



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de dos regiones que afectan el replegamiento de las Triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*. Caracterización del mecanismo cinético de su replegamiento

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.en C. Mónica Rodríguez Bolaños

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Ruy E. Pérez Montfort
Instituto de Fisiología Celular UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Diego González Halphen
Instituto de Fisiología Celular UNAM

Dr. Juan P. Pardo Vázquez
Facultad de Medicina UNAM

Ciudad de México, Febrero de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PMDCB/2751/2018

Rodríguez Bolaños Mónica
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

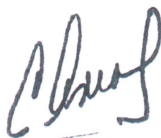
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **12 de noviembre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis “Análisis de dos regiones que afectan el replegamiento de las Triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Caracterización del mecanismo cinético del replegamiento”, dirigida por el/la Dr(a). **Pérez Montfort Ruy**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Bustos Jaimes Ismael
VOCAL	González Segura Lilián
VOCAL	Reyes Vivas Horacio
VOCAL	Sánchez Puig Nuria Victoria
SECRETARIO	Sosa Peinado Alejandro

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de noviembre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 201 en el edificio oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort, junto con la asesoría del comité tutor conformado por los Doctores Diego González Halphen y Juan Pablo Pardo Vázquez.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo No.254694 por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del donativo No.IN221812 e IN206816. Y por la beca de estudios de posgrado otorgada por CONACyT, No.262118

Se reconoce la ayuda del posgrado en Ciencias Bioquímicas y del programa del apoyo a los estudios de posgrado (PAEP), por el apoyo brindado para asistir a congresos.

Agradezco la ayuda técnica de la Bióloga Nallely Cabrera González en la realización del presente trabajo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química y al Instituto de Fisiología celular, por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

A mi comité tutor por compartir sus enseñanzas y valiosos consejos.

A los miembros del honorable jurado por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Ruy, por haberme brindado la oportunidad de trabajar y aprender en su laboratorio por tantísimos años. Usted es un ejemplo de disciplina, tenacidad y paciencia. Gracias por su guía.

A mis padres, les agradezco enormemente su amor, comprensión, ayuda incondicional y sacrificio. Los amo. Gracias por ser un ejemplo de lucha y determinación.

A Héctor por todo su amor, paciencia y apoyo a través de todos estos años. Sigamos creciendo y caminando juntos.

A todos aquellos quienes han influido en mi formación, les agradezco su apoyo, orientación y confianza. Gracias por compartir su sabiduría y experiencias que lograron enriquecer mi crecimiento.

A mis amigos, cada uno de ustedes me ha ayudado a continuar en el camino de la vida. A cada uno los admiro y les agradezco su apoyo y paciencia. Los quiero.

A mi familia del AFG, gracias por mostrarme que la vida no es sólo el trabajo, gracias por esos momentos jocosos del día. Muchísimas gracias Paty por empujarme a evolucionar y mejorar continuamente.

A mi Ohana y mis Kumus por ayudarme a ser una mejor persona e impulsar siempre la búsqueda y el aprendizaje.

Dedicatorias

A mis padres Alicia y José Luis por enseñarme a luchar por mis objetivos.

A Héctor Vicente por todo su apoyo, amor y comprensión. Gracias por ser mi amigo y volverme una mejor persona.

I´m walking to the day...

Estoy caminando por grandes montañas
Estoy caminando con mis zapatos desgastados
Estoy caminando cada día
Hasta siempre, hasta siempre

Cada paso se hace nuevo
Mientras camino cada vez más lejos
Si, tropiezo y caigo puedo sacudirme y continuar

Estoy caminando por grandes montañas
Estoy caminando con mis zapatos desgastados
Estoy caminando cada día
Hasta siempre, hasta siempre
Un paso hasta el vasto cielo azul
Un paso hasta cruzar la meta

Aunque sufra graves prejuicios, y este cansado a veces
Aunque caminase en contra del viento
Caminaré con el ritmo
Hasta siempre, hasta siempre

R Jhun

INDICE

Resumen	i
Abreviaturas.....	ii
1.0.Introducción.....	1
1.1. Características estructurales de la triosafosfato isomerasa.....	1
1.2. Intercara de la triosafosfato isomerasa	4
1.3. Sitio activo y mecanismo de catálisis.....	9
1.4 TIMs Monoméricas	13
1.5. La TIM dentro del metabolismo.....	14
1.6. El plegamiento de la TIM.....	16
1.7. Las Triosafosfato isomerasas de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>T.brucei</i> (TcTIM y TbTIM).....	19
2.0. Antecedentes.....	21
2.1. Estudios de reactivación de la TIM.....	21
3.0. Hipótesis.....	29
4.0. Objetivos.....	30
5.0. Estrategia experimental.....	31
6.0. Materiales y métodos.....	32
6.1. Construcción y clonación de las mutantes de la TIM.....	32
6.2. Ensayos de sobreexpresión.....	36
6.3. Purificación de las mutantes de TcTIM y TbTIM.....	36
6.4. Determinación de la actividad catalítica y caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM.....	38
6.5. Desnaturalización y replegamiento	38
6.6. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las quimeras de las regiones 1 y 2	39
6.7. Dicroísmo circular	40
6.8. Análisis estructural de los aminoácidos relevantes de las regiones 1 y 2.....	41
7.0. Resultados.....	42
7.1. Construcción y clonación de las mutantes de la TIM	42

7.2. Ensayos de sobreexpresión.....	42
7.3. Purificación de las mutantes de TcTIM y TbTIM.....	44
7.4. Determinación de la actividad catalítica y caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM.....	44
7.5. Dicroísmo circular.....	47
7.6. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las quimeras de las regiones 1 y 2.....	49
7.7. Reactivación de las mutantes aditivas región 1	50
7.8. Reactivación de las mutantes aditivas región 2.....	52
7.9. Análisis estructural de los aminoácidos relevantes en la región 1 y 2.....	56
7.10. Probando los residuos importantes, conversión de una TbTIM en TcTIM.....	60
8.0. Discusión.....	62
8.1. Papel de las asas en la reactivación de la región 1.....	62
8.2. Papel de las asas en la reactivación de la región 2.....	65
8.3. Agregación en estas enzimas.....	67
9.0. Conclusiones.....	67
10.0. Perspectivas.....	68
11.0. Referencias bibliográficas.....	69
12.0. Artículos producidos durante el doctorado.....	76

Abreviaturas

A β	Péptido beta amiloide
QA	Ácido quinolínico
AGEs	Especies avanzadas de glucosilación (advanced glycation products)
APP	Precursor de la proteína beta amiloide
LB	Medio Luria Bertani
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
Dpn I	Endonucleasa proveniente de <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
DTNB	Ácido ditionitrobenzónico
DTT	Ditiotreitol
dNTPS	Mezcla de nucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
GAP	Glicerol fosfato
G3P	D-Gliceraldehído 3 fosfato
α -GDH	Alfa gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil β -D-Tiogalactopiranosido
MES	Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MMTS	Metal metano tiosulfonato
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.
NMR	Resonancia magnética nuclear
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PMS Fenacina metosulfato
SDS Dodecil sulfato de sodio
TIM Triosafosfato isomerasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características estructurales de la triosa fosfato isomerasa

La triosa fosfato isomerasa (TIM), es una enzima oligomérica presente en casi todos los organismos (Halbedel et al., 2007, Roland et al., 2013), que posee por monómero aproximadamente 250 aminoácidos (masa molecular: 27000 Da), aunque la longitud de su secuencia puede variar dependiendo de la especie. En todos los organismos la TIM se encuentra en forma de dímero, excepto en algunos organismos extremófilos, en donde la TIM forma tetrameros como en el caso de: *Thermotoga maritima*, *Pyrococcus woesei*, *Methanocaldococcus jannaschii* y *Thermoproteus tenax*. Se cree que la forma tetramérica es una adaptación para conservar la actividad de la enzima en condiciones extremas, como temperaturas elevadas. (Beaucamp et al., 1997; Maes et al., 1999; Walden et al., 2001; Höcker et al., 2001; Gayathri et al., 2007; Katebi y Jernigan., 2014). La TIM cataliza el quinto paso de la glucólisis en donde se encarga de la isomerización de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP).

La primera estructura cristalizada de la TIM (Banner et al., 1975) reveló que presenta una topología tipo barril ($\beta\alpha$)₈ conocida también como barril TIM, la cual es el motivo estructural más frecuente dentro de las proteínas (el 10% de las enzimas estudiadas posee dicho motivo estructural) (Lesk et al., 1989; Wierenga., 2001). Este motivo consta de un patrón repetitivo de 8 hebras beta plegadas y 8 hélices alfa unidas entre sí por asas. Las hebras beta forman el interior de la proteína (barril) y se encuentran dispuestas entre sí de manera paralela, rodeadas por las hélices alfa. En la estructura de la TIM hay dos tipos de asas que unen su estructura; la primera de ellas une al extremo carboxilo terminal de la hélice alfa con el inicio de la hebra beta (asas externas) y el segundo tipo de asas son aquellas que unen al extremo carboxilo terminal de la hebra beta con el inicio de la hélice alfa (asas internas) (figura 1 A, C).

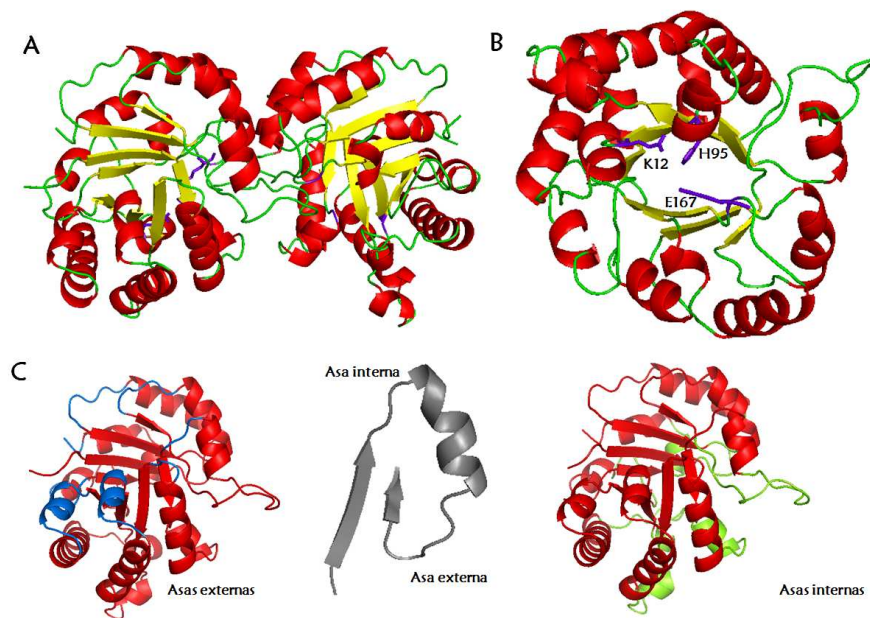


Figura 1. Estructura de la TIM de *T. cruzi* (PDB 1TCD). A.- Dímero de la TIM. B.- Monómero de la TIM. En amarillo se muestra el barril, formado por las hebras beta dispuesto al interior de la enzima y rodeado por las hélices alfa en color rojo; en color morado se muestran los tres residuos catalíticos que están presentes en ambos monómeros. C.- Los dos tipos de asas en la TIM, las asas internas unen la hebra beta con el inicio de la hélice alfa (color verde), mientras que las asas externas unen el final de las hélices alfa con el inicio de las hebras beta (color azul).

El sitio activo se encuentra localizado siempre al final del barril en las asas internas 1, 4 y 6, justo en la interfase del dímero (Faber y Petsko., 1990; Lolis et al., 1990; Knowles., 1991; Wierenga 2001, Wierenga et al., 2010) (figura 1 B). Los residuos catalíticos son: lisina 13 (asa interna 1), histidina 95 (asa interna 4), glutamato 167 (asa interna 6) aunque Wierenga (Wierenga., 2010) propone también a la asparagina 11 (asa interna 1) como un cuarto residuo catalítico. Dichos residuos se encuentran altamente conservados y, la modificación por mutagenesis de cualquiera de estos residuos lleva a la pérdida de la actividad de la enzima.

La TIM no requiere de ningún cofactor para realizar catálisis, ni tampoco de algún ión metálico. Evolutivamente, la TIM se considera como un catalizador perfecto, ya que sólo la difusión del sustrato al sitio activo es lo que limita su función. Tanto la función como el mecanismo catalítico de la TIM se encuentran conservados en todas las especies (Albert et al., 1981; Katebi y Jernigan.,

2014). Cada monómero posee un sitio activo y todos los residuos relacionados con la catálisis (figura 1 A, B); sin embargo, la TIM solamente es completamente activa cuando se encuentra en forma de dímero (Hernández-Alcántara et al., 2002; Wierenga 2001).

El asa 6, o asa tapadera, o asa catalítica (figura 2 A), es una de las partes de la TIM esenciales para una buena actividad enzimática. Ésta se compone por los aminoácidos 166-176 y, cuando la enzima no se encuentra en presencia de sustrato, esta asa permanece en posición preferencialmente abierta (estabilizada por contactos con el asa 5). Cuando se encuentra en presencia del sustrato, esta asa se mueve cerca de 7 Å para alcanzar la conformación cerrada estabilizándose con los contactos con el asa 7 (figura 2 B y C) (Wierenga 2010, Liao et al., 2018). Particularmente, los residuos 168-173 se encargan de la formación de una porción rígida que funge como tapa, en donde los residuos 170-173 se apoyan para formar interacciones con el grupo fosfato del sustrato. El papel del asa 6 es asegurar un buen rendimiento en la reacción y estabilizar al intermediario durante la reacción de isomerización (ver más adelante en sección 1.3). En el interior del asa cerrada, se forma un ambiente especial que facilita la transferencia del protón entre los carbonos 1 y 2 del sustrato. El glutamato 167, en ausencia del sustrato, se une a la serina 96 mediante interacciones tipo puente de hidrógeno y, cuando el sustrato entra al sitio activo, esta unión se rompe y el glutamato se repositona para comenzar la catálisis (Knowles et al., 1991; Rozovsky y McDermott 2001). Estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) han demostrado que el asa interna 7 se sincroniza con el movimiento de las bisagras del asa 6 controlando el movimiento de esta asa (Wierenga 2010; Katebi y Jernigan 2014). Esto permite que el glutamato catalítico se posicione más adentro del sitio activo para acercarse al sustrato. Un funcionamiento incorrecto del asa 6 da lugar a la formación de metilglioxal. La mutagenesis en el asa 6 muestra que la eliminación de 4 residuos de dicha asa en la TIM de pollo (isoleucina 170, glicina 171, treonina 172 y glicina 173) produce la pérdida de actividad (esta mutante es cerca de 10^5 veces menos activa que la enzima silvestre), y favorece a la formación de metilglioxal (Pompliano et al., 1990).

El metilglioxal es un compuesto altamente reactivo y se desconoce su función biológica, por lo que se piensa que es una molécula tóxica. Tanto la DHAP como el GAP, pueden dar lugar a la formación de metilglioxal durante la catálisis enzimática y no enzimática (la extracción de un protón en el C_1 genera un intermediario enediol, el cual se desprotona fácilmente para formar al

metilglioal). Sin embargo, cuando la TIM cataliza la reacción, la formación de este intermediario es tan veloz (la reacción catalizada es 10^9 veces más rápida que la no catalizada) que la producción de metilglioal es despreciable (Hal y Knowles 1975; Lolis et al., 1990; Knowles et al., 1991; Wierenga et al., 1991).

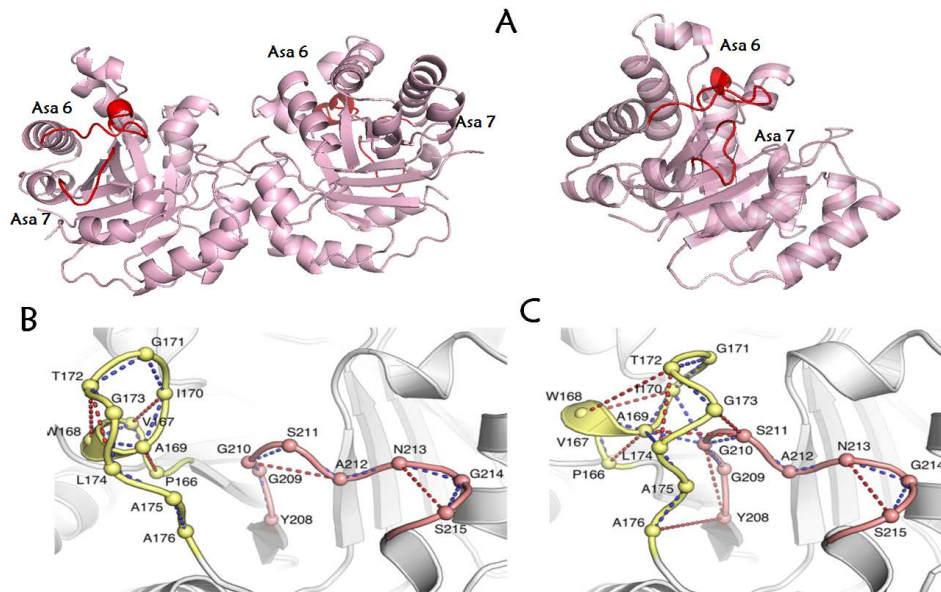


Figura 2.- Diferencias estructurales entre las conformaciones abierta y cerrada de las asas 6 y 7 de la TIM durante la catálisis. A.- Posición de las Asas 6 y 7 en el dímero y en el monómero de la TIM de *T. cruzi* (PDB 1TCD). B.- Conformación abierta del asa 6. En amarillo se muestra el asa 6 y en rosa el asa 7 de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1YPI) C.- Conformación cerrada del asa 6 de *S. cerevisiae*, el asa 6 se muestra en amarillo y el asa 7 en rosa (PDB 1NEY). Las líneas punteadas en rojo indican los puentes de hidrógeno y las líneas azules las interacciones Ca-Ca en una distancia de 5 Å. Tomado y modificado de Liao et al., 2018.

1.2. Intercara de la TIM

La intercara se conforma por 32 residuos que se distribuyen principalmente en las asas internas 1 a 4 de cada uno de los monómeros, aunque el asa interna 8 también participa. La intercara se encuentra estabilizada por alrededor de 20 enlaces tipo puente de hidrógeno entre moléculas de ambos monómeros y moléculas de agua. Existen en particular 18 moléculas de agua que juegan un

papel importante en la estabilidad del dímero. En gran medida, estas interacciones entre los monómeros y las moléculas de agua controlan los contactos de la interfase, en especial los contactos entre las regiones 1 y 2. Se piensa que estas moléculas de agua son remanentes de algún estado de plegamiento de la enzima (Lolis et al., 1990). La modificación de esta red de contactos desestabiliza al dímero como ocurre con la mutación del glutamato por aspartato en la posición 104 en la TIM de humano (Rodríguez-Almazán et al., 2008).

La dimerización juega un papel importante en el reacomodo de la arquitectura global de la enzima; prueba de ello, es que la TIM sólo es completamente activa cuando se encuentra en forma dimérica. Esto posiblemente se deba a que los contactos que se forman entre los monómeros mismos, modifican la geometría del sitio catalítico, brindándole así una mejor capacidad de catálisis (Wierenga 2010). Se ha observado mediante estudios de dinámica molecular que, al llevarse a cabo la dimerización la movilidad de las asas 6 y 7 aumenta (asegurando la función de la enzima), mientras que la rigidez de las asas 1-4 aumenta (figura 3). El aumento en la rigidez de estas asas, parece ser indispensable para que los residuos del sitio catalítico se posicionen correctamente para llevar a cabo su función.

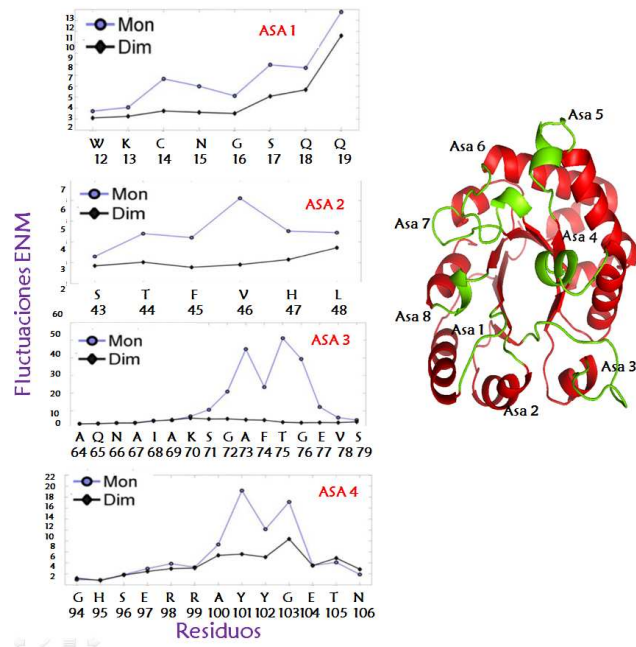


Figura 3.-Cambios en la movilidad de las asas internas antes y después de la dimerización. En los gráficos de la parte izquierda, podemos observar la disminución en la movilidad de las asas internas 1-4 al dimerizarse. Los rombros negros representan al dímero y el círculo con línea azul indica al monómero. Dichos cambios fueron monitoreados en la TIM de *Trypanosoma brucei*. Por otro lado, a la derecha, podemos observar la posición de estas asas en el monómero de *Trypanosoma cruzi*. (PDB 1TCD). Tomado y modificado de Katebi y Jernigan 2014.

Dada la importancia de la dimerización, se podría pensar que las interacciones interfaciales deberían poseer un elevado grado de conservación entre especies, sin embargo, no es así, ya que los residuos involucrados en la formación de la interfase muestran una variabilidad considerable. Por ejemplo, la TIM de *Trypanosoma cruzi* y la TIM de *T. brucei* (TcTIM y TbTIM), son enzimas homólogas con un alto grado de similitud entre sí, sin embargo, sólo poseen un 82 % de identidad de secuencia en sus residuos de interfase (tabla 1).

Tabla 1.- Aminoácidos de la intercara del dímero de TbTIM y TcTIM. Los residuos no conservados entre TcTIM y TbTIM se encuentran resaltados con un asterisco. Tomado de García-Torres I., (2006).

TcTIM			TbTIM		
Asn12	Gly 73	Ile173	Asn11	Gly 72	Ile172
Lys14	Ala 74	Gly174	Lys13	Ala 73	Gly174
Cys15	Phe75		Cys14	Phe74	
Asn16	Thr76		Asn15	Thr75	
Gly17	Gly77		Gly16	Gly76	
Ser18	Glu78		Ser17	Glu77	
Glu19 *	Val79		Gln18 *	Val78	
Ser20 *	Ser80		Gln19 *	Ser79	
Thr45	Ile83		Thr44	Ile82	
Phe46	Leu84		Phe45	Leu83	
Leu47 *	Asp86		Val46 *	Asp85	
His48	Tyr87 *		His47	Phe86 *	
Ile49 *	Ile89 *		Leu48 *	Val88 *	
Pro50 *	Val93		Ala49 *	Val92	
Met51	His96		Met50	His95	
Gln66	Glu98		Gln65	Glu97	
Asn67	Arg99		Asn66	Arg98	
Ile69	Tyr102		Ile68	Tyr101	
Ser72	Tyr103		Ser71	Tyr102	

El asa interna 3, o asa interdigitante, es una de las asas más largas en la TIM y también posee un papel importante en la estabilidad del dímero (figura 4). Esta se ancla dentro del espacio formado por las asas 1 y 4 del otro monómero y está formada por los aminoácidos 65-79. Uno de los residuos con mayor número de interacciones en la interfase es la treonina 75, que se encuentra al final del asa 3. Esta treonina establece una serie de puentes de hidrógeno que se extienden hasta el sitio activo de la otra subunidad. El grupo hidroxilo de esta treonina, parece ser especialmente importante para lograr un acercamiento óptimo de las cadenas laterales de los residuos catalíticos (Wierenga et al., 1991; Schliebs et al., 1996).

En la TIM de algunos parásitos como los tripanosomatidos, el asa 3 rodea a la cisteína 14 o cisteína de interfase, la cual tiene un papel importante en la estabilidad del dímero (García-Torres., 2006). El grado de exposición de la interfase del dímero al solvente, se encuentra relacionado a la estabilidad de éste; por ejemplo, cuando no se tiene una interfase (mutantes monoméricas) se ha observado que la movilidad de los residuos catalíticos (histidina 95 y lisina 12) aumenta, generando una caída importante en la capacidad de catálisis de la enzima (Schliebs et al., 1996; Katebi y Jernigan., 2014).

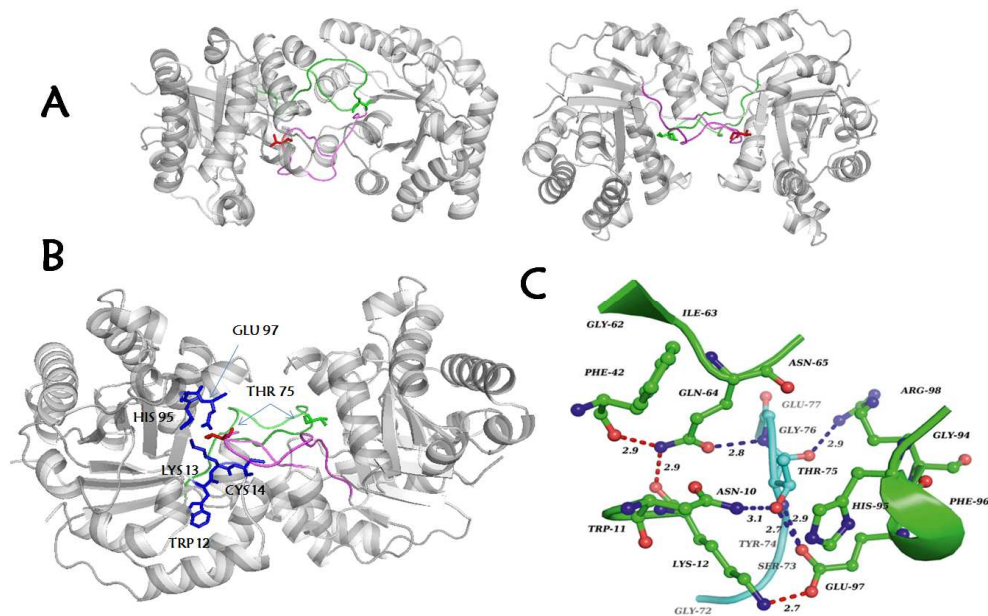


Figura 4.- El asa 3 y su interacción indirecta con los residuos catalíticos. A.-El asa 3 es la más larga de toda la enzima, y esta se ancla directamente al otro monómero mediante contactos con las asas 4 y 1. En verde y en rosa se observa la disposición de estas asas en el dímero. Resaltado en rojo se muestra a la treonina 75. B.- La treonina 75 es un aminoácido altamente conservado en las TIMs y su posicionamiento le permite interactuar de manera indirecta con los residuos catalíticos del otro monómero. C.- Red de contactos entre la treonina 75 en con los residuos del otro monómero en la TIM de *Plasmodium falciparum* (PDB 1O5X). La treonina 75 interactúa directamente con la asparagina 11 y de manera indirecta con la histidina 95 mediante la interacción con el glutamato 97. Las líneas punteadas azules, indican las interacciones tipo puente de hidrogeno entre los residuos del asa 3 y el otro monómero, mientras que las líneas punteadas en rojo, los puentes de hidrógeno la dentro de la misma cadena del monómero. Tomado y modificado de Bandyopadhyay et al., 2015.

1.3 Sitio activo y mecanismo de catálisis

Tanto la función como el mecanismo catalítico de la TIM se encuentran conservados en todas las especies (Eucarya, Archaea y Bacteria). Existen cuatro componentes principales para el mecanismo los cuales son: A) La captura del sustrato del sitio catalítico debido a la movilidad de las asas 6 y 7, B) el reconocimiento específico del sustrato facilitado por el asa 8, C) la catálisis del sustrato de DHAP a GAP y viceversa y D) la transición del asa catalítica entre los estados abierto y cerrado, para liberar al producto. (Katebi y Jernigan2014).

El sitio catalítico se compone por 3 residuos, los cuales están ubicados en las asas internas en un sitio cercano al carbono terminal de la enzima. Estos residuos son: glutamato 167 (asa interna 6), histidina 95 (asa interna 4) y lisina 13 (asa interna 1).

La reacción comienza con la captación estereoespecífica del protón del carbono dos del sustrato por el grupo carbonilo del glutamato 167, el cual se encuentra bien posicionado y a la distancia adecuada para poder realizar la extracción (a 3 Å de los carbonos 1 y 2 y ortogonal con respecto al plano del enolato), formando así al intermediario cis-enediol. La histidina 95 funge como electrófilo y su acción polariza al grupo carbonilo del sustrato permitiendo la enolización (Knowles 1991; Lolis et al., 1990). La lisina 13 ayuda a la estabilización de la carga negativa del carbonilo en el estado de transición, incrementando la acidez del protón. También este residuo se encuentra muy relacionado con la especificidad de la TIM por su sustrato, ya que proporciona estabilidad electrostática al grupo fosfato del sustrato y del intermediario (Albert et al., 1987, Davenport et al., 1991). Finalmente, la reacción concluye con la desprotonación del O₁ del glutamato 167 y la reprotonación del C₂ (Albert et al., 1981) (figura 5).

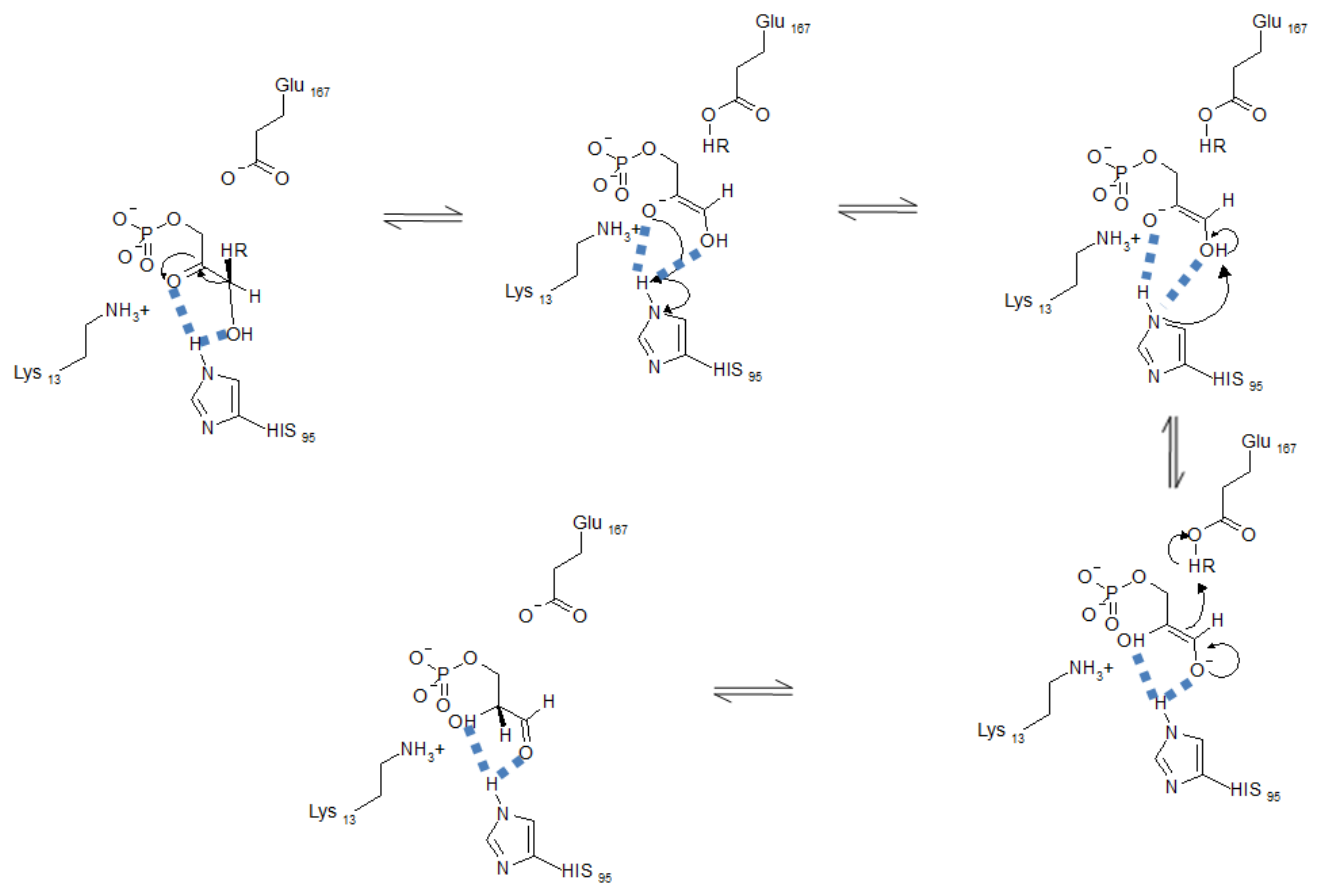


Figura 5.- Mecanismo de reacción clásico de la TIM. *El mecanismo clásico fue propuesto por Knowles. En este mecanismo la transferencia del protón se lleva a cabo por el Glu 167 y la His95. (Tomado y modificado de Wierenga., 2010).*

Se sabe que la mutación de los residuos catalíticos resulta en la pérdida de la actividad enzimática. Por ejemplo, la sustitución del glutamato 167 mediante mutagenesis por glicina o alanina, genera un decremento de casi 1×10^6 veces en la actividad enzimática. En el caso de la mutagenesis de la histidina 95 por alanina, la actividad disminuye casi 140 veces. Si bien la mutación de ese residuo disminuye la actividad, esta no es tan grave como cuando se muta el glutamato 167, por lo que Harris y colaboradores propusieron un mecanismo alternativo (mecanismo criss-cross), en donde el papel de la histidina 95 es parcial y el glutamato 167 es quien se encarga de la transferencia de protones entre C_1 , C_2 , O_1 y O_2 del sustrato. El primer paso de este mecanismo consiste en la abstracción del protón del C_1 del sustrato (DHAP) por el O_2 del glutamato 167; el protón unido al O_2 es transferido al carboxilato del sustrato generando una resonancia en el carbonilo del glutamato 167, de tal modo que el O_1 ahora transfiere el protón al C_2 (figura 6).

Aún existe controversia acerca de cuál de los mecanismos es el correcto, pero estudios realizados con NMR, muestran que el mecanismo de transferencia del protón es más eficiente y directo cuando se lleva a cabo entre los C_1 y C_2 , como en el caso del mecanismo clásico (O'Donoghue et al., 2005).

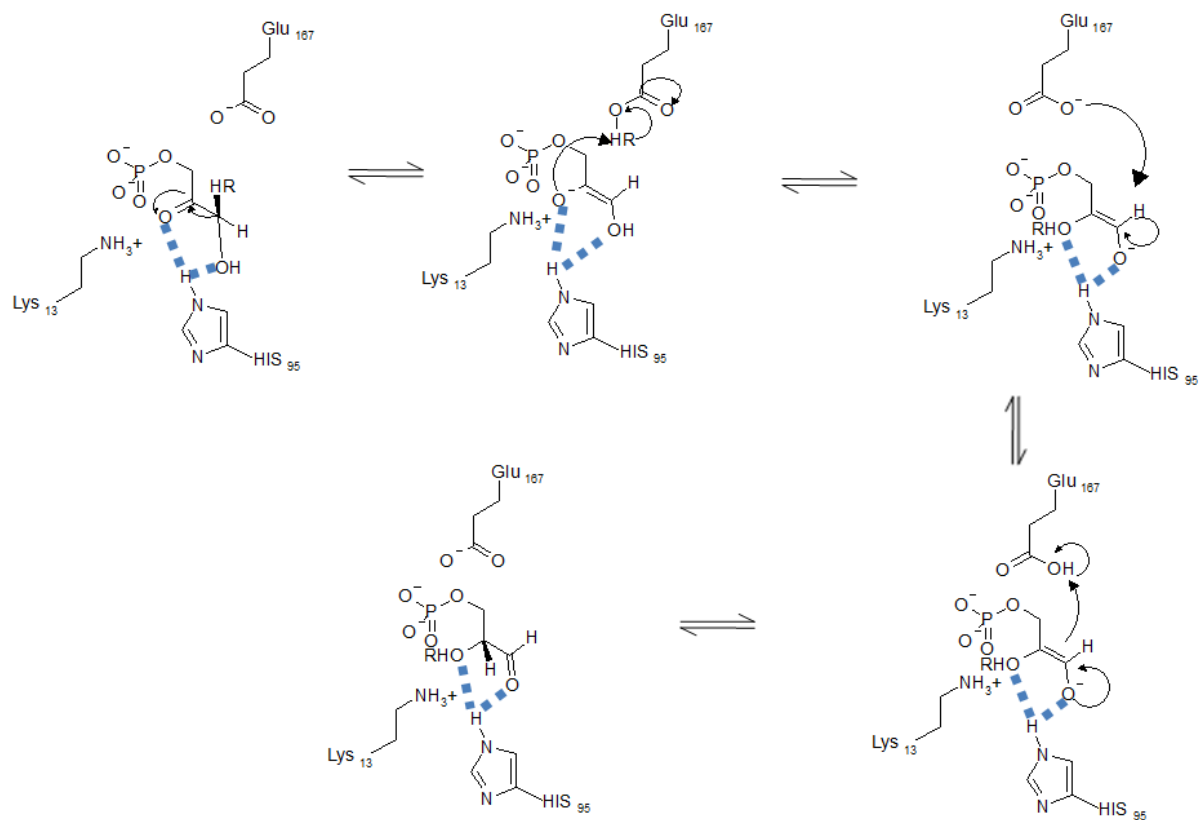


Figura 6.- Mecanismo de reacción “criss-cross” de la TIM. El mecanismo criss-cross propone que la transferencia del protón se lleva a cabo únicamente por el glutamato 167 por medio de su grupo carboxilato. Modificado de Wierenga., 2010.

1.4. TIMs monoméricas

En la TIM los residuos catalíticos están localizados en cada uno de los monómeros, sin embargo, como se mencionó, ésta sólo es completamente activa cuando se encuentra en forma de dímero. Los residuos catalíticos se encuentran en las asas internas, las cuales ayudan a estabilizar la interfase del dímero. Se han realizado múltiples estudios con TIMs monoméricas con el fin de elucidar algunas propiedades estructurales del monómero y sus asas. Una particularidad presente en todas estas TIMs es que todas muestran una capacidad de catálisis muy reducida. La primer TIM monomérica fue la monoTIM, la cual fue generada a partir de la TIM de *Trypanosoma brucei*, mediante la eliminación de 7 residuos del asa interna 3. La estructura cristalográfica de esta mutante (1TRI), muestra que las asas relacionadas con la dimerización en la enzima silvestre se encuentran desordenadas, o adoptan conformaciones muy diferentes a la nativa. En el caso del asa 4, ésta adopta una nueva conformación ordenada pero orientada hacia afuera, mientras que el asa 1 se encuentra desordenada. El asa 8 en la estructura 1MSS (TIM de *T. brucei*) en ausencia de ligando, adopta también una conformación inusual (figura 7).

En general, las asas 1, 4 y 8 cuando se encuentran en forma dimérica, poseen una estructura más rígida, mientras que en las monoTIMs estas mismas asas tienen una amplia diversidad de conformaciones (Wierenga 2010; Katebi y Jernigan., 2014). Por esta razón, se piensa que el posicionamiento correcto de estas asas es indispensable para alcanzar una capacidad de catálisis óptima.

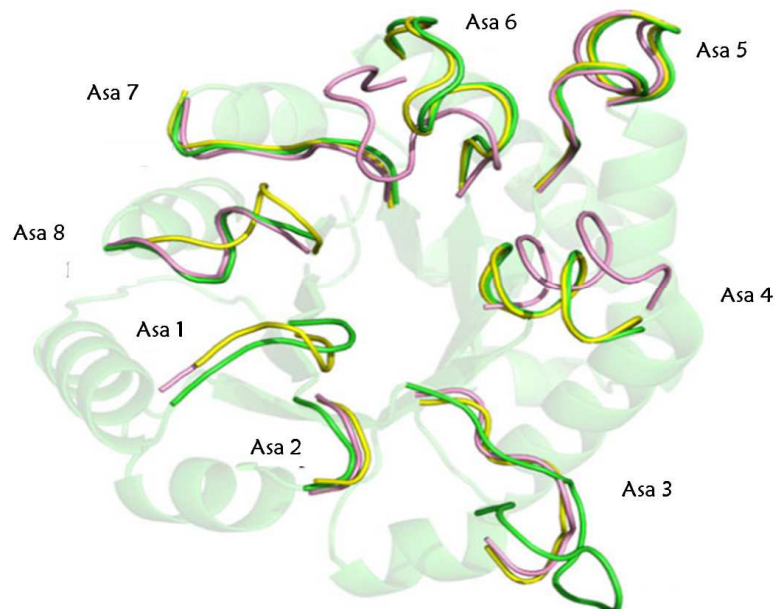


Figura 7.- Comparación estructural de las asas internas de las TIMs monoméricas. En verde, el monómero de TbTIM silvestre (TbTIM dimérica, PDB 5TIM Subunidad A), en morado TbTIM monomérica con la conformación del asa 6 cerrada (monoTbTIM, PDB 1TRI) y en amarillo MonoTbTIM con la conformación abierta del asa 6 (PDB 1MSS). Existe una variabilidad estructural entre las asas 8, 1 y 4 de las monoTIMs con respecto a las asas de TbTIM silvestre. En TbTIM dimérica, las asas se encuentran más rígidas debido a la dimerización, mientras que en las monoTbTIMs las asas mencionadas muestran una mayor diversidad conformacional (Tomado y modificado de Wierenga 2010).

1.5. La TIM en el metabolismo

La glucólisis consiste en 10 pasos secuenciales cuyo fin es convertir a una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato. En este proceso, se utilizan dos moléculas de ATP y se producen cuatro moléculas de ATP, generando una ganancia neta de dos moléculas de ATP (Katebi y Jernigan., 2014). En consecuencia, la TIM es responsable de la ganancia neta de ATP en la glucólisis, así como la producción extra de una molécula de piruvato por molécula de glucosa. Esta mejora en la glucólisis es de suma importancia en la bioenergética tanto de los metabolismos aeróbicos como de los anaeróbicos (Wierenga 2001).

