge range of E_A values amongst the wild-type proteins (from ~ 350 to 800 kJ mol^{-1}) and also between the four E104D mutants (from around 480 to nearly 800 kJ mol^{-1}). On comparing E_A for a given wild-type TIM

**Figure 3**

Illustrative examples of experimental DSC thermograms for GITIM and its E104D mutant (a) and for HsTIM and its E104D mutant (b) at the indicated scan rates. The profiles at other scan rates were qualitatively similar. Symbols represent experimental apparent heat capacity data, and continuous lines are the best fits of the two-state irreversible model. Note that, for clarity, the profiles have been shifted in the y -axis.

with the corresponding value for its E104D mutant, it is observed that the mutation affects the activation energy for thermal denaturation to markedly different extents; for example in HsTIM the mutation increased the activation energy by about 430 kJ mol^{-1} , whereas in TcTIM, the mutation decreased it by 78 kJ mol^{-1} . Clearly in different TIMs the conservative E104D mutation induces

Table III

Activation Energies E_A (kJ mol^{-1}), First-Order Rate Constant k (min^{-1}) at 37°C , Kinetic Urea m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) Value (m^\ddagger), Urea m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) Value for Equilibrium Unfolding (m_{EQ}), Fractional Degrees of Exposure to the Solvent (\sim Fractional Degrees of Unfolding) in the Transition States (m^\ddagger/m_{EQ}) for Wild-Type and Mutant E104D TIMs

	TcTIM ^a	TcTIM E104D	TbTIM ^a	TbTIM E104D	GITIM	GITIM E104D	HsTIM	HsTIM E104D
E_A	792.8 ± 17.6	714.7 ± 14.6	397.9 ± 4.6	480.6 ± 11.0	366.6 ± 7.0	647.0 ± 20.3	361.2 ± 3.8	795.5 ± 20.7
k	1.1×10^{-9}	1.2×10^{-7}	6.7×10^{-5}	1.6×10^{-4}	5.8×10^{-5}	2.4×10^{-5}	7.2×10^{-6}	3.2×10^{-6}
m^\ddagger	8.34 ± 0.12	9.48 ± 0.15	1.69 ± 0.20	4.23 ± 0.22	3.94 ± 0.44	11.00 ± 0.12	2.77 ± 0.05	13.55 ± 0.62
m_{EQ}^b	30.67	30.67	30.35	30.35	30.02	30.02	30.09	30.09
m^\ddagger/m_{EQ}	0.272 ± 0.01	0.309 ± 0.01	0.056 ± 0.008	0.140 ± 0.01	0.131 ± 0.02	0.367 ± 0.01	0.092 ± 0.002	0.451 ± 0.05

^aFrom Costas *et al.*³⁰

^bCalculated using the correlation presented by Myers *et al.*³⁵ The necessary accessible surface areas were calculated from the Protein Data Bank files and a modification of the Shrake–Rupley algorithm as described in Costas *et al.*³⁰

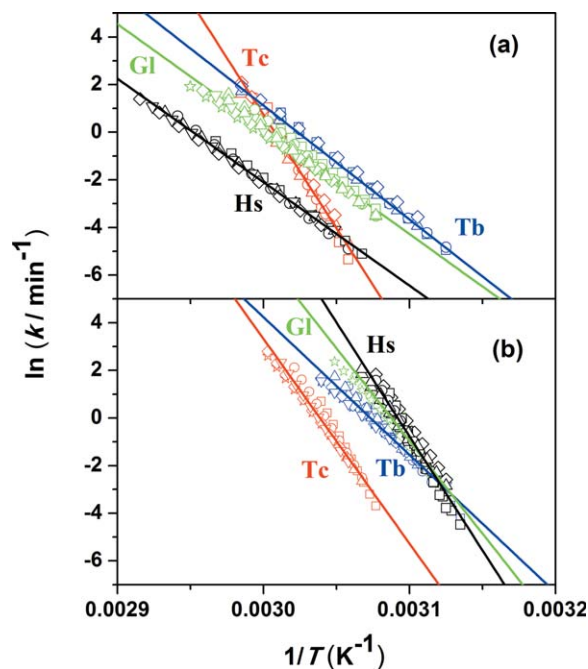


Figure 4

Arrhenius plots for the irreversible thermal denaturation of the wild-type TIMs (a) and their E104D mutants (b). Data for wild-type TcTIM and TbTIM are from Costas *et al.*³⁰ The protein concentrations were 0.4 mg mL⁻¹. The different symbols correspond to the different scan rates used in the DSC experiments (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 K min⁻¹). The lines are the best fits of the Arrhenius equation $k = \exp[(-E_A/R)(1/T - 1/T^*)]$. The values of the activation energies E_A are given in Table III.

significantly different alterations in the energetics of the transition state during thermal denaturation.

Kinetic stability and transition state plasticity

The different activation energies of the TIMs studied may contribute to different rates of denaturation at the temperature in which the organism lives. Thus, it was considered relevant to compare the kinetic stability of the four enzymes and the mutants at the same temperature, that is, 37°C. To this end, we made a rather short Arrhenius extrapolation to 37°C of the data in Figure 4; the k values at 37°C for the various TIMs are given in Table III. For TcTIM and TcTIM E104D, the values were several orders of magnitude slower than those of the other proteins, indicating that kinetic stability of the two former TIMs is much higher than that of the other enzymes.