La TIM cataliza el quinto paso de la glucólisis, en donde se encarga de la isomerización de gliceraldehído 3- fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Si bien la TIM no es una enzima reguladora, sí se encarga de proveer al metabolismo de ciertas moléculas que conectan con otras

vías metabólicas como: 1) la vía de las pentosas (en donde se pueden formar azúcares complejos a partir del GAP) (Bar-Even et al., 2012); 2) la síntesis de novo del NAD⁺ vía síntesis de ácido quinolínico (QA) (el aspartato es oxidado a iminoaspartato el cual se condensa con una molécula de DHAP para formar el QA, que finalmente es fosforilado para ser convertido en ácido nicotínico mononucleótido, uno de los precursores del NAD⁺)(Osterman, 2009); 3) en la gluconeogénesis (en donde a partir del piruvato u oxaloacetato se pueden llegar a formar GAP o DHAP) y 4) en la biosíntesis de triacilgliceroles en tejido adiposo (en donde no hay expresión de la enzima glicerol cinasa para fosforilar a glicerol, por lo que la síntesis de los triacilgliceroles se hace a partir de DHAP) (Lincet e Icard 2015).

Tras casi dos décadas de estudio, se han encontrado funciones importantes para muchas enzimas que no están relacionados con su función catalítica. Algunos ejemplos de ello están entre las enzimas de la glucólisis, las cuales se encargan de regular la actividad de otras proteínas. Por ejemplo, la aldolasa que ayuda al ensamblaje y al funcionamiento a la ATPasa de tipo vacuolar, la hexocinasa que modula la función de las proteínas apoptóticas Bax, bak y Bad, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, que se encarga de la regulación transcripcional del gen de la histona H2B durante el progreso del ciclo celular, la glucosa-6-fosfato isomerasa, que se encarga de la inducción de movilidad celular a través de la secreción y unión de ésta al receptor del factor autócrino de movilidad gp 78 (Roland et al., 2013) y la piruvato cinasa la cual se encuentra relacionada con la progresión de la segregación de cromosomas en la citocinesis, fosforilando a las proteínas STAT 3, BUB3 y MYL2. En células con cáncer la piruvato cinasa, promueve cambios metabólicos importantes que favorecen a la progresión de las células malignas.

En el caso de la TIM, se ha propuesto que el simple ensamblaje correcto de ésta es necesario para tener un funcionamiento neuronal óptimo, por ello, cuando existen problemas que generan cambios que modifican su función, o fallos en la regulación del ciclo celular, se presentan serios problemas neurodegenerativos (Roland et al., 2013).

Existe evidencia de que la TIM participa en el control del ciclo celular mediante la interacción con la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2). La Cdk2 se encuentra involucrada en el control del ciclo celular, su actividad es esencial para que ocurra la meiosis y para tener un control adecuado del balance entre la proliferación celular, la muerte celular y la reparación del DNA. La TIM tiene máxima actividad en las fases S y G2 del ciclo celular, aunque también se encuentra activa en la

fase G1-S, en donde funge como punto de revisión de la calidad del DNA. Esta ciclina fosforila a múltiples proteínas como: CTNNB1, USP37, p53/TP53, NPM1, CDK7, RB1, BRCA2, MYC, NPAT, EZH2 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P24941>) y, en estudios recientes, se ha descrito a la TIM como blanco de Cdk2 (Imami et al., 2008; Dephoure et al., 2008 ; Beranova-Giorgianni et al., 2006). La TIM al ser fosforilada por la Cdk2, sufre un decremento en su actividad, deteniendo la vía glucolítica y el resto de las vías que se interconectan, generando un arresto en la fase mitótica del ciclo celular (Lee et al., 2010).

En muchos reportes se dice que la fosforilación de la TIM por la Cdk2 se lleva a cabo en la serina 21, sin embargo, dichos reportes no han sido concluyentes, ya que TIMs con diferentes residuos en esa posición se fosforilan de igual manera por la Cdk2.

También la Cdk2 está relacionada en la vía de señalización del óxido nítrico (NO), controlando así los niveles de estrés oxidativo en la célula. Un fallo en la regulación de dicha actividad, genera concentraciones altas de especies reactivas de nitrógeno que causan modificaciones importantes en la TIM, como la nitración de las tirosinas de la enzima.

Se ha descubierto también que la TIM es un blanco de las proteínas arginina metiltransferasas (PRMTs) quienes metilan a los grupos guanidino de las argininas y generan cambios en su función.

Las modificaciones en las proteínas generadas por las PRMTs producen cambios en los patrones epigenéticos de las células (ya que pueden modificar a las histonas) y cambios en la interacción proteína-proteína generando así, cambios en varias funciones biológicas como: la traducción de señales, diferenciación celular, desarrollo embriológico y activación/represión. Se sabe que cambios en la regulación de las PRMTs, generan diversos tipos de cáncer (Cha y Jho., 2012).

Se ha demostrado *in vitro* (cultivo celular) que las PRMTs metilan a la TIM, modulando la cantidad de enzima activa y su función. El sitio probable de metilación se encuentra entre los residuos 189-191 (región 6). Las PRMTs realizan una doble metilación que favorece la monomerización de la enzima controlando así los niveles de enzima activa (Kim et al., 2010; Roland et al., 2013).

También se ha descrito que la TIM interacciona con la cofilina (proteína que se une a la actina para regular la longitud de los microfilamentos y que también actúa en la reorganización de los microtubulos para el tráfico de vesículas). El complejo formado por la cofilina y la TIM, se transloca

a la membrana plasmática donde se asocia a la Na, K-ATPasa. Se piensa que una vez formado el complejo glucolítico, puede proporcionar ATP a la ATPasa (Jung et al., 2002).

1.6. El plegamiento de la TIM

El plegamiento es el proceso complejo mediante el cual una proteína adquiere su conformación nativa o funcional. Dicho proceso involucra múltiples transiciones entre un gran número de conformaciones, que se sabe que no ocurren de manera azarosa, sino que existen rutas preferenciales que sigue el péptido para llegar a su estructura nativa. En 1961, Anfinsen demostró que la información necesaria para que el plegamiento de una proteína se lleve a cabo, se encuentra codificada dentro de la cadena polipeptídica.

En algunas ocasiones, se presentan ciertos conformeros parcialmente plegados, los cuales no son productivos quedando atrapados en un nivel de energía libre menor (Dobson, 2003). Estos conformeros a menudo exponen residuos que en estado nativo normalmente se encuentran ocultos y que pueden interactuar con otros péptidos. Por ejemplo, los residuos hidrofóbicos al exponerse, pueden generar la interacción con otras proteínas en condiciones semejantes, generando así el fenómeno de coagregación (Gidalevitz et al 2006). En el espacio intracelular la concentración de proteínas es de cerca de 80-400 mg/mL (Rivas et al 2004, Senske, et al, 2016), por lo que se piensa que la interacción de múltiples proteínas es un fenómeno común.

Para comprender los fenómenos relacionados con el plegamiento de una proteína, es necesario poseer información detallada acerca de las propiedades estructurales y dinámicas del péptido. Una de las herramientas más poderosas de las que se dispone para obtener esta información, es la mutagenesis dirigida. Esta técnica nos permite evaluar el efecto que tiene una mutación dada sobre la estructura de la proteína y ver cómo ésta afecta la flexibilidad o rigidez de la cadena polipeptídica. Dichos cambios se reflejan en la variación de las propiedades de la proteína. De tal manera que, al comparar los cambios en los datos obtenidos entre una enzima silvestre con aquellos obtenidos al introducir los residuos de aminoácidos mutados, es posible identificar los aminoácidos importantes para algún fenómeno en específico, como el plegamiento.

La ruta de replegamiento y desplegado de las TIMs de diferentes organismos ha sido ampliamente estudiada (Zarate-Perez et al, 2009). En la tabla 2 se muestra un resumen de las rutas de desplegado de diferentes TIMs.

Tabla 2.- Despliegamiento de las TIMs de diferentes especies. N₂ representa al dímero nativo, A representa agregado, N₂* a un intermediario dimérico, M representa a monómero plegado y U al monómero desplegado. Modificado de Zárate-Pérez et al., 2009 y Romero-Romero et al., 2015.

Enzima	Código PDB	Desnaturalizante	Ruta de desplegamiento
<i>B. stearotermophilus</i>	1BTM	Gdn-HCl	N ₂ → 2U
<i>T. maritima</i>	1B9B	Gdn-HCl	N ₂ → A → 2U
<i>Rabbit b</i>	1R2R	Gdn-HCl	N ₂ → 2U
<i>P. falciparum</i>	1YDV	Urea, Gdn-HCl	N ₂ ⇌ 2U, N ₂ → N ₂ * → A → 2U
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1YPI	Gdn-HCl, urea, temperatura, presión	N ₂ ⇌ 2M ⇌ 2U, N ₂ ⇌ 2U, 2M ⇌ 2U, N ₂ ⇌ 2U
<i>L. mexicana</i>	1AMK	Gdn-HCl	N ₂ ⇌ 2U
<i>T. brucei</i>	1TPF	Gdn-HCl	N ₂ ⇌ N ₂ * ⇌ 2M ⇌ 2U ↓ ↓ A A
<i>T. cruzi</i>	1TCD	Gdn-HCl	N ₂ ⇌ N ₂ * ⇌ 2M ⇌ 2U
<i>Homo sapiens</i>	2JK2	Urea	N ₂ ⇌ 2U
<i>Deinococcus radiodurans</i>	4Y90	Calor	N ₂ ⇌ 2U
<i>Streptomyces coelicolor</i>	4Y9A	Calor	N ₂ ⇌ 2U
<i>Clostridium perfringens</i>	4Y8F	Calor	N ₂ ⇌ 2U

En cuanto al replegamiento, solamente se ha estudiado para algunas TIMs de diferentes especies (*Oryctolagus cuniculus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Deinococcus radiodurans*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium perfringens*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*). En los casos de las TIMs de conejo y levadura, se ha descrito como un proceso de dos estados, mientras que para las TIMs de los tripanosomas se ha descrito un mecanismo de tres estados. En todos los casos, el plegamiento del monómero es el proceso que ocurre con mayor rapidez (en alrededor de 46.8 s^{-1}).

1.7. Las Triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* (TcTIM y TbTIM)

Dada la importancia de la TIM en varios ámbitos, es importante poseer información detallada acerca de las propiedades estructurales y dinámicas de esta proteína, para comprender fenómenos particulares. Con el fin de encontrar zonas importantes dentro de sus secuencias relacionadas con alguna función específica que nos permita, en un futuro, generar algún compuesto que la inhiba o la active. Por ejemplo, la generación de algún inhibidor especie específico entre enzimas homólogas, ha sido uno de los objetivos principales del trabajo en nuestro grupo de investigación (Gómez-Puyou et al., 1995; Maldonado et al., 1998; Garza-Ramos 1998; Pérez-Montfort et al., 1999; García-Torres et al., 2011; Álvarez et al., 2015).

Hemos trabajado con las triosafosfato isomerasas de dos parásitos sanguíneos *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. La familia *Trypanosomatidae*, se encuentra compuesta por parásitos eucariontes unicelulares flagelados que pertenecen al orden *Kinetoplastida*, capaces de infectar a una amplia variedad de huéspedes. Los tripanosomatidos de mayor importancia pública son: A) Leishmanias, causantes de enfermedades como la leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea B) Los tripanosomas africanos (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*) causantes de la enfermedad del sueño en humanos y enfermedades del ganado (causando fuertes pérdidas económicas) y C) *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (Dietmar 2014).

TcTIM y TbTIM tienen un 73% de identidad en sus secuencias de aminoácidos, 82% de identidad entre sus residuos de interfase y, en total, sólo poseen 65 diferencias. Ambas enzimas poseen propiedades catalíticas similares y sus estructuras tridimensionales varían muy poco. La sobreposición de sus estructuras cristalográficas posee un RMSD de 0.96 \AA (PDBs 1TCD y 5TIM).

En todas las TIMs el área de la intercara entre ambos dímeros es muy grande, existen 32 aminoácidos que forman la intercara (tabla 1). En el caso de TbTIM, la interfase tiene un área de 1522 y 1533 Å² y para TcTIM de 1476 y 1491 Å², para los monómeros A y B respectivamente.

A pesar del alto grado de similitud entre TcTIM y TbTIM, éstas presentan diferencias significativas cuando se les enfrenta a agentes que modifican su actividad catalítica. Por ejemplo, la susceptibilidad ante la proteasa subtilisina es diferente. Luego de ser expuesta a la acción de la subtilisina, TbTIM conserva cerca del 50% de su actividad inicial, mientras que TcTIM pierde toda su actividad, sugiriendo una hidrólisis del 100% (Reyes-Vivas et al., 2002). En ensayos de termoestabilidad seguidos por dicroísmo circular a 222 nm, se observa que TbTIM es más sensible al aumento de temperatura que TcTIM, mientras que la temperatura de desnaturalización aparente de TcTIM es de 57.6 °C, la de TbTIM es de 53.0°C (García-Torres et al., 2006). En el caso de la renaturalización, luego de ser desnaturalizada con temperatura, TcTIM presenta reversibilidad pero TbTIM no. Cuando ambas enzimas son tratadas con agentes derivatizantes de grupos sulfhidrilo, como el metilmetano tiosulfonato (MMTS) o el ácido dinitrobenzoico (DTNB), su susceptibilidad es diferente. Cuando TcTIM se inactiva con MMTS, es 70 veces más sensible que TbTIM (Pérez-Montfort et al., 1999; Reyes-Vivas et al., 2001; García-Torres et al., 2011). Otra diferencia en el comportamiento, ocurre cuando ambas TIMs se exponen a agentes caotrópicos, como el clorhidrato de guanidina. La reactivación de TcTIM, luego de ser desnaturalizada por clorhidrato de guanidina, es más rápida y eficiente que la que presenta TbTIM (Zomosa-Signoret et al., 2003).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios de reactivación de la TIM

En 2003 Zomosa-Signoret y colaboradores, observaron que TbTIM y TcTIM presentaban diferentes patrones de desplegamiento-plegamiento, a pesar del alto grado de similitud estructural que poseen ambas proteínas. La reactivación a partir de monómeros desplegados con clorhidrato de guanidina, fue mucho más eficiente y rápida en TcTIM que en TbTIM. Mientras TcTIM alcanzaba un 80% de reactivación durante los primeros 10 minutos (y un 90% a los 45 min), TbTIM sólo lograba un 40% de reactivación a los 45 minutos. El mecanismo descrito para la reactivación de ambas enzimas, involucra una secuencia uni-bi-uni, en donde la primera reacción unimolecular consiste en el plegamiento de monómeros, seguida de una reacción bimolecular en la cual dos monómeros plegados se unen para formar al dímero inactivo. Finalmente, ocurren otros rearrreglos internos unimoleculares que conducen a la formación del dímero activo (figura 8).

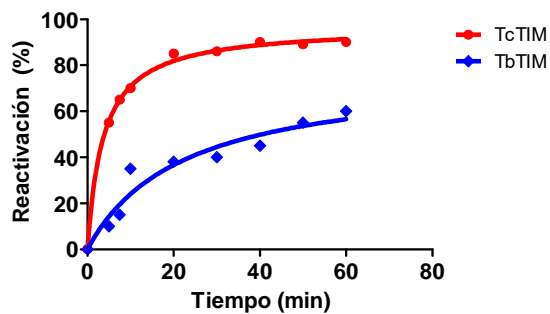


Figura 8.- Cinéticas de reactivación de TcTIM y TbTIM. Las enzimas fueron desnaturizadas a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con Gdn-HCl 6 M durante una hora a 25°C, transcurrido ese tiempo, las proteínas fueron diluidas hasta una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad recuperada, en donde el 100% lo representa la actividad de la enzima nativa incubada con la concentración residual de Gdn-HCl (60 mM) (Modificado de Zomosa-Signoret et al., 2003)

Con el fin de explorar y tratar de encontrar aquellos aminoácidos funcionalmente relevantes que pudiesen proporcionarnos una explicación precisa de las diferencias expuestas y, en especial respecto las diferencias en la reactivación de TcTIM y TbTIM, se realizaron mutantes quiméricas entre ambas TIMs. Para su estudio en el laboratorio, la TIM se dividió en 8 regiones. Cada región se encuentra formada por una hoja β plegada, una α hélice y las asas que respectivamente las unen (figura 9).

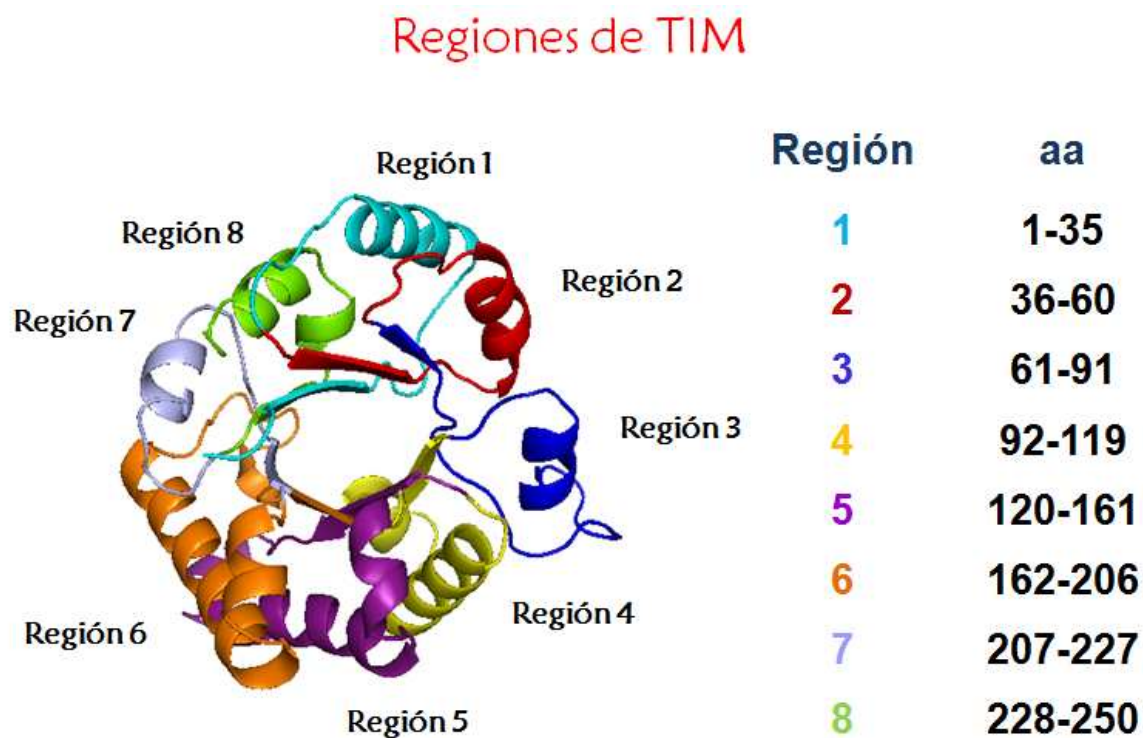


Figura 9.-División esquemática de la triosafosfato isomerasa. En la tabla se muestra los aminoácidos que forman a cada una de las regiones y el esquema muestra la disposición de cada una de éstas en el monómero.

Existen en total 65 diferencias entre ambas secuencias de aminoácidos. El mayor número de diferencias entre ambas secuencias, se localizan en las regiones 1, 5 y 6 (Tabla 3, sombreadas en verde claro). La primera estrategia utilizada para el diseño y construcción de las mutantes fue realizar la conversión gradual de una TcTIM en una TbTIM, aumentando el número de regiones de TbTIM y disminuyendo las de TcTIM. En total se generaron 6 quimeras (Tabla 4).

Tabla 3.-Diferencias entre las secuencias de las triosafosfato isomerasas de *T. brucei* y *T. cruzi*.

Región	Aminoácidos	# de diferencias	Sustituciones conservativas	Sustituciones semiconservativas	Sustituciones sin homología
1	1-35	13	8	1	4
2	36-60	7	4	2	1
3	61-91	8	5	1	2
4	92-119	5	2	-	3
5	120-161	15	8	3	4
6	162-206	10	5	2	3
7	207-227	3	-	2	1
8	228-250	4	4	-	-
Total		65	36	11	18

Todas las mutantes se caracterizaron cinéticamente y, en general, no se observó gran variación en su actividad catalítica; sólo la quimera TcTIM1-6;TbTIM 7-8 parece ser un poco menos eficiente (Tabla 5). Se han obtenido cristales de algunas de las mutantes y, en la resolución de su estructura, no se han encontrado diferencias significativas entre la estructura de éstas y las enzimas silvestres (Torres-Larios A., datos no publicados).

Tabla 4.-Quimeras construidas a partir de las triosafosfato isomerasas de TbTIM y TcTIM.
Tomado y modificado de García-Torres I., (2012).

Quimera	Regiones de TcTIM	Regiones de TbTIM
TcTIM1-6;TbTIM7-8	1-6	7-8
TcTIM1-5;TbTIM6-8	1-5	6-8
TcTIM1-4;TbTIM 5-8	1-4	5-8
TcTIM1-3;TbTIM4-8	1-3	4-8
TcTIM1-2;TbTIM3-8	1-2	3-8
TcTIM1;TbTIM2-8	1	2-8

Tabla 5.- Parámetros cinéticos de TcTIM y TbTIM silvestres y de las seis quimeras iniciales.
Tomado y modificado de García-Torres I., (2012).

Enzima	K_m (G3P mM)	$k_{cat} \times 10^5$ (min ⁻¹)	$k_{cat}/K_m \times 10^7$	(M ⁻¹ s ⁻¹).
TbTIM	0.45	3.1	1.15	
TcTIM	0.43	2.7	1.05	
TcTIM1-6;TbTIM7-8	0.13	0.956	1.23	
TcTIM1-5;TbTIM6-8	0.38	1.55	0.68	
TcTIM1-4;TbTIM 5-8	0.63	3.32	0.87	
TcTIM1-3;TbTIM4-8	0.58	3.31	0.95	
TcTIM1-2;TbTIM3-8	0.57	3.28	0.92	
TcTIM1;TbTIM2-8	0.48	3.17	1.10	

Al realizar los ensayos de reactivación de las enzimas quiméricas de las regiones de TcTIM y TbTIM, la mayoría mostraron un comportamiento intermedio a los extremos observados en las dos enzimas silvestres (figura 10). Sin embargo, cuando se realizó el ensayo con la quimera TcTIM1;TbTIM2-8, la reactivación de esta fue muy deficiente (figura 10, triángulos verdes) y muy lenta (alrededor de sólo el 5%), en contraste con la quimera TcTIM1,2;TbTIM2-8, la cual se reactivó de manera rápida y eficiente, igual que TcTIM (figura 10 cuadros negros). Los resultados anteriores mostraron que, los contactos entre ambas regiones (1 y 2) estaban relacionados con este cambio de comportamiento en la reactivación. En ambas regiones existen sólo 20 aminoácidos diferentes (figura 11). Con el fin de descartar o averiguar el papel de estas dos regiones en la reactivación, se generó un nuevo grupo de enzimas quiméricas con todas las posibles combinaciones de las regiones 1 y 2.

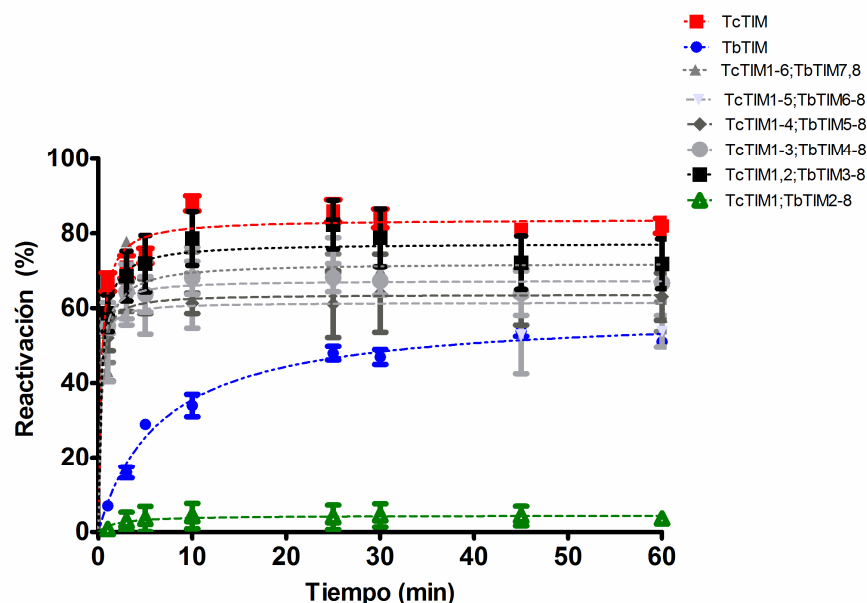


Figura 10.- Cinéticas de reactivación de las enzimas quiméricas de TcTIM y TbTIM. Las enzimas fueron desnaturalizadas a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con Gdn-HCl 6 M durante una hora a 25°C; transcurrido ese tiempo, las proteínas fueron diluidas hasta una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad recuperada, en donde el 100% lo representa la actividad de la enzima nativa incubada con la concentración residual de Gdn-HCl (60 mM) Tomado y modificado de Viguera Meneses G, (2010).

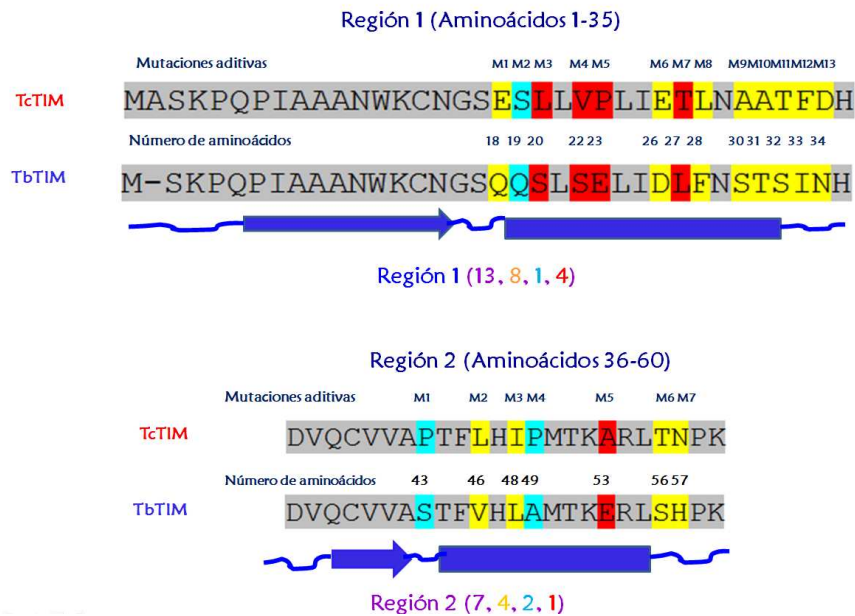


Figura 11.- Diferencias entre los residuos en las regiones 1 y 2 de TbTIM y TcTIM. En amarillo se resaltan las diferencias conservativas (tamaño y polaridad), en cian las diferencias semiconservativas (polaridad) y en rojo los aminoácidos sin ninguna característica similar, en azul se esquematiza la región de estructura secundaria correspondiente (flecha: hoja beta, cilindro: alfa hélice).

En total, se produjeron seis enzimas quiméricas de las regiones 1 y 2 y la reactivación de éstas se muestra en la figura 12. Para estudiar el efecto de la región 1, se construyeron las quimeras TcTIM1; TbTIM2-8 y TcTIM2-8;TbTIM1. La quimera TcTIM1;TbTIM2-8 se reactivó poco y de manera lenta, mientras que su contraparte se reactivó de manera rápida, eficiente e inclusive mejor que la enzima silvestre (TcTIM). Por otro lado, para estudiar el efecto de la región 2, se hicieron las quimeras TcTIM2;TbTIM1,3-8 y TcTIM1,3-8;TbTIM2. En estas mutantes, se observaron dos tipos de comportamiento, el primero en donde la enzima TcTIM2;TbTIM1,3-8 se reactiva rápidamente tal como lo hace TcTIM, pero la eficiencia que esta mutante alcanza es similar al de TbTIM; el segundo comportamiento observado fue el de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2, la cual no se reactivó.

Por su parte, se probó la combinatoria de ambas regiones y la mutante TcTIM1,2;TbTIM3-8, se comportó de manera similar a TcTIM, mientras que la mutante TcTIM3-8;TbTIM1,2 se reactivó un

poco menos que TbTIM, pero de igual manera se reactivó lentamente. Cabe destacar que la mutante TcTIM3-8;TbTIM1,2, resultó ser inestable y tendió a disociarse con el tiempo a la concentración utilizada en el ensayo; por tal razón y con fines comparativos, esta mutante aparece en la figura 12 utilizando para su normalización un control sin incubar durante una hora a 25°.

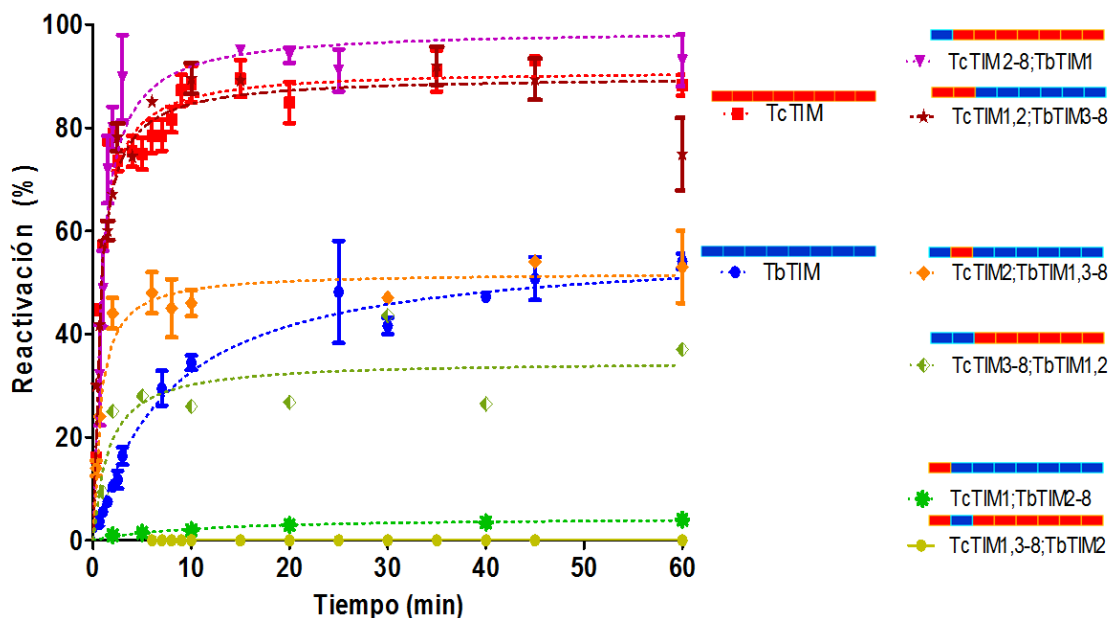


Figura 12.- Cinéticas de reactivación de las enzimas quiméricas de las regiones 1 y 2. Las barras al costado derecho del gráfico esquematizan las regiones de TcTIM y de TbTIM en cada enzima. En azul TbTIM, en rojo TcTIM. Las enzimas se desnaturizaron a una concentración de 500 µg/mL con Gdn-HCl 6 M durante una hora a 25°C; transcurrido ese tiempo, se diluyeron las proteínas hasta que tuvieran una concentración de 5 µg/mL. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad recuperada, en donde el 100% lo representa la actividad de la enzima nativa incubada con la concentración residual de Gdn-HCl (60 mM). Tomado y modificado de Rodríguez Bolaños M, (2013).

Existen combinaciones de ambas regiones cuyas contribuciones a la reactivación la favorecen o la perjudican (figura 12). La combinatoria que conduce a una reactivación poco eficiente, lenta o inexistente, es la región 1 de TcTIM y la región 2 de TbTIM. Dicha combinación se encuentra en las

mutantes TcTIM1;TbTIM2-8 (que alcanza un 5% en reactivación, asterisco verde) y la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2 (que no se reactiva, punto verde olivo). La combinatoria que favorece la reactivación es la región 1 de TbTIM y la región 2 de TcTIM en cuyo caso, la reactivación ocurre de manera rápida y eficiente como en las mutantes TcTIM2-8;TbTIM1 (triángulo morado) y TcTIM2;TbTIM1,3-8 (rombo anaranjado).

La mutagenesis nos permite evaluar el efecto de cada uno de los residuos sobre las propiedades de la proteína. De tal manera que al comparar los cambios en los datos obtenidos con una enzima silvestre, con aquellos obtenidos al introducir los residuos de aminoácidos mutados, es posible identificar los aminoácidos importantes.

El presente trabajo tuvo como fin continuar con la búsqueda de los aminoácidos importantes para el replegamiento de TcTIM y TbTIM en las regiones 1 y 2, así como identificar cuáles de estos residuos son los causantes de la diferencia de comportamiento entre estas enzimas. Para ello, se decidió realizar un nuevo grupo de mutantes aditivas para conocer la contribución de cada uno de los aminoácidos en las regiones 1 y 2.

3. HIPÓTESIS

Entre las 20 diferencias en las regiones 1 y 2, se encuentran los aminoácidos responsables del distinto comportamiento en la reactivación de los monómeros desplegados por clorhidrato de guanidina entre las triosafosfato isomerasas de *T. cruzi* y *T. brucei*. *Entonces la mutación de estos residuos nos permitirá elucidar aquellas posiciones importantes en la reactivación de las enzimas luego de ser desnaturalizadas con clorhidrato de guanidina.*

4. OBJETIVOS

Objetivo general

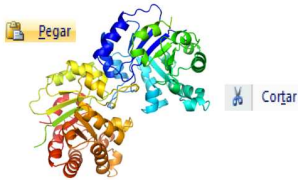
Buscar en las regiones 1 y 2, los aminoácidos responsables de la diferencia de comportamiento en el replegamiento de TcTIM y TbTIM después de ser tratadas con clorhidrato de guanidina.

Objetivos particulares

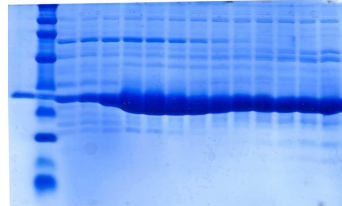
- Obtener grupos de mutantes aditivas con los residuos correspondientes con el fin de determinar el papel de cada residuo en la reactivación.
- Purificar dichas quimeras y realizar su caracterización cinética.
- Generar proteínas con múltiples mutaciones mediante mutagénesis dirigida para realizar la interconversión del comportamiento en la reactivación de una enzima en otra.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Diseñar y hacer mutantes aditivas de las regiones 1 y 2 de las triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*



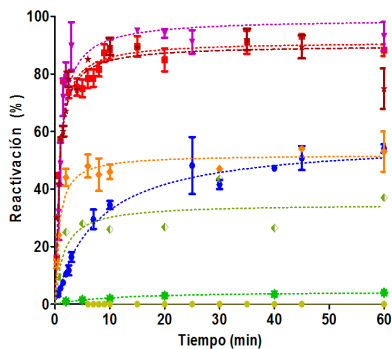
Realizar su clonación, transformación en células de sobreexpresión BL21-Codon Plus (DE3) RIL



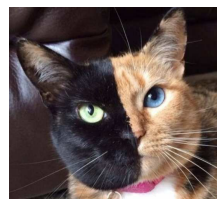
Purificación mediante cromatografía de desarrollo rápido (FPLC)



Realizar su cinética de reactivación



Según los resultados obtenidos, producción de proteínas mutantes múltiples



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Construcción y clonación de las mutantes de la triosa fosfato isomerasa

Las secuencias de DNA de TbTIM y TcTIM fueron tomadas de la base de datos del NCBI (X03921 y U53867, respectivamente) para el diseño de las proteínas quiméricas.

La nomenclatura utilizada para nombrar a las mutantes quiméricas, consistió en nombrar las regiones que poseen cada una de las proteínas progenitoras, por ejemplo, la mutante TcTIM1;TbTIM2-8, posee sólo la región uno de TcTIM y el resto de TbTIM, mientras que la nomenclatura utilizada para nombrar a las mutantes aditivas fue: RXMX; en donde R hace referencia a la región en donde se encuentra la mutación y M el número de mutaciones aditivas que contiene. Por tanto, la mutante R1M1 se encuentra en la región 1 y es la mutación 1, mientras que la R2M5, la mutación se encuentra en la región 2 y tiene 5 mutaciones aditivas (Tablas 6 y 7).

Tabla 6.-Diagrama de la composición de las mutantes aditivas de la región 1 de TcTIM y TbTIM.

Las mutantes de la región 1 se construyeron utilizando a la quimera TcTIM1;TbTIM2-8 como templado y las mutaciones se introdujeron de manera aditiva, utilizando como templado a la mutante antecedente. El diagrama de la derecha representa a los 13 aminoácidos diferentes en la región 1; en rojo se indican los residuos de TcTIM y en azul los de TbTIM. Los asteriscos indican mutantes con mutaciones no aditivas.

Mutante	Número de mutaciones aditivas en la región 1	Regiones de TbTIM	Esquema de los aminoácidos diferentes en la región 1
R1M1	1	2-8	
R1M2	2	2-8	
R1M3	3	2-8	
R1M4	4	2-8	
R1M5	5	2-8	
R1M6	6	2-8	
R1M7	7	2-8	
R1M8	8	2-8	
R1M9	9	2-8	
R1M10	10	2-8	
R1M11	11	2-8	
R1M12	12	2-8	
R1M13	13	2-8	
TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1 Q18E, S32T,I33F, N34D	4 *	1,3-8	
TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1Q18E,E23P,D26E,S32T,I33F, N34D	6 *	1,3-8	

Tabla 7.-Diagrama de la composición de las mutantes aditivas de la región 2 TcTIM y TbTIM. Las mutantes de la región 2, fueron hechas utilizando a la quimera TcTIM1,3-8;TbTIM2 como templado y las mutaciones se introdujeron de manera aditiva, utilizando como templado a la mutante antecedente. El diagrama de la derecha representa a los 7 aminoácidos diferentes en la región 2 de TcTIM (rojo) y TbTIM (azul).

Mutante	Número de mutaciones aditivas en la región 2	Regiones de TcTIM	Esquema de los aminoácidos diferentes en la región 2
R2M1	1	1,3-8	
R2M2	2	1,3-8	
R2M3	3	1,3-8	
R2M4	4	1,3-8	
R2M5	5	1,3-8	
R2M6	6	1,3-8	
R2M7	7	1,3-8	

Los genes con las mutaciones aditivas de las regiones 1 y 2 se construyeron mediante mutagénesis dirigida (Stratagene), utilizando a la Vent DNA polimerasa (New England BioLabs). Los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis se muestran en la tabla 8. Para la mutagénesis de la región 1 se utilizó como templado en DNA de la quimera TcTIM1;TbTIM2-8, mientras que para la mutagénesis de la región 2 se utilizó como templado el DNA de la quimera TcTIM1,3-8;TbTIM2.

Después de realizar la primer mutación sobre la quimera TcTIM1;TbTIM2-8, es decir, la mutante R1M1, se utilizó el DNA de esta mutante como templado para introducir la nueva mutación. De igual manera, se continuó utilizando el DNA de la mutación anterior como templado para el resto de las mutaciones. Para la región 2, se procedió de manera similar utilizando como templado para la primer mutación el DNA de la quimera TcTIM1,3-8;TbTIM2.

Una diferencia adicional que presentan TcTIM y TbTIM, es que TcTIM tiene una alanina extra en la posición 2 que TbTIM no tiene. Con el fin de explorar si esta diferencia afectaba la reactivación, se hizo la mutante R1M13ΔAla2.

Todas las quimeras y mutantes se clonaron en el vector pET-3a (Novagen,WI) con los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*. La mezcla de reacción utilizada para en la mutagenesis se muestra en la tabla 9 y las condiciones de amplificación se muestran en la figura 13.

Tabla 8.- Oligonucleótidos utilizados para las mutagénesis aditivas y puntuales de las regiones 1 y 2. En los casos de mutagénesis aditiva, se utilizó como DNA templado aquel con la mutación inmediata anterior.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDO FW	OLIGONUCLEÓTIDO RV
R1M1	5' TGC AAC GGC TCC CAG AGT TTG CTT GTA 3'	5' TAC AAG CAA ACT CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M2	5' TGC AAC GGC TCC CAG CAG TTG CTT GTA CCA 3'	5' TGG TAC AAG CAA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M3	5' TGC AAC GGC TCC CAG CAG TCT CTT GTA CCA 3'	5' TGG TAC AAG AGA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M4	5' TGC AAC GGC TCC CAG CAG TCT TTG TCT GAG CTC ATC GAT ACG CTC 3'	5' GAG CGT ATC GAT GAG CTC AGA CAA AGA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M5	5' GAGCGTATCGATGAGCTCAGACAAAGACTGCTGG GAGCCGTTGCA3'	5' GAG CGT ATC GAT GAG CTC AGA CAA AGACTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M6	5' TCT TTG TCT GAG CTC ATT GAT ACG CTC 3'	5' GAG CGT ATC AAT GAG CTC AGA CAA AGA 3'
R1M7	5' GAG CTC ATT GAT CTG CTC AAT GCA GCG 3'	5' CGC TGC ATT GAG CAG ATC AAT GAG CTC 3'
R1M8	5' CTC ATT GAT CTG TTT AAT GCA GCG ACT 3'	5' AGT CGC TGC ATT AAA CAG ATC AAT GAG 3'
R1M9	5' GAT CTG TTT AAT TCC GCG ACT TTT GAT 3'	5' ATC AAA AGT CGC GGA ATT AAA CAG ATC 3'
R1M10	5' GAT CTG TTT AAC TCC ACA ACT TTT GAT CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG ATC AAA AGT TGT GGA GTT AAA CAG ATC 3'
R1M11	5' GAT CTG TTT AAC TCC ACC AGC TTT GAT CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG ATC AAA GCT GGT GGA GTT AAA CAG ATC 3'
R1M12	5' AAC TCC ACA AGC ATC GAT CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG ATC GAT GCT TGT GGA GTT 3'
R1M13	5' AAC TCC ACA AGC ATC AAC CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG GTT GAT GCT TGT GGA GTT 3'
R1M13ΔAla2	5' CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG TCC AAG CCA CAA CCC ATC GC 3'	5' GCG ATG GGT TGT GGC TTG GAC ATA TGT ATA TCT CCT TCT TAA AG 3'
TcTIM2;TbTIM1,3-8	5' TTT AAC TCC ACA ACC TTT GAT CAC GAC GTG CAA 3'	5' TTG CAC GTC GTG ATC AAA GGT TGT GGA GTT AAA 3'
R1Q18E,E23P,D26E,S32T,I33F,N34D	5' TTT AAC TCC ACA ACC TTT GAT CAC GAC GTG CAA 3'	5' TTG CAC GTC GTG ATC AAA GGT TGT GGA GTT AAA 3'
TcTIM2;TbTIM1,3-8 R1Q18E, S32T,I33F,N34D	5' GTG CAA TGC GTA GTG GCC CCG ACC TTT GTT CAC CTT GCC ATG 3'	5' CAT GGC AAG GTG AAC AAA GGT CGG GGC CAC TAC GCA TTG CAC 3'
R2M1	5' CAA TGC GTA GTG GCC CCG ACC TTT CTG CAC CTT GCC ATG ACC 3'	5' GGT CAT GGC AAG GTG CAG AAA GGT CGG GGC CAC TAC GCA TTG 3'
R2M2	5' TGC GTA GTG GCC CCG ACC TTT CTG CAC ATC GCC ATG ACC AAG 3'	5' CTT GGT CAT GGC GAT GTG CAG AAA GGT CGG GGC CAC TAC GCA 3'
R2M3	5' GTA GTG GCC CCG ACC TTT CTG CAC ATC CCG ATG ACC AAG GAG 3'	5' CTC CTT GGT CAT CGG GAT GTG CAG AAA GGT CGG GGC CAC TAC 3'
R2M4	5' CAC ATC CCA ATG ACG AAG GCG CGT CTT TCA CAC CCC AAA 3'	5' TTT GGG GTG TGA AAG ACG CGC CTT CGT CAT TGG GAT GTG 3'
R2M5	5' ACG AAG GCG AGG CTC ACC CAC CCC AAA TTT GTG 3'	5' CAC AAA TTT GGG GTG GGT GAG CCT CGC CTT CGT 3'
R2M6	5' ACG AAG GAG CGT CTT ACC AAC CCC AAA TTT GTG ATT GCG 3'	5' AAT CAC AAA TTT GGG GTT GGT AAG ACG CGC CTT CGT 3'
R2M7		

Tabla 9.- Mezcla de reacción para la producción de mutaciones. En los casos de mutagénesis aditiva, se utilizó como DNA templado aquel con la mutación inmediata anterior.

Reactivo	Volumen (μL)
DNA	1
Oligonucleótido Fw [100ng / μL]	2
Oligonucleótido Rv [100ng / μL]	2
Solución de nucleótidos trifosfatados 10 mM (dNTPs)	1
Vent DNA polimerasa	1
Amortiguador de reacción estándar Thermopol (10x)	5
Agua	38

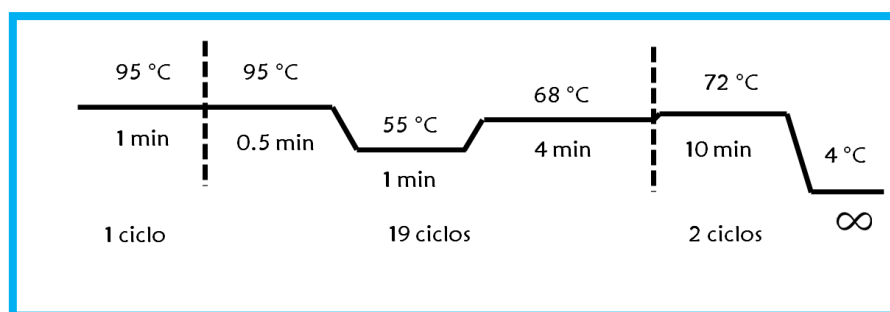


Figura 13.- Condiciones de amplificación para la reacción de la polimerasa en cadena, utilizadas para realizar la mutagénesis.

Una vez realizada la amplificación para introducir la mutación deseada, se realizó la digestión del DNA parental o del templado con la enzima de restricción *Dpn* I (New England Biolabs); la digestión se hizo a 37° C durante 2 horas.

Posteriormente, el producto de la digestión se transformó en células ultracompetentes de *E. coli* XL-gold o *E. coli* DH5 α , las cuales se sembraron en cajas de medio LB suplementadas con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron durante 18 h a 37°C. De las colonias resultantes se eligieron cinco colonias al azar para realizar subcultivos de cada una de ellas en medio líquido de LB adicionado con ampicilina (100 μ g/mL). De igual manera, se incubaron a 37 °C por 18 h y se extrajo el DNA con el kit Wizard®Plus SV minipreps DNA purification system de Promega. Los DNAs resultantes fueron secuenciados para asegurar la correcta inserción de la mutación. Una vez confirmada la mutación, el DNA portador de la mutación de interés se volvió a transformar en células ultracompetentes de *E. coli* BL21-codon plus (DE3) RIL y se tomaron muestras para su conservación.

6.2. Ensayos de sobreexpresión de las mutantes de TcTIM y TbTIM

Para establecer las condiciones óptimas de sobreexpresión de proteína recombinante, se realizó un precultivo en medio líquido LB (100 mL) adicionado con ampicilina (100 μ g/mL) y cloranfenicol (30 μ g/mL), el cual se incubó a 37 °C hasta una densidad óptica de $A_{600nm} = 0.6$. Una vez alcanzada esta densidad, se tomó una muestra de 100 μ L y se guardó a 4°C. Enseguida, al cultivo se le añadió isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4 mM para inducir la producción de proteína y se dividió en tres partes. Cada parte se incubó a una temperatura distinta, la primer parte se incubó a 20°C, la segunda a 30°C y la tercera a 37°C. Se tomaron muestras a las 3 y 16 horas de incubación y se mantuvieron a 4°C para su posterior análisis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 %, siguiendo la metodología descrita por Schägger (Schägger., 1994).

6.3. Purificación de las mutantes de TcTIM-TbTIM

Luego de encontrar las condiciones adecuadas para la expresión de cada proteína se crecieron células bacterianas con el plásmido correspondiente a cada mutación en medio Luria-Bertani

suplementado con ampicilina a 100 µg/mL y cloranfenicol a 30 µg/mL. Se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6 y luego se les agregó IPTG, a una concentración final de 0.4 mM, para inducir la producción de las proteínas. Los cultivos se incubaron durante 12 horas más a 30 °C antes de cosechar las células.

En el caso de la mutante R2M1, esta fue transformada en células de *E. coli* Origami B (DE3). De igual manera, las bacterias se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 34 µg/mL, tetraciclina 12.5 µg/mL y kanamicina 15 µg/mL. Las células se incubaron a 37 °C hasta una $OD_{600\text{ nm}}=0.6$ y se indujeron con IPTG 0.5 mM, y luego el cultivo se incubó durante 24 horas más a 15 °C.

Después de 12 horas de inducción, las bacterias se centrifugaron por 15 min a 6400 g a 4 °C. Tras la cosecha de células, estas se resuspendieron en 30 mL de amortiguador de lisis (MES 100 mM, DTT 1mM, EDTA 0.5 mM, PMSF 0.2 mM, NaCl 300 mM, pH 6.3). Cada suspensión se sonicó durante 1 minuto, con descansos de 2 minutos en hielo; en total, se realizaron 10 ciclos a una potencia de 5 W. Posteriormente, esta misma suspensión se centrifugó durante 60 minutos a 203 500 g a 4°C El sobrenadante de cada una de las mutantes se diluyó hasta obtener una concentración final de NaCl de 20 mM y luego estos sobrenadantes se cargaron en una columna Sp Sepharose Fastflow, previamente equilibrada con el amortiguador MES 50 mM pH 6.3. La elución de la proteína se realizó utilizando un gradiente con el amortiguador NaCl 500 mM, MES 50 mM pH 6.3. A las fracciones enriquecidas con la TIM se les agregó paulatinamente y, en agitación, sulfato de amonio hasta alcanzar un 70% (w/v) de saturación. Después de 16 horas en agitación, la proteína se centrifugó a 35000 g por 15 min a 4°C . La pastilla resultante, se resuspendió en 3 mL de amortiguador trietanolamina (TEA) 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4, y se le agregó la cantidad suficiente de sulfato de amonio para llegar a una concentración final de 2.2 M. La proteína se cargó en la columna de interacción hidrofóbica Butyl Toyopearl, previamente equilibrada con amortiguador TEA 100 mM, EDTA 10 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M. La elución de la proteína se realizó nuevamente con un gradiente de 2 M a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las fracciones enriquecidas con la TIM se colectaron y se concentraron. La determinación de la cantidad de proteína se hizo midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar $\epsilon=34,950\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La purificación de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2 (S43P), se realizó de igual manera que el resto de las mutantes, hasta la cromatografía de intercambio catiónico y, posteriormente, se concentró y cargó en la columna de filtración en gel superdex 75 (GE), previamente equilibrada con el amortiguador TEA 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4. Las fracciones enriquecidas con la TIM, se colectaron, concentraron y se guardaron para su posterior uso.

6.4. Determinación de la actividad catalítica y caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM

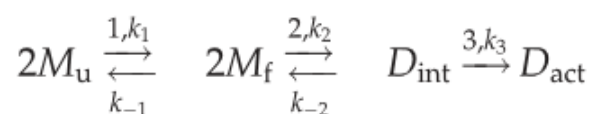
La actividad enzimática se midió siguiendo la interconversión de gliceraldehído 3-fosfato (D,L-GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a 25 ° C mediante un ensayo acoplado con la glicerolfosfato deshidrogenasa (α GDH). La actividad enzimática se siguió con los cambios en la absorbancia a 340 nm debidos a la oxidación del NADH. La mezcla de reacción contenía trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, gliceraldehído 3 fosfato 1 mM, NADH 0.2 mM y glicerolfosfato deshidrogenasa 20 μ g/mL; la reacción se midió con 5 ng/mL de proteína. Para obtener los parámetros cinéticos de las enzimas, la concentración de GAP se varió desde 0.05 a 2 mM y los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten.

6.5. Desnaturalización y replegamiento

La desnaturalización se hizo incubando a las enzimas a 25 °C por una hora a una concentración de 0.5 mg/mL en el amortiguador TEA 100 mM, EDTA 10 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM y Gdn HCl 6 M a pH 7.4. Para llevar a cabo la reactivación, se tomó una alícuota de la mezcla anterior y se diluyó 100 veces en amortiguador TEA 100 mM, EDTA 10 mM y DTT 1 mM a pH 7.4. En este punto, la concentración de la proteína era de 5 μ g/mL. Tras la dilución de las proteínas, se tomaron muestras de estas a diferentes tiempos y se les midió actividad (el volumen final de la mezcla de reacción fue de 1 mL), de esta forma se midió la reactivación de las enzimas. En todos los casos, la cantidad de Gdn-HCl residual tras la dilución de las enzimas fue de 60 mM. Para asegurar que esta cantidad de Gdn-HCl no afectaba la reactivación de las enzimas, se incubó a la enzima con Gdn-HCl 60 mM durante el tiempo que dura el experimento. La actividad de la enzima control nunca se afectó. La actividad se midió a 25 °C. En el caso de la reactivación a diferentes concentraciones, se probaron a las enzimas en un intervalo de 10-500 nM de monómero.

6.6. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las quimeras de las regiones 1 y 2

Las constantes de velocidad de la reactivación de las TIMs, se obtuvieron realizando los ensayos de reactivación a diferentes concentraciones. A partir de estos datos, se calcularon las constantes de dos maneras: la primera de ellas es como lo reporta (Zomosa-Signoret *et al.*, 2003), considerando que la secuencia de reactivación es:



donde M_u representa al monómero desplegado, M_f al monómero plegado, D_{int} al dímero intermediario y D_{act} al dímero activo.

A partir de los gráficos de reactivación a diferentes concentraciones contra tiempo, se hizo un ajuste exponencial para obtener las constantes de pseudoprimer orden (ecuación 1), que describen la formación de los dímeros a diferentes concentraciones de enzima.

$$Y = y_0 + A_1 e^{kt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde “t” representa el tiempo, “k” la constante observada o constante de pseudoprimer orden, “Y” la actividad catalítica, “ y_0 ” representa un valor de la actividad a tiempo infinito y “ A_1 ” representa la amplitud de la curva (actividad) a un tiempo “t”. Posteriormente, se graficaron los valores calculados para las constantes observadas contra la concentración de proteína para obtener las constantes de segundo orden, o constantes asociadas a la formación del dímero activo. Las concentraciones de monómero fueron de 10 a 500 nM.

La segunda forma de calcular las constantes de velocidad y, en especial para las mutantes de región 2, fue mediante la utilización del software Dynafit de Biokin. Para ello, se construyeron y

probaron diferentes modelos para calcular las constantes de velocidad asociadas a replegamiento. Finalmente, el modelo utilizado se describe en la figura 14. Las constantes se obtuvieron a partir de los mejores ajustes de los datos de reactivación a diferentes concentraciones para cada una de las enzimas.

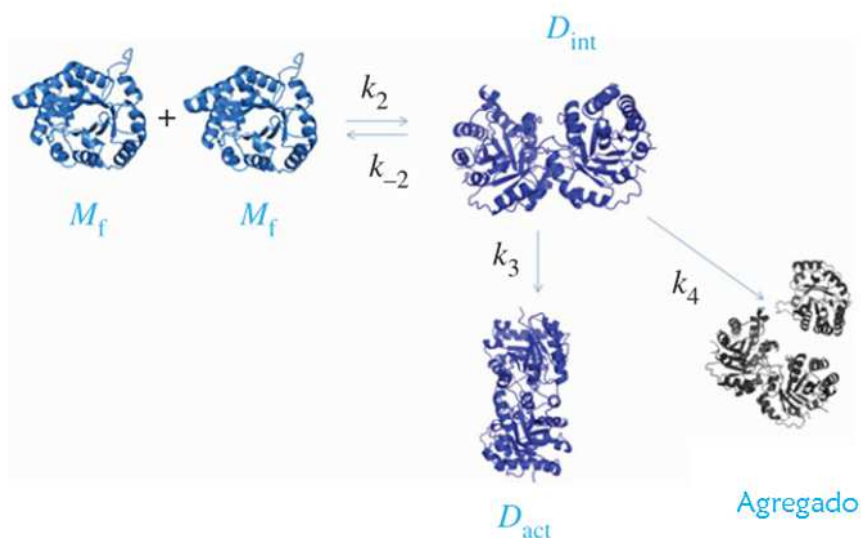


Figura 14.- Modelo generado para el programa Dynafit, utilizado para el cálculo de las constantes de velocidad. M_f representa al monómero plegado, D_{int} al dímero intermediario, D_{act} al dímero nativo y Agregado representa a los agregados.

6.7. Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular se obtuvo en el espectropolarímetro AVIV 62 HDS (Lakewood, NJ). La celda utilizada fue de cuarzo con una longitud de paso de 0.1 mm. El experimento se realizó a 25° C y el barrido se hizo de 260 a 190 nm. Las enzimas se dializaron en amortiguador de fosfatos, pH 7.4 y, posteriormente, se filtraron en membranas con tamaño de poro de 0.45 μm . Los espectros obtenidos muestran el promedio de dos preparaciones independientes con tres replicas. La concentración de proteína utilizada para cada enzima fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.8. Análisis estructural de los aminoácidos relevantes en la región 1 y 2

Con el fin de tratar de comprender el porqué estas mutaciones generan cambios tan importantes en la reactivación, se realizó una búsqueda de los contactos de los aminoácidos mutados a una distancia de 4 Å. Para ello, se utilizaron las coordenadas cristalográficas de las enzimas silvestres 5TIM (TbTIM) y 1TCD (TcTIM).

7. Resultados

7.1. Construcción y clonación de las mutantes de la triosafosfato isomerasa

La producción de las mutantes se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez obtenidas todas las construcciones de las quimeras y de las mutantes de la región 1 y 2, se realizaron los cultivos pertinentes para secuenciar el DNA y corroborar la incorporación adecuada de las mutaciones. En todos los casos la incorporación de las mutaciones fue exitosa.

7.2. Ensayos de sobreexpresión

En general, las quimeras no presentaron problemas con su sobreexpresión. Al variar algunas condiciones, fue posible obtener proteína suficiente para realizar los ensayos; sin embargo, se observó que la mutante R2M1 presentó un excelente rendimiento al sobreexpresarla en cualquier condición. Sin embargo, en todos los casos esta mutante tendía a formar cuerpos de inclusión dejando una cantidad muy pequeña en la parte soluble. En la tabla 10 se muestran las condiciones de sobreexpresión utilizadas para cada una de las proteínas.

Tabla 10.- Condiciones de sobreexpresión de las mutantes aditivas de las regiones 1 y 2.

Mutante	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (horas)	[IPTG] mM	Rendimiento (mg/L de cultivo)
TcTIM	37	16	0.4	30 a 40
TbTIM	37	16	1	30
TcTIM1;TbTIM2-8	37	16	1	10
R1M1	30	16	0.4	5
R1M2	37 o 30	16	0.4	2.5
R1M3	30	16	0.4	66

R1M4	20	16	1	1.8
R1M5	37 o 30	16	0.4	5
R1M6	37 o 30	16	0.4	6
R1M7	37 o 30	16	0.4	15
R1M8	37 o 30	16	0.4	6
R1M9	37 o 30	16	0.4	10
R1M10	37 o 30	16	0.4	20
R1M11	37 o 30	16	0.4	15
R1M12	37 o 30	16	0.4	10
R1M13	37 o 30	16	0.4	8
R1M13ΔALA2	37 o 30	16	0.4	10
TcTIM2;TbTIM1,3-8 (R1Q18E,E23P,D26E,S32T,I33F,N34D)	37 o 30	16	0.4	20
TcTIM2;TbTIM1,3-8 (R1Q18E,S32T,I33F,N34D)	37 o 30	16	0.4	15
TcTIM1,3-8;TbTIM2	10	24	0.1	0.2*
R2M1	10	24	0.1	0.25*
R2M2	30	16	0.4	5
R2M3	30	16	0.4	5
R2M4	30	16	0.4	10
R2M5	30	16	0.4	15
R2M6	30	16	0.4	10
R2M7	30	16	0.4	11

* Proteína soluble obtenida a partir de 10 L de cultivo.

7.3. Purificación de las mutantes de TcTIM y TbTIM

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó tal como se describió previamente. En un principio, todas mutantes recibieron un tratamiento con NaCl 300 mM al momento de llevarse a cabo la ruptura celular. En la figura 15, se puede observar que las proteínas se purificaron exitosamente. La mutante R2M1 se preparó a partir de 10 litros de cultivo, se obtuvo con bajo rendimiento y no se logró purificar completamente (figura 15 C). Durante su purificación, después de la elución de la columna de filtración en gel, la proteína se concentró y se le midió actividad enzimática la cual resultó ser muy baja (1400 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína), pero, mayor a la de su proteína antecesora (TcTIM1,3-8;TbTIM2). Para realizar el ensayo anterior, solamente se tomaron las fracciones correspondientes al dímero. Estos resultados sugieren que hubo algún cambio en el plegado normal de estas enzimas.

7.4. Determinación de la actividad catalítica y caracterización cinética de las mutantes de TcTIM y TbTIM.

Los parámetros cinéticos de las mutantes y las enzimas silvestres, se determinaron en la dirección de DL-gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (tabla 11). En general, los datos obtenidos para las mutantes quiméricas y las mutantes aditivas de la región 1 son similares a los determinados para las enzimas silvestres. En el caso de las mutantes de la región 2, los parámetros mostraron una variación importante, en donde las primeras mutantes de esta región poseían capacidades catalíticas muy limitadas (enzimas TcTIM1,3-8;TbTIM 2 y R2M1). Posteriormente, los valores de los parámetros cinéticos presentaron una transformación progresiva hacia lo esperado. Conforme se incrementaron el número de mutaciones, hasta llegar a la mutante R2M4, los datos recuperaron valores similares a los de las enzimas silvestres.

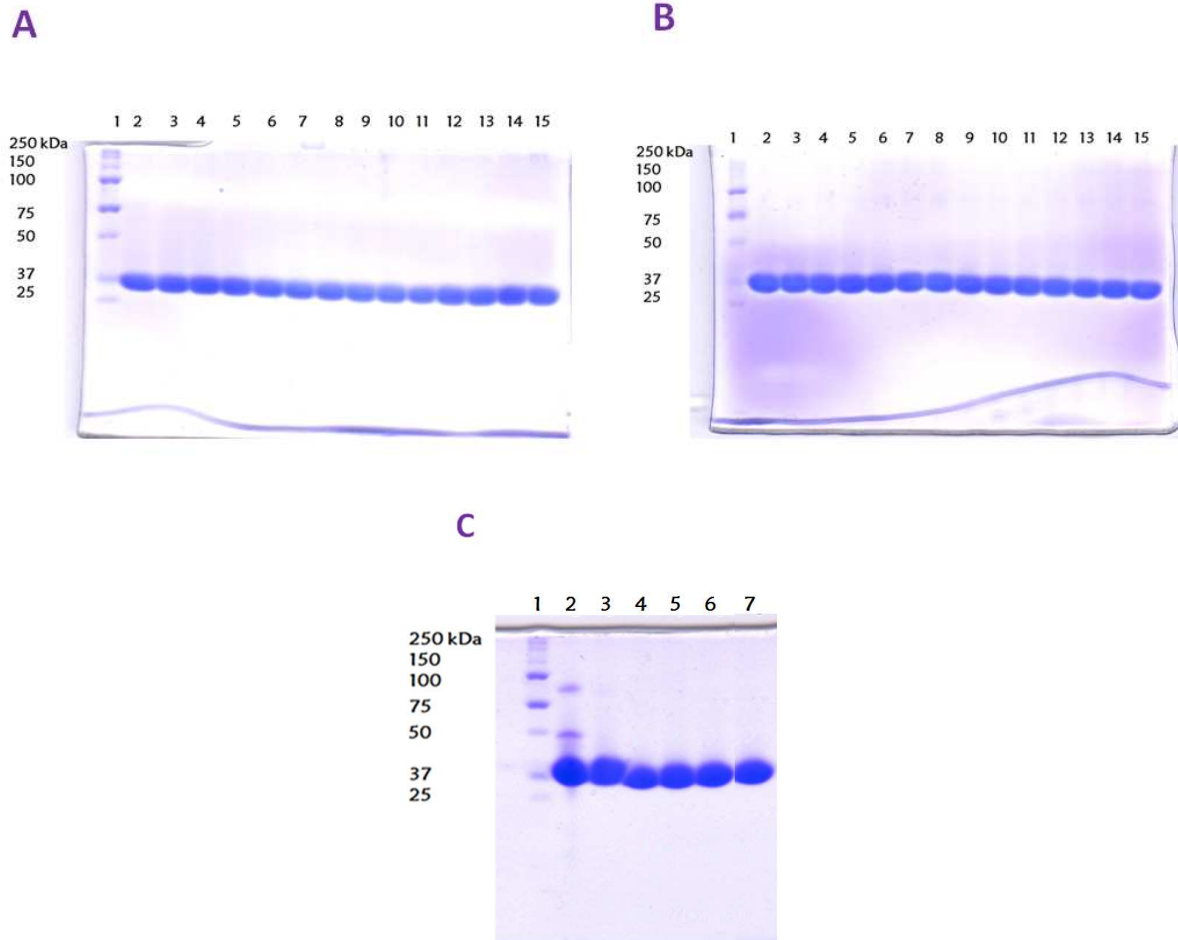


Figura 15.- Purificación de las TIMs de diferentes especies, enzimas quiméricas y enzimas mutadas de TcTIM y TbTIM (geles SDS-PAGE al 12 %). Luego de seguir los protocolos de purificación, todas las proteínas se obtuvieron puras. *La cantidad de proteína cargada por carril fue de 30 microgramos en cada gel.* **Gel A)** 1.- Marcador de peso molecular (*Precision plus protein standards, BioRad*). 2.-TcTIM.3.-TbTIM.4.-TcTIM1-6;TbTIM7-8. 5.- TcTIM1-5;TbTIM6-8. 6.- TcTIM1-4;TbTIM5-8. 7.- TcTIM1-3;TbTIM4-8. 8.- TcTIM1,2;TbTIM3-8. 9.- TcTIM1;TbTIM2-8. 10.- TcTIM2-8;TbTIM1. 11.- TcTIM2;TbTIM1,3-8. 12.- TcTIM1,3-8;TbTIM2. 13.- TcTIM3-8;TbTIM1,2. 14.- R1M1. 15.- R1M2. **Gel B)** 1.- Marcador de peso molecular (*Precision plus protein standards, BioRad*). 2.- R1M3. 3.- R1M4. 4.- R1M5. 5.- R1M6. 6.- R1M7. 7.- R1M8. 8.- R1M9. 9.- R1M10. 10.- R1M11. 11.- R1M12. 12.- R1M13. 13.- R1M13 Δ Ala2.14.- R2M2. 15.- R2M3. **Gel C)** 1.- Marcador de peso molecular (*Precision plus protein standards, BioRad*). 2.- R2M1. 3.- R2M4. 4.- R2M5. 5.- R2M6. 6.- R2M7. 7.- TcTIM2;TbTIM1,3-8R1Q18E ,E23P,D26E,S32T,I33F,N34D.

Tabla 11.- Parámetros cinéticos de las de las mutantes de las regiones 1 y 2, así como de las mutantes aditivas y mutantes puntuales. Los datos mostrados son un promedio de tres determinaciones independientes.

Enzima	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$(k_{cat}/K_m) \times 10^7$ ($M^{-1}s^{-1}$)
TcTIM	0.44 ± 0.05	6000 ± 230.5	1.36 × 10 ⁷
TbTIM	0.45	5166.66	1.15 × 10 ⁷
TcTIM1-6;TbTIM7-8	0.13	1600	1.23 × 10 ⁷
TcTIM1-5;TbTIM6-8	0.38	2583.33	0.68 × 10 ⁷
TcTIM1-4;TbTIM5-8	0.63	5533.33	0.87 × 10 ⁷
TcTIM1-3;TbTIM4-8	0.58	5516.66	0.95 × 10 ⁷
TcTIM1-2;TbTIM3-8	0.57	5466.66	1.10 × 10 ⁷
TcTIM1;TbTIM2.8	0.45 ± 0.05	3883.33 ± 176.8	0.83 × 10 ⁷
TcTIM2-8;TbTIM1	0.40 ± 0.03	6100 ± 183.4	1.50 × 10 ⁷
TcTIM2;TbTIM1,3-8	0.51 ± 0.04	7583.33 ± 331.1	1.47 × 10 ⁷
TcTIM1;3-8;TbTIM2	0.40	71.66	1.9 × 10 ⁵
TcTIM1,2;TbTIM3-8	0.70 ± 0.05	6850 ± 431.20	0.96 × 10 ⁷
TcTIM3-8;TbTIM1,2	0.35 ± 0.05	9616 ± 305.4	1.65 × 10 ⁷
R1M1	0.20 ± 0.03	3316.66 ± 163	1.66 × 10 ⁷
R1M2	0.22 ± 0.02	6666.66 ± 285.3	3.1 × 10 ⁷
R1M3	0.19 ± 0.05	3250 ± 273.3	1.71 × 10 ⁷
R1M4	0.23 ± 0.04	4183.33 ± 258.2	1.82 × 10 ⁷
R1M5	0.22 ± 0.04	3133.33 ± 233.3	1.42 × 10 ⁷
R1M6	0.56 ± 0.02	5916.66 ± 7.72	1.04 × 10 ⁷
R1M7	0.45 ± 0.04	8000 ± 236	1.7 × 10 ⁷
R1M8	0.33 ± 0.06	5550 ± 465.61	1.6 × 10 ⁷
R1M9	0.62 ± 0.06	5166.66	0.84 × 10 ⁷
R1M10	0.27 ± 0.07	5166.66 ± 431.3	1.9 × 10 ⁷
R1M11	0.50 ± 0.04	6500 ± 268	1.3 × 10 ⁷
R1M12	0.33 ± 0.07	5166.66 ± 115.94	1.6 × 10 ⁷
R1M13	0.27 ± 0.05	6166.66 ± 304.92	2.3 × 10 ⁷
R1M13ΔAla2	0.41	5000	1.2 × 10 ⁷
R2M1	1.88 ± 0.53	1316.66 ± 44	7.0 × 10 ⁵
R2M2	2.8 ± 0.44	1833.33 ± 121.8	6.9 × 10 ⁵
R2M3	0.72 ± 0.04	6000 ± 421.8	0.83 × 10 ⁷
R2M4	0.49 ± 0.05	5666.66 ± 354.7	1.16 × 10 ⁷
R2M5	0.52	4000	0.76 × 10 ⁷
R2M6	0.52	4000	0.76 × 10 ⁷
R2M7	0.22 ± 0.06	5666.66 ± 364.7	2.16 × 10 ⁷
TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1 Q18E, S32T,I32F,N34D	0.60 ± 0.13	4500 ± 584.74	0.7 × 10 ⁷
TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1Q18E,E23P,D26E,S32T,I32F,N34	0.59 ± 0.07	6000 ± 434.32	1.01 × 10 ⁷

7.5. Dicroísmo circular

En general, la mayoría de las mutantes mostró espectros de dicroísmo circular compatibles con el motivo estructural de barril TIM. Presentaron tres señales, dos de ellas negativas, una en 222 nm y otra entre 208-210 nm, así como una señal positiva entre 190-195 nm. Sin embargo, existieron pequeñas variaciones en la intensidad y/o forma de las señales, debidas a los cambios durante la mutagénesis (Kishan et al., 1994) los cuales generan cierta variación en el plegado de la enzima (figura 16). Tomando en cuenta dicha variación en el empaquetamiento de cada enzima, también se evaluó la actividad catalítica de éstas como prueba de su correcto ensamblaje. Como criterio, se decidió que si los valores de capacidad catalítica no caían en valores similares a lo reportado para las monoTims, se consideró a las proteínas como bien plegadas. De las estructuras con mayor variación, se identificaron a la quimera TcTIM 1;TbTIM2-8 y la mutante R2M1. En el caso de la quimera TcTIM1;TbTIM2-8, existe una disminución en el grado de intensidad de la señal de las hélices α , lo cual podría indicar que existe una diferencia en el plegamiento de esta enzima. Esta enzima tiene parámetros catalíticos ligeramente por debajo de lo reportado para las enzimas silvestres, mostrando que hay una perturbación en el sitio catalítico, así como en todas las mutantes de la región 1 (tabla 11). En el caso de la mutante R2M1, se muestra una señal correspondiente a un barril TIM; sin embargo, a diferencia del resto de las mutantes, ésta mostró un aumento en la intensidad muy marcado de estas señales, indicando un posible problema en el plegado de esta enzima.

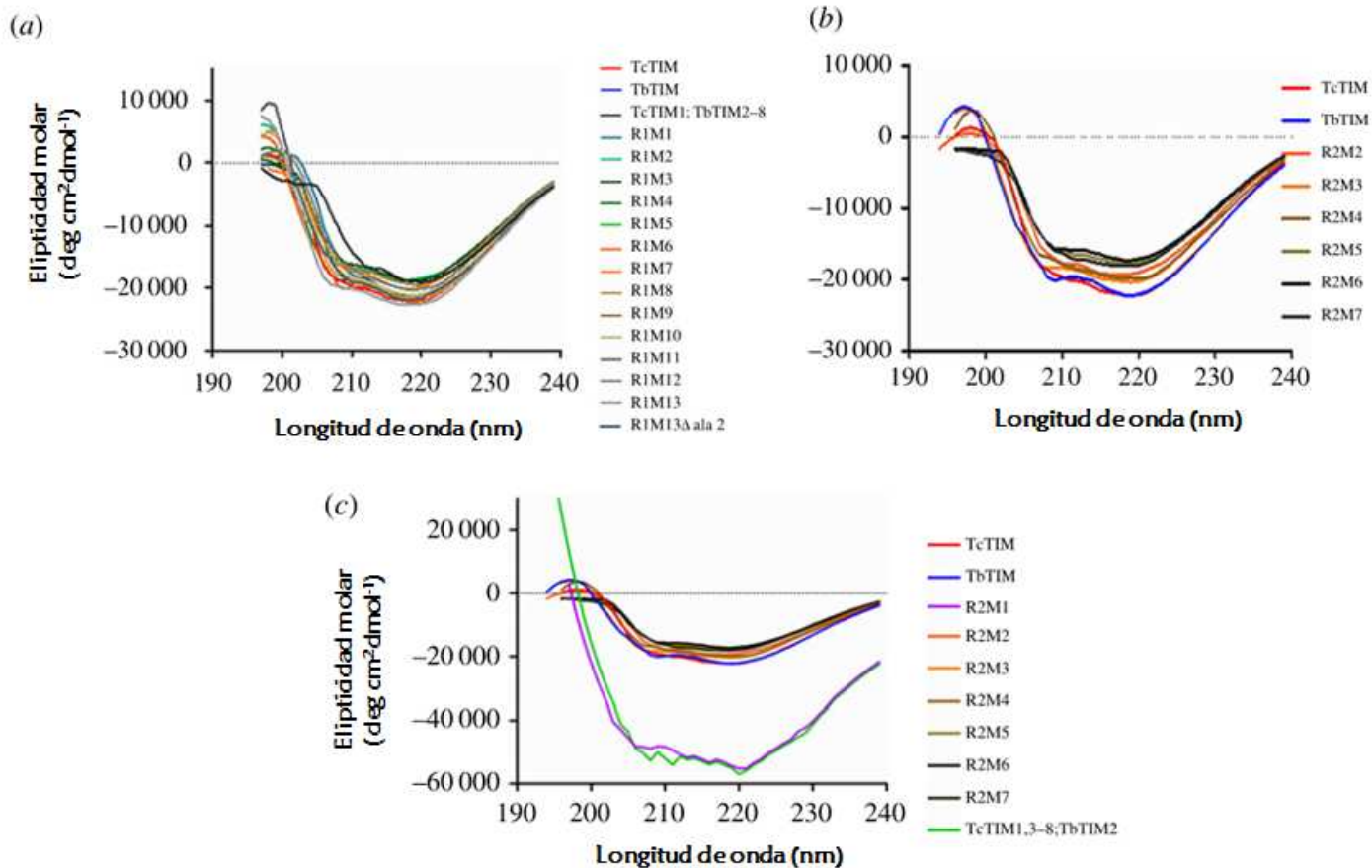


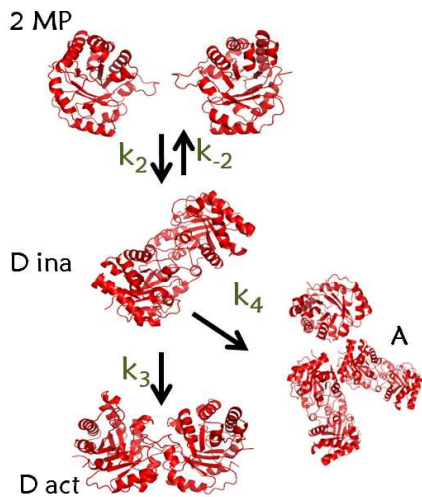
Figura 16.- Espectros de dicroísmo circular de las mutantes aditivas de las regiones 1 y 2. Las proteínas se dializaron en amortiguador de fosfatos pH 7.4. El espectro se realizó con 250 $\mu\text{g/mL}$ de enzima por celda. A) Espectro de las mutantes de la región 1. B) Espectro de las mutantes aditivas de la región 2. C) Comparación de espectros de las enzimas de la región 2 y enzimas silvestres con la quimera TcTIM1,3-8;TbTIM2 y la mutante R2M1.

7.6. Determinación de las constantes de velocidad de reactivación de las quimeras de las regiones 1 y 2

Los pasos limitantes en la reactivación son la asociación de los monómeros y el rearrreglo interno que describe el paso del dímero inactivo al dímero activo (Zomosa-Signoret et al., 2003). Para obtener las constantes de velocidad relacionadas a estos pasos, se hizo la reactivación de las quimeras de regiones 1 y 2 a diferentes concentraciones (de 10 a 500 nM de monómero).

En la tabla 12 se muestran los valores de las constantes de velocidad determinadas para las mutantes aditivas de la región 2 y algunas mutantes de regiones 1 y 2.

Tabla 12.- Constantes de velocidad calculadas de las de las mutantes de las regiones 1 y 2, así como las mutantes aditivas de región 2. En la imagen a la izquierda se indica la secuencia de la reactivación así como las constantes que describen cada etapa.



Mutante	k_2 ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-2} (s^{-1})	k_3 (s^{-1})	k_4 (s^{-1})
TcTIM	4.3×10^5	1.6×10^{-7}	1×10^{-3}	7.2×10^{-4}
TbTIM	0.75×10^5	1.4×10^{-7}	1.3×10^{-3}	6.4×10^{-4}
R2M1	1.4×10^7	0.9×10^{-7}	2.5×10^{-4}	2.3×10^{-3}
R2M2	1.0×10^7	1.1×10^{-7}	3.1×10^{-4}	1.3×10^{-3}
R2M3	3.5×10^5	1.0×10^{-7}	8.4×10^{-4}	5.6×10^{-4}
R2M4	4.8×10^5	1×10^{-7}	9.6×10^{-4}	7.6×10^{-4}
R2M5	1.6×10^5	1×10^{-7}	1.0×10^{-3}	8.8×10^{-4}
R2M6	2.5×10^5	1.0×10^{-7}	2.1×10^{-3}	3.2×10^{-4}
R2M7	4.7×10^5	1×10^{-7}	1.4×10^{-3}	5.2×10^{-4}
TcTIM1;TbTIM2-8	1.5×10^5	1×10^{-7}	1.2×10^{-3}	1.2×10^{-3}
TcTIM2-8;TbTIM1	1.5×10^7	9.1×10^{-7}	3.1×10^{-4}	2.3×10^{-4}
TcTIM1,2;TbTIM3-8	3.8×10^5	1.9×10^{-7}	1.0×10^{-4}	2.3×10^{-4}
TcTIM2;TbTIM1,3-8	8.3×10^5	1.3×10^{-7}	1.0×10^{-4}	1.3×10^{-4}

7.7. Reactivación de las mutantes aditivas de la región 1

Al realizar las cinéticas de reactivación para las mutantes aditivas de la región 1 (figura 17) se observó que, al introducir tan sólo la primer mutación (R1M1), se alcanzó una reactivación del 50% con respecto al máximo esperado (dado que la mutante parental es mayoritariamente TbTIM, la meta fue alcanzar un comportamiento como el de TbTIM). En el caso de las mutaciones aditivas R1M2 y R1M3, la reactivación cae cerca de un 10 % respecto al valor obtenido anteriormente. Por otro lado, la mutante R1M4 genera una caída drástica en la reactivación, mostrando un comportamiento como el de la quimera TcTIM1;TbTM2-8. Posteriormente, al introducir la quinta mutación aditiva, el valor alcanzado, es un 10% mayor al de TbTIM silvestre. La sexta mutación, R1M6, hace que la reactivación sea igual a la de TbTIM, mientras que la séptima mutación, mantiene este comportamiento.

Por otro lado, la mutante R1M8 presenta una ligera caída del 10 % en la reactivación, la cual es revertida al introducir la novena mutación, que inclusive, parece reactivarse con mayor velocidad que TbTIM silvestre y es un poco más eficiente que ésta última, al menos en los primeros 10 minutos de la cinética. Con la décima mutación aditiva, se presenta nuevamente un comportamiento tipo TbTIM, mientras que al introducir la décimo-primer mutación, la reactivación se vuelve muy eficiente (cerca de un 20% más que TbTIM). Al introducir la décimo-segunda y décimo-tercera mutación, la reactivación vuelve a tener un comportamiento muy parecido a TbTIM. La mutante R1M13 Δ Ala2 no presenta diferencia alguna con el comportamiento mostrado por la decimo-tercera mutante R1M13.