We also examined if the differences in thermal unfolding of the proteins, and their respective mutants, are related to their solvent accessible surfaces. The denaturant concentration effects on free energy changes and the corresponding changes in solvent accessible surface have

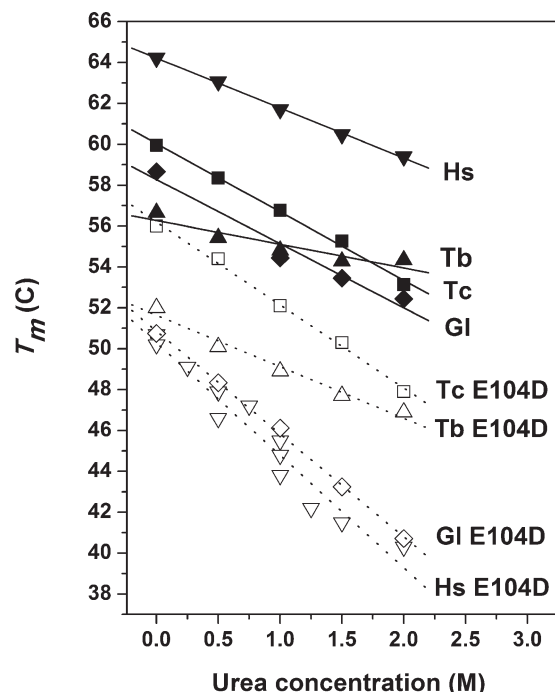


Figure 5

The effect of urea concentration on the temperature of the maximum of DSC transitions (T_m) for the TIM proteins studied in this work. Data for wild-type TcTIM and TbTIM are from Costas *et al.*³⁰ The lines are the best fits of straight lines to the data (symbols). The protein concentrations were 0.4 mg mL⁻¹. The T_m values shown correspond to a scan rate of 1.5 K min⁻¹, although T_m values obtained at other scanning rates give very similar dependencies and, in particular, give essentially the same values for the slope $dT_m/d[\text{urea}]$.

been well documented³⁵ and are represented by the so-called m values. The kinetic urea values $m^\ddagger = -\delta\Delta G^\ddagger/\delta[\text{urea}]$ are conveniently derived from the urea concentration dependence of the maximum of DSC transitions (T_m) and the activation energy using³¹:

$$m^\ddagger = -\frac{E_A}{T_m} \left(\frac{dT_m}{d[\text{urea}]} \right) - RT_m \left(\frac{d \ln(E_A/RT_m^2)}{d[\text{urea}]} \right) \quad (1)$$

since the derivatives involved are readily available. The second term in Eq. (1) is small (accounts for a maximum of 15% of the total m^\ddagger value for the proteins studied here), therefore the m^\ddagger values (Table III) are mainly given by $dT_m/d[\text{urea}]$ which can be accurately determined from the experimental urea dependence of the T_m values shown in Figure 5. The kinetic m^\ddagger values can be transformed into fractional degrees of unfolding (exposure to solvent) in the transition state by calculating the ratio m^\ddagger/m_{EQ} , where m_{EQ} is an urea-value for equilibrium unfolding devoid from strong distortions caused by residual structure in the unfolded state; to estimate these m_{EQ} values, we have therefore resorted to the general correlation reported by Myers *et al.*³⁵ The m^\ddagger/m_{EQ}

ratios (Table III) are larger for the E104D mutants than for the corresponding wild-type TIMs, indicating a greater exposure to solvent in the transition state for the mutants. It is noteworthy that there are marked differences between the four enzymes: in HsTIM, for example, the mutation brought about a fivefold increase, whereas in TcTIM the mutation increased the m^\ddagger/m_{EQ} ratio 1.1 times. Figure 6 shows that the effect of the E104D mutation on denaturation temperature, $\Delta T_m = T_m(\text{E104D}) - T_m(\text{wt})$, is clearly correlated with its effect on the exposure to solvent of the transition state, $\Delta(m^\ddagger/m_{\text{EQ}}) = m^\ddagger/m_{\text{EQ}}(\text{E104D}) - m^\ddagger/m_{\text{EQ}}(\text{wt})$. Therefore, the deleterious effect of this apparently very conservative mutation is linked to the kinetic stability and transition-state plasticity of the proteins.

Activation, unfolding, and solvation-barrier contributions

As shown before,³⁰ the experimental activation energies in Table III cannot be solely explained in terms of the degree of unfolding in the transition states. Instead, it is necessary to invoke an additional energetic contribution, which is absent in the native states; this has been termed solvation-barrier contribution, since it is associated with partially broken, water-unsatisfied interactions in the transition states. To estimate the impact of the E104D mutation in the activation, unfolding, and solvation-barrier contributions, as well as in the enthalpic, entropic, and free energy components of the process, we used the calculation scheme described below which follows the general lines of our previously published work.³⁰ This analysis uses 335.15 K (60°C) as a reference temperature. This is convenient because 60°C is roughly in the middle of the denaturation temperature range defined by the proteins studied in this work and also because it is the reference temperature used by Robertson *et al.*³⁶ in their structural parametrization of protein energetics.