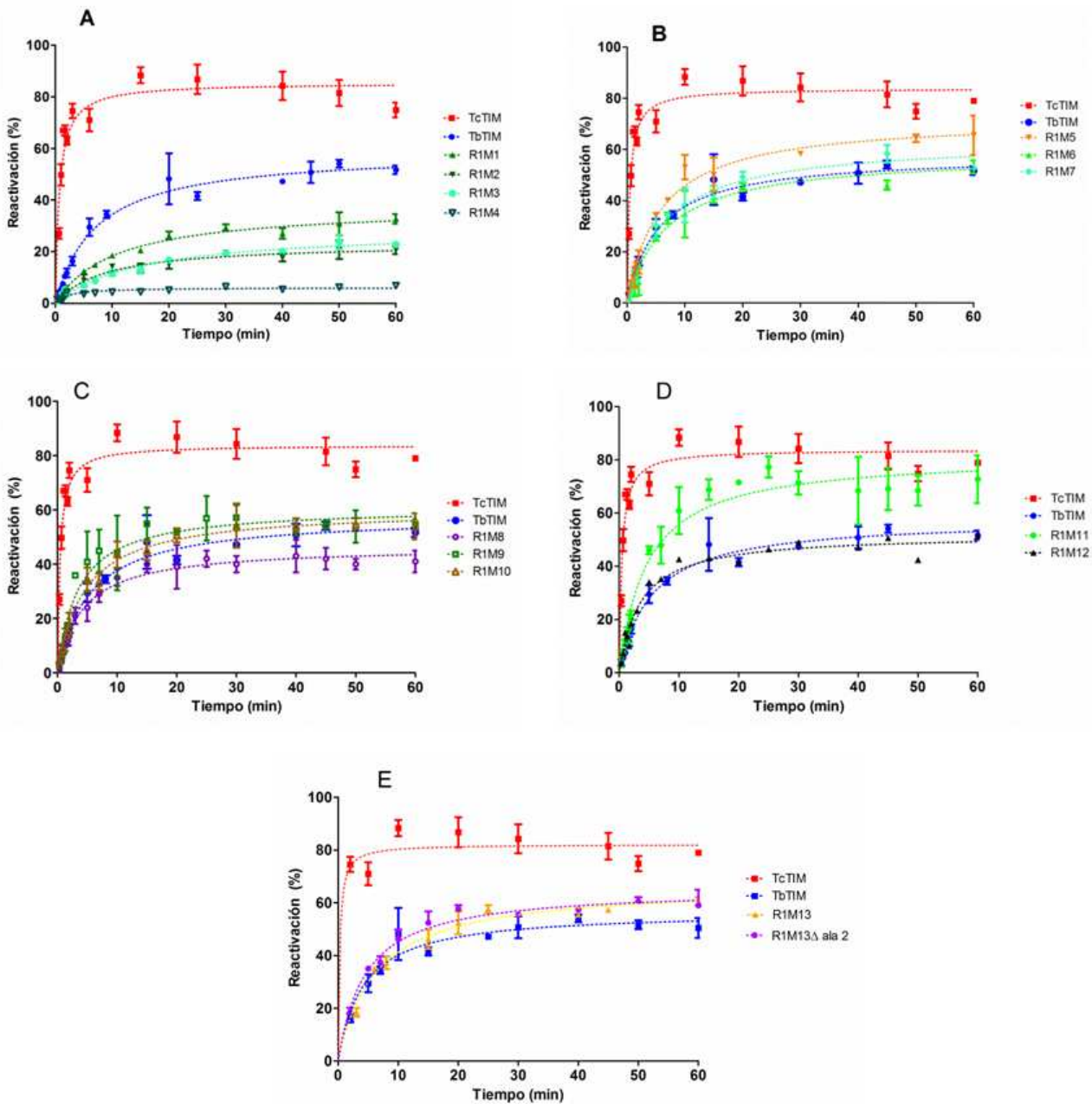


Figura 17.- Cinéticas de reactivación de las mutantes aditivas de la región 1. Las enzimas fueron desnaturizadas a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con Gdn-HCl 6 M durante una hora a 25°C. Transcurrido ese tiempo, las proteínas fueron diluidas hasta una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad recuperada, en donde el 100% lo representa la actividad de la enzima nativa incubada con la concentración residual de Gdn-HCl (60 mM). En las figuras A, B, C, D y E, podemos observar la transformación progresiva en la reactivación lograda mediante la mutagénesis aditiva de los residuos de la región 1.

7.8. Reactivación de las mutantes aditivas de la región 2

Al realizar las reactivaciones de las mutantes de la región 2 (figura 18), observamos que en el caso de R2M1 y R2M2 presentan un comportamiento en la reactivación muy diferente al observado previamente. En ambas, la reactivación genera una curva bifásica con una parte rápida en donde, en los primeros 10 minutos, se alcanza más del 100% y, luego, una parte lenta en donde la reactivación decrece a valores parecidos a los de TbTIM. Cuando se introduce la tercer mutación, la curva vuelve a tener forma de hipérbola rectangular, sin embargo, ésta continúa teniendo un pico con mayor actividad cerca de los diez minutos. El valor obtenido en la reactivación en R2M3 se encuentra intermedio entre ambas enzimas silvestres, ya que se reactiva con mayor velocidad que TbTIM pero es más lenta que TcTIM y el máximo de reactivación se encuentra un 15 % por debajo de TcTIM. La cuarta mutación tiene un comportamiento muy similar a la R2M3, pero es un poco más rápida y eficiente. En el caso de la R2M5, la reactivación es igual que la que presenta TcTIM, sin embargo, esta mutante aun sigue presentando el comportamiento bifásico, con el pico con reactivación mayor en tiempos cercanos a los 10 minutos. En el caso de la R2M6, la mutante se sigue comportando de manera similar a la R2M5, pues aun presenta el pico máximo de reactivación, pero en menor intensidad. Finalmente la mutante R2M7 presenta una reactivación igual que TcTIM.

La mutagenesis de la región 2, mostró dos puntos en donde el replegamiento se encuentra afectado, el primero de ellos es la velocidad con el que ocurre dicho replegamiento y el segundo es un proceso de agregación. La región 2 tiene varios residuos de interfase, como la valina 46, la leucina 48, la alanina 49 en TbTIM y la leucina 46, la isoleucina 48 y la prolina 49 en TcTIM (figura 19), los cuales interactúan de manera directa con el otro monómero. Al modificar dichas interacciones, la asociación también se verá afectada.

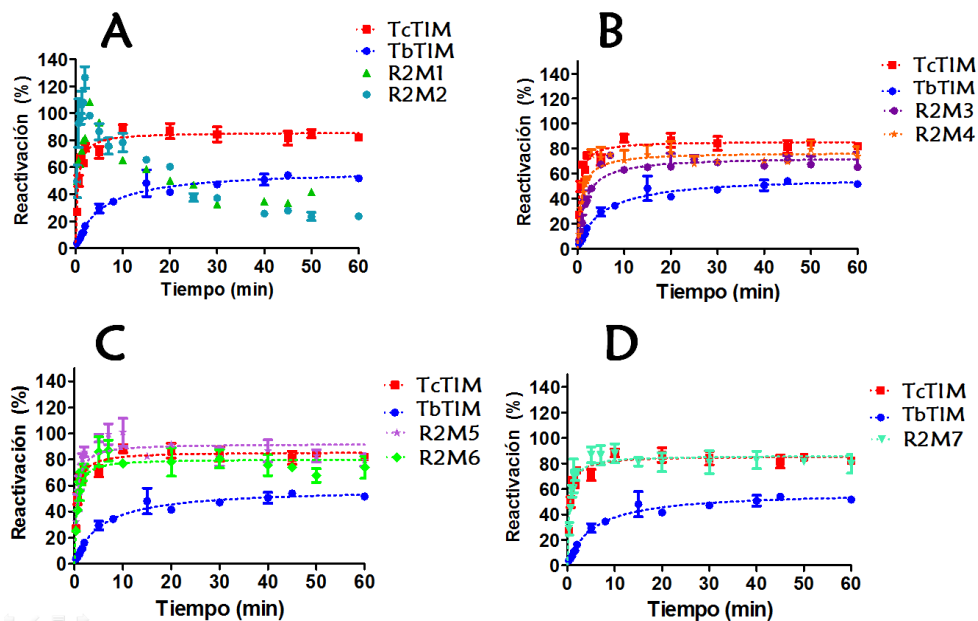


Figura 18.- Cinéticas de reactivación de las mutantes aditivas de la región 2. Las enzimas se desnaturalizaron a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ con Gdn-HCl 6 M durante una hora a 25°C. Transcurrido ese tiempo las proteínas se diluyeron a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad recuperada, en donde el 100% representa la actividad de la enzima nativa incubada con la concentración residual de Gdn-HCl (60 mM).

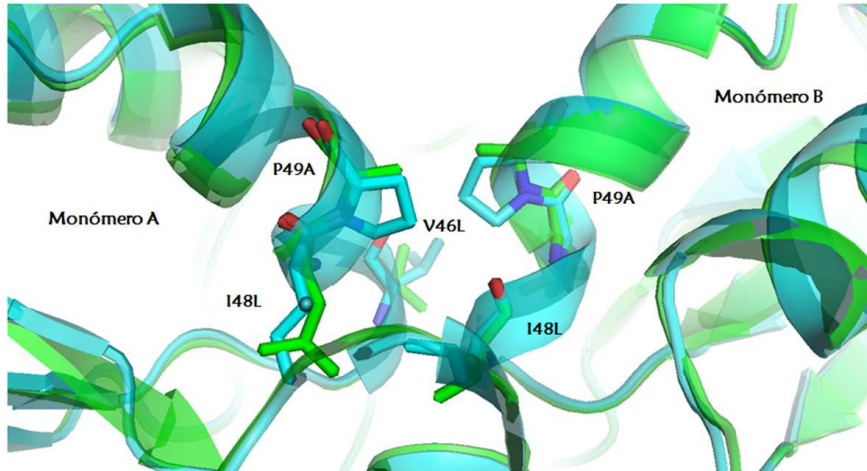


Figura 19. Superposición de las estructuras tridimensionales de algunos de los residuos de interfase de la región 2, de TcTIM (cian PDB 1TCD) y TbTIM (verde PDB 5TIM). La naturaleza de los residuos señalados principalmente es de tipo hidrofóbico. Al realizar la mutagénesis en esta zona se producen cambios dramáticos en la reactivación.

Al calcular las constantes de velocidad para la reactivación, pudimos encontrar cuáles y cuántos son los residuos que afectan directamente la velocidad y la agregación del proceso de replegamiento. En la tabla 12 se observan los valores obtenidos para las constantes de velocidad en estas mutantes. Los residuos 43 y 46 son cruciales para que se lleve a cabo la reactivación (véase las mutantes R2M1 y R2M2 en la figura 18). Dichos residuos generan un comportamiento en la reactivación que no se había visto anteriormente, sin embargo, en ausencia de estos residuos la enzima no se reactiva (ver a la quimera TcTIM1,3-8;TbTIM2 en figura 12). Estos aminoácidos se encuentran situados en el asa interna 2, la cual une el final de la hoja beta 2 con la hélice 2, y están muy cercanos a la lisina 12 uno de los residuos catalíticos (figura 20).

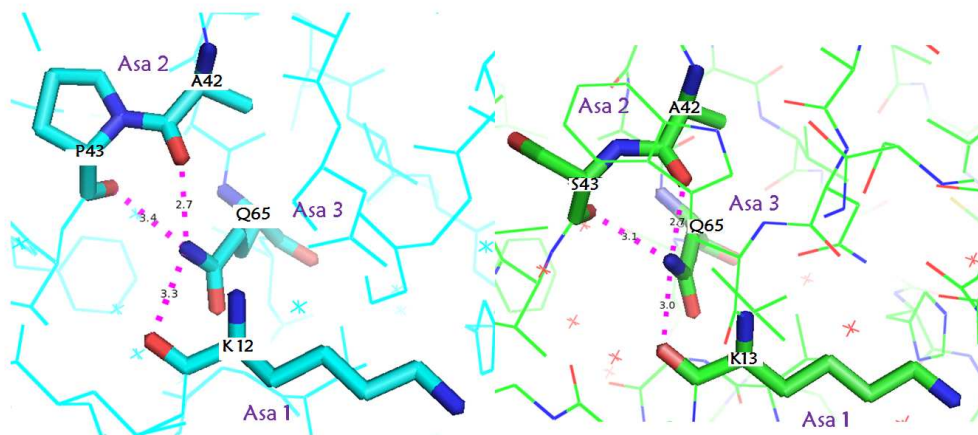


Figura 20. Conectividad entre los residuos de la región 2 y la lisina 13. En cian se muestra a *TcTIM* (PDB 1TCD) y en verde a *TbTIM* (PDB 5TIM). Los puntos en magenta indican las interacciones tipo puente de hidrógeno. La prolina 43 en *TcTIM* o serina en *TbTIM*, presentan una conectividad indirecta con la lisina catalítica 12 a través de la comunicación indirecta con la Glutamina 66 del asa 3. El corte de distancia utilizado para definir a las interacciones tipo puente de hidrógeno fue de 2.5-3.5 Å.

La variación de las constantes de velocidad de las mutantes R2M1 y R2M2, indica la posible existencia de un intermediario de plegamiento, cuya actividad acumulada es la que genera la fase rápida en el replegamiento. Las constantes k_2 y k_3 (tabla 12) en estas mutantes en particular, son mayores que las reportadas para las enzimas silvestres, indicando un incremento en la velocidad de asociación de los monómeros y un aumento de velocidad en el rearreglo interno. Si bien, ambas constantes son mayores, la k_2 es casi dos órdenes de magnitud mayor, generando la acumulación del intermediario. En la caída de la actividad o fase lenta, la agregación se encuentra favorecida ya que a pesar de que la k_3 también es mayor que en las enzimas silvestres, la k_4 es mayor que en éstas. En el caso de las mutantes R2M3 y R2M4, éstas siguen teniendo una curva bifásica con una fase rápida y otra lenta. Sin embargo, la diferencia entre las actividades de estas fases es mucho menor. En ambos casos, las constantes k_2 se encuentran en el intervalo de las enzimas silvestres, al igual que la constante k_3 para R2M3. En el caso de la R2M4, la k_3 es ligeramente mayor que en las enzimas silvestres. En ambas mutantes, la asociación y el rearreglo interno se encuentran afectados por estos residuos. En el caso de la R2M5, las constantes de velocidad y la reactivación son similares a las enzimas silvestres, aunque aun presenta el pico de

actividad máxima a los 10 minutos. En tiempos prolongados (arriba de 40 min) la agregación en esta enzima comienza a producir ciertos estragos, ya que se observa una ligera pérdida de la actividad, luego de transcurrido dicho tiempo. Finalmente, la mutante R2M7 es la que recupera un comportamiento tipo TcTIM. Los aminoácidos de la región 2 que favorecen la asociación se encuentran altamente relacionados, son los que corresponden a las primeras mutaciones (R2M1 y R2M2 o posiciones 43 y 49 respectivamente) y, en un menor grado, los residuos 56 y 57. Por otro lado, los aminoácidos relacionados con la interconversión del dímero son los residuos 43, 46, 48, 49 y 53, los cuales afectan a las constantes k_2 y k_3 , mientras que los residuos 56 y 57 son los residuos que regresan el comportamiento del replegamiento a los valores de las enzimas silvestres.

7.9. Análisis estructural de los aminoácidos relevantes en las regiones 1 y 2

Con el fin de tratar de comprender el por qué estas mutaciones generan cambios tan importantes en la reactivación, se realizó una búsqueda de los contactos de los aminoácidos mutados a una distancia de 4 Å. Para ello, se utilizaron las coordenadas cristalográficas de las enzimas silvestres 5TIM (TbTIM) y 1TCD (TcTIM).

En trabajos previos, se ha observado que TbTIM presenta una región 1 con una estructura más compacta que TcTIM (Maldonado *et al.*, 1998), en el sentido de que TbTIM posee más interacciones que estabilizan a la enzima en esta región. Tanto en TcTIM como en TbTIM, la cara externa de la hélice se encuentra completamente expuesta al solvente, mientras que la cara interna de la hélice se encuentra dirigida hacia la hebra beta 1. La hélice 1 establece contactos tipo puente de hidrógeno con los residuos de la hebra beta 1, con la hélice 2 y la hélice 8. Sin embargo, una de las diferencias más notables entre ambas enzimas es que TcTIM posee una prolina en la posición 23, mientras que TbTIM posee un ácido glutámico en la posición equivalente. En TbTIM, la glutamina 18 se encuentra unida mediante puentes de hidrógeno al ácido glutámico 23, mientras que en TcTIM la existencia de la prolina 23 genera un rearrreglo en la hélice que hace que la longitud entre los giros de la hélice entre la serina 19 a la prolina 23 sea mayor por 1.2 Å en TcTIM que en TbTIM (Maldonado E., *et al.*, 1998). Este aumento en la distancia genera modificaciones en la orientación del resto de los aminoácidos de la hélice, generando cambios en la comunicación con otros residuos. Por ejemplo, en TbTIM la glutamina 18 establece dos

contactos tipo puente de hidrógeno con el aspartato 85 del monómero b (región 3 de la otra subunidad), los cuales no se forman cuando se encuentra la prolina 23, como en TcTIM, debido a la reorientación producida (figura 21).

En la región 1 las contribuciones de mayor importancia se produjeron en las mutantes R1M1, R1M5 y R1M6. En la mutante R1M1 se realizó el cambio de un ácido glutámico por una glutamina, el cual es un cambio conservativo pero que tiene un fuerte impacto en la reactivación. Como se mencionó antes, el residuo 18, en TbTIM genera una interacción con la otra subunidad, pero ésta solamente se forma cuando no existe el cambio de orientación de este residuo, debido a la presencia de la prolina 23.

A raíz de lo anterior, una de las preguntas que surgieron fue: ¿Porqué la mutante R1M1 presenta un cambio tan drástico, si en ambos casos la presencia de la prolina cambia de orientación del residuo 18, independientemente de cuál sea?

Debido a que no se conoce la estructura tridimensional de esta mutante, se realizó un modelado por homología en el servidor swiss model (Guex et al., 2009 y Biasini et al., 2014), en el que se obtuvieron las coordenadas para las mutantes puntuales, a partir de las coordenadas cristalográficas de las enzimas silvestres (PDB: 5TIM y 1TCD).

El servidor produjo dos modelos para la mutante R1M1. En ambos casos, el residuo 18 se encontraba en una posición intermedia (con respecto a las posiciones observadas en TcTIM y TbTIM). Uno de los dos contactos con el monómero B de la región 3 se restablece, explicando así el porqué este residuo produce un cambio tan drástico. Esto indica que tienen un papel importante en la asociación de las enzimas.

Al realizar el cambio de la prolina 23 por el glutamato en la mutante R1M5, la enzima se reactiva con mayor eficiencia que TbTIM. Esta situación posiblemente se deba a la reducción de la "cavidad" de 1.2 Å que la prolina genera y, consecuentemente, al restablecimiento del contacto con la región 3 y la glutamina 18. Sin embargo, es la mutante R1M6 la que muestra una reactivación con un comportamiento muy parecido al de TbTIM silvestre. El cambio generado con la sexta mutación es un ácido glutámico por un ácido aspártico. Ambos poseen un tamaño y carga similar, sin embargo, al revisar las interacciones con los residuos vecinos en los modelos cristalográficos de las enzimas silvestres (PDB: 5TIM y 1TCD), observamos que TbTIM forma dos

contactos con la arginina 54 (conservado en ambas enzimas), en la región 2 mientras que TcTIM no forma ninguno. Si bien, este aminoácido es el mismo en ambas enzimas, en el caso de TcTIM la orientación de este es completamente distinta a la de TbTIM, por lo que no forma ninguna interacción con el residuo 26 de la región 1 (figura 21).

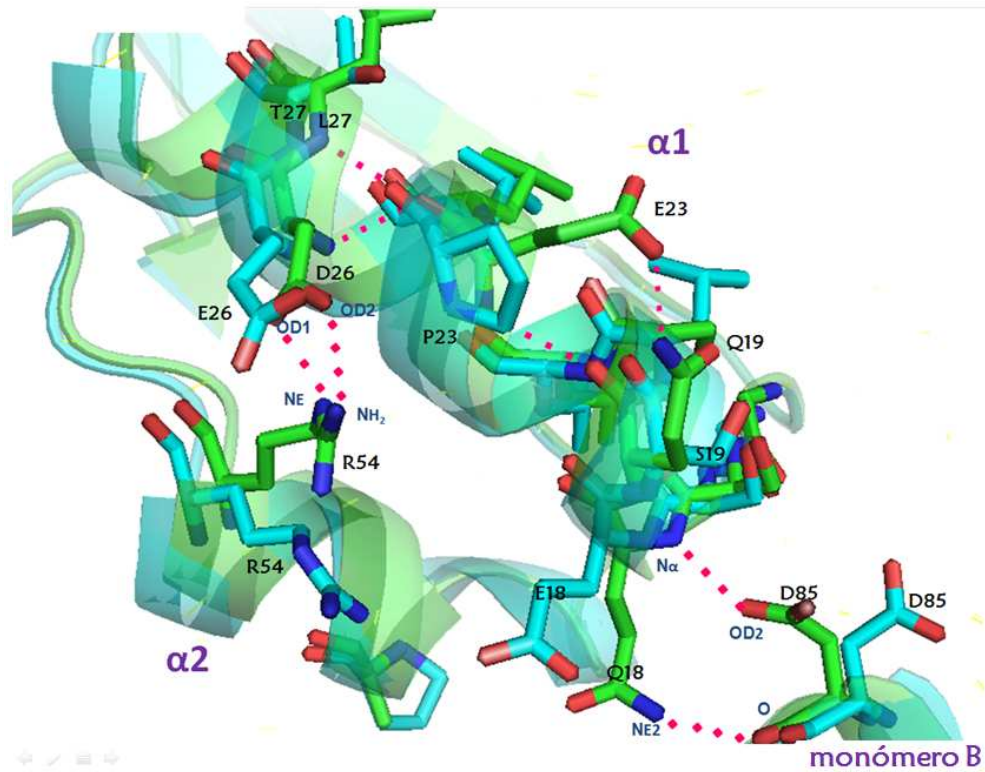


Figura 21.- Superposición de las estructuras tridimensionales de las regiones 1 y 2 de TcTIM (cian) y TbTIM (verde). En TcTIM, la presencia de la P23 en la mitad de la hélice produce una apertura de 1.2 Å entre los giros de la hélice generando cambios en los contactos entre los aminoácidos vecinos. TbTIM no tiene dicho espacio y no modifica estas interacciones. El cambio de conformación de la Q18 en TbTIM y la E18 en TcTIM es resultado de la presencia/ausencia de la prolina 23. En la alfa hélice 2 ($\alpha 2$) la R54 en TbTIM es capaz de formar interacciones con el residuo D26 en la región 1, mientras que, en TcTIM, la R54 no lo hace debido al cambio de orientación de este residuo. En puntos rojos se muestran los puentes de hidrógeno. El corte de distancia utilizado para definir a las interacciones tipo puente de hidrógeno fue de 2.5-3.5 Å.

Por otro lado, otro de los cambios más dramáticos fue el de la mutante R1M11, cuya reactivación se incrementa de manera importante. El cambio en esta mutante fue de una treonina por una serina en la posición 32. Al igual que en los casos anteriores, no hay mucha diferencia en la naturaleza de estos residuos pero, al observar las estructuras en los modelos cristalográficos, pudimos ver que la disposición de estos residuos es diferente entre ambas enzimas (figura 22). Este residuo se encuentra al final de la hélice 1 y se observó que, en TbTIM, se forman contactos con el residuo 34 (que corresponde al décimo tercer cambio), mientras que en TcTIM no se forman, mostrando así una vez más que la reactivación está más favorecida cuando existe una posición más abierta.

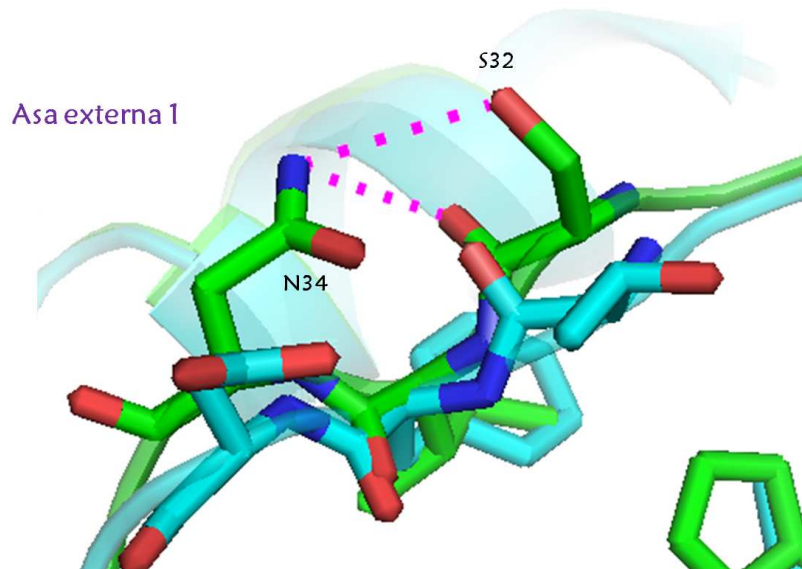


Figura 22.- Superposición de las estructuras tridimensionales de los residuos del asa 1 externa TcTIM (cian, PDB 1TCD) y TbTIM (verde, PDB 5TIM). Los residuos en las posiciones 30 a 32 forman parte del asa 1 externa. En el caso de TbTIM, la serina 32 forma contactos con la asparagina 34, los cuales TcTIM no forma. Los puntos en magenta indican los puentes de hidrógeno formados. El corte de distancia utilizado para definir a las interacciones tipo puente de hidrógeno fue de 25-3.5 Å.

En general, no sabemos la forma en que estos residuos interactúan durante los estadios tempranos del plegamiento, pero es claro que éstos son importantes para guiar al péptido a través

de todo el espacio conformacional accesible. Si bien, el no poseer las estructuras cristalográficas que respalden estas afirmaciones las vuelve algo especulativas, hay trabajos como el de Rodríguez-Almazán et al., 2008, en donde sólo la mutación de un residuo produce cambios importantes en la estabilidad estructural de la enzima.

7.10. Probando los residuos importantes, conversión de una TbTIM en TcTIM

Una vez identificados los residuos importantes de cada una de las regiones y, con el fin de comprobar que estos cambios son los responsables de las diferencias de comportamiento entre TcTIM y TbTIM, se planteó la construcción de una nueva serie de mutantes con las combinatorias de los residuos con contribuciones significativas de ambas regiones. Estas mutantes se diseñaron pensando en la conversión de una TbTIM en una TcTIM. Los residuos elegidos fueron 13, 6 residuos de la región 1 (posiciones 18, 23, 26, 32, 33 y 34) los 7 residuos diferentes de la región 2 (posiciones 43, 46, 48, 49, 53, 56 y 57). El templado de DNA que se utilizó para el diseño de estas mutantes fue el de la quimera TcTIM2; TbTIM 1,3-8, la cual ya posee las 7 diferencias de la región 2 de TcTIM. Como se observó en las mutagenesis de la región 2, todos los residuos de esta zona son importantes mientras que, en la región 1 se observaron tres residuos que proporcionaban un gran aporte en la reactivación. Estos residuos fueron los que están en las posiciones 18, 23 y 32. Pensando en los residuos que brindaban mayor aporte en la reactivación de la región 1, se realizaron dos mutantes: TcTIM 2; TbTIM1,3-8 R1: Q18E, S32T, I33F, N34D y TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1: Q18E, E23P, D26E, S32T, I33F, N34D. La primer mutante se construyó pensando en explorar el potencial de los residuos E18 y T32 (los residuos F33 y D34 también se cambiaron, ya que al obtener el mapa de contactos de estos residuos, muestran una comunicación estrecha e importante que TbTIM tiene, pero que TcTIM no posee con el residuo T32, figura 22). Con la segunda mutante se pensó probar la combinatoria de los residuos E18, P23 y T32 pero, adicionalmente, se agregó el residuo E26 el cual se observó que era importante para recuperar las propiedades de la enzima silvestre (ver secciones 7.7 y 7.9).

Como se mencionó, la quimera TcTIM2;TbTIM1,3-8 se reactiva rápidamente pero la eficiencia que alcanza es similar a la de TbTIM (figura 23). Sin embargo, cuando se mutaron los residuos E18, P32, F33 y D34, la reactivación se volvió muy eficiente, inclusive mayor que en TcTIM. Esta mutante también presentó un pico de mayor reactivación en los primeros 10 minutos de la cinética (fenómeno similar al que ocurre con las mutantes de la región 2). Al final de la reactivación (t = 40-

80 min) también tuvo una caída de casi el 10% con respecto a los valores obtenidos para TcTIM en el mismo tiempo (figura 23). En el caso de esta mutante, la caída de reactivación al final de la cinética podría ser debida a los residuos T32, F33 y D34 que tienen interacción con los residuos T56 y N57(R2), los cuales son diferentes entre sí en ambas enzimas. Y al modificar estos aminoácidos, se modifican la cantidad de contactos que se forman. Adicionalmente, como se observó en la mutagénesis de la región 2, los residuos T56 y N57 son los que regresan el comportamiento tipo silvestre en las constantes que definen el rearrreglo interno y la agregación. Esto indica que la perturbación de los contactos en esta zona genera este cambio. Al igual que para las mutantes de la región 2, existe un pico de mayor reactivación que aparece cuando el entorno de los residuos S43P y V46L se modifica. Al estar presente la prolina en la posición 23, cambia los contactos entre los residuos de la región 1 y la región 2, modificando la estabilidad de la enzima y promoviendo la aparición de este tipo de comportamientos.

Finalmente, la otra combinatoria que se probó fue con los residuos E18,P23,E26,T32,F33 y D34 ; al realizar la reactivación de esta mutante (TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1: Q18E, E23P, D26E, S32T, I33F, N34D), observamos que ésta tiene un comportamiento como el de TcTIM (figura 23) , es decir, se reactiva rápida y eficientemente tal como lo hace TcTIM. Al obtener los parámetros cinéticos de ambas mutantes, estos fueron ligeramente diferentes, ya que su afinidad por el sustrato es mayor, sin embargo, los valores se encuentran en el rango de lo reportado para las enzimas silvestres (tabla 11).

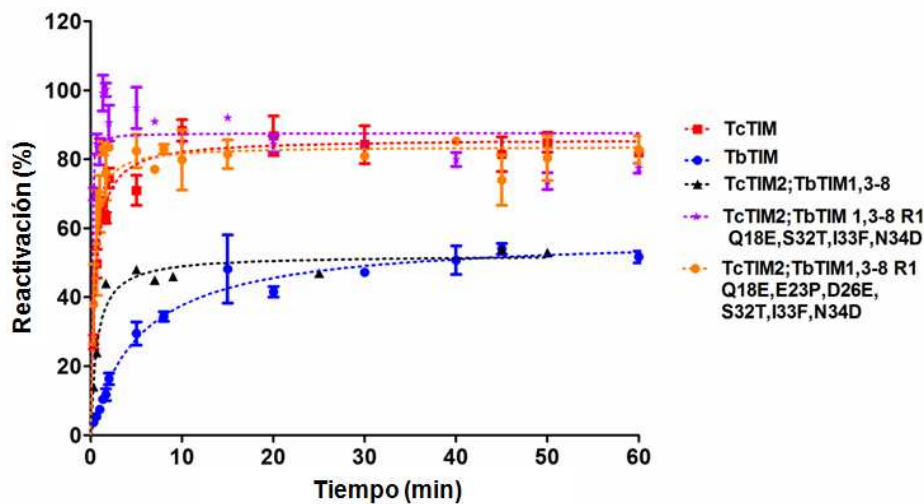


Figura 23.- Reactivación de dos mutantes con combinatorias de residuos de las regiones 1 y 2. Las enzimas se desnaturalizaron a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con Gdn-HCl 6 M durante una hora a 25°C. Transcurrido ese tiempo, las proteínas se diluyeron a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad recuperada, en donde el 100% lo representa la actividad de la enzima nativa incubada con la concentración residual de Gdn-HCl (60 mM).

8. Discusión

8.1. Papel de las asas en la reactivación de la región 1

A pesar del alto grado de similitud en secuencia como en estructura tridimensional entre TcTIM y TbTIM, existen diferencias importantes como la reactivación de monómeros desplegados con GdnHCl. El propósito de este trabajo fue el conocer los aminoácidos responsables de esta diferencia de comportamiento.

Nuestros resultados a partir de la mutagénesis de las regiones 1 y 2 indican que los aminoácidos en las posiciones 18, 19, 20, 22, 23 y 26 (utilizando la numeración de TbTIM) en la región 1 y los

residuos 43, 46, 48, 49, 53, 56 y 57 en la región 2, son los residuos con mayor efecto en la reactivación ya que, al ser mutados, afectan la capacidad de replegado de ambas enzimas.

Al observar la posición de estos residuos encontramos que la mayoría se encuentran en la periferia o pertenecen a alguna de las asas de la TIM. El primero (posición 18), se encuentra al inicio de la hélice 1, justo al terminar el asa 1 de interfase (que une la hoja β 1 con la α hélice 1) mientras que los residuos de posiciones 32, 33 y 34 se sitúan en el asa externa 1 que conecta la hélice 1 con la hebra β 2. En el caso de la región 2, los residuos que tienen un papel primordial en la asociación de los monómeros son los residuos 43 y 46 situados en el asa 2 interfacial y los residuos 56 y 57 en el asa 2 externa. En múltiples estudios, se ha observado que las asas poseen un papel importante en el plegamiento, ya que los contactos que forman con el resto de la cadena polipeptídica limitan el espacio conformacional disponible, agilizando o frenando el proceso del plegamiento (Viguera y Serrano 1997; Katebi y Jernigan 2014; Gavrillov et al., 2015). Por lo tanto, la localización de estos residuos en estas asas podría ser un factor que guíe el plegamiento de estas proteínas y la diferencia en su replegamiento, posiblemente radique en las interacciones no nativas que se forman en tiempos iniciales del plegamiento o en la diferencia de los ángulos diedros que forman estos aminoácidos. TcTIM, cuyo replegamiento es más eficaz y veloz, presenta una variación importante en estos ángulos con respecto a TbTIM, ya que en ambas hélices 1 y 2, TcTIM posee una prolina a la mitad de estas, lo cual genera un cambio en los ángulos del resto de la hélice. El movimiento y/o posicionamiento de las asas, así como la rigidez que las prolinas brindan a la cadena polipeptídica, son factores que limitan el espacio conformacional accesible durante el plegamiento. En el caso de TcTIM, la presencia de las prolinas parece agilizar el proceso del replegamiento en vez de limitarlo. En múltiples estudios (Feige et al., 2010, Gruber y Balbach 2015), se ha observado que la isomerización de prolinas es un punto que alenta el plegamiento; sin embargo, esto no parece suceder en TcTIM ya que la presencia de prolinas no limita la velocidad del plegamiento, si no que se lleva a cabo de manera más efectiva, con mayor velocidad y con menos agregación que en TbTIM.

La interfase de las TIM's se encuentra constituida principalmente por asas. En etapas más avanzadas del plegamiento, el movimiento de estas asas es un factor que repercute en el proceso, ya que éstas se encuentran muy relacionadas con la dimerización, uno de los puntos cruciales en

el plegamiento. La asociación de los monómeros en las TIM's, permite la recuperación de la actividad catalítica óptima (Zomosa-Signoret *et al.*, 2003)

Las asas que se encuentran relacionadas con la dimerización son la 1, 2, 3 y 4 internas (aquellas que unen la hebra beta con la hélice alfa). El asa 3, es el asa más larga en la enzima y se acomoda encima del asa 2 del otro monómero, permitiendo la interacción entre los residuos de las asas interfaciales 1 y 4. Cuando se lleva a cabo la asociación entre los monómeros, la movilidad de estas asas, junto con el asa 8, se restringe para mantener a los residuos catalíticos en la posición correcta, mientras que las asas 6 y 7 se hacen más móviles para que éstas puedan continuar con su funciones (proteger el sitio catalítico y permitir la liberación del producto y entrada de sustratos) (Katebi y Jernigan 2014).. En las mutantes de las regiones 1 y 2, la modificación de contactos debida a la mutagénesis, provocó cambios estructurales que se reflejaron en la capacidad de plegamiento y en los parámetros catalíticos de estas mutantes (tabla 11 y figura 16).

Con respecto a las capacidades catalíticas de las proteínas estudiadas, la mayoría de las proteínas presentó cambios discretos en los parámetros cinéticos (tabla 11). En el caso de las mutantes aditivas de la región 1: R1M1, R1M2, R1M3, R1M4, R1M5, R1M8, R1M9, R1M11, R1M13, las constantes K_m , se encontraron cerca de la mitad de lo determinado para las enzimas silvestres. Esto quizá pueda deberse a que, en la región 1, se encuentran dos de los 4 residuos catalíticos de la TIM: la asparagina 11 y la lisina 13, cuyo papel principal en la catálisis es el reconocimiento del sustrato y la estabilización de las cargas negativas de los intermediarios durante la reacción (Wierenga 2010). Posiblemente, al realizar la mutagénesis en esta zona se modifiquen algunos contactos en los alrededores de estos residuos que los afectan, sin embargo, estos cambios parecen no ser tan drásticos para producir la pérdida de la geometría del sitio activo.

Después de la asociación de los monómeros, las asas interfaciales atraviesan por una serie de reajustes que permiten que la catálisis ocurra de manera adecuada. Este posicionamiento es recuperado cuando se introduce la sexta mutación aditiva en la región 1 (posiciones 18, 19, 20, 22, 23 y 26), en la cual podemos ver la recuperación de los parámetros cinéticos a valores similares a los de la enzima silvestre. Este restablecimiento es de esperarse, ya que, al realizar la mutagenesis de la posición 23 y 26, se estaría recuperando la conformación de TbTIM y, por ende, el restablecimiento de los contactos con la región 2, reduciendo la movilidad de esta área y recuperando la capacidad catalítica.

8.2. Papel de las asas de la región 2 en la reactivación

La región 2 controla la velocidad con la que se lleva a cabo el replegamiento. Probablemente esto se debe a la comunicación estrecha que tiene con la región 1 y las regiones 2 y 3 del otro monómero.

Las mutantes de la región 2 mostraron una variación importante en sus parámetros cinéticos. Esto se debe a que la asociación de los monómeros en estas mutantes se encuentra afectada, generando un incremento en la movilidad de las asas interfaciales y causando así la desestabilización del sitio activo de éstas. La estructura secundaria seguida por DC de la mutante TcTIM1,3-8;TbTIM2, en la cual la catálisis se encontró muy afectada, mostró un perfil característico para un barril α/β_8 , sin embargo, la intensidad de la señal que presenta con respecto a las enzimas silvestres es considerablemente mayor, al igual que en la mutante R2M1 (figura 16). El fenómeno anterior solamente se ha observado en estudios de desnaturalización al equilibrio seguidos por DC en TcTIM, en donde se encontró un intermediario de la ruta de desplegamiento con características similares (aumento en la cantidad de estructura secundaria e incremento en la intensidad de fluorescencia) (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2005).

Adicionalmente, estas enzimas fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular, con el fin de corroborar su naturaleza dimerica. A las fracciones con el dímero de cada una de estas enzimas, se les midió actividad enzimática, obteniéndose un valor muy bajo, comparado con los valores reportados para las TIMs monoméricas. Si bien estas mutantes se encontraban en forma dimerica, la escasa actividad enzimática sugiere que la mutante TcTIM 1,3-8;TbTIM2 presenta problemas con la asociación correcta del dímero y problemas con la geometría del sitio catalítico.

Los residuos críticos que controlan la velocidad de reactivación (asociación de la enzima) y la velocidad de agregación son el 43 y el 46 que se sitúan al inicio y al final del asa interfacial que une a la hebra beta 2 al asa 2. En ambas mutantes (R2M1 y R2M2), la reactivación genera un pico de gran actividad relacionado con la acumulación de una especie intermediaria (que genera el pico) y, la caída que sigue en la curva, podría ser debida a la agregación de esta misma especie dimerica durante el rearreglo interno para la formación del dímero nativo. Dicha acumulación se debe a cambios importantes en las constantes de velocidad asociadas a estos fenómenos. Al

mutar estos aminoácidos, la reactivación de la enzimas se hace posible (comparando con la enzima TcTIM1,3-8;TbTIM2), sin embargo, tanto sus propiedades catalíticas como las constantes cinéticas relacionadas al replegamiento se encuentran afectadas. Los datos de los parámetros cinéticos muestran que en estas mutantes, existe un aumento de la K_m entre 4 y 7 veces con respecto a lo reportado para las enzimas silvestres. Esto indica que al realizar estos cambios, la asociación de los monómeros mejora (con respecto a la quimera TcTIM1,3-8;2 TbTIM 2) estabilizando al sitio activo. Por otro lado, las constantes de disociación para estas mutantes fueron ligeramente menores que en las enzimas silvestres, indicando que la caída en la reactivación en tiempos posteriores a los 10 min no es por la disociación de la enzima, si no por la agregación durante el rearreglo interno para formar al dímero nativo.

En la cuarta mutación, al igual que sucedió en la región 1 al introducir una prolina a la mitad de una hélice, los ángulos diedros de los residuos contiguos se modifican y, con ello, los contactos con otros residuos. Esto ocurre con la R54, que en TbTIM, que tiene una conformación diferente a la de TcTIM, permite una mayor interacción con los residuos de la hélice 1 (figura 21). En el caso de esta mutante, los valores de K_m casi recuperan los valores de lo reportado para la enzima silvestre.

La amplitud o porcentaje máximo que alcanza la curva de reactivación y la capacidad que la curva tiene para mantenerse estable (en tiempos cercanos a 60 min) es reflejo de la propensión a la agregación de cada enzima. En la región 2, encontramos que dicha propensión o resistencia está dada por los residuos T 56 y N 57 (ubicados en el asa 2 externa junto a los residuos de T 32, F 33 y D 34 del asa externa 1). Al mutar estos residuos en la región 2, se observa una recuperación en la amplitud de la curva, estabilizando el valor de la reactivación y evitando la agregación en tiempos prolongados. En especial, el cambio del residuo 57 hace que el pico inicial de mayor actividad ($T=10$ min) desaparezca por completo (figura 18 D). Al observar la constante de velocidad de asociación, es este residuo el que devuelve la magnitud de la constante a valores como los de TcTIM, indicando que este residuo afecta a la asociación de la enzima.

En el caso de la mutante TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1: Q18E, S32T, I33F, N34D, se observó una vez más el pico de mayor reactivación (figura 23). En esta enzima se mutaron dos de los aminoácidos con mayor impacto en la reactivación, pues se afectan los residuos presentes en las asas 1 interna y externa. Como se menciono antes, al cambiar la comunicación del asa externa 1 con el asa

externa 2, se afecta la capacidad de agregación de la enzima y, con ello, la amplitud con la que se reactiva la enzima. La aparición del pico de mayor reactivación posiblemente es resultado de una comunicación deficiente entre estas dos regiones. Con la introducción de la mutación Q18E se recupera parcialmente la comunicación con el monómero b, pero la comunicación con el resto de la hélice no se lleva a cabo debido a la presencia de la prolina 23. Por lo que, al preparar la mutante TcTIM 2;TbTIM1,3-8 R1: Q18E, E23P, D26E, S32T, I33F, N34D, se buscó recuperar el resto de la comunicación con la hélice 1. Finalmente, al adicionar los residuos P23 y E26, ocurriría una reestructuración en la región de la hélice1, asa 1 interna y asa 1 externa, que permiten mejorar comunicación hélice 1-2, así como una asociación adecuada de los monómeros, obteniendo así un comportamiento tipo TcTIM.

8.3. Agregación durante el replegamiento

Existen dos puntos críticos de agregación en la ruta de reactivación de estas enzimas según lo reportado por Cháñez-Cárdenas, *et al*, 2002. El primero de ellos ocurre durante la asociación de los dímeros y según los resultados obtenidos, parecen ser los residuos en las posiciones 18, 43, 46, 48 y 57 quienes afectan este proceso. Al modificar cualquiera de estos residuos, se conduce a una reactivación poco eficiente. El otro punto crítico en donde ocurre la agregación se encuentra en la reestructuración del intermediario dimérico al dímero nativo. En este caso, son los residuos en las posiciones 32, 33, 34, 56 y 57 los que tienen un papel importante, ya que al modificar sus interacciones, la variación de la amplitud de las curvas se hace muy evidente, en especial en tiempos cercanos a los 60 min.