The activation energies E_A (or enthalpies since $E_A \cong \Delta H^\ddagger$ at atmospheric pressure) at the corresponding T_m values can be calculated at a reference temperature T_0 (333.15 K) using

$$\Delta H^\ddagger(T_0) = E_A + \Delta C_p^\ddagger \cdot (T_0 - T_m) \quad (2)$$

Assuming that the activation heat capacity (ΔC_p^\ddagger) is equal to total heat capacity scaled by the accessibility (the degree of exposure to the solvent in the transition state (m^\ddagger/m_{EQ})), and that there is no solvation-barrier contribution ($\Delta C_p^* = 0$),

$$\Delta C_p^\ddagger = \Delta C_{p,\text{EQ}} \cdot \left(\frac{m^\ddagger}{m_{\text{EQ}}} \right) \quad (3)$$

where $\Delta C_{p,\text{EQ}}$ is the heat capacity change upon equilibrium unfolding that can be estimated using the well

known correlation between the unfolding enthalpy and the number of residues in the protein³⁶ (this correlation also uses 333.15 K as the reference temperature). The result using TIM proteins is that $\Delta C_{p,\text{EQ}} = 28.35$ kJ/K mol, but the conclusions reached (see below) using $\Delta C_{p,\text{EQ}} = 0$ or 56.7 kJ/K mol are qualitatively the same. From Eq. (3), the activation enthalpies at T_0 are given by

$$\Delta H^\ddagger(T_0) = E_{\text{act}} + \Delta C_{p,\text{EQ}} \cdot \left(\frac{m^\ddagger}{m_{\text{EQ}}} \right) (T_0 - T_m) \quad (4)$$

In the transition-state theory, the relation between the rate constant k for unfolding/denaturation and the activation thermodynamic parameters is

$$k = k_0 \exp \left(- \frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right) \quad (5)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (6)$$

Using these two equations, the activation entropy at the T_m is given as

$$\Delta S^\ddagger(T_m) = \frac{\Delta H^\ddagger(T_m)}{T_m} - \frac{\Delta G^\ddagger(T_m)}{T_m} = \frac{E_{\text{act}}}{T_m} + R \ln k_m - R \ln k_0 \quad (7)$$

and since at the reference temperature T_0 ,

$$\Delta S^\ddagger(T_0) = \Delta S^\ddagger(T_m) + \Delta C_p^\ddagger \cdot \ln \left(\frac{T_0}{T_m} \right) \quad (8)$$

the activation entropy at T_0 is given by:

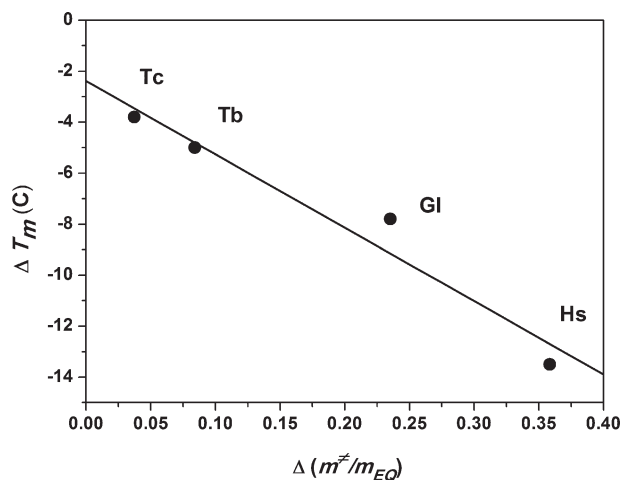
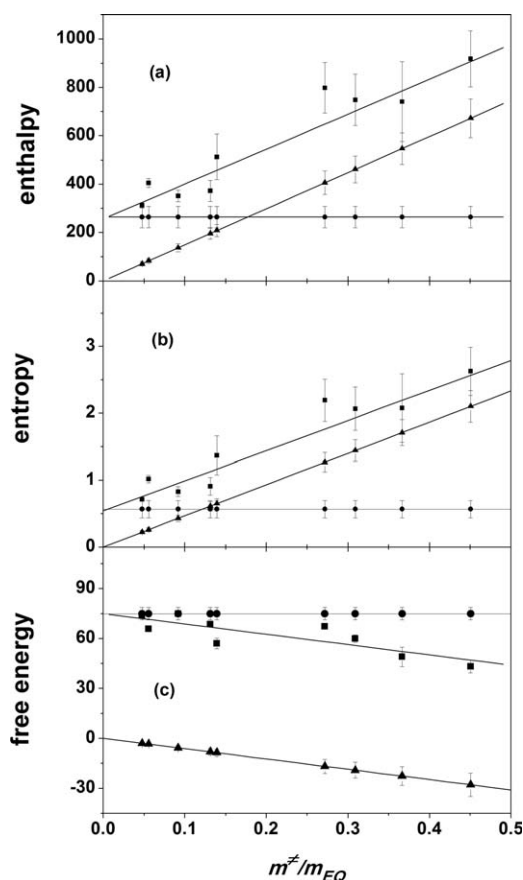


Figure 6

The effect of the E104D mutation. Correlation between the change on denaturation temperature [$\Delta T_m = T_m(\text{E104D}) - T_m(\text{wt})$] and the change of exposure to solvent of the transition state [$\Delta(m^\ddagger/m_{\text{EQ}}) = m^\ddagger/m_{\text{EQ}}(\text{E104D}) - m^\ddagger/m_{\text{EQ}}(\text{wt})$] for the TIM proteins studied in this work. ΔT_m was calculated from the T_m values obtained from the DSC scans at 1.5 K min⁻¹.


Figure 7

Activation (■), solvation (●), and unfolding (▲) contributions to the enthalpy (a), entropy (b), and free energy (c) against the fractional degree of unfolding (exposure to the solvent) in the transition state, $m^{\ddagger}/m_{\text{EQ}}$, for the TIM proteins studied in this work, according to Eqs. (11–13). Data for the TIM of *Leishmania mexicana* from Costas *et al.*³⁰ were also included. The lines are the best fits of straight lines to the data. The units for the enthalpy and free energy are kJ mol^{-1} and for the entropy $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$, respectively.

$$\Delta S^{\ddagger}(T_0) = \frac{E_{\text{act}}}{T_m} + R \ln k_m - R \ln k_0 + \Delta C_{\text{P,EQ}} \left(\frac{m^{\ddagger}}{m_{\text{EQ}}} \right) \ln \left(\frac{T_0}{T_m} \right) \quad (9)$$

where $R \ln k_0 = 0.207 \text{ kJ/K mol}$ has been previously estimated.³⁰ The activation free energy at T_0 is immediately obtained using:

$$\Delta G^{\ddagger}(T_0) = \Delta H^{\ddagger}(T_0) - T_0 \Delta S^{\ddagger}(T_0) \quad (10)$$

To obtain the unfolding and solvation contributions at T_0 , we make two additional assumptions. The first is that in the transition state, the unfolding contributions (ΔX_{unf}) scale with accessibility with a coefficient equal to the change associated with total unfolding. The second is that the solvation contributions (ΔX^*) are

constant and equal for the wild-type TIMs and their E104D mutants. Hence,

$$\Delta H^{\ddagger} = \Delta H^* + \Delta H_{\text{unf}} = \Delta H^* + \Delta H_{\text{EQ}} \cdot \left(\frac{m^{\ddagger}}{m_{\text{EQ}}} \right) \quad (11)$$

$$\Delta S^{\ddagger} = \Delta S^* + \Delta S_{\text{unf}} = \Delta S^* + \Delta S_{\text{EQ}} \cdot \left(\frac{m^{\ddagger}}{m_{\text{EQ}}} \right) \quad (12)$$

$$\Delta G^{\ddagger} = \Delta G^* + \Delta G_{\text{unf}} = \Delta G^* + \Delta G_{\text{EQ}} \cdot \left(\frac{m^{\ddagger}}{m_{\text{EQ}}} \right) \quad (13)$$

Therefore, plots of ΔX^{\ddagger} against $m^{\ddagger}/m_{\text{EQ}}$ provide both the unfolding and solvation-barrier contributions. Figure 7 shows that in fact ΔX^{\ddagger} varies linearly with accessibility (correlation coefficients ranging from 0.96 to 0.84) and displays the ΔX^* and ΔX_{unf} contributions.

The effect of the E104D mutation in the enthalpic, entropic and free energy components of the activation and unfolding contributions (those for solvation are null, under the assumptions noted above) can be obtained as $\Delta \Delta X = \Delta X(\text{E104D}) - \Delta X(\text{wt})$ and are shown in Figure 8 as a function of the accessibility change upon mutation, $\Delta(m^{\ddagger}/m_{\text{EQ}}) = m^{\ddagger}/m_{\text{EQ}}(\text{E104D}) - m^{\ddagger}/m_{\text{EQ}}(\text{wt})$. Figure 9 shows that $\Delta \Delta G^{\ddagger}$ and $\Delta \Delta G_{\text{unf}}$ clearly correlate with the effect of the E104D mutation on the maximum of the DSC transitions, ΔT_m . This indicates that the decrease in thermal stability (as measured by ΔT_m) correlates with an increase in the fractional degree of exposure to the solvent in the transition state (Fig. 6) which, in turn, is reflected in the activation and unfolding free energy barriers (Fig. 9) for the irreversible denaturation, that ultimately determine the protein kinetic stability. As seen in Figure 9, these effects are small for TcTIM but quite large for HsTIM.