9. Conclusiones

Una de las diferencias importantes entre TcTIM y TbTIM silvestres es el grado de compactación que presentan. En algunos casos, poseer una estructura más laxa resulta ser una ventaja, ya que esto brinda un amplio grado de libertad conformacional de los residuos del péptido que permiten la adaptación a ciertos cambios. En el caso del replegamiento, un ambiente más laxo entre las regiones 1 y 2, lo favorece, sin embargo, el contacto entre estas dos regiones es esencial para que tal proceso se lleve a cabo.

De los dos acercamientos utilizados para obtener las constantes de asociación, el que arrojó mejores resultados, fue el obtenido con el software Dynafit, ya que con este se lograron obtener estimaciones de las constantes de asociación de las mutantes de la región 2, los cuales no se pudieron obtener con el modelo propuesto anteriormente por Zomosa-Signoret y colaboradores (ya que no se podían ajustar las curvas bifásicas). Para validar los datos de las constantes obtenidas con el Dynafit, se obtuvieron las constantes de asociación para otras mutantes (enzimas quiméricas de las regiones 1 y 2) sin comportamientos bifásicos en su reactivación y los resultados obtenidos para estas constantes fueron muy similares a los obtenidos con el modelo de Zomosa-Signoret y colaboradores.

Las posiciones importantes en la región 1 son 18, 23, 26, 32, 33 y 34, mientras que las posiciones para la región dos son 43, 46, 48, 49, 53, 56 y 57. Los residuos para obtener un comportamiento tipo TbTIM son los residuos Q18, Q19, S20, S22, E23, D26 de la R1 y en la R2 fueron los residuos S43, V46, L48, A49, E53, S56 y H57, mientras que para obtener un comportamiento tipo TcTIM, los residuos involucrados son: R1 E18, P23, E26, T32, F33, D34, y en la R2 P43, L46, I48, P49, A53, T56 y N57. Esto solo es válido para el proceso de replegamiento luego de desnaturalizar a la enzima con clorhidrato de guanidina a una temperatura de 25 °C.

Los residuos presentes en las asas internas son los que controlan el proceso de dimerización, mientras que las asas externas brindan estabilidad al dímero durante la transición entre dímero intermediario a dímero nativo, evitando la agregación durante el replegamiento.

10. Perspectivas

La siguiente pregunta que se busca contestar es saber si estas mismas regiones y residuos también se encuentran relacionados con el desplegamiento de estas enzimas. Como se mencionó, los patrones de desplegamiento para estas dos enzimas se encuentran ampliamente estudiados y se han encontrado pequeñas diferencias entre ambas rutas. Una de las diferencias más importantes es la presencia de un intermediario de plegamiento presente en TcTIM (el cual tiene características particulares como aumento en la cantidad de estructura secundaria cuando es detectado por DC), y también un incremento en la intensidad de fluorescencia con respecto a la enzima silvestre que no se encuentra presente en la ruta de plegamiento de TbTIM.

En estudios de Ch3nez-C3rdenas y colaboradores (Ch3nez-C3rdenas *et al.*, 2005), se encontr3 que el intermediario de TcTIM se encuentra estabilizado a concentraciones bajas de Gdn-HCl 0.1-1 M. En un espectro de fluorescencia, en este intervalo de concentraciones, TcTIM muestra mayor intensidad de fluorescencia que la enzima sin agente caotr3pico. En el caso de TbTIM, no hay variaci3n de la se3al en este rango de concentraciones (figura 24). Como un primer acercamiento para saber si las regiones 1 y 2 est3n relacionadas con la presencia de este intermediario, se realiz3 la desnaturalizaci3n de la mutante de TcTIM1;TbTIM2-8, la cual mayoritariamente es TbTIM con s3lo la regi3n 1 de TcTIM observ3ndose la presencia de dicho intermediario, indicando as3 que esta regi3n se encuentra involucrada en el proceso de desplegamiento (figura 25).

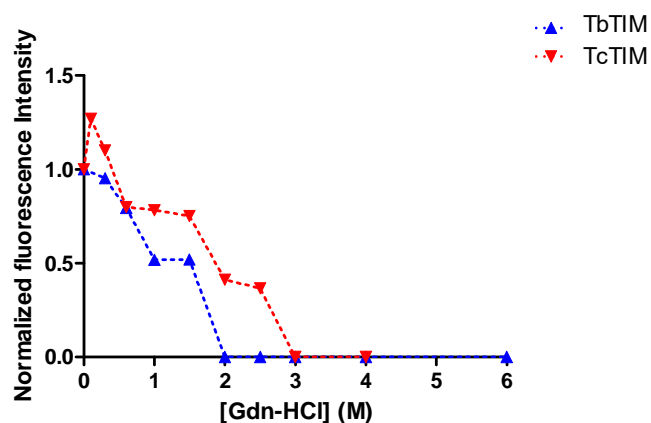


Figura 24.- Cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca a distintas concentraciones de Gdn-HCl. Las muestras fueron incubadas a una concentración de 50 µg/mL durante 48 h a 25°C con diferentes concentraciones de Gdn-HCl. Los datos fueron normalizados como lo menciona Ch3nez-C3rdenas y colaboradores en 2005.

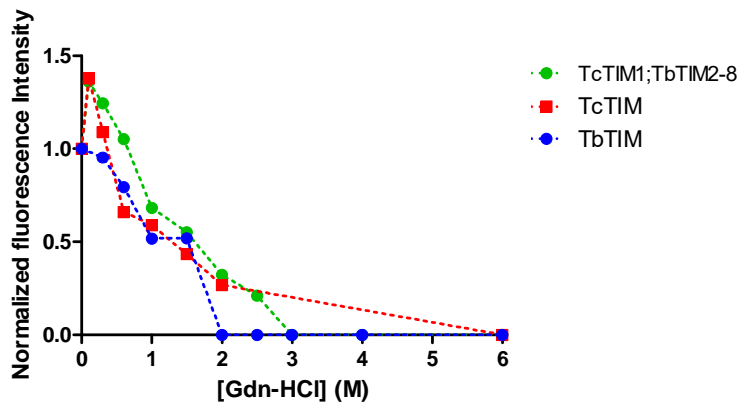


Figura 25.- Cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca a distintas concentraciones de Gdn-HCl. Las muestras fueron incubadas a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 h a 25°C con diferentes concentraciones de Gdn-HCl. Los datos fueron normalizados como lo menciona Chánez-Cárdenas y colaboradores en 2005.

11.0. Referencias bibliográficas

(<http://www.uniprot.org/uniprot/P24941>)

1. Afinsen CB., Haber E., Sela M., White FH Jr. (1961). The kinetics of formation of the native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **47**:1309-1314.
2. Alber TC., Davenport RC., Giammona DA., Lolis E., Petsko GA., Ringe D. (1987) Crystallography and site-directed mutagenesis of yeast triosephosphate isomerase: what can we learn about catalysis from a “simple” enzyme? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **52**:603-613.
3. Albert T., Banner DW., Bloomer AC., Petsko GA., Phillips D., Rivers PS., Wilson IA. (1981) On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosephosphate isomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **293** (1063):159-171.
4. Álvarez G., Martínez J., Varela J., Birriel E., Cruces E., Gabay M., Leal SM., Escobar P., Aguirre-López B., Cabrera N., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R, Yaluff G., Torres S., Serna E., Vera de Bilbao N., González M., Cerecetto H. (2015) Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo. *Eur J Med Chem* **100**:246-256.
5. Banner DW., Bloomer AC., Petsko GA., Phillips DC., Pogson CI., Wilson IA., Corran PH., Furth AJ., Milman JD., Offord RE., Priddle JD., Waley SG. (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255** (5510):609-614.
6. Bar-Even A., Flamholz A., Noor E., Milo R. (2012) Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat Chem Biol*. **8** (6):509-517.
7. Bandyopadhyay D., Murthy MR., Balaram H., Balaram P. (2015) Probing the role of highly conserved residues in triosephosphate isomerase –analysis of site specific mutants at positions 64 and 75 in the plasmodial enzyme. *FEBS J* **282** (20):3863-3882.

8. Beaucamp N., Schuring H., Jaenicke R. (1997) The PGK-TIM fusion protein from *Thermotoga maritime* and its constituent parts are intrinsically stable and fold independently. *Biol Chem.* **378** (7):679-685.
9. Beranova-Giorgianni S., Zhao Y., Desiderio DM., Giorgianni F. (2006) Phosphoproteomic analysis of the human pituitary. *Pituitary* **9** (2):109-120.
10. Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Gallo Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**: W252-8.
11. Cha B., Jho EH. (2012) Protein arginine methyltransferases (PRMTs) as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* **16** (7):651-664.
12. Chánez-Cárdenas ME., Fernández-Velso DA., Vázquez-Contreras E., Coria R., Saab-Rincón G., Pérez-Montfort R. (2002) Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch Biochem Biophys.* **399** (2):117-129.
13. Chánez-Cárdenas ME., Pérez-Hernández G., Sánchez-Rebollar BG., Costas M., Vázquez-Contreras E. (2005) Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* **44** (32):10883-10892.
14. Davenport RC., Bash PA., Seanton BA., Karplus M., Petsko GA., Ringe D. (1991) Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* **30**(24): 5821-5826.
15. Dephoure N., Zhou C., Villén J., Beausoleil SA., Bakalarski CE., Elledge SJ., Gygi SP. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105** (31):10762-10767.
16. Dietmar Sterverding (2014) The history of Chagas disease. *Parasit Vectors* **7**:317.
17. Dobson CM. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426** (6968): 884-890.
18. Faber GK., Petsko GA. (1990) The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci.* **15** (6):228-234.
19. Feige MJ., Hendershot LM., Buchner J. (2010) How antibodies fold. *Trends Biochem Sci.* **35**(4): 189-198.

20. García Torres Itzhel. (2006) Producción y caracterización de una triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* con la interfase de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular. México.
21. García-Torres I., Cabrera N., Torres-Larios A., Rodríguez-Bolaños M., Díaz-Mazariegos S., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R. (2011) Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *Plos One* **6** (4):e18791.
22. García Torres Itzhel. (2012) Quimeras de la triosafosfato isomerasa: Transformación progresiva de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* en la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (tesis para obtener el grado de doctorado en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular. México.
23. Garza-Ramos G., Cabrera N., Saavedra-Lira E., Tuena de Gómez-Puyou M., Ostoa-Saloma P., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* **253** (3): 684-691.
24. Gavrilov Y., Dagan S., Lavy Y. (2015) Shortening a loop can increase protein native state entropy. *Proteins* **83** (12): 2137-2146.
25. Gayathri P., Banerjee M., Vijayalakshmi A., Azeez S., Balaram H., Balaram P., Murthy MR. (2007) Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **63** (Pt2): 206-220.
26. Gidalevitz T., Ben-Zvi A., Ho KH., Brignull HR., Morimoto RI. (2006) Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* **311** (5766): 1471-1474.
27. Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga RA., Rojo-Domínguez A., Pérez-Montfort R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol.* **2**(12):847-855.
28. Gruber T., Balbach J. (2015) Protein folding mechanism of the dimeric amphiphysin II/Bin 1 N-BAR domain. *Plos One.* **10** (9): e0136922.

29. Guex N., Peitsch MC., Schwede T. (2009) Automated comparative structure modelling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*. **30** (Suppl 1): S162-S173.
30. Hall A., Knowles JR. (1975) The uncatalyzed rates of enolization of dihydroxyacetone phosphate and of glyceraldehyde 3-phosphate in neutral aqueous solution. The quantitative assessment of the effectiveness of an enzyme catalyst. *Biochemistry* **14** (19): 4348-4353.
31. Hernández-Alcántara G., Garza-Ramos G., Hernández GM., Gómez-Poyou A., Pérez-Montfort R. (2002) Catalysis and stability of the triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* **41** (13):4230-4238.
32. Höcker B., Jürgens C., Wilmanns M., Sterner R. (2001) Stability, catalytic versatility, and evolution of the (Beta-alpha)(8)-barrel fold. *Curr Opin Biotechnol*. **12** (4):376-381.
33. Imami K., Sugiyama N., Kyono Y., Tomita M., Ishihama Y. (2008) Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nano LC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. *Anal Sci*. **24** (1):161-166.
34. Jung J., Yoon T., Choi EC., Lee K. (2002) Interaction of cofilin with triose-phosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na,K-ATPase via Rho-mediated signaling pathway. *J Biol Chem*. **277** (50):48931-48937.
35. Katebi AR., Jernigan RL. (2014) The critical role of the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics, and functionality. *Protein Sci*. **23** (2):213-228.
36. Kim C., Lim Y., Yoo BC., Won NH., Kim S., Kim G. (2010) Regulation of post-translational protein arginine methylation during HeLa cell cycle. *Biochim Biophys Acta*. **1800** (9):977-985.
37. Kishan R. ZeelenJP., Noble ME., Borchert TV., Mainfroid V., Goraj K., Martial JA., Wierenga RK. (1994) Modular mutagenesis of a TIM-barrel enzyme: the crystal structure of chimeric *E. coli* TIM having the eighth beta alpha-unit replaced by the equivalent unit of chicken TIM. *Protein Eng* **7**(8):945-951.
38. Knowles JR. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **350** (6314):121-124.

39. Lee WH., Choi JS., Byun MR., Koo KT., Shin S., Lee SK., Surh YJ. (2010) Functional inactivation of triosephosphate isomerase through phosphorylation during etoposide-induced apoptosis in HeLa cell: potential role of Cdk2. *Toxicology* **278** (2):224-228.
40. Lesk AM., Bränden CI., Chothia C. (1989) Structural principles of alpha/beta barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins* **5** (2):139-148.
41. Liao Q., Kulkarni Y., Sengupta U., Petrovic D., Mulholland AJ, Van der Kramp MW., Strodel B, Kamerlin SCL. (2018) Loopmotion in triosephosphate isomerase is not a simple open and shut case. *J Am Chem Soc* **140** (46): 15889-15903.
42. Lincet H., Icard P. (2015) How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene* **34** (29):3751-3759.
43. Lolis E., Alber T., Davenport RC., Rose D., Hartman FC., Petsko GA. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **29** (28):6609-6618.
44. Maes D., Zeelen JP., Thanki N., Beaucamp N., Alvarez M., Thi MH., Backmann J., Martial JA., Wyns L., Jaenicke R., Wierenga RK. (1999) The crystal structure of triose phosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima* : a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* **37**(3):441-453.
45. Maldonado E., Soriano-García M., Moreno A., Cabrera N., Garza-Ramos G., de Gómez-Puyou M., Gómez Puyou A., Pérez-Montfort R., (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol.* **283** (1):193-203.
46. O'Donoghue AC., Amyes TL., Richard JP. (2005) Hydron transfer catalyzed by triosephosphate isomerase. Products of isomerization of (R)-glyceraldehyde 3-phosphate in D₂O. *Biochemistry* **44** (7): 2622-2631.
47. Osterman A. (2009) Biogenesis and homeostasis of nicotinamide adenine dinucleotide cofactor. *EcoSal Plus* **3**(2). doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.10.
48. Pérez-Montfort R., Garza-Ramos G., Alcántara GH., Reyes-Vivas H., Gao XG., Maldonado E., de Gómez-Puyou MT., Gómez-Puyou A. (1999) Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* **38** (13): 4114–4120.

49. Pompliano DL., Peyman A., Knowles JR. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **29**(13): 3186-3194.
50. Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Mendoza-Hernández G., López-Velázquez G., Pérez-Montfort R., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez-Puyou A. (2002) Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins* **48** (3): 580–590.
51. Rivas G., Ferrone F., Herzfeld, J. (2004). Life in a crowded world. *EMBO Rep.* **5**(1): 23–27.
52. Rodríguez-Almazán C., Arreola R., Rodríguez-Larrea D., Aguirre-López B., de Gómez-Puyou MT., Pérez-Montfort R., Costas M., Gómez-Puyou A., Torres-Larios A. (2008) Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alteration of conserved water network at the dimer interface. *J Biol Chem.* **283** (34):23254-23263.
53. Rodríguez Bolaños Mónica. (2012) Análisis de dos regiones que afectan el repliegamiento de las triosafosfato isomerasas de *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* por medio de mutantes (tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Fisiología Celular. México.
54. Roland PB., Stuchul KA., Larsen SB., Amrich CG., Vandemark AP., Celotto AM., Palladino MJ. (2013) Evidence of a triosephosphate isomerase non-catalytic function crucial to behavior and longevity. *J Cell Sci.* **126** (14): 3151-3158.
55. Rozovsky S., McDermott AE. (2001) The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* **310**(1):259-270.
56. Schägger H.(1994) A practical guide to membrane protein purification. Denaturing electroforetic techniques. Frankfurt, Germany. Academic Press.
57. Schliebs W., Thanki N., Eritja R., Wierenga R. (1996) Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* **5** (2): 229-239.
58. Senske M., Constantinescu-Aruxandei D., Havenith M, Herrmann C., Weingärtner H., Ebbinghaus S. (2016). The temperature dependence of the Hofmeister series: thermodynamic fingerprints of cosolute–protein interactions. *Phys Chem Chem Phys.* **18** (43): 29698–29708.

59. Viguera AR., Serrano L. (1997) Loop length, intramolecular diffusion and protein folding. *Nat Strct Biol.* **4** (11): 939-946.
60. Viguera Meneses Liliana Guadalupe.(2010) Caracterización de la cinética de reactivación de las quimeras de la Triosafosfato isomerasa de Trypanosoma cruzi y Trypanosoma brucei (tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Fisiología Celular. México.
61. Walden H., Bell GS., Russell RJ., Siebers B., Hensel R., Taylor GL. (2001) Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* **306** (4):745-757.
62. Wierenga RK. (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492** (3):193-198.
63. Wierenga RK., Kapetanidou EG., Venkatesan R. (2010) Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci.* **67** (23):3961-3982.
64. Wierenga RK., Noble ME., Vriend G., Nauche S., Hol WG. (1991) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in presence of 2.4 M Ammonium sulphate. A comparison with structure of trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J Mol Biol.* **220** (4):995-1015.
65. Zárate Pérez F., Chánez-Cárdenas ME., Arreola R., Torres-Larios A., Vázquez-Contreras E. (2009) Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. *Biochem Biophys Res Commun.* **382**(3):626-630.
66. 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. (2003) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* **42** (11): 3311-3318.

12.0. Artículos producidos durante el doctorado



Cite this article: Rodríguez-Bolaños M, Cabrera N, Perez-Montfort R. 2016 Identification of the critical residues responsible for differential reactivation of the triosephosphate isomerases of two trypanosomes. *Open Biol.* **6**: 160161. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160161>

Received: 1 June 2016

Accepted: 20 September 2016

Subject Area:

biochemistry/biophysics

Keywords:

triosephosphate isomerase, critical residues, reactivation, protein folding, guanidine hydrochloride, site-directed mutagenesis

Author for correspondence:

Ruy Perez-Montfort

e-mail: ruy@ifc.unam.mx

[†]This paper is dedicated to the memory of Dr Armando Gómez-Puyou.

Identification of the critical residues responsible for differential reactivation of the triosephosphate isomerases of two trypanosomes

Monica Rodríguez-Bolaños, Nallely Cabrera and Ruy Perez-Montfort[†]

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, 04510 México DF, México

RP-M, 0000-0003-0810-1159

The reactivation of triosephosphate isomerase (TIM) from unfolded monomers induced by guanidine hydrochloride involves different amino acids of its sequence in different stages of protein refolding. We describe a systematic mutagenesis method to find critical residues for certain physico-chemical properties of a protein. The two similar TIMs of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* have different reactivation velocities and efficiencies. We used a small number of chimeric enzymes, additive mutants and planned site-directed mutants to produce an enzyme from *T. brucei* with 13 mutations in its sequence, which reactivates fast and efficiently like wild-type (WT) TIM from *T. cruzi*, and another enzyme from *T. cruzi*, with 13 slightly altered mutations, which reactivated slowly and inefficiently like the WT TIM of *T. brucei*. Our method is a shorter alternative to random mutagenesis, saturation mutagenesis or directed evolution to find multiple amino acids critical for certain properties of proteins.

1. Introduction

It is generally anticipated that proteins with very similar sequences will also exhibit similar functional and physico-chemical properties. Although this is commonly true, some proteins that have a high sequence identity and great functional and structural similarity can have important quantitative differences in some physico-chemical properties such as protein folding or protein reactivation. Such is the case for the triosephosphate isomerases (TIMs) from *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. These two trypanosomes diverged around 100 million years before the present [1] and thus many of their proteins have high similarity in their sequences. In the case of their TIMs, they have 73.9% identity and a sequence similarity of 92.4%. The three-dimensional structures for both enzymes have been determined and they superpose with an RMSD of 0.96 Å. TIM is the prototype of the (β/α)₈ barrel fold family of proteins. It is a homodimer and, even though each monomer contains the three amino acids of the catalytic site—K13, H95 and E167, using the numbering of the sequence of TIM from *T. brucei* (TbTIM)—it is active only in the dimeric form. TbTIM has a sequence of 250 amino acids, and TIM from *T. cruzi* has a sequence of 251 amino acids. For simplification purposes, the numbering of the sequence of TbTIM is used in this work. We have previously reported that TbTIM and TcTIM show quantitative and qualitative differences in their susceptibility to digestion with subtilisin [2] and quantitative differences in their susceptibility to several low molecular weight agents [3], and in particular to sulfhydryl reagents [4–8]. Another quantitative difference has been reported in their velocity and extent of reactivation from guanidine chloride (GdnHCl) unfolded monomers [9].

The denaturation pathway of TIM from several species has been widely studied [10–13]. Several papers describe it as a three-state process [11,13] in

which first the dimers dissociate into monomers that have no catalytic activity but retain considerable tertiary structure, and afterwards the monomers unfold completely. The reactivation of TIM from GdnHCl unfolded monomers has also been studied [9,14–16]. In this case, and in particular for TbTIM and TcTIM, the monomers refold upon the removal of the denaturant and subsequently form an intermediate dimer that undergoes internal rearrangements to yield the native and active dimer. This three-state process occurs in both enzymes and despite their great sequence similarity, the reactivation of TcTIM is two to three times faster and approximately 30% more efficient than for TbTIM [9].

In this work, we used a new method, based on the one previously described by García-Torres *et al.* [17], of progressive grafting of different portions of one of these two homologous proteins to the equivalent region of the other protein, to identify the parts of the TIMs that participate in the quantitative differences observed in the reactivation of both proteins. The strategy also used ‘additive’ and systematic site-directed mutagenesis to identify the role of individual amino acids involved in the occurrence, control, extent and speed of the differences in reactivation shown by these two proteins. In the end, we were able to produce an enzyme with 95% of the sequence of TbTIM that had 13 mutations within the first 60 amino acids of that sequence, which had a reactivation behaviour comparable with (and even slightly more efficient than) that of wild-type (WT) TcTIM. We were also able to produce another enzyme with 95% of the sequence of TcTIM with slightly different mutations, also in the first 60 amino acids of its sequence, which had a slow and inefficient reactivation pattern comparable to that of WT TbTIM. Our experiments allowed us to pinpoint all the amino acids that are critical for this quantifiable physico-chemical behaviour.

2. Material and methods

2.1. Design of the genes of chimeric proteins and production of ‘additive’ mutants

The design of the genes for the chimeric proteins was described in detail by García-Torres *et al.* [17]. Briefly, the DNA sequences X03921 for TbTIM and U53867 for TcTIM were used to construct the chimeric proteins. The sequences of TbTIM and TcTIM were divided into eight regions, roughly encompassing one beta sheet one loop and one alpha helix (for the exact distribution, see figure 1 in [17]). Thus, initially, six chimeric enzymes were constructed. The nomenclature used in this work for the chimeric proteins is as follows: TcTIM1–6;TbTIM7,8 has the sequence of regions 1–6 of TcTIM, and the sequence of regions 7 and 8 of TbTIM; or TcTIM1,2;TbTIM3–8 has the sequence of regions 1 and 2 of TcTIM and the sequence of regions 3–8 of TbTIM, etc. (table 1a). The genes, for chimeras TcTIM1–6;TbTIM7,8, TcTIM1–5;TbTIM6–8, TcTIM1–4;TbTIM5–8, TcTIM2–8;TbTIM1, TcTIM1,3–8;TbTIM2 and TcTIM2;TbTIM1,3–8, were synthesized by GENSCRIPT (Piscataway, NJ). Other chimeras used in this work, which include TcTIM1–3;TbTIM4–8, TcTIM1,2;TbTIM3–8 and TcTIM1;TbTIM2–8, were made as described by García-Torres *et al.* [17]. The gene of chimeric protein TcTIM3–8;TbTIM1,2 was made with three PCRs using Accuzyme DNA polymerase (Bioline, Taunton, MA). In the first reaction, regions 1 and 2 of the

sequence of TbTIM were amplified, using the DNA of WT TbTIM and the sequences of the T7 promoter and the sequence 5'TGC GGC AAT CTG GAA CTT GGG GTG TGA AAG ACG3' (Rv Tc3–8;Tb1,2) as internal initiator. In the second reaction, the sequences of T7 terminator and 5'TCA CAC CCC AAG TTC CAG ATT GCC GCA3' (Fw Tc3–8;Tb1,2) were used with the DNA of WT TcTIM as template. Finally, in the third reaction, the products of PCR1 and PCR2 were combined, using the sequences of T7 promoter and T7 terminator as external oligonucleotides.

The DNA of two of these chimeras (TcTIM1;TbTIM2–8 and TcTIM1,3–8;TbTIM2) were used as templates for the production of ‘additive’ mutants of regions 1 and 2, respectively (table 1b,c). These mutants were produced by site-directed mutagenesis using Vent DNA polymerase (Stratagene, CA) and the oligonucleotides listed in table 2.

The nomenclature used for these additive mutants has the general form RXMX, where R is the region in which the mutant occurs and M is the number of additive mutants it has. Thus, mutant R1M1 has one mutation in region 1 and mutant R2M5 has five additive mutations in region 2.

2.2. Expression and purification of the chimeric proteins and the mutants

All the genes of the chimeric enzymes and the mutants were cloned into the pET-3a vector (Novagen, WI) with *NdeI* and *BamHI* restriction sites, and subsequently sequenced. Each gene was transformed into *Escherichia coli* BL21-Codon Plus (DE3) RIL cells (Novagen, WI).

Bacteria containing the plasmids with each of the mutant genes were grown in Luria–Bertani medium supplemented with 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin and were incubated at 37°C until the cell cultures reached an $A_{600\text{ nm}} = 0.6$. The bacteria were induced with a final concentration of 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), and the cells were incubated 12 h longer at 30°C before harvesting them.

Harvested bacteria were centrifuged for 15 min at 6400g and resuspended in 30 ml of lysis buffer (100 mM MES, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 300 mM NaCl, pH 6.3). Each suspension was sonicated at a potency of 5 W for 10 times 1 min with 2 min rest between each cycle. The sonicated suspensions were centrifuged at 203 500g for 60 min. The supernatant of each chimeric enzyme or mutant was diluted until the final concentration of NaCl was 20 mM and was then applied to a SP Sepharose Fastflow column that had been previously equilibrated with buffer A (50 mM MES pH 6.3). The protein was eluted using a NaCl linear gradient with buffer B (50 mM MES, NaCl 500 mM pH 6.3). Crystalline ammonium sulfate was gradually added up to 70% (w/v) saturation under agitation to the fractions containing TIM. This suspension was further agitated for 16 h and then centrifuged for 15 min at 35 000g. The precipitate was resuspended into 3 ml of buffer C (100 mM triethanolamine (TEA), 10 mM EDTA, pH 7.4), and enough ammonium sulfate was added to have a final concentration of 2.2 M. The protein was then applied to a hydrophobic interaction column of butyl toyopearl that had been previously been equilibrated with buffer D (100 mM TEA, 10 mM EDTA and 2 M ammonium sulfate). The protein was eluted with a linear gradient of 2 to 0 M of ammonium sulfate. The fractions containing TIM

Table 1. (a) Diagram of the composition of the chimeric enzymes of TbTIM and TcTIM. The name and the corresponding regions of TbTIM and TcTIM are indicated. In the bar diagram at the right, blue bars show TbTIM regions, and orange bars show TcTIM regions. (b) Diagram of the composition of the additive mutants of TbTIM and TcTIM. Additive mutants of region 1 were made using chimera TcTIM 1;TbTIM2–8 as a template. Different amino acids in region 1 were mutated in an additive manner. The dot diagram at the right depicts the 13 different amino acids in region 1; blue dots correspond to TbTIM residues and orange dots correspond to TcTIM residues. For the two site-directed mutants at the bottom of the table chimera TbTIM 1,3–8; TcTIM2 was used as template and the individual mutations of the different amino acids of region 1 are shown. The asterisks indicate that the mutations for the two site-directed mutants are not additive. Blue dots correspond to TbTIM residues and orange dots correspond to TcTIM residues. (c) Diagram of the composition of the additive mutants of TbTIM and TcTIM for region 2. Chimera TcTIM 1,3–8;TbTIM2 was used as a template and the seven different amino acids were mutated in an additive manner. The dot diagram at the right depicts the seven different amino acids in region 2; blue dots correspond to TbTIM residues and orange dots correspond to TcTIM residues.

(a) chimera	regions of TcTIM	regions of TbTIM	scheme
TcTIM 1–6;TbTIM7–8	1–6	7–8	
TcTIM 1–5;TbTIM6–8	1–5	6–8	
TcTIM1–4;TbTIM5–8	1–4	5–8	
TcTIM1–3;TbTIM4–8	1–3	4–8	
TcTIM1,2;TbTIM3–8	1–2	3–8	
TcTIM1;TbTIM2–8	1	2–8	
TcTIM2–8;TbTIM1	2–8	1	
TcTIM2;TbTIM1,3–8	2	1,3–8	
TcTIM1,3–8;TbTIM2	1,3–8	2	
TcTIM3–8;TbTIM1,2	3–8	1,2	
(b) mutant	no. additive mutations in region 1	regions of TbTIM	scheme of different amino acids in region 1
R1M1	1	2–8	
R1M2	2	2–8	
R1M3	3	2–8	
R1M4	4	2–8	
R1M5	5	2–8	
R1M6	6	2–8	
R1M7	7	2–8	
R1M8	8	2–8	
R1M9	9	2–8	
R1M10	10	2–8	
R1M11	11	2–8	
R1M12	12	2–8	
R1M13	13	2–8	
TcTIM 2;TbTIM1,3–8 R1 Q18E, S32T,I33F, N34D	4*	1,3–8	
TcTIM 2;TbTIM1,3–8 R1Q18E,E23P,D26E,S32T,I33F, N34D	6*	1,3–8	
(c) mutant	no. additive mutations in region 2	regions of TcTIM	scheme of different amino acids in region 2
R1M1	1	1,3–8	
R1M2	2	1,3–8	
R1M3	3	1,3–8	
R1M4	4	1,3–8	
R1M5	5	1,3–8	
R1M6	6	1,3–8	
R1M7	7	1,3–8	

Table 2. Oligonucleotides used for the additive mutagenesis and the site-directed mutagenesis of regions 1 and 2. For additive mutations, the DNA template of the additive mutant immediately preceding it was used.

mutant	FW primer	RV primer
R1M1	5' TGC AAC GGC TCC CAG AGT TTG CTT GTA 3'	5' TAC AAG CAA ACT CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M2	5' TGC AAC GGC TCC CAG CAG TTG CTT GTA CCA 3'	5' TGG TAC AAG CAA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M3	5' TGC AAC GGC TCC CAG CAG TCT CTT GTA CCA 3'	5' TGG TAC AAG AGA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M4	5' TGC AAC GGC TCC CAG CAG TCT TTG TCT GAG CTC ATC GAT ACG CTC 3'	5' GAG CGT ATC GAT GAG CTC AGA CAA AGA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M5	5' GAG CGT ATC GAT GAG CTC AGA CAA AGA CTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'	5' GAG CGT ATC GAT GAG CTC AGA CAA AGACTG CTG GGA GCC GTT GCA 3'
R1M6	5' TCT TTG TCT GAG CTC ATT GAT ACG CTC 3'	5' GAG CGT ATC AAT GAG CTC AGA CAA AGA 3'
R1M7	5' GAG CTC ATT GAT CTG CTC AAT GCA GCG 3'	5' CGC TGC ATT GAG CAG ATC AAT GAG CTC 3'
R1M8	5' CTC ATT GAT CTG TTT AAT GCA GCG ACT 3'	5' AGT CGC TGC ATT AAA CAG ATC AAT GAG 3'
R1M9	5' GAT CTG TTT AAT TCC GCG ACT TTT GAT 3'	5' ATC AAA AGT CGC GGA ATT AAA CAG ATC 3'
R1M10	5' GAT CTG TTT AAC TCC ACA ACT TTT GAT CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG ATC AAA AGT TGT GGA GTT AAA CAG ATC 3'
R1M11	5' GAT CTG TTT AAC TCC ACC AGC TTT GAT CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG ATC AAA GCT GGT GGA GTT AAA CAG ATC 3'
R1M12	5' AAC TCC ACA AGC ATC GAT CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG ATC GAT GCT TGT GGA GTT 3'
R1M13	5' AAC TCC ACA AGC ATC AAC CAC GAT GTG CAA 3'	5' TTG CAC ATC GTG GTT GAT GCT TGT GGA GTT 3'
R1M13 Δ ALA2	5' CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG TCC AAG CCA CAA CCC ATC GC 3'	5' GCG ATG GGT TGT GGC TTG GAC ATA TGT ATA TCT CCT TCT TAA AG 3'
TcTIM2;TbTIM1,3–8 R1Q18E, E23P,D26E,S32T,I33F,N34D	5' TTT AAC TCC ACA ACC TTT GAT CAC GAC GTG CAA 3'	5' TTG CAC GTC GTG ATC AAA GGT TGT GGA GTT AAA 3'
TcTIM 2;TbTIM1,3–8 R1Q18E, S32T,I33F,N34D	5' TTT AAC TCC ACA ACC TTT GAT CAC GAC GTG CAA 3'	5' TTG CAC GTC GTG ATC AAA GGT TGT GGA GTT AAA 3'
R2M1	5' GTG CAA TGC GTA GTG GCC CCG ACC TTT GTT CAC CTT GCC ATG 3'	5' CAT GGC AAG GTG AAC AAA GGT CGG GGC CAC TAC GCA TTG CAC 3'
R2M2	5' CAA TGC GTA GTG GCC CCG ACC TTT CTG CAC CTT GCC ATG ACC 3'	5' GGT CAT GGC AAG GTG CAG AAA GGT CGG GGC CAC TAC GCA TTG 3'
R2M3	5' TGC GTA GTG GCC CCG ACC TTT CTG CAC ATC GCC ATG ACC AAG 3'	5' CTT GGT CAT GGC GAT GTG CAG AAA GGT CGG GGC CAC TAC GCA 3'
R2M4	5' GTA GTG GCC CCG ACC TTT CTG CAC ATC CCG ATG ACC AAG GAG 3'	5' CTC CTT GGT CAT CGG GAT GTG CAG AAA GGT CGG GGC CAC TAC 3'
R2M5	5' CAC ATC CCA ATG ACG AAG GCG CGT CTT TCA CAC CCC AAA 3'	5' TTT GGG GTG TGA AAG ACG CGC CTT CGT CAT TGG GAT GTG 3'
R2M6	5' ACG AAG GCG AGG CTC ACC CAC CCC AAA TTT GTG 3'	5' CAC AAA TTT GGG GTG GGT GAG CCT CGC CTT CGT 3'
R2M7	5' ACG AAG GAG CGT CTT ACC AAC CCC AAA TTT GTG ATT GCG 3'	5' AAT CAC AAA TTT GGG GTT GGT AAG ACG CGC CTT CGT 3'

were pooled and concentrated. Protein concentration was determined at 280 nm, using an extinction coefficient $\epsilon = 34\,950\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

There were some differences in the expression and purification of chimeric enzyme TcTIM1,3–8;TbTIM2 and a mutant derived from it: TcTIM1,3–8;TbTIM2(S43P). They were transformed into *E. coli* Origami B (DE3) and were also grown in Luria–Bertani medium supplemented with $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin, $34\ \mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol, $12.5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline and $15\ \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin. These cells were incubated at 37°C until they reached an $A_{600\text{ nm}} = 0.6$ and then induced with $0.5\ \text{mM}$ IPTG. They were further incubated for 24 h at 15°C before harvesting them.

Their purification followed the same steps as those of the other chimeric proteins and mutants until after the cationic exchange column. These proteins were then concentrated and applied to a Superdex 75 gel filtration column previously equilibrated with $100\ \text{mM}$ TEA, $10\ \text{mM}$ EDTA pH 7.4. The fractions containing protein from this column were concentrated and kept until further use.

2.3. Activity assays

Enzyme activity was measured following the conversion of DL-glyceraldehyde 3-phosphate (D,L-GAP) to dihydroxyacetone phosphate using α -glycerolphosphate dehydrogenase (α -GDH) as coupling enzyme at 25°C [17]. The oxidation of NADH was monitored at 340 nm, and the reaction mixture had $10\ \text{mM}$ TEA, $10\ \text{mM}$ EDTA, $1\ \text{mM}$ GAP, $0.2\ \text{mM}$ NADH and $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ α -GDH. The reaction was started by adding $5\ \text{ng ml}^{-1}$ of the corresponding protein. To calculate kinetic parameters, GAP concentration was varied between 0.05 and $2\ \text{mM}$, and the data were adjusted to the Michaelis–Menten model.

2.4. Denaturation and reactivation

The enzymes were denatured by incubation of $0.5\ \text{mg}$ of protein ml^{-1} at 25°C for 1 h in $100\ \text{mM}$ TEA, $10\ \text{mM}$ EDTA, $1\ \text{mM}$ DTT and $6\ \text{M}$ GdnHCl pH 7.4. For reactivation, aliquots of the latter mixture were diluted 100-fold into a buffer that contained $100\ \text{mM}$ TEA, $10\ \text{mM}$ EDTA and $1\ \text{mM}$ DTT pH 7.4. At this point, the concentration of protein was $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (183 – $186\ \text{nM}$). After diluting the proteins, aliquots were removed at different times, and activity was measured in a final volume of 1 ml of reaction mixture. In all cases, the residual concentration of GdnHCl after dilution was $60\ \text{mM}$ in the activity assay and $60\ \mu\text{M}$ in the assay mixture. Control experiments in which all enzymes were incubated with $60\ \text{mM}$ GdnHCl for the duration of the experiment showed that their activity was not affected. As stated above, activity measurements were performed at 25°C . In cases where reactivation was performed at different concentrations, a range of 10 – $500\ \text{nM}$ monomer was used.

2.5. Determination of the rate constants in the reactivation

The rate constants of the reactivation of different chimeras and mutant TIMs were calculated from assays performed at different protein concentrations. Rate constants were calculated in two ways: the first is like the one reported in

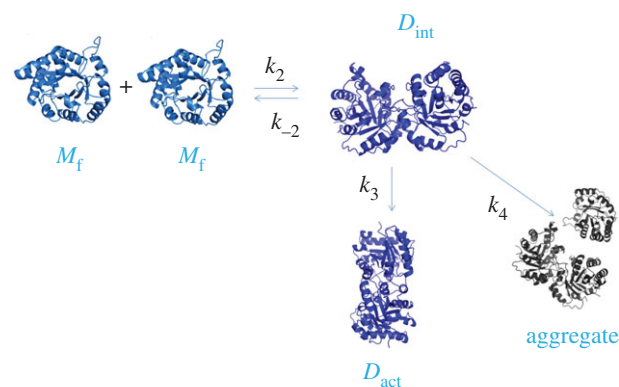
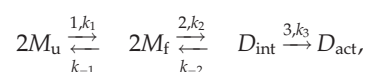


Figure 1. Model of protein folding used to calculate the velocity constants using the program DYNFIT. M represents the monomer, D_{int} represents the intermediate dimer, D_{act} represents the active dimer and aggregate represents aggregates.

Zomosa-Signoret *et al.* [9] considering the sequence of reactivation as follows:



where M_u represents the unfolded monomer, M_f the folded monomer, D_{int} the intermediate dimer and D_{act} the active dimer.

We performed an exponential fit from the plots of reactivation at different concentrations against time, to obtain the pseudo-first-order constants (equation (2.1)) that describe the formation of dimers at different enzyme concentrations

$$Y = y_0 + A_1 e^{kt}. \quad (2.1)$$

In this equation, t represents time, k the observed or pseudo-first-order constant, Y the catalytic activity, y_0 a value of activity at infinite time and A_1 represents the amplitude of the curve (activity) at time t . The values obtained for the observed constants were plotted against the protein concentration to get the second-order constants or the constants associated with the formation of the active dimer. In these cases, monomer concentrations varied between 10 and $500\ \text{nM}$ (data not shown).

Additionally, for the calculation of the velocity constants, in particular the mutants of region 2, we used DYNFIT software (from BioKin [18]). For this purpose, different models were tested to calculate the velocity constants associated with refolding. The model we chose finally is described in figure 1. This model omits the information regarding the folding of the monomers. This was because in the work of Zomosa-Signoret *et al.* [9] no differences were found in this first step between TbTIM and TcTIM. The new model also proposes an additional step in the folding process, which is aggregation, introducing a new constant k_4 . Thus, the definitions of the constants are: k_2 is the association constant of folded monomers, k_{-2} is the dissociation constant of folded monomers, k_3 is the constant for the rearrangement from intermediate dimer to active dimer and k_4 is the constant for the formation of aggregates from intermediate dimers.

The value of the constants was obtained from the best fit of the data of reactivation at different concentrations for each one of the enzymes.

2.6. Circular dichroism

Circular dichroism spectra were obtained with an AVIV 62 HDS spectropolarimeter (Lakewood, NJ) in a $0.1\ \text{mm}$ quartz cell at 25°C . The scanned wavelengths were 190 – $260\ \text{nm}$.