Structure of wild type and mutants in the vicinity of Glu104

In an attempt to understand the different impact that the E104D mutation has on the TIMs we studied, we crystallized and solved the structure of the E104D mutants of TbTIM and TcTIM; the crystal structure of E104D HsTIM has been described¹⁴ and we were unable to crystallize the E104DGITIM mutant. The structures were compared with the reported structures of their respective wild types. A notable feature in the structures of the wild-type and the mutant enzymes is that their overall structures superpose quite well, as shown by the RMSD deviation between the C_{α} of wild-type and mutant enzymes (Supporting Information Figure S1). Accordingly, we focused on the region of residue 104 in the wild-type and mutant enzymes. As shown in Figure 10, Glu104 is part of a conserved cluster of five residues in each monomer. In the four wild-type enzymes, the geometry between these residues is largely conserved, the distance between Glu104 of the two subunits being in a similar range. Figure 10 also shows the arrangement of

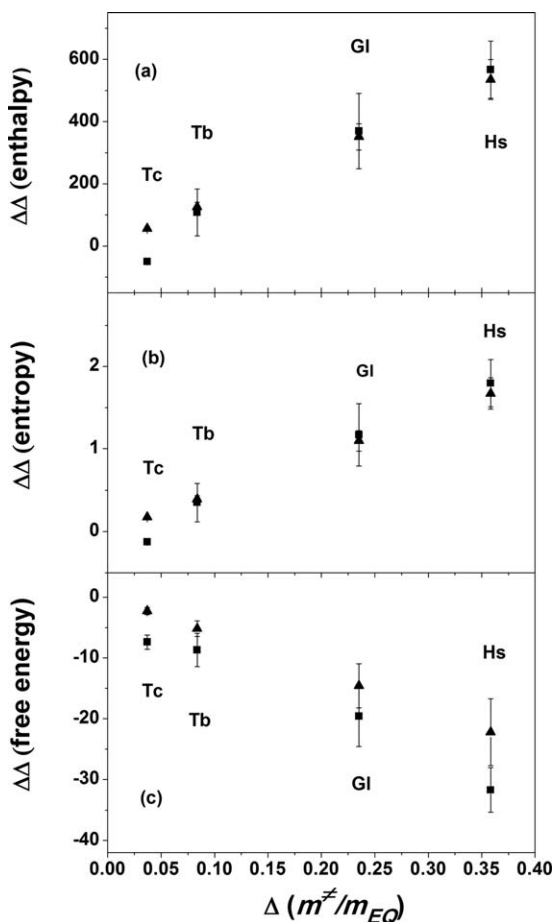


Figure 8

The effect of the E104D mutation [$\Delta\Delta X = \Delta X(\text{E104D}) - \Delta X(\text{wt})$] on the activation (■) and unfolding (▲) enthalpy (a), entropy (b), and free energy (c) against the change of exposure to solvent of the transition state, [$\Delta(m^\ddagger/m_{\text{EQ}}) = m^\ddagger/m_{\text{EQ}}(\text{E104D}) - m^\ddagger/m_{\text{EQ}}(\text{wt})$], for the TIM proteins studied in this work. Units for the enthalpy and free energy are kJ mol^{-1} and for the entropy $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$, respectively.

these residues in the E104D mutants of HsTIM, TbTIM, and TcTIM. The data show that there are no important and consistent differences between the wild-type and mutant enzymes, except that the intermonomeric salt bridge between Glu77 and Arg 98 is missing in the HsTIM mutant, while it is conserved in both TbTIM and TcTIM. Also, the distance between residues 104 of the two subunits is larger in the case of the mutant enzymes.

As there are no obvious differences that could account for the effect of the E104D mutation, we examined the residues that are in the first shell of Glu104, at a cut off distance of 4 Å, as well as those present in the second shell (Supporting Information Tables S1 and S2). For the latter, we centered on the corresponding residue of the first shell and identified those residues that are at a distance of <4 Å. We found no significant differences for Glu104 when the residues of the first shell of the wild-type enzymes were compared with those of the mutant

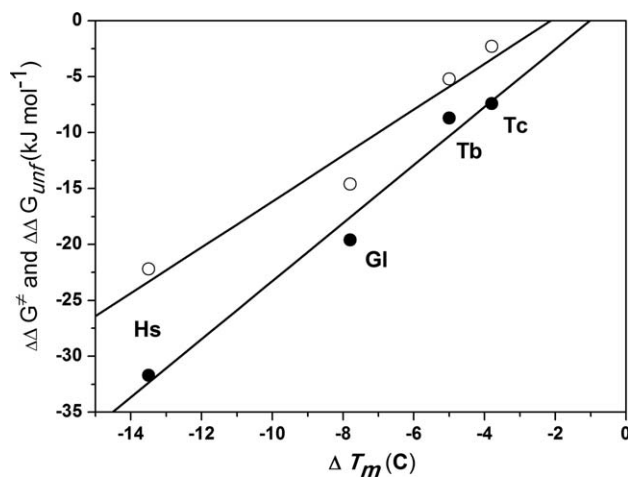


Figure 9

The effect of the E104D mutation. Correlation between the change on activation (filled symbols) and unfolding (open symbols) free energy and the change on denaturation temperature, ΔT_m , for the TIM proteins studied in this work. ΔT_m was calculated from the T_m values obtained from the DSC scans at 1.5 K min^{-1}

enzymes. Likewise, both, the wild-type and mutant enzymes have the same, or equivalent, residues in the second shell and at markedly similar distances. It is appropriate to note that wild-type GITIM exhibits the same basic structure in the vicinity of Glu104. However, GITIM differs from the other enzymes in the residues that are in the second shell; this is due to differences in its amino acid sequence and not to alterations of its general structure.

Taken together, the data from the crystal structures of the wild-type and mutant enzymes show that the different impacts of the E104D mutation on the four enzymes that were studied, are not due to differences in the molecular environment of Glu104, but that, most likely, the differences result from the molecular context in which the E104D mutation is introduced.

DISCUSSION

It has been reported that mutations of nonconserved amino acids may not affect function, especially if they are on the surface of the enzyme; however, function is affected,³⁷ if the mutations are combined with other mutations that *per se* have no functional influence. It is also well known that the detrimental effect of a mutation may be compensated by introduction of additional mutations^{38–40}; in fact, the analysis of amino acid sequences often reveals that during evolution, the replacement of an amino acid that is important for function is accompanied by covariations of other residues.⁴¹ Thus, it is logical to assume that in evolution, whenever an amino acid is changed, its function will either be abolished or

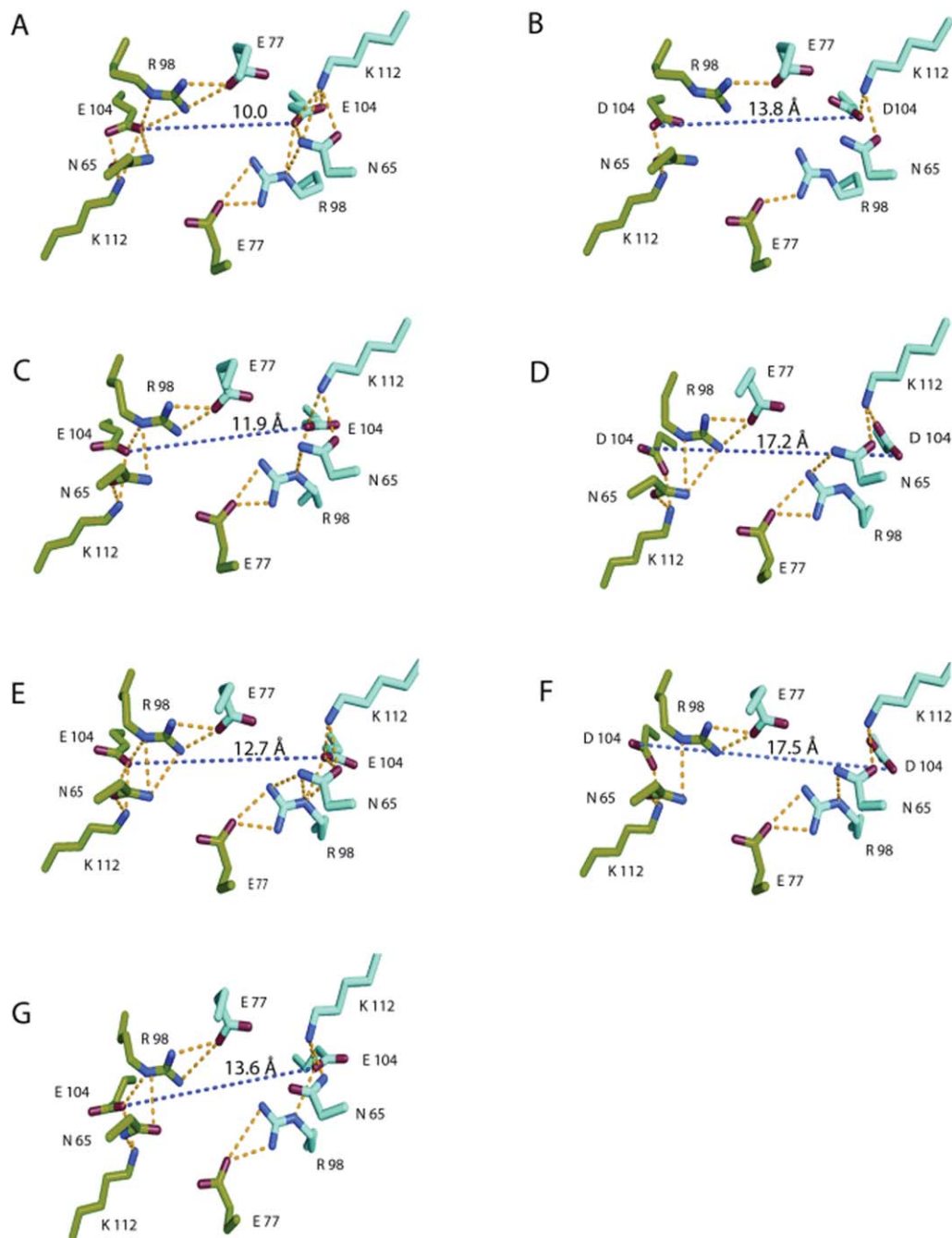


Figure 10

Conserved cluster of five residues in the interface region in the wild-type and mutant enzymes. The cluster is formed by Asn 65, Glu 77, Arg 98, Glu 104, and Lys 112 for each subunit (monomer A in green and monomer B in cyan). The seven panels are: (A) HsTIM wt (PDB code: 2JK2), (B) HsTIM E104D (PDB code: 2VOM), (C) TcTIM wt (PDB code: 1TCD), (D) TcTIM E104D (PDB code: 4HHP), (E) TbTIM wt (PDB code: 2J27), (F) TbTIM E104D (PDB code: 4JEQ), and (G) GiTIM wt (PDB code: 4BI7). The distances between residues 104 were estimated using the atoms OE2 and OD2 of glutamate and aspartate, respectively. The yellow dots depict atoms that are closer than 3.5 Å. Other than the salt bridge between Glu77 (monomer A) and Arg 98 (monomer B), there are no residues of the other subunit at <4 Å.