Table 3. Kinetic parameters of the chimeric enzymes, the additive mutants of regions 1 and 2 and of mutants obtained by site-directed mutagenesis. All data shown are the means of three independent determinations.

enzyme	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$(k_{cat}/K_m) \times 10^7$ ($M^{-1} s^{-1}$)
TcTIM	0.44 ± 0.05	6000 ± 230	1.36
TbTIM	0.45 ± 0.05	5167 ± 117	1.15
TcTIM1–6;TbTIM7–8	0.13 ± 0.01	1600 ± 83	1.23
TcTIM1–5;TbTIM6–8	0.38 ± 0.01	2583 ± 67	0.68
TcTIM1–4;TbTIM5–8	0.63 ± 0.03	5533 ± 467	0.87
TcTIM1–3;TbTIM4–8	0.58 ± 0.07	5517 ± 33	0.95
TcTIM1,2;TbTIM3–8	0.70 ± 0.02	6850 ± 431	0.96
TcTIM1;TbTIM2–8	0.45 ± 0.05	3883 ± 177	0.83
TcTIM2–8;TbTIM1	0.40 ± 0.03	6100 ± 183	1.50
TcTIM2;TbTIM1,3–8	0.51 ± 0.04	7583 ± 331	1.47
TcTIM1,3–8;TbTIM2	0.40 ± 0.03	72 ± 15	1.9×10^5
TcTIM3–8;TbTIM1,2	0.35 ± 0.05	9616 ± 305	1.65
R1M1	0.20 ± 0.03	3317 ± 163	1.66
R1M2	0.22 ± 0.02	6667 ± 285	3.00
R1M3	0.19 ± 0.05	3250 ± 273	1.71
R1M4	0.23 ± 0.04	4183 ± 258	1.82
R1M5	0.22 ± 0.04	3133 ± 233	1.42
R1M6	0.56 ± 0.02	5916 ± 8	1.04
R1M7	0.45 ± 0.04	8000 ± 236	1.77
R1M8	0.33 ± 0.06	5550 ± 466	1.68
R1M9	0.62 ± 0.06	5167 ± 300	0.84
R1M10	0.27 ± 0.07	5167 ± 431	1.91
R1M11	0.50 ± 0.04	6500 ± 268	1.03
R1M12	0.33 ± 0.07	5167 ± 116	1.56
R1M13	0.27 ± 0.05	6167 ± 305	2.28
R1M13 Δ Ala2	0.41 ± 0.03	5000 ± 219	1.21
R2M1	1.88 ± 0.53	1317 ± 44	7.0×10^5
R2M2	2.65 ± 0.44	1833 ± 122	6.9×10^5
R2M3	0.72 ± 0.04	6000 ± 422	0.83
R2M4	0.49 ± 0.05	5667 ± 355	1.16
R2M5	0.52 ± 0.03	4000 ± 165	0.76
R2M6	0.52 ± 0.04	4000 ± 210	0.76
R2M7	0.22 ± 0.06	5667 ± 365	2.16
TcTIM2;TbTIM1,3–8 R1Q18E,S32T,I33F,N34D	0.60 ± 0.13	4500 ± 585	0.75
TcTIM2;TbTIM1,3–8 R1Q18E,E23P,D26E,S32T,I33F,N34D	0.59 ± 0.07	6000 ± 434	1.01

All enzymes ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) were dialysed in phosphate buffer 10 mM, pH 7.4 and were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ membranes. The spectra show the mean of two independent enzyme preparations with three replicas.

3. Results

3.1. Kinetic characterization and secondary structure of the enzymes

The kinetic parameters and constants were determined for the WT, all chimeric and mutant enzymes, as already

stated, in the direction of G3P to DHAP (table 3). In general, the data obtained for the chimeric enzymes and the additive mutants of region 1 are similar to those of the WT enzymes. In the case of the additive mutants of region 2, some parameters showed an important variation, in which the first mutants of this region had very diminished catalytic capacity (e.g. TcTIM1,3–8;TbTIM2 and additive mutant R2M1). The subsequent additive mutants had better catalytic parameters that were similar to those of WT enzymes, starting from additive mutant R2M4.

To assess if there were any important changes in the secondary structure of the enzymes, these were subjected to circular dichroism analysis. The results indicate that they

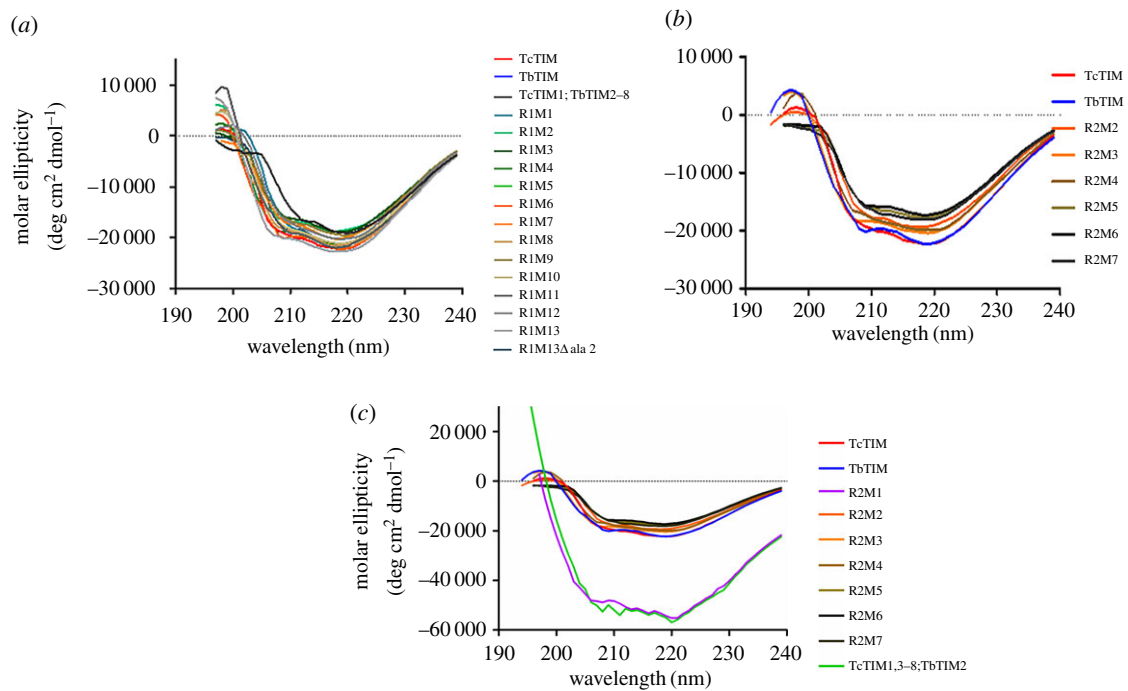


Figure 2. Circular dichroism spectra of chimeric enzymes, additive mutants and mutant enzymes. Proteins were dialysed against phosphate buffer pH 7.4, and spectra were made with 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each enzyme in the cell. (a) Spectra of additive mutants of region 1. (b) Spectra of additive mutants of region 2. (c) Comparison of spectra of chimeric enzyme TcTIM1,3-8;TbTIM2 with those of the WT enzymes and additive mutants of region 2.

correspond to a structure of a β/α barrel with two negative signals at 222 nm and another between 208 and 201 nm, and a positive signal between 190 and 195 nm. Most mutants also show that their structural profile corresponds to the TIM barrel motif, but they have slight variations in the intensity or form of the signal owing to changes in the mutagenesis [19], which generate small changes in the folding of the enzyme (figure 2). The structures with greatest variation were chimeres TcTIM1;TbTIM2-8 and TcTIM1,3-8;TbTIM2. In the case of chimer TcTIM1;TbTIM2-8, the intensity of the signal is diminished for the α -helices, which could indicate a difference in the folding of this enzyme. Catalytically, it has slightly lower values than the WT enzymes showing it has a perturbation in the catalytic site. In addition, the great majority of the additive mutants in region 1 show a K_m of about one-half of the K_m for the WT enzymes indicating that the catalytic site is also affected (table 3). In the case of the chimeric enzyme TcTIM1,3-8;TbTIM 2 and additive mutant R2M1, for which the signals of molar ellipticity are more intense than for the rest of the enzymes (figure 2c), the results are discussed below (§4.2).

3.2. Regions 1 and 2 are responsible for differences in the reactivation of monomers unfolded with GdnHCl

When the reactivation assays were performed with the chimeric enzymes produced from TbTIM and TcTIM, almost all showed an intermediate behaviour to the one seen with the WT enzymes (figure 3). However, when chimeric enzyme TcTIM1;TbTIM2-8 was tested, the reactivation was extremely poor (figure 3, green triangles) and very slow (approx. only 5% of the reactivation) when compared with chimeric enzyme TcTIM1,2;TbTIM2-8, whose reactivation was as fast and

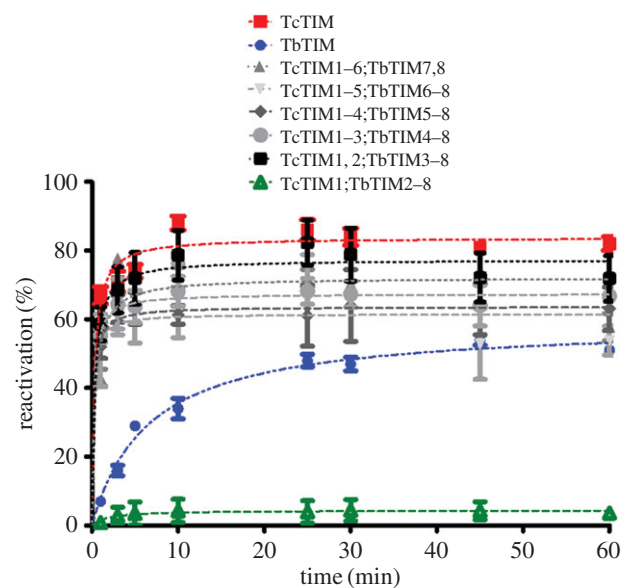


Figure 3. Reactivation of WT TbTIM, WT TcTIM and six chimeric enzymes. Proteins (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were treated with 6 M GdnHCl for 1 h at 25°C. The enzymes were then diluted 100-fold, and reactivation was measured. Results are expressed as percentage of recovered activity, where 100% is the activity of the native enzymes incubated with the residual concentration of GdnHCl (60 mM).

efficient as that of WT TcTIM (figure 3, black squares). These results meant that the different amino acids in regions 1 and 2 between the sequences of WT TbTIM and WT TcTIM were responsible for the changes observed in reactivation. These two regions have 13 and 7 differences, respectively (from a total of 20; figure 4). To ascertain that these two regions were indeed implicated in some aspect of the process of reactivation, we made a new set of chimeric enzymes with all possible combinations of regions 1 and 2.

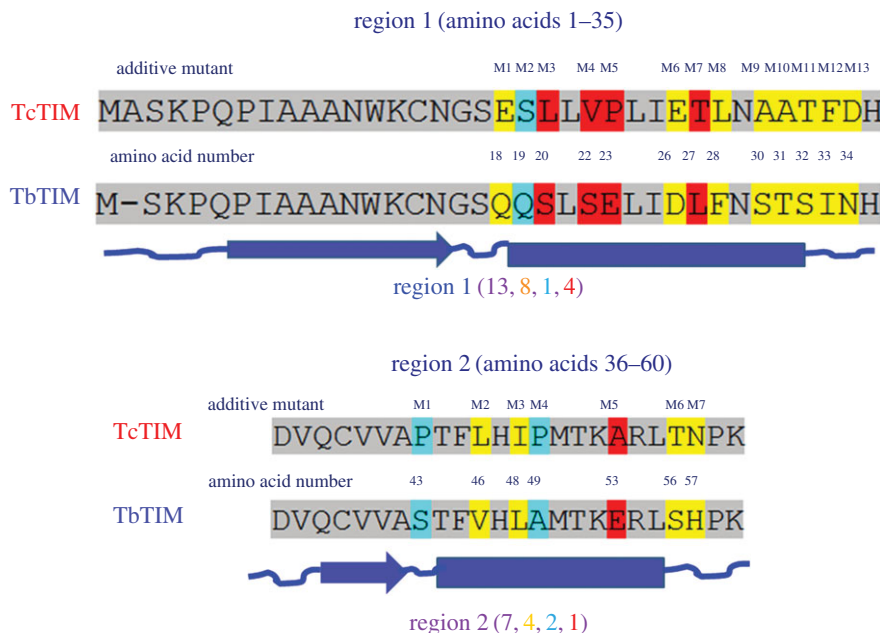


Figure 4. Aligned sequences of regions 1 and 2 of WT TbTIM and WT TcTIM. The differences in the amino acids are highlighted as conservative (similar size and polarity) in yellow, semiconservative (similar polarity) in cyan, and without similarity in red. Secondary structure elements are shown below in blue as lines (loops), arrows (beta sheets) and barrels (alpha helices).

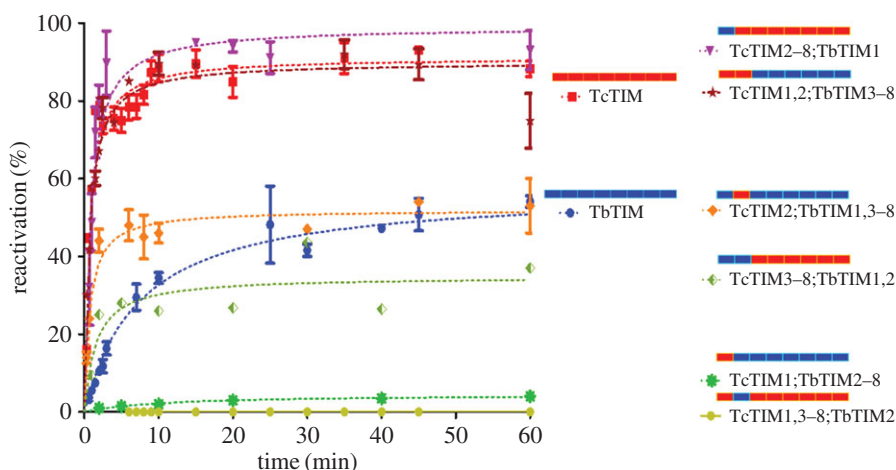


Figure 5. Reactivation of WT TbTIM, WT TcTIM and all the chimeric enzymes of regions 1 and 2. The cartoons with bars at the right represent the regions of TbTIM (blue) and TcTIM (orange) for each enzyme. Proteins ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) were treated with 6 M GdnHCl for 1 h at 25°C . The enzymes were then diluted 100-fold and reactivation was measured. Results are expressed as percentage of recovered activity, where 100% is the activity of the native enzymes incubated with the residual concentration of GdnHCl (60 mM).

3.3. Reactivation of chimeric enzymes of regions 1 and 2

The six chimeric enzymes with all possible combinations of regions 1 and 2 were assayed and the results are shown in figure 5. To test region 1, we constructed chimeric enzymes TcTIM1;TbTIM2–8 and TcTIM2–8;TbTIM1. Chimeric enzyme TcTIM1;TbTIM2–8 reactivated minimally and very slowly, whereas chimeric enzyme TcTIM2–8;TbTIM1 was 100% efficient (even better than WT TcTIM) and also very fast. On the other hand, to test region 2, we constructed chimeric enzymes TcTIM2;TbTIM1,3–8 and TcTIM1,3–8;TbTIM2. These enzymes showed two distinct behaviours, the first was shown by chimeric enzyme TcTIM2;TbTIM1,3–8, which reactivated just as fast as WT TcTIM but only partially, to the extent that TbTIM does (40%); the second was that chimeric enzyme TcTIM1,3–8;TbTIM2 did not reactivate at all.

When the remaining combinations of both regions were assayed, chimeric enzyme TcTIM1,2;TbTIM3–8 reactivated in a similar manner to WT TcTIM (90%), whereas chimeric enzyme TcTIM3–8;TbTIM1,2 reactivated somewhat less than WT TbTIM and also, like this last enzyme, did it slowly. It should be pointed out that chimeric enzyme TcTIM3–8;TbTIM1,2 was unstable and tended to dissociate at the concentration and the times used in the assays, which is why, to make its results comparable to the other proteins, the results shown for this enzyme in figure 5 are normalized against a control that did not receive the usual incubation of 1 h at 25°C .

3.4. Synergistic and antagonistic combinations of regions 1 and 2

As can be seen in figure 5, there are combinations of regions 1 and 2 that favour or hinder reactivation. The combination that

Table 4. Calculated velocity constants for additive mutants of region 2 and for some chimeric enzymes.

mutant	k_2 ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{-2} (s^{-1})	k_3 (s^{-1})	k_4 (s^{-1})
TcTIM	4.3×10^5	1.6×10^{-7}	1×10^{-3}	7.2×10^{-4}
TbTIM	0.75×10^5	1.4×10^{-7}	1.3×10^{-3}	6.4×10^{-4}
R2M1	1.4×10^7	0.9×10^{-7}	2.5×10^{-4}	2.3×10^{-3}
R2M2	1.0×10^7	1.1×10^{-7}	3.1×10^{-4}	1.3×10^{-3}
R2M3	3.5×10^5	1.0×10^{-7}	8.4×10^{-4}	5.6×10^{-4}
R2M4	4.8×10^5	1×10^{-7}	9.6×10^{-4}	7.6×10^{-4}
R2M5	1.6×10^5	1×10^{-7}	1.0×10^{-3}	8.8×10^{-4}
R2M6	2.5×10^5	1.0×10^{-7}	2.1×10^{-3}	3.2×10^{-4}
R2M7	4.7×10^5	1×10^{-7}	1.4×10^{-3}	5.2×10^{-4}
TcTIM1;TbTIM2–8	1.5×10^5	1×10^{-7}	1.2×10^{-3}	1.2×10^{-3}
TcTIM2–8;TbTIM1	1.5×10^7	9.1×10^{-7}	3.1×10^{-4}	2.3×10^{-4}
TcTIM1,2;TbTIM3–8	3.8×10^5	1.9×10^{-7}	1.0×10^{-4}	2.3×10^{-4}
TcTIM2;TbTIM1,3–8	8.3×10^5	1.3×10^{-7}	1.0×10^{-4}	1.3×10^{-4}

produces an extremely inefficient or null reactivation is region 1 of TcTIM and region 2 of TbTIM; this combination is present in chimeric enzymes TcTIM1;TbTIM2–8 (which only reaches 5% reactivation) and TcTIM 1,3–8;TbTIM2 (which does not reactivate). The combination that favours reactivation is region 1 of TbTIM and region 2 of TcTIM; in this case, reactivation occurs in a fast and efficient manner such as with chimeric enzymes TcTIM2–8;TbTIM1 (100%) and TcTIM2;TbTIM1,3–8 (90%).

3.5. Velocity constants of chimeric enzymes of regions 1 and 2

The limiting steps in reactivation of TIM are the association of the monomers and the inner rearrangement that transforms the intermediate dimer into the active dimer [9]. To obtain the velocity constants of these two steps, we reactivated chimeric enzymes of regions 1 and 2 at different concentrations that varied from 10 to 500 nM of monomer. In all cases, excepting chimeric enzyme TcTIM3–8;TbTIM1,2, the plot of absorbance versus time was linear, indicating that the reactivation was not affected by the dissociation of the enzyme during the measurement of the activity (data not shown). Table 4 shows the values of the velocity constants determined for the chimeric enzymes of regions 1 and 2, except for chimeric enzymes TcTIM1,3–8;TbTIM2 and TcTIM3–8;TbTIM1,2, for which no data could be obtained. It should be noted that the velocity constants that are related to the association of monomers were always equal to or larger than that obtained for WT TcTIM in those proteins that have region 2 of TcTIM. On the contrary, when the proteins have region 2 of TbTIM, the constants are lower, even by one order of magnitude, than those reported for the WT enzymes.

3.6. Reactivation of the additive mutants of region 1

To continue locating the amino acids that are important for reactivation in these two regions, a group of additive mutants was prepared with each, and all the residues that are different

in region 1 between WT TcTIM and WT TbTIM, by the progressive and cumulative site-directed mutagenesis converting chimeric enzyme TcTIM;TbTIM2–8 into WT TbTIM. This involved the production of 13 additive mutants.

In the reactivation kinetics of these additive mutants of region 1 (figure 6), we observed that when the first mutation was introduced (R1M1) the reactivation was about 50% as efficient as that of WT TbTIM. Two further additive mutations R1M2 and R1M3 had the effect of reducing activation efficiency by approximately 10%. The fourth additive mutant R1M4 showed an important diminishment in its reactivation capacity with a behaviour similar to chimeric enzyme TcTIM1;TbTM2–8. However, when the fifth additive mutant R1M5 was assayed, the reactivation of this enzyme was approximately 10% more efficient than WT TbTIM. The sixth additive mutant R1M6 returned the reactivation pattern to one like that of WT TbTIM and the seventh additive mutant R1M7 has no apparent effect on the reactivation. It is important to point out here that an additive mutation may have either positive (R1M1, R1M5), negative (R1M2, R1M4, R1M6) or neutral (R1M3, R1M7) effect on the reactivation pattern when compared with the additive mutant that preceded it. The eighth additive mutant showed a decrease in reactivation capacity of approximately 10% with respect to R1M7. However, the ninth additive mutant R1M9 not only increased the velocity of reactivation, improving WT TbTIM, but also did it with a greater efficiency, at least for the first 10 min of the kinetic analysis. The 10th additive mutant R1M10 returns to a reactivation pattern like that of WT TbTIM, but the 11th additive mutant R1M11 again increases the efficiency of the reactivation by approximately 20% over that of WT TbTIM. Both the 12th and 13th additive mutants, R1M12 and R1M13, respectively, return the reactivation pattern to that of WT TbTIM. Because the sequence of WT TcTIM has an additional Ala in position 2, when compared with the sequence of WT TbTIM, we constructed an additive mutant that lacked this Ala in its sequence to test the possibility that this additional amino acid might have some influence on the

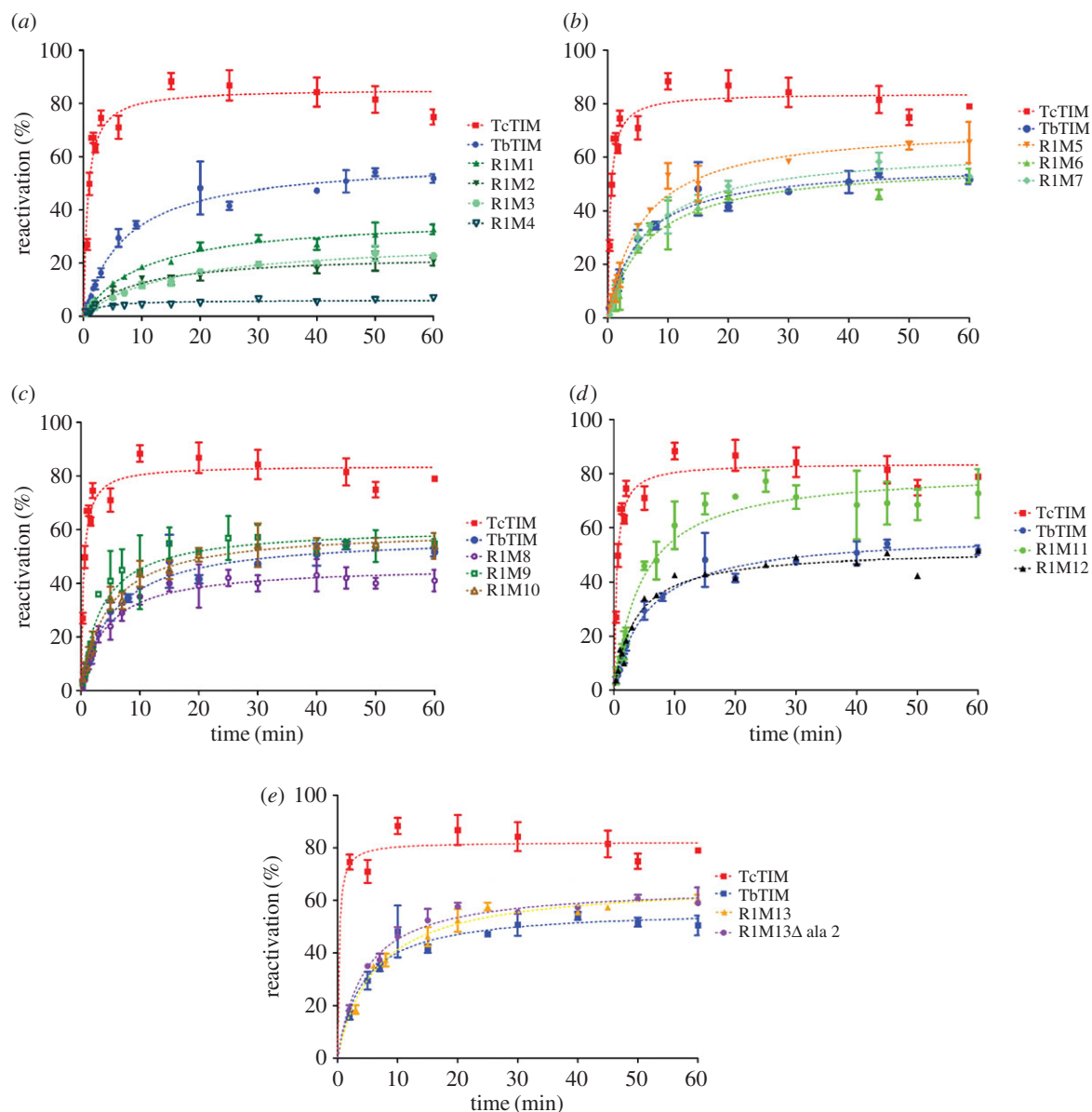


Figure 6. (a–e) Reactivation of WT TbTIM (blue), WT TcTIM (red) and all the additive mutants of region 1. Proteins ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) were treated with 6 M GdnHCl for 1 h at 25°C . The enzymes were then diluted 100-fold, and reactivation was measured. Results are expressed as percentage of recovered activity, where 100% is the activity of the native enzymes incubated with the residual concentration of GdnHCl (60 mM). The data shown are the mean of three separate and independent experiments.

reactivation pattern. Additive mutant R1M13 Δ Ala2 had an equal reactivation pattern to R1M13 (figure 6).

3.7. Structural analysis of the relevant amino acids in region 1

Trying to understand why these mutations had the observed effect on the reactivation patterns observed, we performed a search of the contacts with other residues at a distance of 4 \AA from the mutated amino acids, as well as of the mutated amino acids themselves in the structures with PDB identifiers: 5TIM (TbTIM) and 1TCD (TcTIM). All changes in region 1 are in helix 1 and the beginning of the loop that connects region 1 with region 2. The external face of helix 1 is exposed to the solvent and interacts with helices 2 and 8 on both sides, whereas the internal face interacts with beta sheet 1. It was observed in previous studies that TcTIM has a looser conformation than TbTIM at this site, with fewer interactions between these regions [5]. One of the amino acids that produce this structural

difference is Pro 23, which is in the middle of the helix and exposed to solvent, generating a wider gap in the turns of the helix (approx. 1.2 \AA). This opening not only decreases the contacts of the residues in this helix, but also modifies the spatial orientation of other amino acids such as Glu 18 (which corresponds to Gln 18 in TbTIM).

In our results of the mutagenesis of region 1, the change of the amino acid in position 18 (Glu for Gln) has one of the strongest effects even though it is quite conservative in both the size and the form of the residue. The important changes in the reactivation of chimeric enzyme TcTIM1;TbTIM2–8 generated by mutating this amino acid are probably caused by the change in orientation of this residue owing to the presence or absence of Pro 23. The structure of TbTIM (without Pro 23) shows a helix 1 that is more compact and with more interactions, allowing Gln 18 to have an orientation that permits the formation of a hydrogen bond with Asp 85 of region 3, monomer B. The native Glu 18 of TcTIM has an orientation that does not permit this interaction (see figure 3 in [5]). Thus, these observations point to the importance of the interactions between the amino acids in positions 18 and 23 in

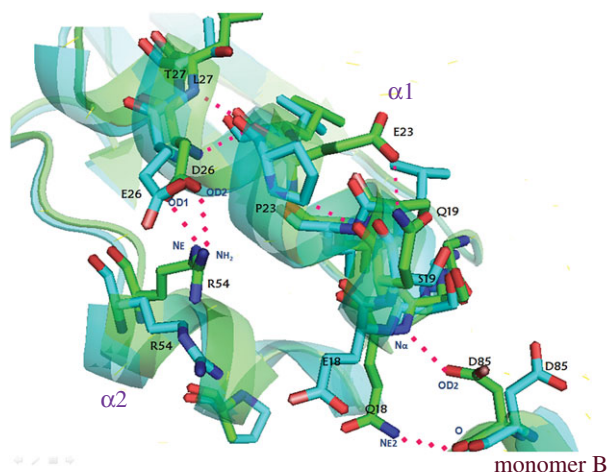


Figure 7. Superposition of the three-dimensional structures of regions 1 of WT TbTIM (green) and WT TcTIM (cyan). In TcTIM, the presence of P23 in the middle of helix 1 produces an aperture of 1.2 Å in the turns of this helix that results in additional interactions with neighbouring residues, which TbTIM does not have. This results in the different conformation of Q18 and E18 in TbTIM and TcTIM, respectively, preventing the latter from forming a contact with monomer B. In alpha-helix 2 ($\alpha 2$) R54 in the structure of TbTIM is able to form a contact with D26, which is not the case for TcTIM.

the sequences of TbTIM and TcTIM, and provide a structural explanation for our experimental results.

One question that arose was why additive mutant R1M1 had such a drastic change in reactivation behaviour given that, even though amino acid 18 was mutated, Pro 23 was still present.

Because chimeric enzyme TcTIM1;TbTIM2–8 has mainly the sequence of TbTIM, which structurally has more contacts between regions 1 and 2 than TcTIM, it could be possible that the mutation produced a rearrangement of the amino acid in position 18, in which perhaps one of the two contacts with region 3 of monomer B was restored. Because no crystal structure of additive mutant R1M1 is available, we performed homology modelling, using the Swiss Model server and the coordinates of both WT TIMs [20–22]. The server produced two models in which the amino acid in position 18 is in an intermediate position from the ones observed in WT TbTIM and TcTIM. In this case, one of the two hydrogen bonds was restored, and this should explain the big change in the reactivation behaviour of additive mutant R1M1. This suggests that this amino acid is related to the association between subunits.

When Pro 23 was mutated, we saw that the reactivation increased greatly in efficiency; it was even better than TbTIM. This is due to the rearrangement of the helix (changing the residue stabilizes the helix and restores the interactions with other amino acids), yet it is not until the mutagenesis of the amino acid at position 26 (R1M6) when the reactivation behaviour is again like that of WT TbTIM. This is a conservative change again in size and form of the amino acid, but, like the change of the amino acid in position 18, it modifies the charge. Observing the close contacts of amino acids in positions 23 and 26, these interact both with Arg 54 of region 2, which is the same residue in both TbTIM and TcTIM, but which has a different orientation in the crystal structures of the WT enzymes (figure 7). Arg 54 in TbTIM is oriented in a manner that permits the formation of a hydrogen bond with Asp26, whereas this interaction is absent in TcTIM.

We do not know how these amino acids interact in the early stages of folding during reactivation, but it is clear

that they are important to guide the process of determining the accessible conformational space for these enzymes.

Even though our statements regarding the changes in position of the amino acids mentioned previously were made comparing some available crystallographic structures of TIMs, the lack of the structures of the enzymes we studied, in particular, makes the movements we propose speculative. However, there are previous works in which the mutation of some residues result in important changes for a certain function [19]. As we could observe in solution (figure 2), these mutants show differences in their secondary structure, indicating that mutagenesis changes the number of contacts in the enzyme, so that it is possible that the variation of the reactivation and folding patterns could be due to the correct or incorrect positioning of one or more key residues.

3.8. Reactivation of the additive mutants of region 2

The additive mutants to analyse region 2 were built using chimeric enzyme TcTIM1;3–8;TbTIM2 as the template. In this case, there are seven differences in the sequences of region 2, and the purpose was to gradually transform chimeric enzyme TcTIM1;3–8;TbTIM2 into the sequence of WT TcTIM. To our surprise, in the reactivation kinetics of additive mutants R2M1 and R2M2, a new and very different behaviour was observed (figure 8). Initially, during the first 10 min, the reactivation values rise extremely fast and reach values that exceed 100% reactivation. The curve then falls and reaches reactivation efficiencies similar to or somewhat below the values obtained for TbTIM. The reactivation curve has again a similar form: biphasic, with an increase in activity in the fast phase and an activity decrease in the slow phase. When the third additive mutation is introduced (R2M3), it still has a peak of highest activity approximately at 10 min (which now reaches around 80% reactivation), and then follows intermediate values situated in an intermediate position between those of the WT enzymes. This additive mutant reactivates with greater velocity than WT TbTIM, but is slower than WT TcTIM, and its maximum reactivation efficiency is approximately 15% lower than that of WT TcTIM. The fourth additive mutant (R2M4) is very similar to the third but is slightly faster and more efficient. In the case of the fifth additive mutant R2M5, the final reactivation efficiency is the same as that of WT TcTIM but it still shows a peak with approximately 100% reactivation at 10 min. The sixth additive mutant R2M6 shows a very similar behaviour to R2M5 and the seventh additive mutant R2M7 shows the same reactivation pattern as WT TcTIM (without the initial peak). Table 4 shows the velocity constants obtained for these additive mutants.

Mutagenesis of region 2 revealed that two aspects of refolding were affected. The first was the speed with which the refolding occurs and the second was the process of aggregation. As was mentioned previously, the limiting steps in reactivation are the association of monomers and the internal rearrangement going from intermediate dimer to native dimer. Region 2 has several interface residues (Val 46, Leu 48 and Ala 49 in TbTIM or Leu 46, Ile 48 and Pro 49 in TcTIM) that interact with the other monomer, which naturally will affect the association when they are modified.

Calculating the velocity constants of reactivation of mutant enzymes of these amino acids allowed us to see which points of the process were affected and which residue was responsible for each effect (table 4).

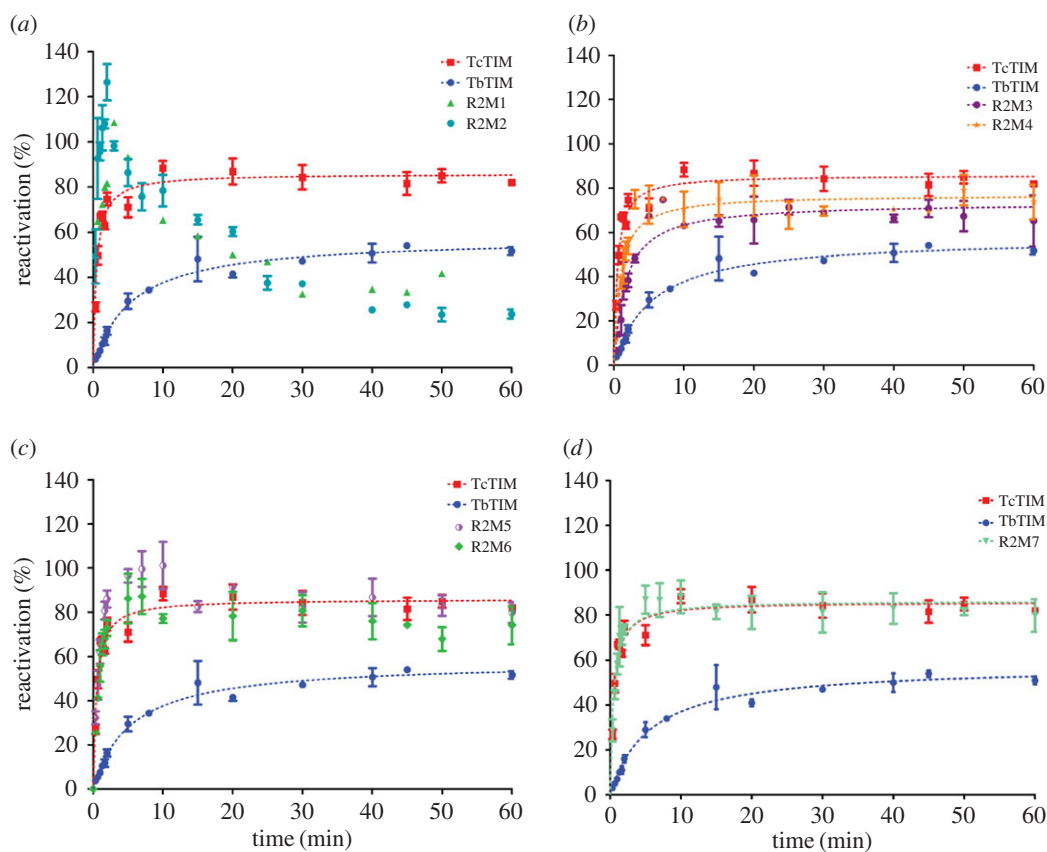


Figure 8. (a–d) Reactivation of WT TbTIM (blue), WT TcTIM (red) and all the additive mutants of region 2. Proteins ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) were treated with 6 M GdnHCl for 1 h at 25°C . The enzymes were then diluted 100-fold and reactivation was measured. Results are expressed as percentage of recovered activity, where 100% is the activity of the native enzymes incubated with the residual concentration of GdnHCl (60 mM). The data shown are the mean of three separate and independent experiments.

Some of the residues that are crucial for the reactivation of chimeric enzyme TcTIM_{1,3–8};TbTIM₂ were those in positions 43 and 46 (additive mutants R2M1 and R2M2). These mutations generated a different behaviour from that seen before for any enzyme, yet without modifying these residues, the reactivation of chimeric enzyme TcTIM_{1,3–8};TbTIM₂ would not occur. These amino acids are in the loop that joins beta strand 2 with helix 2, and all of them are very close to the catalytic loop.

The variation of the kinetic constants in these two additive mutants indicates that there must be a folding intermediate with catalytic activity that produces the peak (figure 8a). Constants k_2 and k_3 in these mutants are much higher, when compared with the WT enzymes. An increase in the association velocity of the monomers generates the accumulation of the folding intermediate with activity, whereas the subsequent fall that is observed could be due to aggregation of the enzymes, because the constants k_4 are also elevated.

In the case of additive mutants R2M3 and R2M4, the reactivation curve has the same biphasic form, like the rest of the mutants, yet these curves also have a small maximum peak of reactivation during the first 10 min. The values of the k_2 constants are within the range of those reported for the WT enzymes, and for additive mutant R2M4, it is slightly greater, yet the constants k_3 are even higher than those of the WT enzymes, indicating that for these additive mutants both the association of the monomers and the formation of the active dimers are quite important. The reactivation of additive mutant R2M5 already has similar values to those of WT TcTIM, but it still also shows a very small maximum at 10 min, with the other constants similar to those of the WT

enzymes, and aggregation starting to play a role. Finally, additive mutant R2M7 has a reactivation behaviour like a WT enzyme in which the peak at 10 min disappears, and the velocity constants are very similar to those of the WT enzymes.

From these results, we conclude that the amino acids of region 2 that favour the association of TIM are those of the first (R2M1) and second (R2M2) additive mutants (positions 43 and 49, respectively) and to a lesser degree those in positions 56 and 57. On the other hand, the conversion of an intermediate dimer with activity to an active dimer is affected by the amino acids in positions 43, 46, 48, 49 and 53, increasing the value of constants k_4 and k_3 , an effect that diminishes when amino acids in positions 56 and 57 are mutated, returning the values of these constants to those shown by the WT enzymes.

3.9. Site-directed mutagenesis of selected amino acids from regions 1 and 2

Having identified the amino acids in regions 1 and 2 that are important for the quantitative change of behaviour in reactivation for TbTIM and TcTIM, we decided to make a mutant enzyme mostly with the sequence of TbTIM, only changing the six amino acids identified in region 1 and the seven amino acids in region 2 from TcTIM, to see if this enzyme would reactivate like TcTIM. The DNA template used to make this mutant enzyme was that of chimeric enzyme TcTIM₂;TbTIM_{1,3–8}, which already has the seven differences in region 2 and has a reactivation pattern similar to TbTIM (figure 9). Mutant TcTIM₂;TbTIM_{1,3–8} R1:Q18E,E23P,D26E,

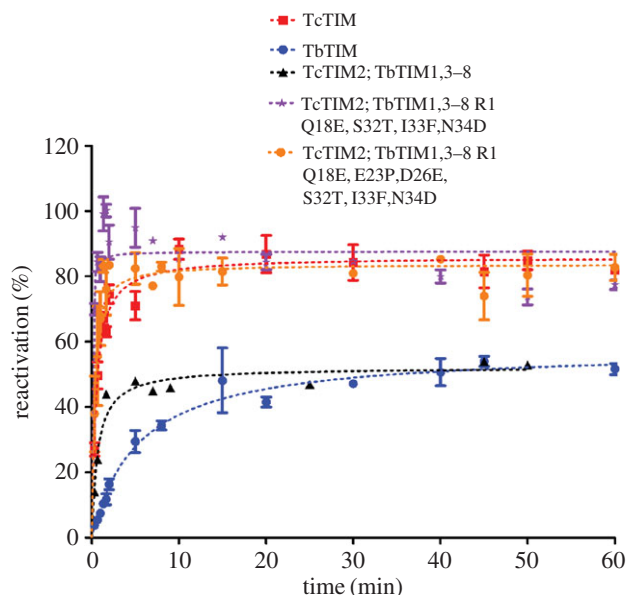


Figure 9. Reactivation of WT TbTIM, WT TcTIM, a chimeric enzyme and two mutants obtained by site-directed mutagenesis. Proteins ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) were treated with 6 M GdnHCl for 1 h at 25°C . The enzymes were then diluted 100-fold and reactivation was measured. Results are expressed as percentage of recovered activity, where 100% is the activity of the native enzymes incubated with the residual concentration of GdnHCl (60 mM). The data shown are the means of three separate and independent experiments.

S32T,I33F,N34D was constructed, and, as expected, it had a reactivation pattern just like WT TcTIM (figure 9). The kinetic parameters turned out to be slightly different, because they have a greater affinity for its substrate, but their values are within the range of the WT enzymes (table 3).