preserved depending on the adequacy of the interactions that may be established. In this regard, it is relevant to point out that the properties of an amino acid within a protein structure can be modulated by its contacts with neighboring residues, but also by distant residues. An

example of the latter phenomena is illustrated in TIM. The enzymes from some parasites have an interface Cys surrounded by residues of loop3 of the other subunit. It has been reported that chemical derivatization (thiomethylation) of the Cys induces strikingly different effects

in different TIMs.^{20,42} It was shown that the impact of derivatization is related to the dimensions of loop3, the larger the loop the lower the detrimental effect of derivatization. Likewise, it was reported³ that the reactivity of the Cys depends on the existence of particular amino acids that are far from the interface Cys. Collectively, the data illustrate that in proteins, amino acids may be replaced or undergo chemical alterations without loss of function, provided that the local environment and/or the network of interactions of distant residues confers resistance to the perturbing agent.

Therefore, it may be asked if amino acids that exist in all sequences of homologous enzymes have been conserved because the system does not tolerate a change of such residue, even if the mutation is conservative. In the case of catalytic residues, the answer seems quite obvious, catalysis requires the participation of residues with strict chemical and physicochemical properties that have to be positioned at precise geometrical distances; hence, it is very difficult to find a replacement. In this context, it is noteworthy that Saab-Rincón *et al.*⁴³ were able to confer to TIM the capacity to express thiamine phosphate synthase activity. On the other hand, there are residues, such as Glu104 of TIM, that do not directly participate in catalysis, and yet they are present in all homologous enzymes. *A priori*, it may be assumed that these residues are essential for folding or for maintaining protein stability. Indeed, in the TIMs that were here examined, we observed that the E104D mutation affects dimer formation and the kinetic stability of TIMs from four different organisms. However, there were striking differences in the susceptibility of the enzymes to the E104D mutation, indicating that in enzymes that carry out the same function, even if they have high sequence identity, conserved amino acids do not contribute to the same extent to the global properties of homologous enzymes.

The latter findings indicate that the functional importance of an amino acid, even if it is conserved, depends on the rest of the protein and raise the question of how the contribution of conserved amino acids to the general properties of a protein should be evaluated. This is a difficult problem since each homologous enzyme has a particular amino acid sequence, and hence different amino acid interactions. Indeed, the diversity in amino acid sequences may explain why TIMs from different organisms in which the same $(\alpha/\beta)_8$ structure was built with different amino acids exhibit different susceptibilities to the E104D mutation. In addition, and because homologous enzymes have different amino acid composition, it may be speculated that enzymes acquired their particular structural features as an adaptation to the demands of the environments in which the cells live. For example, *T. cruzi* and *T. brucei* have a complex life cycle⁴⁴; they thrive in intra- and extracellular media as well in two markedly different hosts (mammals and triatominae or

flies of the genus glossina, respectively). Throughout their lives, these parasites successfully resist marked changes in pH, temperature, oxygen concentration, and ion composition. In comparison to the life cycle of trypanosomes, that of *G. lamblia* is relatively simple⁴⁴; these parasites live in mammalian intestinal tracts until they are excreted and acquire the cystic form that can again be ingested by mammal. In contrast to the parasites, the cells of *H. sapiens* subsist in rather constant conditions. Thus, it may be more than a coincidence that the magnitude of the E104D induced changes in the denaturation temperature T_m and the exposure to solvent in the transition state of the four enzymes follow the sequence TcTIM < TbTIM < GtTIM < HsTIM (see Figs. 6 and 9). In particular, it is noteworthy that the kinetic stability of the protein depends on the previous mutational background, suggesting that kinetic stability might be an important feature of epistasis.^{45,46} Of course, it is clear that the possible relation between the kinetic stability of enzymes and the life conditions of the organisms deserves further studies. Nonetheless, the overall data of this work illustrate that because each homologous enzyme has a particular sequence and a distinctive set of amino acid interactions, it should be regarded as a unique entity that has evolved for function and stability in the organisms to which it belongs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Pavel Afonine for his help in the crystal structures refinements. They also thank Dr. Georgina Garza-Ramos for her useful comments to this work.