As seen with the reactivation of the additive mutants of region 2, all seven amino acids are important, but in the case of the reactivation of the additive mutants of region 1, there were three amino acids that had a greater effect. Two additional mutants were made to study the effects of these amino acids. The mutants were TcTIM2;TbTIM1,3–8 R1:Q18E, S32T,I33F,N34D and TcTIM 2;TbTIM1,3–8 R1:Q18E,E23P,-D26E,S32T,I33F,N34D. The first mutant was constructed to explore amino acids at positions 18 and 32. Amino acids at positions 33 and 34 were also changed, because the contact map of these residues show hydrogen bonds in the structure of WT TbTIM, which is absent for residue 32 in the structure of WT TcTIM. The second mutant explored the combination of amino acids at positions 18, 23 and 32, and amino acid at position 26 was added, because it is important for recovering the reactivation pattern of the WT enzyme (see reactivation of the additive mutants of region 1).

As mentioned earlier, chimeric enzyme TcTIM2;TbTIM1,3–8 reactivates rapidly and with an efficiency like that of WT TbTIM (figure 9), but changing amino acids at positions 18, 32, 33 and 34 increased the efficiency of reactivation greatly, making it even better than that of WT TcTIM. This mutant also showed a peak of increased activation at 10 min (like that of the additive mutants of region 2), but at the end of the time in which reactivation was followed (40–80 min) it had lower values, by approximately 10%, when compared with WT TcTIM at the same times (figure 9). This fall at the end of the reactivation period for this mutant can be explained by the interaction that amino acids at positions 32, 33 and 34 have

with those at positions 56 and 57 (which are in region 2). In WT TbTIM and WT TcTIM, exactly all of these amino acids are different, so, when they are changed, all interactions, hydrogen bonds, etc., are also altered. Additionally, as already seen in the reactivation of additive mutant of region 2, amino acids at positions 56 and 57 recover the reactivation patterns to that of the WT enzymes and affect the internal rearrangement of the active intermediate and the aggregation. Thus, a perturbation in these sites could produce this behaviour. As in the additive mutants of region 2, the reactivation curve shows a peak of higher reactivation at 10 min, and it appears when the amino acids in positions 43 and 46 are mutated (Ser for Pro and Val for Leu, respectively). The Pro in position 43 changes the contacts between several amino acids in region 1 and region 2, modifying the stability of the enzyme.

4. Discussion

4.1. The role of the loops in reactivation: region 1

The amino acid sequences of WT TbTIM and WT TcTIM are very similar as are their three-dimensional structures, both have a quantitatively different behaviour in the reactivation of their monomers that have been unfolded with GdnHCl. In this work, we investigated which regions and which amino acids are responsible for these differences. This investigation was based on previous observations that have shown that in TIM only native dimers have catalytic activity and this is considered to be evidence that the quaternary structure of the enzyme is correct [8,9,23,24]. Even though there are also reports of activities in monomeric TIMs, these activities are very much lower than those reported for TbTIM and TcTIM [25,26].

Our results with the additive mutants of region 1 indicate that the amino acids in positions 18, 19, 20, 22, 23 and 26 of the sequence are those that influence reactivation positively to produce the folding pattern of TbTIM, whereas in region 2, all seven amino acids are important for reactivation. In the three-dimensional structure of the enzymes, most of these residues are exposed to the solvent or belong to one of the loops of the TIM barrel. The first, at position 18, is at the beginning of helix 1, just after interfacial loop 1 (which joins beta sheet 1 with helix 1), whereas the amino acids at positions 32, 33 and 34 are in external loop 1, which connects helix 1 with beta sheet 2. In the cases of region 2, residues at positions 43 and 46 (which affect monomer association) are in interfacial loop 2 and amino acids at positions 56 and 57 are in external loop 2. Several studies have shown that loops play an important role in protein folding, because the contacts that they form with the rest of the polypeptide chain limit the available conformational space, accelerating or slowing down the process [27–30]. Thus, the position of these amino acids in the loops could be a factor that guides the folding in these proteins and the difference in their reactivation could be due to the interactions formed in the initial points of folding or to the dihedral angles formed by the side chains of these amino acids. TcTIM has different dihedral angles from TbTIM, because in both enzymes, helix 1 and helix 2 have a Pro in the middle of the sequence, which alters their structure. In contrast with other studies in which the isomerization of Pro is a factor that slows the folding process of proteins [31,32], this does not happen

with TcTIM, whose reactivation is faster and more efficient and shows less aggregation than TbTIM.

The interface of TIM is made mainly by some of its loops. In advanced stages of folding, the movement of these loops is a factor that influences the process because they are related to the dimerization of the monomers, one of the crucial steps of folding. The association of the monomers in TIM permits the recovery of optimal catalytic activity [9].

The loops that are involved in dimerization are interfacial loops 1–4 (those that join the beta sheet with the subsequent alpha helix). Loop 3 is the longest loop in the enzyme and it is positioned over loop 2 of the other monomer, allowing the interaction between the residues of interfacial loops 1 and 4. When dimerization takes place the mobility of these loops, together with that of loop 8, is restricted to keep the correct position of the catalytic amino acids. Meanwhile, loops 6 and 7 increase their mobility, so they can continue to protect the catalytic site and allow the entrance of substrates and the liberation of products [28].

Modifying the contacts of loops 1–4 and 8 by mutating amino acids in regions 1 and 2 can increase the mobility of these loops altering the reactivation pattern and the catalytic parameters of the mutant enzymes; the results shown in table 3 and figure 6 are consistent with this.

The K_m values for the additive mutants from region 1 (R1M1, R1M2, R1M3, R1M4, R1M5, R1M8, R1M9, R1M11 and R1M13) were close to half of the value for the WT enzymes (table 3). This could be due the fact that region 1 contains two of the four catalytic residues of TIM. These are Asn 11 and Lys 13, whose role in catalysis is the recognition of the substrate and the stabilization of the negative charges of the intermediates during the enzymatic reaction [33]. The changes in the amino acid sequence in this region can result in the modification of some contacts of the residues that affect catalysis. Both Asn 11 and Lys 13 are in interfacial loop 1. Several changes in region 1 can modify the interactions and positioning of the rest of the amino acids. The most important residues are in positions 18, 19, 20, 22, 23 and 26, because their changes induce the recovery of the catalytic parameters.

After the association of the monomers, small adjustments in the loops of TIM may follow. That is why in additive mutants of region 1 the change of K_m to values comparable with those of the WT enzymes occurs when the structure of helix 1 and interfacial loop 1 acquire a conformation like WT TbTIM when Pro 23 and Glu 26 are changed, and the torsion angles of the helix become like those of WT TbTIM (figure 7). This allows the reestablishment of contacts with region 2, reducing mobility and stabilizing this area.

4.2. The role of the loops in reactivation: region 2

Region 2 controls the speed of reactivation, possibly because of the close connection it has with region 1 of the same monomer and regions 2 and 3 of the adjacent monomer. Mutants of region 2 had important variations in their kinetic properties because they affect the association of both monomers probably increasing the mobility of the interfacial loops (thus also increasing the catalytic capacity and destabilizing the active site in the enzymes).

Catalysis in chimeric enzyme TcTIM1,3–8;TbTIM2 was strongly affected (table 3). The analysis of its secondary structure by circular dichroism showed the characteristic pattern of a $(\beta/\alpha)_8$ barrel but with a signal considerably more intense

than the WT enzymes (figure 2). This has also been previously observed by circular dichroism in equilibrium denaturing studies of TcTIM, where an intermediate with similar characteristics (increase of secondary structure and intensity of fluorescence) was reported [13]. The chimeric enzyme was also analysed by size exclusion chromatography [11] to ascertain that the very low activity was due to the dimer. It had values that were similar to a monoTIM [25,26,34], indicating that the association of the monomers was affected.

Amino acids in positions 43 and 46 in region 2 were found to be critical for the velocity of reactivation (association of the enzyme) and the velocity of aggregation, and they are located at the end of interfacial loop 2 that joins beta strand 2 and helix 2. In additive mutants R2M1 and R2M2, the reactivation curve has a peak with great activity caused by the accumulation of an intermediary species with good activity, which subsequently falls because of the aggregation of this dimeric species during the internal rearrangement to form the native dimer. There are great changes in the velocity constants that affect these phenomena; for example, the association constants for these additive mutants are two orders of magnitude higher than those of the WT enzymes and the aggregation constants are also increased by one order of magnitude, favouring the appearance of the reactive intermediary and its accumulation. On the one hand, the mutation of these two amino acids allows the reactivation of the enzymes, when compared with chimeric enzyme TcTIM1,3–8;TbTIM2, but both the catalytic properties and the kinetic constants of reactivation are affected. These additive mutants also showed a fourfold to sevenfold increase in the value of K_m over those of the WT enzymes, which means that the mutations favour the association of the monomers, stabilizing the active site. On the other hand, their dissociation constants were slightly smaller than those of the WT enzymes, indicating that the fall in the reactivation pattern after 10 min is not owing to dissociation of the enzyme, but to aggregation during the internal rearrangement to form the native dimer.

The fourth mutation of region 2 (Ala to Pro), just like when a Pro was introduced into a helix when mutating region 1, caused the modification of the dihedral angles with the neighbouring amino acids and the change of contacts with other residues like Arg 54, which has a different conformation in WT TbTIM and WT TcTIM. In this last enzyme, Pro can have more interactions with amino acids in helix 1 (figure 7). The K_m value of R2M4 is almost equal to that of the WT enzyme.

The amplitude and maximal percentage reached by the reactivation curves and their tendency to remain at stable values (around 60 min) is related to the propensity of each mutant enzyme to aggregate. In region 2, this tendency is associated with amino acids in positions 56 and 57, which are located in external loop 2 near amino acids in positions 32, 33 and 34 of external loop 1. When amino acids in positions 56 and 57 are mutated, the amplitude of the reactivation curve is recovered, and the values at longer times are stabilized, because aggregation is minimal or does not occur. Amino acid in position 57, particularly, makes the initial peak at 10 min disappear (figure 8*d*); it also returns the value of the velocity constant for association to that shown by WT TcTIM, indicating that it affects the association of the enzyme.

In the case of mutant TcTIM2;TbTIM1,3–8 R1:Q18E, S32T,I33F,N34D, the reactivation peak at 10 min appeared again. In this mutant, two of the points (the amino acid in position 18 and the amino acids in positions 32, 33 and 34 together) with greatest effect on the reactivation patterns

were changed. Residue 18 is located in internal loop 1, and residues 32, 33 and 34 are located in external loop 1, and, as was previously seen, changes in this external loop have effects on the amplitude of the reactivation curve and the tendency to aggregate, because interactions between loops 1 and 2 are affected. This mutant showed an increase in the amplitude of the reactivation pattern, but it has also a tendency to aggregate, indicating problems in the association between dimers and generating an accumulation of molecular species that is seen as the peak at 10 min (like the one observed for region 2) that eventually leads to aggregation.

Another critical point is the amino acid at position 23. As already mentioned, the introduction of a Pro in the middle of helix 1 produces important changes that affect several contacts all along the helix. In mutant TcTIM2;TbTIM1,3–8 R1:Q18E,E23P,D26E,S32T,I33F,N34D, this residue and the one in position 26 were changed, which allowed a restructuring of helix 1, internal loop 1 and external loop 1, which also allowed a better interaction between helix 1 and helix 2 (figure 7) and a better association of monomers, yielding a reactivation pattern comparable with WT TcTIM.

4.3. Aggregation of these enzymes

Chávez-Cárdenas *et al.* [13] reported two critical points where aggregation can occur along the reactivation route for WT TbTIM. The first occurs during the association of the dimers, and results from this work indicate that amino acids in positions 18, 43, 46, 48 and 57 have an effect on this process, because modifying these residues leads to an inefficient reactivation. The second critical point for aggregation is during the restructuring of the dimeric intermediate to the active dimer. Here, amino acids in positions 32, 33, 34, 56 and 57 are those that have an influence, because modifying their interactions influences the amplitude of the reactivation curves, and this is very evident at times near 60 min.

5. Conclusion

One of the differences between WT TbTIM and WT TcTIM is the rigidity of their structure. In the case of WT TcTIM, the structure is laxer, which permits a greater degree of conformational freedom and, in the case of reactivation, the environment around regions 1 and 2, favours refolding. From this study, it is clear that the contacts established between these two regions is essential for reactivation to take place.

Our studies have established the critical residues involved in the renaturation/reactivation of two TIMs from two

trypanosomatids. The important positions of amino acids in region 1 are 18, 23, 26, 32, 33 and 34, whereas for region 2, they are 43, 46, 48, 49, 53, 56 and 57. To make a TcTIM reactivate with a TbTIM-like behaviour you need to mutate the following amino acids: R1: 18, 19, 20, 22, 23 and 26, and R2: 43, 46, 48, 49, 53, 56 and 57. To make a TbTIM reactivate with a TcTIM-like behaviour you need to mutate amino acids R1: 18, 23, 26, 32, 33 and 34, and R2: 43, 46, 48, 49, 53, 56 and 57. Thus, 13 residues, or 5% of the protein sequence, are critical in determining a specific physico-chemical property of the enzyme.

The amino acids in the internal loops control the process of dimerization, whereas those in the external loops control the stability of the dimer during the transition of intermediate dimer to native dimer, avoiding aggregation.

In this work, we developed a strategy to search systematically multiple amino acids from quite similar proteins that are involved in quantitative differences of their biochemical and/or biophysical properties. We favour this method over a random mutagenesis approach; it is able to find the residues involved in controlling the corresponding properties, with a relatively small and restricted number of chimeric enzymes, additive mutants and planned site-directed mutant proteins, continuously monitored by experimental results (see [17]). Additive mutagenesis provided insights into the process and mechanism of the reactivation of TbTIM and TcTIM. We believe that this experimental approach can be of more general value in studies of protein–function relationships.

Data accessibility. The data supporting this article have been included in the main text, tables and figures.

Authors' contributions. M.R.-B. and R.P.-M. conceived and designed the experiments; M.R.-B. and N.C. performed the experiments; M.R.-B. and R.P.-M. analysed the data; M.R.-B. and R.P.-M. wrote the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Competing interests. The authors declare they have no competing interest.

Funding. This work was supported by grant no. 167823 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (to R.P.-M.) and grant no. IN221812 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico Universidad Nacional Autónoma de México (to R.P.-M.). M.R.-B. was the recipient of a fellowship from CONACyT (no. 262118).

Acknowledgements. The authors thank Ms Guadalupe Viguera-Meneses for performing the initial experiments of reactivation with six chimeric enzymes. The authors also thank Dr Juan Pablo Pardo for suggesting and help with the use of the DYNAPIT program, and Dr Diego González-Halphen for helpful discussions and careful revision of the manuscript. The authors also acknowledge Dr Armando Gómez-Puyou for the helpful discussions during the initial stages of the research. This work was performed by M.R.-B. as part of the fulfilment of her doctoral dissertation in the Posgrado en Ciencias Bioquímicas of the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

1. Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. 1999 The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* **118**, 107–116. (doi:10.1017/S0031182098003473)
2. Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Mendoza-Hernández G, López-Velázquez G, Perez-Montfort R, Tuena de Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. 2002 Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins* **48**, 580–590. (doi:10.1002/prot.10179)
3. Téllez-Valencia A, Olivares-Illana V, Hernández-Santoyo A, Perez-Montfort R, Costas M, Rodríguez-Romero A, López-Calahorra F, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. 2004 Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* **341**, 1355–1365. (doi:10.1016/j.jmb.2004.06.056)
4. Maldonado E, Moreno A, Panneerselvam K, Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Soriano-García M, Perez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. 1997 Crystallization and preliminary X-Ray analysis of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Prot. Pept. Lett.* **4**, 139–144.

5. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. 1998 Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **283**, 193–203. (doi:10.1006/jmbi.1998.2094)
6. Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Perez-Montfort R. 1997 Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **244**, 700–705. (doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00700.x)
7. Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Perez-Montfort R, Gómez-Puyou A. 1998 Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.* **253**, 684–691. (doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2530684.x)
8. Perez-Montfort R, Garza-Ramos G, Alcántara GH, Reyes-Vivas H, Gao XG, Maldonado E, de Gomez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. 1999 Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* **38**, 4114–4120. (doi:10.1021/bi982425s)
9. Zomosa-Signoret V, Hernández-Alcántara G, Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Garza-Ramos G, Perez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A. 2003 Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* **42**, 3311–3318. (doi:10.1021/bi0206560)
10. Benítez-Cardoza CG, Rojo-Domínguez A, Hernández-Arana A. 2001 Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* **40**, 9049–9058. (doi:10.1021/bi010528w)
11. Cháñez-Cárdenas ME, Fernández-Velasco DA, Vázquez-Contreras E, Coria R, Saab-Rincón G, Perez-Montfort R. 2002 Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**, 117–129. (doi:10.1006/abbi.2001.2749)
12. Gokhale RS, Ray SS, Balaram H, Balaram P. 1999 Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* **38**, 423–431. (doi:10.1021/bi981087s)
13. Cháñez-Cárdenas ME, Pérez-Hernández G, Sánchez-Rebollar BG, Costas M, Vázquez-Contreras E. 2005 Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidinium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry* **44**, 10883–10892. (doi:10.1021/bi047687a)
14. Waley SG. 1973 Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochemistry* **135**, 165–172. (doi:10.1042/bj1350165)
15. Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. 1993 Interactions between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *J. Biol. Chem.* **268**, 26872–26878.
16. Rietveld AW, Ferreira ST. 1998 Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: The importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* **37**, 933–937. (doi:10.1021/bi9721593)
17. García-Torres I, Cabrera N, Torres-Larios A, Rodríguez-Bolaños M, Díaz-Mazariegos S, Gomez-Puyou A, Perez-Montfort R. 2011 Identification of amino acids that account for long-range interactions in two triosephosphate isomerases from pathogenic trypanosomes. *PLoS ONE* **6**, e18791. (doi:10.1371/journal.pone.0018791)
18. Kuzmic P. 1996 Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**, 260–273. (doi:10.1006/abio.1996.0238)
19. Kishan R, Zeelen JP, Noble ME, Borchert TV, Mainfroid V, Goraj K, Martial JA, Wierenga RK. 1994 Modular mutagenesis of a TIM-barrel enzyme: the crystal structure of a chimeric *E. coli* TIM having the eighth beta alpha-unit replaced by the equivalent unit of chicken TIM. *Protein Eng.* **7**, 945–951. (doi:10.1093/protein/7.8.945)
20. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006 The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201. (doi:10.1093/bioinformatics/bti770)
21. Biasini M *et al.* 2014 SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, W252–W258. (doi:10.1093/nar/gku340)
22. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. 2009 Automated comparative protein structure modelling with swiss-model and swiss-Pdb viewer: a historical perspective. *Electrophoresis* **30**(Suppl. 1), s162–s173. (doi:10.1002/elps.200900140)
23. Garza-Ramos G, Perez-Montfort R, Rojo-Domínguez A, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. 1996 Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* **241**, 114–120. (doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0114t.x)
24. Reyes-Vivas H, Hernández-Alcántara G, Cabrera N, Perez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gomez-Puyou A. 2001 Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* **40**, 3134–3140. (doi:10.1021/bi002619j)
25. Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. 1997 A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**, 9655–9662. (doi:10.1021/bi963086a)
26. Thanki N, Zeelen JP, Mathieu M, Jaenicke R, Abagyan RA, Wierenga RK, Schliebs W. 1997 Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): the modelling and structure verification of seven-residue loop. *Protein Eng.* **10**, 159–167. (doi:10.1093/protein/10.2.159)
27. Gavrilov Y, Dagan S, Levy Y. 2015 Shortening a loop can increase protein native state entropy. *Proteins* **83**, 2137–2146. (doi:10.1002/prot.24926)
28. Katebi AR, Jernigan RL. 2014 The critical role of the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics, and functionality. *Protein Sci.* **23**, 213–228. (doi:10.1002/pro.2407)
29. Viguera AR, Serrano L. 1997 Loop length, intramolecular diffusion and protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 939–946. (doi:10.1038/nsb1197-939)
30. Krieger F, Fierz B, Bieri O, Drewello M, Kiefhaber T. 2003 Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding. *J. Mol. Biol.* **332**, 265–274. (doi:10.1016/S0022-2836(03)00892-1)
31. Feige MJ, Hendershot LM, Buchner J. 2010 How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 189–198. (doi:10.1016/j.tibs.2009.11.005)
32. Gruber T, Balbach J. 2015 Protein folding mechanism of the dimeric amphiphysin II/Bin 1 N-BAR domain. *PLoS ONE* **10**, e0136922. (doi:10.1371/journal.pone.0136922)
33. Wierenga RK, Kapetanios EG, Venkatesan R. 2010 Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3961–3982. (doi:10.1007/s00018-010-0473-9)
34. Saab-Rincón G, Juárez VR, Osuna J, Sánchez F, Soberón X. 2001 Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Eng.* **14**, 149–155. (doi:10.1093/protein/14.3.149)

Correction



Cite this article: Rodríguez-Bolaños M, Cabrera N, Perez-Montfort R. 2016 Correction to 'Identification of the critical residues responsible for differential reactivation of the triosephosphate isomerases of two trypanosomes'. *Open Biol.* **6**: 160294. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160294>

Correction to 'Identification of the critical residues responsible for differential reactivation of the triosephosphate isomerases of two trypanosomes'

Monica Rodríguez-Bolaños, Nallely Cabrera and Ruy Perez-Montfort

Open Biol. **6**, 160161. (Published online 12 October 2016). (doi:10.1098/rsob.160161)

In table 1c, in the left column, the seven additive mutants of TbTIM and TcTIM for region 2 named R1M1, R1M2, R1M3, R1M4, R1M5, R1M6 and R1M7, should be named R2M1, R2M2, R2M3, R2M4, R2M5, R2M6 and R2M7, respectively.

The correct table appears below

(c) mutant	no. additive mutations in region 2	regions of TcTIM	scheme of different amino acids in region 2
R2M1	1	1,3–8	
R2M2	2	1,3–8	
R2M3	3	1,3–8	
R2M4	4	1,3–8	
R2M5	5	1,3–8	
R2M6	6	1,3–8	
R2M7	7	1,3–8	

REVIEW ARTICLE

Medical and Veterinary Importance of the Moonlighting Functions of Triosephosphate Isomerase

Mónica Rodríguez-Bolaños* and Ruy Perez-Montfort*

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, 04510 México DF, México

Abstract: Triosephosphate isomerase is the fifth enzyme in glycolysis and its canonical function is the reversible isomerization of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. Within the last decade multiple other functions, that may not necessarily always involve catalysis, have been described. These include variations in the degree of its expression in many types of cancer and participation in the regulation of the cell cycle. Triosephosphate isomerase may function as an auto-antigen and in the evasion of the immune response, as a factor of virulence of some organisms, and also as an important allergen, mainly in a variety of seafoods. It is an important factor to consider in the cryopreservation of semen and seems to play a major role in some aspects of the development of Alzheimer's disease. It also seems to be responsible for neurodegenerative alterations in a few cases of human triosephosphate isomerase deficiency. Thus, triosephosphate isomerase is an excellent example of a moonlighting protein.

ARTICLE HISTORY

Received: December 20, 2017
Revised: October 16, 2018
Accepted: October 18, 2018

DOI:
10.2174/1389203719666181026170751

Keywords: Triosephosphate isomerase, moonlighting, cancer, antibody, virulence factor, allergen, cryopreservation, Alzheimer's disease, neurodegeneration.

1. INTRODUCTION

Glycolysis is a catabolic pathway involving ten steps, in which one glucose molecule is converted to two pyruvate molecules, consuming two ATPs, but gaining four molecules of ATP for each transformed glucose [1]. Triosephosphate isomerase (TIM) catalyzes the fifth step of glycolysis, reversibly isomerizing glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP). Even though TIM is not a regulatory enzyme, it is in charge of providing metabolites that connect with other metabolic pathways including (i) the pentose phosphate pathway, in which complex sugars can be formed from GAP [2]; (ii) the de novo synthesis of NAD⁺ via the synthesis of quinolinic acid (QA): here aspartate is oxidized to iminoaspartate, which condenses with a molecule of DHAP to form QA; QA is then phosphorylated to be converted into nicotinic acid mononucleotide, one of the precursors of NAD⁺ [3]; (iii) gluconeogenesis, in which GAP or DHAP may be formed starting from pyruvate or oxaloacetate [4] and (iv) biosynthesis of triacylglycerols in adipose tissue, where DHAP is used for the synthesis of triacylglycerols [5].

TIM is present in all organisms [6, 7] and, in most known cases, has approximately 250 amino acids per monomer chain (molecular mass ~ 27,000 Da), even though the length of the protein, and the molecular mass, can vary considerably in different species. The first crystallized structure of TIM revealed it had a (β/α)₈-barrel topology [8], currently known as the TIM barrel. This is the most frequent structural motif in soluble proteins. Close to 10 % of the enzymes with known structure are TIM barrels [9, 10]. TIM does not require any ion or cofactor to perform its catalytic function [11, 12]. TIM is only active as a dimer, but both monomers have all catalytic residues. From an evolutionary and kinetic point of view, TIM is considered a perfect catalyst, since only the velocity of diffusion of the substrate to the active site is the limiting step for catalysis. Both, the function and the catalytic mechanism of TIM have been conserved in all species throughout evolution [1, 10, 11]. TIM is a well-studied glycolytic enzyme that has been thoroughly characterized from an enzymatic point of view.

After years of research on many enzymes, new functions, which are not related to their catalytic function, have been discovered [13]. Some examples can be found in glycolytic enzymes, which besides their main function, also regulate the activity of other proteins. For example, aldolase helps in the assembly and function of the vacuolar-type ATPase, hexokinase regulates the function of the apoptotic proteins Bax, Bak, and Bad, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates the transcription of the gene of histone H2B during the progress of the cellular cycle, and glucose-6-

*Address correspondence to these authors at the Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Delegación Coyoacán, 04510 México D.F., Mexico;
Tel: + 52 55 5622 5657; Fax: + 52 55 5622 5630;
E-mails: mbolanos@email.ifc.unam.mx (MR-B), ruy@ifc.unam.mx (RP-M)

phosphate isomerase participates in inducing cellular motility through secretion and binding to the tumor autocrine motility factor receptor gp 78 [6].

This review focuses on new non-catalytic functions of TIM in multiple biochemical systems, most of them medical and one of them of veterinary importance. It has been reported that, depending on its location and oligomeric state, TIM can have different functions. For example, TIM expression levels are associated and seem to be important markers of different types of cancers [14]. TIM is also involved in the cellular cycle via its interaction with cyclin 2 dependent kinase (Cdk2) [15-17]. In other cases, TIM secreted to the surrounding medium may function as a virulence factor [18]. TIM may also function as an allergen that easily elicits immune responses [19]. Modification of TIM allows adequate signaling for the maturation of highly specialized cells like spermatozoa [20]. It has also been proposed that TIM must be assembled correctly for an optimal function of neurons. And finally, TIM also seems to play an important role in Alzheimer's disease [7] and in neurodegeneration problems in some cases of the rare human TIM deficiency disease [21, 22].

2. TIM AND CANCER

2.1. Variation in the Degree of TIM Expression

The incidence of cancer seems to be increasing in recent years and is becoming more prevalent in its numerous varieties (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>). Many tools for early detection and diagnosis of different types of cancers lack sensitivity and often positive confirmation of its presence occurs only in the advanced stages of the disease [23]. The dysfunction of tumor suppressors and oncogenes produce modifications in several intracellular signaling pathways, which reprogram the metabolism of tumor cells to favor their survival and growth. Glycolysis is a central degradation pathway in eukaryotes, but in the majority of cases, cells acquire their ATP stores from oxidative phosphorylation. In several cancers, metabolic alterations trigger the transformation of healthy cells into diseased cells. One of these alterations, called the Warburg effect, is when the cancer cell uses glycolysis as its main pathway to produce ATP. Depending on the cell type, the mRNA expression of TIM increases 5 to 20-fold when the cells start proliferating [24, 25]. The deregulation of the levels of expression for TIM is one of the characteristics of cancer [14]. The level of expression of this enzyme in different cells and its clinical implications are not defined and, in some cases, result in beneficial effects and in other cases they become deleterious [25-27].

The expression of TIM is associated with the suppression of the development of the tumor and metastasis in some types of cancers like hepatocarcinoma and carcinoma of the stomach [24, 25]. In liver cancer, the effect of suppression of the tumors has been described both *in vitro* and *in vivo* in YY-88103, Hep3B, and Huh7 cells and in tumors extracted from patients with hepatocarcinoma. Even though the mechanism of how TIM affects the progression of the disease is not well understood, it has been shown that the overexpression of TIM, in this type of cancer, inhibits cellular growth arresting the cells in phases G1/S of the cell cycle

[25]. Some of the genes that participate in the modulation of phases G1/S are P53, P16, P27, cyclin D1, and Rb. The alteration of their levels increases cell growth and the risk of tumor formation [28]. Additionally, high levels of TIM, modify the expression patterns of regulatory proteins like P53, P16, P27, cyclin, Rb, and β -catenin. The increase in the expression of P53 and P27 produces a decrease in the expression of cyclin D1, which leads to a cellular arrest and stops propagation, while β -catenin, an enzyme closely related to metastasis, reduces its expression [25].

TIM expression is deregulated in all cases of gastric cancer [27]. Overexpression of TIM in gastric carcinoma cells with phenotype SGC7901/VCR, which are multi-resistant to the drugs used to treat the illness, helps reduce this multi-resistance. Similarly, a reduction of the expression of TIM favors resistance to those drugs [24]. This indicates that overexpression of TIM helps in the treatment of gastric cancer.

Another TIM that has a suppressor effect on the growth of cells is the TIM from a species of mollusk called *Arca inflata*. It has a toxic effect on adenocarcinoma cells with A549 and SPC-A-1 phenotypes and also on HEP G2 liver carcinoma cells [29].

In different ways, expression of TIM in different types of gastric cancers is related to an increase in invasion, metastasis and the proliferation of tumor cells [26]. In gastric carcinoma cell lines with the BGC-823 phenotype, overexpression of TIM promotes cellular proliferation, migration, and invasion, but does not generate any changes in the cell cycle. However, when TIM expression is suppressed in cells with phenotype MGC-803, proliferation decreases and an apoptosis signal is turned on, producing an arrest of the cell cycle in phase G2/M [14, 23, 27]. Thus, the intracellular concentration of TIM in these cells is of great importance for their disease-producing behavior.

Additionally, the levels of expression of TIM are also altered in other types of cancers such as cancer of the urinary tract [14], carcinoma of the ovaries [30], lung adenocarcinoma [14], cancer of the colon with a high metastatic potential [23], gastric carcinoma [26], thyroid cancer [31], breast cancer [32, 33], squamous cell carcinoma of the esophagus [34], pancreatic cancer [31], kidney cancer [35, 36], esophageal carcinoma [26] and squamous lung cell carcinoma [14, 23, 25]. In all cases, TIM is related to the metastatic and invasive behavior of the diseases.

2.2. TIM Expression Levels as Markers for the Prognosis of Different Cancers

The differential expression of TIM in cancerous cells and in normal cells has an important diagnostic value and relates to the prognosis of the patient. The possibilities of survival can be predicted depending on the type of cancer, the size of the tumor, the presence of metastasis, the degree of histologic differentiation of the cells and the overexpression of TIM [26, 37].

In gastric cancers, survival is diminished in patients with high levels of TIM expression and who have tumors larger than 5 cm, in comparison with those who have tumors of the same size but low expression levels of TIM [26]. In cases of

papillary and follicular cancer of the thyroid, a differential expression of this enzyme has been found [31]. It has been observed that this expression, together with that of other proteins such as A2, cofilin1, PCNA, and HSP27, allows differentiation between both types of cancer, helping in its timely and appropriate treatment [31]. In breast cancer cells expression of TIM is also elevated in comparison to healthy cells, making it a good biomarker for the disease [33].

Metastasis is a common complication of cancer, which typically worsens the prognosis of the patients. The detection of the places where the cancer has spread is of utmost importance for the treatment of the disease. In the case of some gynecological cancers, there are some deregulated proteins that function as biomarkers. For example, in endometrial and ovarian cancer, TIM is expressed more intensely in the secondary tumors than in the primary tumor [38]. Numerous proteins have been described that can serve as biomarkers in different types of cancer, but, interestingly, TIM seems to be deregulated very frequently in a great number of varieties of this illness and, in many cases, can be a useful marker.

2.3. Anti-TIM Antibodies

The immune response is one of the primary and fundamental lines of defense against pathogenic agents. During the first stages of tumor formation, many proteins or peptides are expressed on the surface of cancerous cells. These molecules may initiate an immune response in the patient against the tumor [39]. Humoral responses against cancer have been demonstrated with the identification of many different surface and intracellular antigens in different types of tumors. However, the concentration of antigens tends to be very low, particularly during the initial stages of the ailments [23]. Early detection and diagnosis are of vital importance in many malignancies. The detection of autoantibodies is one of the widely used approaches for the detection of these illnesses today [32].

TIM is distributed in all the cytoplasm of cells and it is overexpressed to high levels in tissues with high glycolytic activity, like cancer cells. One of the theories about why TIM may have immunogenic activity is that during the development of the tumor it produces aberrant or mutated proteins that can elicit an immune response [34]. Anti-endogenous TIM antibodies have been reported in squamous cell carcinoma of the lung [23], gastrointestinal carcinoma [26], esophageal carcinoma [34], breast cancer [32, 33], hepatoma [34] and carcinoma of the kidney [35], among others.

As mentioned before, one of the theories about the generation of autoimmune responses is the production of aberrant proteins, but the mechanism of the autoantibody response against intracellular proteins remains unknown. In some cases, the response is generated because variant proteins are expressed as results of the activation of alternative promoters after the cancerous transformation of the cells [33] or different isoforms of the protein are expressed [36, 39]. Moreover, it has been proposed that most tumor antigens are not products of damaged genes. Instead, tumor antigens are overexpressed proteins during cellular differentiation [23, 39] that change their expression level depending on the status of the tumor and direct the progression of the disease [36].

In squamous cell carcinoma of the lung, TIM is secreted to the extracellular medium assisting the recognition of the disease by the immune system. Pieper and coworkers [40] suggest that a mutation of threonine 28 for an isoleucine, produces a new epitope which increases the immune response. These autoantibodies also exist in other diseases such as hepatitis, but these antibodies are more reactive in patients with hepatic cancer than in those with hepatitis [34].

The humoral immune response against TIM is apparently dependent on certain post-transcriptional modifications such as protein glycosylation. Antibodies can recognize glycosylated TIM but not TIM without modifications [34, 39]. The high specificity with which the antibodies recognize glycosylated TIM, could yield clues to the metabolic changes that occur in the course of the disease.

In addition to cancer, anti-TIM antibodies have been detected in a variety of diseases. These include systemic lupus erythematosus, particularly its neurologic manifestation known as neuropsychiatric lupus erythematosus [41–43], in osteoarthritis, where they are associated with chronic inflammation [44] and in patients with hepatitis type A and mononucleosis, in which the antibodies cause hemolysis, the reactivation of the Epstein-Barr virus [45] and multiple sclerosis [46].

In general, each tissue or organ in the body has a different molecular composition, depending on its location and function. The mechanism of production of auto-antibodies against many of their extracellular and intracellular proteins is still not fully understood.

3. TIM AS A VIRULENCE FACTOR

Virulence factors are molecules with which a microorganism invades and colonizes other organisms and provokes sickness. Virulence factors can be proteins, carbohydrates or lipids which are usually located on the surface of the pathogen [47]. There are reports on a great number of virulence factors, and notably in some parasites and protozoans, some enzymes that are normally intracellular have been found in the extracellular matrix. Some of them are glycolytic enzymes among which are glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), enolase and TIM. It has been demonstrated that the function of these enzymes in the extracellular matrix is not catalytic [18, 48]. The mechanism of secretion to the exterior of the cell of these enzymes is unknown [47]. No signal sequence or anchoring motif that may help bind TIM, GAPDH or elongation factor thermo unstable (EF-Tu) to the surface of the cells has been identified [18]. Together with other proteins, TIM has been identified on the surface of Gram-positive bacteria [49]. Usually, proteins that anchor on the surface of cells with their C-terminal domain, maintain their N-terminal domain as a recognition peptide [47].

The cell surface has two types of adhesins: one type are proteins that are covalently associated with the membrane, the other type are proteins that are bound to the cellular surface using ionic interactions. In the case of *Lactobacillus plantarum*, it was shown that TIM, GAPDH, and EF-Tu were bound to the membrane with these ionic interactions [50].

TIM has also been reported as an external adhesion molecule in organisms like *Trichomonas vaginalis* [51], *Lactobacillus plantarum* [50] and *Paracoccidioides brasiliensis* [48]. In these organisms, TIM interacts with the epithelial cells and with the proteins of the extracellular matrix like laminin and fibronectin. TIM from *Staphylococcus aureus* mimic lectin activity and permits binding with sugars on the surface of *Cryptococcus neoformans*. The association of *S. aureus* TIM with the glyco-capsule of *C. neoformans* triggers apoptosis, and thus elimination of this pathogen [48, 52]. Furthermore, TIM from *S. aureus* together with enolase regulates fibrinolysis and fibrinogenesis, potentiating its capacity to invade tissue [47, 53].

In some parasites, one way to evade the immune response of the host is the continuous interchange of epitopes on the surface of their cells [54]. In some parasites like *Brugia malayi*, *Schistosoma mansoni* and *Haemonchus contortus*, variations in the quantities of TIM excreted to the medium, depending on the phase of their vital cycle, have been described [55]. It has also been reported that a certain concentration of TIM secreted to the medium is necessary for the maturation of *Brugia malayi*, indicating that TIM plays a role in the evasion/modulation of the host's immune response [56].

Drastic changes in the expression levels of TIM, related to viral replication, have also been reported in viral infections [57]. After viral infection, the machinery of the cell is sequestered by the virus to favor its replication or evade the immune response. The Warburg effect has been observed during infection of the cells of *Exopalaemon carinicauda* by the white spot syndrome virus (WSSV). This includes an increase of activity of glycolysis and a redirecting of the infected cells to different replication states. The levels of TIM are particularly altered, indicating that TIM has a major role in WSSV infection [57, 58].

4. TIM AS AN ALLERGEN

Food allergies are caused by an induced abnormal immune response to certain foods. The eight great groups of foodstuffs that are capable of generating this type of response are peanuts, nuts, soy, wheat, fish, oysters, milk and eggs. Allergies have increased all over the world in the last years, due to the increased consumption of certain foods [59, 60].

Typically, all allergens are proteins and, in some cases, these proteins exist in all organisms. Allergens usually have a low molecular mass (of approximately 10-70 kDa), a high solubility, a high thermic stability, and acid isoelectric points [60, 61]. The most common allergens in the groups of foodstuffs mentioned above have been known for decades, but there are still many that have not been identified and studied. There are databases that enlist details about certain molecular, biochemical and clinical properties of some of these proteins. An example is the list of allergens of the Allergen Nomenclature Sub-Committee of the World Health Organization and the International Union of Immunological Societies (www.allergen.org).

Among numerous families of proteins present in food, it has been found that most allergens belong to a small group

of proteins with restricted biochemical role [62]. Surprisingly, the TIM-barrel is the most frequent motif among the allergens [63].

TIM has been described as a new allergen, mainly in marine organisms and in certain invertebrates. Some of these species are: *Octopus fangsiao* [60], *Blattella germanica* [19], *Penaeus monodon* [64], *Procambarus clarkii* [65], *Citrullus lanatus* [59], *Forcipomyia taiwana* [66], latex (rubber) [67], *Litchi chinensis* [61], *Crangon crangon* [68], *Solea solea* [69] and *Sarcoptes scabiei* [70].

Pan-allergens are proteins that are present in all organisms and have the capacity of cross-reacting [64, 71]. Cross-reactions are immune responses against similar antigenic epitopes, which come from different sources. They generally occur with proteins that have at least 35% homology in their sequences [65]. For example, human TIM cross-reacts with TIMs from other species such as crustaceans, insects, dust mites and mollusks [64]. TIM from *B. germanica* (cockroach) has 60.7% sequence homology with wheat TIM and 19 other TIMs [19]. Thus, patients that are allergic against TIM from *B. germanica* can also react when exposed to other TIMs. Cross-reaction also occurs between TIM and other proteins. For example, TIM from *P. clarkii* has crossed-reactivity with Filamin C (FLN c), which is a protein that binds actin in this same organism [65]. It has also been proposed that hypersensitivity against watermelon (*C. lanatus*) TIM is due to cross-reactivity with the pollen of other plants. In the case of lychee TIM, cross-reaction has been seen with latex (rubber) TIM [67]. TIM from *S. scabiei* var. *canis* shows cross-reactivity with sera from rabbits that have been infected with other parasites. TIM from *S. scabiei* also shows great homology with 25 allergens of dust mites [70].

The mechanism by which TIM generates immune reactivity is not yet fully understood. Rosenberg and coworkers [72], proposed that the formation of homo and hetero-oligomeric aggregates between TIM itself or with other proteins considerably favors the humoral immune response against those proteins. An analysis of the structures of several crystallized allergens showed that 80% of them are dimers [64]. Since the oligomeric state can be important in the induction of the immune response, the treatment of the food before it is ingested is a factor that influences the generation of allergic responses. Generally, food receives treatment with heat (cooking) and is then subjected to changes in pH and enzymatic digestion when it is eaten. Most of the time there is either an increase or decrease in the hyper-reactivity caused by the proteins, in particular by TIM [60]. However, protein in its native conformation is not always the causative agent of allergic reaction [73]. In some cases, as is the case with the TIM from *O. fangsiao*, there is no decrease in the response when it is treated with heat. In contrast, TIM from *P. monodon* loses its immunogenicity under the same conditions [60].

There are two types of antigen epitopes: linear and conformational [73]. It is thought that epitopes of TIM from *O. fangsiao* are of the linear type because their conformations are not affected by hydrolysis and denaturation, but epitopes of TIM from *P. monodon* are conformational.

Much is unknown about the epitopes that initiate an anti-TIM allergy. Nevertheless, in the case of crustaceans and arthropods, such as the dust mite and *S. scabiei*, use of an antibody against anti-TIM IgE has been proposed as a good marker for allergy prediction [64, 70].

Due to their immense nutritional contribution to world food consumption, marine products can frequently produce allergies and hypersensitivity problems. Several common proteins that can elicit an immune response have been identified in these foods, which include tropomyosin, arginine kinase, the light chain of myosin, the sarcoplasmic calcium-binding protein, troponin C, hemocyanin and TIM [60, 73].