REFERENCES

1. Minor DL, Kim PS. Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature* 1996;380:730–734.
2. Lockless SW, Ranganathan R. Evolutionary conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science* 1999;286:295–299.
3. García-Torres I, Cabrera N, Torres-Larios A, Rodríguez-Bolaños M, Díaz-Mazariegos S, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *PLoS One* 2011;6:e1879.
4. Freire E. The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: and analysis of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10118–10122.
5. Halabi N, Rivoire O, Leibler S, Ranganathan R. Protein sectors: evolutionary units of three-dimensional structure. *Cell* 2009;138:774–786.
6. Hey Y, Chen Y, Alexander P, Bryan PN, Orban J. NMR structure of two designed proteins with high sequence similarity, but different folds and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14412–14417.
7. Knowles JR. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 1991;350:121–124.
8. Wierenga RK, Kapetaniou EG, Venkatesan R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:3961–3982.

9. Waley SG. Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem J* 1973;135:165–172.
10. Zomosa-Signoret V, Hernández-Alcántara G, Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Garza-Ramos G, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. Control of reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* 2003;42:3311–3318.
11. Schneider AS. Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:119–140.
12. Orosz F, Oláh J, Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency facts and doubts. *IUBMB Life* 2006;58:703–715.
13. Orosz F, Oláh J, Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1168–1174.
14. Rodríguez-Almazán C, Arreola R, Rodríguez-Larrea D, Aguirre-López B, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R, Costas M, Gómez-Puyou A, Torres-Larios A. Structural basis of triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem* 2008;283:23254–23263.
15. Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. Refined 1.83 Å 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* 1991;220:995–1015.
16. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol* 1998;283:193–203.
17. Reyes-Vivas H, Díaz A, Peón J, Mendoza-Hernández G, Hernández-Alcántara G, de la Mora-de la Mora I, Enriquez-Flores S, Domínguez-Ramírez L, López-Velarde G. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol* 2007;365:752–763.
18. Borchert TV, Pratt K, Zeelen JB, Callens M, Noble ME, Oppendoerfer FR, Michels PA, Wierenga RK. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* 1993;211:703–710.
19. Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* 1997;244:700–705.
20. Enriquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Mendez ST, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velazquez G, Reyes-Vivas H. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins* 2011;79:2711–2724.
21. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:125–132.
22. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760–763.
23. Evans P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2006;62:72–82.
24. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 2007;40:658–674.
25. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallogr D, Biol crystallogr* 2010;66, 213–221.
26. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486–501.
27. Chen VB, Arendall WB, III, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:12–21.
28. Krissinel E, Henrick KJ. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 2007;372:774–797.
29. DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA: DeLano Scientific, 2002.
30. Costas M, Rodríguez-Larrea D, de Maria L, Borchert T, Gómez-Puyou A, Sánchez-Ruiz JM. Between species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol* 2009;385:924–937.
31. Rodríguez-Larrea D, Minning S, Borchert TV, Sanchez-Ruiz JM. Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *J Mol Biol* 2006;360:715–724.
32. Daar IO, Artymiuk PJ, Phillips DC, Maquat LE. Human triosephosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7903–7907.
33. Repiso A, Boren J, Ortega F, Pujades A, Centelles J, Vives-Corrons JL, Climent F, Cascante M, Carreras J. Triosephosphate isomerase deficiency: genetic, enzymatic and metabolic characterization of a new case from Spain. *Haematologica* 2002;87:ECR12.
34. Sánchez-Ruiz JM. Theoretical analysis of the Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J* 1992;61:921–935.
35. Myers JK, Pace CN, Scholtz JM. Denaturant *m* values and heat capacity changes in accessible surface areas of protein folding. *Protein Sci* 1995;4:2138–2148.
36. Robertson AD, Murphy KP. Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem Rev* 1997;97:1251–1268.
37. Axe DD. Extreme functional sensitivity in conservative amino acid changes on enzyme exteriors. *J Mol Biol* 2000;301:585–596.
38. Yanofsky C, Horn V, Thorpe D. Protein structure relationships revealed by mutational analysis. *Science* 1964;146:1593–1594.
39. Davis BH, Poon AFY, Whitlock MC. Compensatory mutations are repeatable and clustered within proteins. *Proc R Soc B* 2009;276:1823–1827.
40. Poon A, Davis BH, Chao L. The coupon collector and the suppressor mutation: estimating the number of compensatory mutations by maximum likelihood. *Genetics* 2005;170:1323–1332.
41. Oria-Hernández J, Rivero-Rosas H, Ramírez-Silva L. Dichotomic phylogenetic tree of the pyruvate kinase family: K⁺-dependent and -independent enzymes. *J Biol Chem* 2006;281:30717–30724.
42. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou A. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity. Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem* 1998;253:684–691.
43. Saab-Rincón G, Olvera L, Olvera M, Rudiño-Piñera E, Benites E, Soberón X, Morett E. Evolutionary walk between (β/α)₈ barrels: catalytic migration from triosephosphate isomerase to thiamine phosphate synthase. *J Mol Biol* 2012;416:255–270.
44. Gilles HM. Protozoan diseases. New York: Oxford University Press; 1999.
45. Sanchez-Ruiz JM. On promiscuity, changing environments and the possibility of replaying the molecular tape of life. *Biochem J* 2012;445:e1–e3.
46. Breen S, Kemena C, Vlasov PK, Notredame C, Kondrashov FA. Epistasis as the primary factor in molecular evolution. *Nature* 2012;490:533–538.