5. TIM AS A BIOMARKER OF CRYOPRESERVED SEMEN

Spermatozoa are highly differentiated cells which lack endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, peroxisomes, lysosomes, and ribosomes and therefore lack transcription and translation. Expression of proteins necessary for fecundation is completed before they are ejected to the environment [74]. Cryopreservation of semen is a technique that permits the conservation and dissemination of gametes of different species. Frequently, the procedure causes structural and functional damage to spermatozoa. The increase in reactive oxygen species (ROS), osmotic stress, mechanical damage and the formation of crystals, are the main causes of the decrease in the quality of sperm during cryopreservation. Changes in any of these variables affect the mobility and potential fertility of the sperm [75]. TIM is located in the membranes of the acrosomes of the spermatozoa and it plays an important role in the capacitation reaction and the binding of sperm to the pellucid zone of the oocyte [76]. Additionally, high levels of TIM have been found in asthenozoospermia (a diminishment in the motility of sperm) in boars. In bulls, high levels of TIM are associated with a lower quantity of sperm and low fertility levels [20, 77].

Analysis of the patterns of overexpression of spermatogenic proteins under various conditions revealed that cryopreservation produces changes in levels of expression of 41 enzymes [74]. These proteins belong to three groups: enzymes for the organization of the flagellum, detoxification proteins, and metabolic energy proteins. Among these enzymes, TIM modifies its quantity to an important degree. In studies of the quality of sperm for cryopreservation, two populations of cells have been identified with different levels of TIM expression. Those with low quantities of TIM before freezing had a better viability after thawing and those with high TIM levels had a low survival rate [20, 77].

It is thought that after thawing the high amounts of TIM predispose the cell to an "early capacitation"; that involves all the cellular modifications that allow the sperm to bind to the oocyte [20, 78, 79]. If capacitation occurs before the right time, the motility of the spermatozoa is affected.

During freezing and thawing of sperm cells, the lipids in their membranes are rearranged. These changes increase the fluidity of the membranes, causing alterations in intracellular calcium permeability, accelerating capacitation and diminishing the viability of the spermatozoa [75, 80, 81].

Additionally, it has been observed that cryopreservation induces important changes in phosphorylation and the redox state via carbonylation of the proteins of sperm. One of the proteins most affected by this reaction is TIM. Carbonylation of proteins is the direct result of the oxidative stress caused by cryopreservation [75].

Changes in the oxidation state of the proteins cause physio-pathological conditions due to the modification of their structure and function. For example, carbonylation of TIM and other enzymes promotes early capacitation of sperm [75].

Protein carbonylation can be a crucial component of redox signaling in certain mammalian tissues. It may be a part of the mechanism for cryo-capacitation, a method commonly used for mammalian sperm [75].

In vivo, infertility is frequently associated with low sperm count (azoospermia), but it has also been found that the production of anti-TIM antibodies hinders capacitation of sperm and their binding to the pellucid zone [76].

6. THE ROLE OF TIM IN ALZHEIMER'S DISEASE

The reactive species of oxygen and nitrogen (ROS and NOS) are normally produced in small amounts in mammalian cells, where they act as physiological messengers. Changes in the cellular environment, exposure to toxins or changes in metabolism change the balance of the concentration of these species. All cells in an organism are vulnerable to the damage caused by an unbalance of ROS. In particular, neurons have increased sensitivity because of their high energy demand and low concentration of antioxidants in these cells [82-84].

One of the hallmarks of Alzheimer's disease is the presence of plaques and neurofibrillary tangles due to the accumulation of the amyloid peptide (A β) and paired helical filaments of Tau protein [85, 86]. The main function of Tau protein is to stabilize microtubules, which are necessary for axonal transport. TIM interacts with Tau protein under normal and also under pathological conditions. Under normal conditions, when there is little oxidative stress, Tau protein protects TIM, preventing modifications that may affect TIM's activity [85]. It is known that A β is capable of reducing the Cu²⁺ and Fe³⁺ ions, with the concurrent production of H₂O₂, which creates a cascade of ROS. The superoxide anion (O₂⁻) reacts with nitric oxide (NO) to produce the peroxynitrite anion (ONOO⁻), which nitrates the tyrosines of proteins. This process is known as nitrotyrosination. This reaction, which involves the addition of a nitro (NO₂) group to a tyrosine, is irreversible and yields 3-nitrotyrosine as a product [87, 88]. In Alzheimer's disease, 45 proteins have been found that undergo this modification [84].

One of the proteins that are most affected by nitrotyrosination is TIM. TIM is the only glycolytic protein whose malfunction is associated with a loss of memory and with cerebral dysfunction and neurodegeneration [6, 7, 89]. When tyrosines of TIM are nitrated, its catalytic efficiency is decreased 15 times with respect to the wild-type enzyme [90]. Human TIM has 4 tyrosines, but the derivatization of Y164 and Y208 have a greater impact on the structure of the enzyme [90].

Enzymatic catalysis of TIM is usually accomplished in a special medium that enables isomerization. This setting is provided by the catalytic loop which remains open when there is no substrate and closed when catalysis is ongoing [91, 92]. Nitration of Y164 and Y208 prevents the loop from closing. Y164 interacts with T168 forming a hydrogen bond that reduces the mobility of the loop. Besides, the hydroxyl group of Y209 (of yeast TIM) is of highest importance for the stabilization of the loop in closed position. When this Y209 has nitrated the catalytic loop remains open, favoring the entrance of water to the active site and, with it, the formation of methylglyoxal (MEG) [88, 90, 93].

MEG is capable of glycosylating other amino acids in proteins and nucleic acids. Arginine is its most frequent target, producing argpyrimidine glycation of A β [84, 87, 88, 90, 94, 95], that accelerates the deposit of the amyloid peptide and considerably increases its toxicity [90].

The modifications brought by oxidative stress, as well as those created by the accumulation of MEG, produce compounds that are capable of modifying the permeability of the mitochondrial membrane [86]. For example, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, a product of the peroxidation of the lipids of the membrane, interacts with some amino acids such as cysteine, lysine, and histidine which generate conformational changes in membrane proteins. The damage to the structure of the membrane can be so severe that its permeability may induce cellular death. Additionally, MEG accumulation diminishes the mitochondrial membrane potential and as a result, the amount of pro-apoptotic proteins Bax and caspase -3 are increased [88, 96, 97].

Other studies indicate that nitrotyrosinated TIM has a greater tendency to aggregate. In an alignment of the sequence of amyloid peptide and TIM, a fragment of TIM showed 20% homology with the amyloid peptide [98]. Accumulation of nitrotyrosinated TIM aggregates that cannot be degraded by the proteasome act as seeds for the fibrogenesis of other proteins.

TIM has an important functional and structural role in Alzheimer's disease. It has been shown that the modification of the structure of the dimer is enough to induce neurodegeneration [7]. Likewise, modification of its function provokes the formation of toxic structures such as neurofibrillary plaques and tangles. Another common feature of Alzheimer's disease is a low level of ATP in the cells, which also correlates with the low activity of TIM [87, 99]. Figure 1 depicts a summary of the pathological processes in which TIM plays a role in Alzheimer's disease.

7. HUMAN DEFICIENCY OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE

Human TIM deficiency is a rare autosomal recessive disease that was first described in 1965. It belongs to a class of diseases called glycolytic enzymopathies which show symptoms such as chronic hemolytic anemia, cardiomyopathy, high susceptibility to infection, neurologic dysfunction and premature death [7, 89, 100].

Thirteen mutations of the gene that codifies for TIM (in chromosome 12p13) have been described for this disease, and all of them result in a diminished enzyme activity that

results in the excessive accumulation of DHAP. However, the most common mutation is in the codon for the amino acid in position 104, where a glutamic acid is substituted for an aspartic acid, producing the mutant enzyme TIM E104D. This mutation occurs in 80% of the cases. Other less frequent mutations are the substitution of cysteine 41 for tyrosine (TIM C41Y) and isoleucine 170 for valine (TIM I170V) [7, 101, 102]. Both mutations affect the dimerization of TIM and the binding of the substrate. There are other mutations that have been identified like the change of phenylalanine for leucine in position 240, glycine for arginine in position 122 or valine for methionine in positions 154 and 231 [22, 100, 101, 103, 104].

There are mainly two types of symptoms caused by this illness: the first is clearly due to the reduced catalytic function of the enzyme, which causes severe metabolic disorders and which are not in the scope of this review. The second type of symptoms, which are absent in very few patients, are associated with neurodegeneration.

7.1. Possible Causes of Neurodegeneration in Human TIM Deficiency

TIM deficiency is different from other glycolytic enzymopathies because none of these are associated with neurologic dysfunction. Although the precise causes for neurodegeneration in TIM deficiency are not known, there are some observations that could potentially explain it. When the catalytic activity of TIM is diminished there is an accumulation of DHAP in all cells [101]. For example, in patients with mutation TIM E145Stop /TIM F240L, the concentration of DHAP inside the erythrocytes is 60 times higher than normal. Even though the accumulation of high concentrations of DHAP is not toxic, the molecule tends to transform non-enzymatically to MEG, which is toxic and capable of modifying proteins and nucleic acids (see section 5 "The role of TIM in Alzheimer's disease" and Fig. 1). Under conditions of high oxidative and nitrative stress, glyoxalases cannot cope with the accumulation of MEG [21] and the glycated proteins, together with the oxidative stress and the damaged DNA, contribute to the neuronal symptoms [22, 101].

DHAP is also a precursor of acyl-DHAP, which is an intermediary in the synthesis of alkyl glycerol ethers and plasmalogens. DHAP can also be converted to non-ether derived glycerolipids, which produces an abnormal metabolism of lipids [105]. It has been reported that plasmalogen levels in the membranes of erythrocytes and lymphocytes can influence several processes related to protection mechanisms from oxidative stress [101, 106]. Coincidentally, the plasmalogen levels in erythrocytes from patients with TIM deficiencies due to TIME104D and TIM F240L/E145stop are diminished [101]. DHAP also inhibits competitively the activity of myo-inositol 3 phosphate synthase, an enzyme that involved in the de novo synthesis of inositol. A deficiency in the concentration of inositol has been described in several pathological conditions like bipolar disorder, Down's syndrome and peripheral diabetic neuropathy, which suggests that the deficit in TIM activity can contribute to neurodegeneration [101].

Other studies that could explain the development of neurodegeneration are those made by Roland *et al.*, [6, 7, 89],

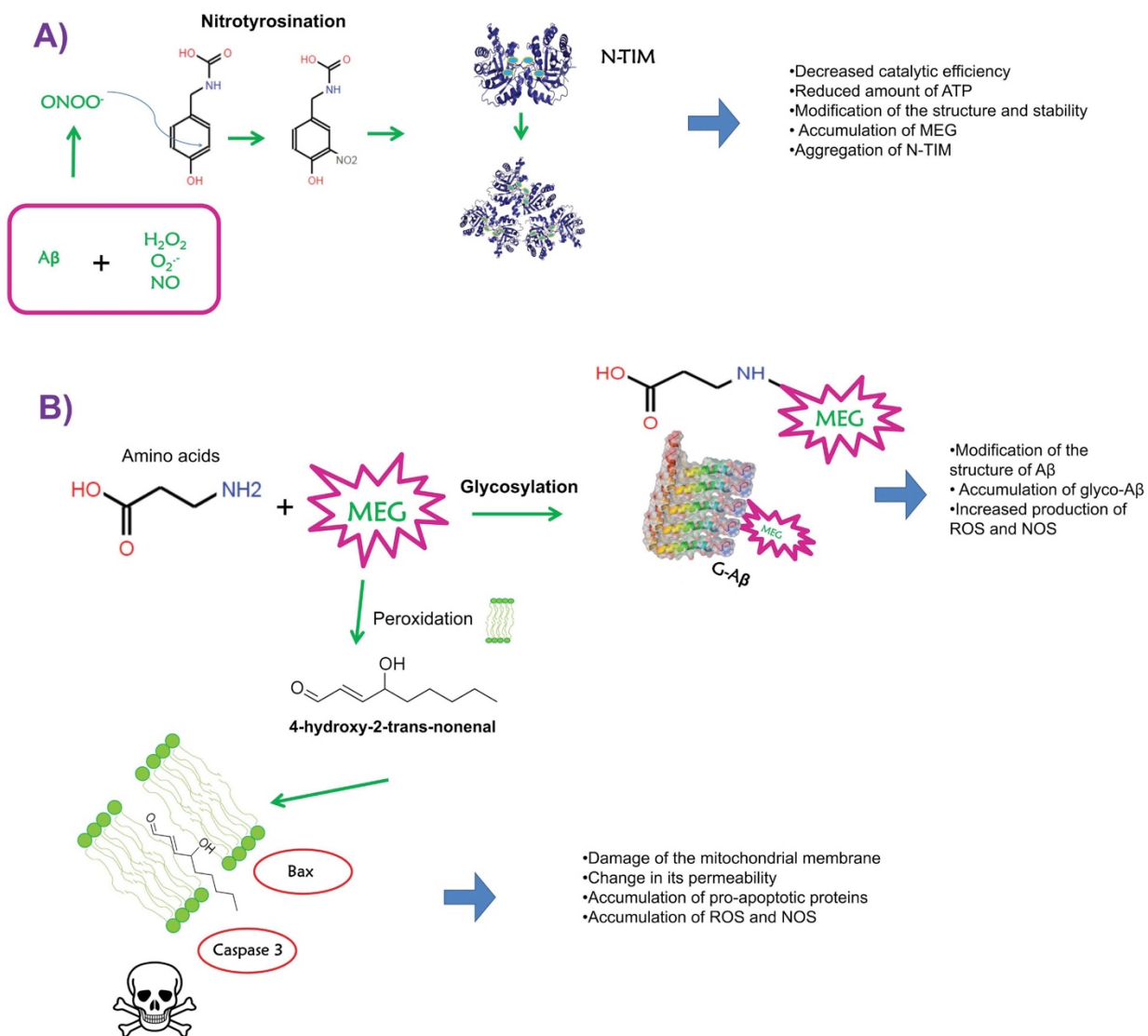


Fig. (1). Role of TIM in Alzheimer's disease. **A)** The accumulation of the amyloid peptide (Aβ), together with the oxidative/nitrative stress produce peroxynitrite which modifies tyrosines in proteins. During the progress of the disease, TIM is nitrotyrosinated (N-TIM), decreasing its catalytic activity, lowering ATP levels in the cells and favoring the formation of methylglyoxal (MEG), a highly toxic molecule. **B)** The accumulation of MEG generates further oxidative/nitrative stress in the cell. The contact of MEG with membranes produces 4-hydroxy-2-trans-nonenal, which damages the membrane and changes the membrane potential of the mitochondria generating apoptosis [96]. MEG can also glycosylate proteins like Aβ (G-Aβ). Accumulation of G-Aβ further favors production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species, and N-TIM aggregates can function as seeds to form new fibrillar structures.

Ralser *et al.* [100] and Rodríguez-Almazán *et al.* [107]. These studies indicate that TIM deficiency is produced by changes in the conformation of the protein, more than because of the metabolic defects caused by the loss of activity. Specifically, problems in dimerization and/or the assembly of the enzyme are the main cause of the disease. One proposal is that TIM participates in the dynamics of the vesicles in the synapse as the main source of the ATP (through glycolysis) that feeds the process and, when this pathway is inhibited, the traffic of the vesicles stops. Another proposal suggests that TIM participates in the mobilization of vesicles as an activator of other molecules that facilitate vesicular traffic [7, 108, 109]. Recently it has been found that TIM binds to cofilin, which is a regulatory protein of actin, and that, the

formation of a TIM-cofilin complex seems to regulate vesicle traffic [7, 110]. Thus, an anomaly in the structure of either protein could influence the formation of this complex, affecting neuronal communication [7].

It has also been reported that TIM can associate with the N-terminus of the transmembrane protein Band 3 from erythrocytes and that this association diminishes its catalytic activity [101, 111]. The N-terminus of protein Band 3 has great sequence similarity with the C-terminus of tubulin, which is the end with which tubulin is bound to the microtubules. It has therefore been suggested that TIM can also bind to the microtubules, which are the main component of neuronal axons, and thus provoke an energetic destabilization [87, 101].

8. DISCUSSION

There is a great discrepancy in the great size of the human genome and the number of synthesized proteins [13]. This difference implies the utilization of the limited amount of synthesized proteins to fulfill multiple functions. The case of TIM, as mentioned previously, is an enzyme present in all organisms, so that its reuse or moonlighting functions is a common occurrence.

TIM has several roles that are different from its traditional main function. But, relatively little is known of the properties and mechanisms that allow it to perform the varied functions described here. TIM seems to have a role in cell cycle signaling. It interacts with proteins like Cdk2, whose activity is essential in meiosis and the adequate control of cellular proliferation, repair, and death [15-17]. Its maximal activity is between phases S and G2, even though it is active in phases G1-S. It has been reported that Cdk2 is able to phosphorylate TIM, reducing its glycolytic activity and causing a disturbance in other pathways, which generate cellular arrest [96].

Cellular proliferation is strictly controlled and TIM, together with other enzymes seems to form a part of the controls. In certain types of gastric cancer, the levels of TIM are unbalanced, initiating the loss of control in cellular proliferation. This makes TIM a good biomarker for this type of ailment [24, 25].

The reason why a difference of expression levels of TIM between one type of cancer and another can vary the prognosis of the patients suffering these diseases is unknown. Yet, one of the aspects that have not been examined is that there may be several isoforms of this protein or that this enzyme may be subjected to different types of post-transcriptional modifications. In some cases, these modifications bring beneficial effects like in the maturation of sperm, where the active form of TIM is the one that is carbonylated [75]. Furthermore, there are other modifications that result in pathological processes like Alzheimer's disease [87, 88] and the formation of anti-TIM autoantibodies [34, 39]. For example, three isoforms of TIM are overexpressed in some types of pulmonary cancer, and, the clinical outcome of the disease varies depending on the isoform that is expressed. Interestingly these isoforms vary only in the type of modifications they show, with phosphorylation being the most common [112].

One of the factors that control post-transcriptional modifications in these proteins is the redox balance of the cell. Cdk2 is also related to the nitric oxide signaling pathway so that any failure in this pathway can cause important modifications in TIM and other proteins [96].

Whenever TIM suffers changes due to oxidative stress, it reduces its activity and changes its conformation favoring the production of MEG and the propagation of the oxidative damage in the cell.

As mentioned earlier, TIM expression has an impact on the prognosis of various cancer patients. The repercussions are different, depending on the type of tumor that develops. This may also be due to a high genetic variation between tumors and the way in which their metabolism varies, thus

affecting the differential response in TIM expression and the prognosis of the patient. Renal tumors have the greatest genetic variation and 3 types of mutations may be found among them. Clear cell renal carcinoma cells have a specific deletion in chromosome 3P, while papillary renal cell carcinoma cells have trisomies and chromosome Y losses and chromosome renal cell carcinoma cells have losses in chromosomes 1, 2, 6 and 10 [35].

A novel therapeutic strategy in cancer treatment is the inhibition of glycolysis. The disruption of this pathway, using Cdk2 to inactivate TIM, could produce the death of malignant cells [96].

It is interesting to note that in several diseases like cancer and Alzheimer's disease, overexpression of TIM also coincides with the overexpression of other proteins such as cofilin. This is a protein that binds actin and regulates the length of the microfilaments; it also acts in the reorganization of the microtubules for vesicle traffic. It is now known that cofilin associates with TIM so that they can be translocated by the plasmatic membrane and bind to the Na/K AT-Pase [110]. As described previously, the mechanisms by which TIM is transported outside the cell, or induces the formation of antibodies, or functions as a virulence factor, are unknown. Perhaps, its ability to associate with proteins related with cellular traffic (cofilin, Band 3 and microtubules) could give a clue.

The presence of TIM autoantibodies in cancer represents a type of "fingerprint" or "signature" of the immune system responding to the progression of the disease. Antibodies can sometimes be detected years or months before the main symptoms of the disease are apparent, giving signs of the dynamics of the carcinogenic process [34]. In neuropsychiatric lupus, anti-TIM antibodies appear in great quantities and they show a high specificity of 94.7%, making them a good marker for this disease [42].

It is thought that antibodies arise due to the exposure of misfolded proteins, however, misfolding is not necessary for immunogenicity. The reason could be the form in which protein is associated with itself or with other proteins [72].

Surprisingly, even though TIM is so immunogenic in certain pathologies, this enzyme also contributes to the evasion of the immune response. Certain parasites and bacteria use it as a protecting shield just for that purpose. In immune tolerance, the immune system recognizes a non-self or self-antigen, but no response is elicited. Tolerance depends on the situation in which the recognition of the antigen takes place [113].

CONCLUSION

TIM belongs to the group of moonlighting proteins, which carry multiple functions. Even though TIM is not a regulating enzyme, it seems to have an important metabolic role in the development of several cancers. The correct assembly of the protein is necessary for normal neuronal function, with structural modifications leading to neurodegeneration. Depending on the cellular environment TIM can be a potent allergen or induce immune tolerance.

New protein moonlighting functions are being discovered and may have evolved as a means of communication and

cooperation between different pathways necessary for fundamental functions in the complex world of different types of cells, within an organism [13].

Finally, further research is required considering TIM and its multiple functions, trying to elucidate the mechanisms by which it accomplishes all these different tasks, either to apply them biotechnologically or to prevent and treat a select group of diseases.

LIST OF ABBREVIATIONS

Abbreviations are defined when first used in the text.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant no. 254694 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (to R.P.-M.). MR-B was the recipient of a fellowship from CONACyT (no. 262118).

REFERENCES

- Katebi, A.R.; Jernigan, R.L. The critical role of the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics, and functionality. *Protein Sci.*, **2014**, *23*, 213-228.
- Bar-Even, A.; Flamholz, A.; Noor, E.; Milo, R. Rethinking glycolysis: On the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, *8*, 509-517.
- Osterman, A. Biogenesis and homeostasis of nicotinamide adenine dinucleotide cofactor. *EcoSal Plus* **2009**, *3*, doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.10.
- Richard, J.P. Restoring a metabolic pathway. *ACS Chem. Biol.*, **2008**, *3*, 605-607.
- Lincet, H.; Icard, P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene*, **2015**, *34*, 3751-3759.
- Roland, B.P.; Stuchul, K.A.; Larsen, S.B.; Amrich, C.G.; VanDemark, A.P.; Celotto, A.M.; Palladino, M.J. Evidence of a triosephosphate isomerase non-catalytic function crucial to behavior and longevity. *J. Cell Sci.*, **2013**, *126*, 3151-3158.
- Roland, B.P.; Zeccola, A.M.; Larsen, S.B.; Amrich, C.G.; Talsma, A.D.; Stuchul, K.A.; Heroux, A.; Levitan, E.S. VanDemark A.P. Palladino M.J. Structural and genetic studies demonstrate neurologic dysfunction in triosephosphate isomerase deficiency is associated with impaired synaptic vesicle dynamics. *PLoS Genet.*, **2016**, *12*, e1005941.
- Banner, D.W.; Bloomer, A.C.; Petsko, G.A.; Phillips, D.C.; Pogson, C.I.; Wilson, I.A.; Corran, P.H.; Furth, A.J.; Milman, J.D.; Offord, R.E.; Priddle, J.D.; Waley, S.G. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution: Using amino acid sequence data. *Nature*, **1975**, *255*, 609-614.
- Lesk, A.M.; Brändén, C.I.; Chothia, C. Structural principles of α/β barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins*, **1989**, *5*, 139-148.
- Wierenga, R.K. The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.*, **2001**, *492*, 193-198.
- Alber, T.; Banner, D.W.; Bloomer, A.C.; Petsko, G.A.; Phillips, D.; Rivers, P.S.; Wilson, I.A. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **1981**, *293*, 159-171.
- Wierenga, R.K.; Kapetanidou, E.G.; Venkatesan, R. Triosephosphate isomerase: A highly evolved biocatalyst. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2010**, *67*, 3961-3982.
- Jeffery, C.J. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.*, **2003**, *19*, 415-417.
- Dang, Y.; Wang, Z.; Guo, Y.; Yang, J.; Xing, Z.; Mu, L.; Zhang, X.; Ding, Z. Overexpression of triosephosphate isomerase inhibits proliferation of chicken embryonal fibroblast cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2011**, *12*, 3479-3482.
- Beranov-Giorgianni, S.; Zhao, Y.; Desiderio, D.M.; Giorgianni, F. Phosphoproteomic analysis of the human pituitary. *Pituitary*, **2006**, *9*, 109-120.
- Dephoure, N.; Zhou, C.; Villén, J.; Beausoleil, S.A.; Bakalarski, C.E.; Elledge, S.J.; Gygi, S.P. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 10762-10767.
- Imami, K.; Sugiyama, N.; Kyono, Y.; Tomita, M.; Ishihama, Y. Automated phosphoproteomic analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania / C18 biphasic column. *Anal. Sci.*, **2008**, *24*, 161-166.
- Pancholi, V.; Chhatwal, G.S. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.*, **2003**, *293*, 391-401.
- Chuang, J.G.; Su, S.N.; Chiang, B.L.; Lee, H.J.; Chow, L.P. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. *Proteomics*, **2010**, *10*, 3854-3867.
- Vilagran, I.; Castillo, J.; Bonet, S.; Sancho, S.; Yeste, M.; Estanyol, J.M.; Oliva, R. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, **2013**, *80*, 443-450.
- Ahmed, N.; Battah, S.; Karachalias, N.; Babaei-Jadidi, R.; Horányi, M.; Baróti, K.; Hollan, S.; Thornalley, P.J. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1639*, 121-132.
- Schneider, A.S. Triosephosphate isomerase deficiency: Historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, **2000**, *13*, 119-140.
- Yang, F.; Xiao, Z.Q.; Zhang, X.Z.; Li, C.; Zhang, P.F.; Li, M.; Chen, Y.; Zhu, G.Q.; Sun, Y.; Liu, Y.F.; Chen, Z.C. Identification of tumor antigens in human lung squamous carcinoma by serological proteome analysis. *J. Proteome Res.*, **2007**, *6*, 751-758.
- Wang, X.; Lu, Y.; Yang, J.; Shi, Y.; Lan, M.; Liu, Z.; Zhai, H.; Fan, D. Identification of triosephosphate isomerase as an anti-drug resistance agent in human gastric cancer cells using functional proteomic analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2008**, *134*, 995-1003.
- Jiang, H.; Ma, N.; Shang, Y.; Zhou, W.; Chen, T.; Guan, D.; Li, J.; Wang, J.; Zhang, E.; Feng, Y.; Yin, F.; Yuan, Y.; Fang, Y.; Qiu, L.; Xie, D.; Wei, D. Triosephosphate isomerase 1 suppresses growth, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2017**, *482*, 1048-1053.
- Chen, T.; Huang, Z.; Tian, Y.; Lin, B.; He, R.; Wang, H.; Ouyang, P.; Chen, H.; Wu, L. Clinical significance and prognostic value of triosephosphate isomerase expression in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*, **2017**, *96*, e6865.
- Chen, T.; Huang, Z.; Tian, Y.; Wang, H.; Ouyang, P.; Chen, H.; Wu, L.; Lin, B.; He, R. Role of triosephosphate isomerase and downstream functional genes on gastric cancer. *Oncol. Rep.*, **2017**, *38*, 1822-1832.
- Ford, H.L.; Pardee, A.B. Cancer and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.*, **1999**, (Suppl. 32-33), 166-172.
- Zhu, J.; Xu, J.; Wang, Y.; Li, C.; Chen, Z.; Song, L.; Gao, J.; Yu, R. Purification and structural characterization of a novel-tumor protein from *Arca inflata*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *105*, 103-110.
- Toyama, A.; Suzuki, A.; Shimada, T.; Aoki, C.; Aoki, Y.; Umino, Y.; Nakamura, Y.; Aoki, D.; Sato, T.A. Proteomic characterization of ovarian cancers identifying annexin-A4, phosphoserine aminotransferase, cellular retinoic acid-binding protein 2, and serpin B5 as histology-specific biomarkers. *Cancer Sci.*, **2012**, *103*, 747-755.
- Paricharttanakul, N.M.; Saharat, K.; Chokchaichamankit, D.; Punyarit, P.; Srisomsap, C.; Svasti, J. Unveiling a novel biomarker panel for diagnosis and classification of well-differentiated thyroid carcinomas. *Oncol. Rep.*, **2016**, *35*, 2286-2296.
- Desmetz, C.; Bibeau, F.; Boissière, F.; Bellet, V.; Rouanet, P.; Maudelonde, T.; Mangé, A.; Solassol, J. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in early stage breast

- cancer and ductal carcinoma *in situ*. *J. Proteome Res.*, **2008**, *7*, 3830-3837.
- [33] Zamani-Ahmadmamdudi, M.; Nassiri, S.M.; Rahbarghazi, R. Serological proteome analysis of dogs with breast cancer unveils common serum biomarkers with human counterparts. *Electrophoresis*, **2014**, *35*, 901-910.
- [34] Gao, H.; Zheng, Z.; Mao, Y.; Wang, W.; Qiao, Y.; Zhou, L.; Liu, F.; He, H.; Zhao, X. Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in the sera of chinese esophageal squamous cell carcinoma patients by modified serological proteome analysis. *Cancer Lett.*, **2014**, *344*, 54-61.
- [35] Valera, V.A.; Li-Ning, T.E.; Walter, B.A.; Roberts, D.D.; Linehan, W.M.; Merino, M.J. Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas. *J. Cancer*, **2010**, *1*, 184-196.
- [36] Unwin, R.D.; Craven, R.A.; Hamden, P.; Hanrahan, S.; Totty, N.; Knowles, M.; Eardley, I.; Selby, P.J.; Banks, R.E. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*, **2003**, *3*, 1620-1632.
- [37] Wang, J.W.; Peng, S.Y.; Li, J.T.; Wang, Y.; Zhang, Z.P.; Cheng, Y.; Cheng, D.Q.; Weng, W.H.; Wu, X.S.; Fei, X.Z.; Quan, Z.W.; Li, Z.Y.; Li, S.G.; Liu, Y.B. Identification of metastasis-associated proteins involved in gallbladder carcinoma metastasis by proteomic analysis and functional exploration of chloride intracellular channel 1. *Cancer Lett.*, **2009**, *281*, 71-81.
- [38] Yoshida, A.; Okamoto, N.; Tozawa-Ono, A.; Koizumi, H.; Kiguchi, K.; Ishizuka, B.; Kumai, T.; Suzuki, N. Proteomic analysis of differential protein expression by brain metastases of gynecological malignancies. *Hum. Cell*, **2013**, *26*, 56-66.
- [39] Hong Y, Huang J. Autoantibodies against tumor-associated antigens for detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.*, **2015**, *7*, 1581-1585.
- [40] Pieper, R.; Christian, R.E.; Gonzales, M.I.; Nishimura, M.I.; Gupta, G.; Settlage, R.E.; Shabanowitz, J.; Rosenberger, S.A.; Hunt, D.F.; Topalian, S.L. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.*, **1999**, *189*, 757-766.
- [41] Sato, S.; Yashiro, M.; Asano, T.; Kobayashi, H.; Watanabe, H.; Migita, K. Association of anti-triosephosphate isomerase antibodies with aseptic meningitis in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.*, **2017**, *36*, 1655-1659.
- [42] Watanabe, H.; Seino, T.; Sato, Y. Antibodies to triosephosphate isomerase in patients with neuropsychiatric lupus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *321*, 949-953.
- [43] Sasajima, T.; Watanabe, H.; Sato, S.; Sato, Y.; Ohira, H. Anti-triosephosphate isomerase antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric lupus. *J. Neuroimmunol.*, **2006**, *181*, 150-156.
- [44] Xiang, Y.; Sekine, T.; Nakamura, H.; Imajoh-Ohmi, S.; Fukuda, H.; Nishioka, K.; Kato, T. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, **2004**, *50*, 1511-1521.
- [45] Ritter, S.; Schröder, S.; Uy, A.; Ritter, K. Haemolysis in hepatitis A virus infections coinciding with the occurrence of autoantibodies against triosephosphate isomerase and the reactivation of latent persistent Epstein-Barr virus infection. *J. Med. Virol.*, **1996**, *50*, 272-275.
- [46] Kolln, J.; Ren, H.M.; Da, R.R.; Zhang, Y.; Spillner, E.; Olek, M.; Hermanowicz, N.; Hilgenberg, L.G.; Smith, M.A.; van den Noort, S.; Qin, Y. Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.*, **2006**, *177*, 5652-5658.
- [47] Furuya, H.; Ikeda, R. Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. *Microbiol. Immunol.*, **2011**, *55*, 855-862.
- [48] Furuya, H.; Ikeda, R. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of *Staphylococcus aureus* and alpha-(1->3)-mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, **2009**, *155*, 2707-2713.
- [49] Ramiah, K.; van Reenen, C.A.; Dicks, L.M.T. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.*, **2008**, *159*, 470-475.
- [50] Kinoshita, H.; Ohuchi, S.; Arakawa, K.; Watanabe, M.; Kitazawa, H.; Saito, T. Isolation of lactic acid bacteria bound to the porcine intestinal mucosa and an analysis of their moonlighting adhesins. *Biosci. Microbiota Food Health*, **2016**, *35*, 185-196.
- [51] Miranda-Ozuna, J.F.; Hernández-García, M.S.; Brieba, L.G.; Benítez-Cardoza, C.G.; Ortega-López, J.; González-Robles, A.; Arroyo, R. The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infect. Immun.*, **2016**, *84*, 2878-2894.
- [52] Yamaguchi, M.; Ikeda, R.; Nishimura, M.; Kawamoto, S. Localization by scanning immunoelectron microscopy of triosephosphate isomerase, the molecules responsible for contact-mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus*. *Microbiol. Immunol.*, **2010**, *54*, 368-370.
- [53] Ikeda, R.; Ichikawa, T. Interaction of surface molecules on *Cryptococcus neoformans* with plasminogen. *FEMS Yeast Res.*, **2014**, *14*, 445-450.
- [54] Ditgen, D.; Anandarajah, E.M.; Meissner, K.A.; Brattig, N.; Wrenner, C.; Liebau, E. Harnessing the helminth secretome for therapeutic immunomodulators. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, *2014*, 964350.
- [55] Bennuru, S.; Semmani, R.; Meng, Z.; Ribeiro, J.M.C.; Veenstra, T.D.; Nutman, T.B. *Brugia malayi* excreted/secreted proteins at the host/parasite interface: stage- and gender-specific proteomic profiling. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2009**, *3*, e410.
- [56] Hewitson, J.P.; Rückert, D.; Harcus, Y.; Murray, J.; Webb, L.M.; Babayan, S.A.; Allen, J.E.; Kurniawan, A.; Maizels, R.M. The secreted triose phosphate isomerase of *Brugia malayi* is required to sustain microfilaria production *in vivo*. *PLoS Pathog.*, **2014**, *10*, e1003930.
- [57] Liu, F.; Li, S.; Liu, G.; Li, F. Triosephosphate isomerase (TPI) facilitates the replication of WSSV in *Exopalaemon carinicauda*. *Dev. Comp. Immunol.*, **2017**, *71*, 28-36.
- [58] Vester, D.; Rapp, E.; Kluge, S.; Genzel, Y.; Reichl, U. Virus-host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: A proteomic approach. *J. Proteomics*, **2010**, *73*, 1656-1669.
- [59] Pastor, C.; Cuesta-Herranz, J.; Cases, B.; Pérez-Gordo, M.; Figueiredo, E.; de las Heras, M.; Vivanco, F. Identification of major allergens in watermelon. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2009**, *149*, 291-298.
- [60] Yang, Y.; Chen, Z.W.; Hurlburt, B.K.; Li, G.L.; Zhang, Y.X.; Fei, D.X.; Shen, H.W.; Cao, M.J.; Liu, G.M. Identification of triosephosphate isomerase as a novel allergen in *Octopus fangsiao*. *Mol. Immunol.*, **2017**, *85*, 35-46.
- [61] Hoppe, S.; Steinhart, H.; Paschke, A. Identification of a 28 kDa Lychee allergen as a triose-phosphate isomerase. *Food Agric. Immunol.*, **2006**, *17*, 9-19.
- [62] Radauer, C.; Bublin, M.; Wagner, S.; Mari, A.; Breiteneder, H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2008**, *121*, 847-852.
- [63] Hoffmann-Sommergruber, K.; Bruckmüller, M. Watermelon contains 92 % water but it also contains allergens! *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2009**, *149*, 289-290.
- [64] Kamath, S.D.; Rahman, A.M.; Voskamp, A.; Komoda, T.; Rolland, J.M.; O'Hehir, R.E.; Lopata, A.L. Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2014**, *58*, 1144-1155.
- [65] Yang, Y.; Zhang, Y.X.; Liu, M.; Maleki, S.J.; Zhang, M.L.; Liu, Q.M.; Cao, M.J.; Su, W.J.; Liu, G.M. Triosephosphate isomerase and Filamin C share common epitopes as novel allergens of *Procambarus clarkii*. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, *65*, 950-963.
- [66] Chen, Y.H.; Lee, M.F.; Lan, J.L.; Chen, C.S.; Wang, H.L.; Hwang, G.Y.; Wu, C.H. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): Clinical analysis and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. *Allergy*, **2005**, *60*, 1518-1523.
- [67] Posch, A.; Chen, Z.; Wheeler, C.; Dunn, M.J.; Raulf-Heimsoth, M.; Baur, X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1997**, *99*, 385-395.
- [68] Bauermeister, K.; Wangorsch, A.; Garoffo, L.P.; Reuter, A.; Conti, A.; Taylor, S.L.; Lidholm, J.; Dewitt, A.M.; Enrique, E.; Vieths, S.; Holzhauser, T.; Ballmer-Weber, B.; Reese, G. Generation of a

- comprehensive panel of crustacean allergens from the north sea shrimp *Crangon crangon*. *Mol. Immunol.*, **2011**, *48*, 1983-1992.
- [69] Pérez-Gordo, M.; Pastor Vargas, C.; Cases, B.; De Las Heras M.; Sanz A.; Vivanco, F.; Cuesta-Herranz, J. New allergen involved in a case of allergy to *Solea solea*, common sole. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **2010**, *104*, 352-353.
- [70] He, R.; Zhang, H.; Shen, N.; Guo, C.; Ren, Y.; Xie, Y.; Gu, X.; Lai, W.; Peng, X.; Yang, G. Molecular characterization and allergenicity potential of triosephosphate isomerase from *Sarcoptes scabiei*. *Vet. Parasitol.*, **2018**, *257*, 40-47.
- [71] Hauser, M.; Roulias, A.; Ferreira, F.; Egger, M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **2010**, *6*, 1.
- [72] Rosenberg, A.S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.*, **2006**, *8*, E501-E507.
- [73] Mao, H.Y.; Cao, M.J.; Maleki, S.J.; Cai, Q.F.; Su, W.J.; Yang, Y.; Liu, G.M. Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Mol. Immunol.*, **2013**, *56*, 463-470.
- [74] Cheng, C.Y.; Chen, P.R.; Chen, C.J.; Wang, S.H.; Chen, C.F.; Lee, Y.P.; Huang, S.Y. Differential protein expression in chicken spermatozoa before and after freezing-thawing treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, **2015**, *152*, 99-107.
- [75] Mostek, A.; Dietrich, M.A.; Słowińska, M.; Ciereszko, A. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology*, **2017**, *92*, 95-102.
- [76] Zangbar, M.S.; Keshtgar, S.; Zolghadri, J.; Gharesi-Fard, B. Antisperm protein targets in azoospermia men. *J. Hum. Reprod. Sci.*, **2016**, *9*, 47-52.
- [77] Vilagran, I.; Castillo-Martín, M.; Prieto-Martínez, N.; Bonet, S.; Yeste, M. Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.*, **2016**, *165*, 22-30.
- [78] Bailey, J.L.; Tardif, S.; Dubé, C.; Beaulieu, M.; Reyes-Moreno, C.; Lefièvre, L.; Leclerc, P. Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. kinase activity and capacitation. *Theriogenology*, **2005**, *63*, 599-614.
- [79] Bone, W.; Jones, A.R.; Morin, C.; Nieschlag, E.; Cooper, T.G. Susceptibility of glycolytic enzyme activity and motility of spermatozoa from rat, mouse, and human to inhibition by proven and putative chlorinated antifertility compounds *in vitro*. *J. Androl.*, **2001**, *22*, 464-470.
- [80] Cormier, N.; Bailey, J.L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **2003**, *69*, 177-185.
- [81] Pons-Rejraji, H.; Bailey, J.L.; Leclerc, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod. Fertil. Dev.*, **2009**, *21*, 525-537.
- [82] Nakamura, T.; Cho, D.H.; Lipton, S.A. Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurol.*, **2012**, *238*, 12-21.
- [83] Nakamura, T.; Tu, S.; Akhtar, M.W.; Sunico, C.R.; Okamoto, S.; Lipton, S.A. Aberrant protein S-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron*, **2013**, *78*, 596-614.
- [84] Zahid, S.; Khan, R.; Oellerich, M.; Ahmed, N.; Asif, A.R. Differential S-nitrosylation of proteins in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **2014**, *256*, 126-136.
- [85] Park, S.A.; Park, H.W.; Kim, N.H.; Kim, Y.H.; Kwak, M.J.; Shin, J.S.; Kim, C.W. Effects of Tau on the activity of triose phosphate isomerase (TPI) in brain cells. *Neurochem. Int.*, **2010**, *56*, 886-892.
- [86] Hu, H.; Tan, C.C.; Tan, L.; Yu, J.T. A mitocentric view of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, **2017**, *54*, 6046-6060.
- [87] Coma, M.; Guix, F.X.; Uribealago, I.; Espuña, G.; Solé, M.; Andreu, D.; Muñoz, F.J. Lack of oestrogen protection in amyloid-mediated endothelial damage due to protein nitrotyrosination. *Brain*, **2005**, *128*, 1613-1621.
- [88] Tajés, M.; Eraso-Pichot, A.; Rubio-Moscardó, F.; Guivernau, B.; Bosch-Morató, M.; Valls-Comamala, V.; Muñoz, F.J. Methylglyoxal reduces mitochondrial potential and activates Bax and caspase-3 in neurons: Implications for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **2014**, *580*, 78-82.
- [89] Roland, B.P.; Amrich, C.G.; Kammerer, C.J.; Stuchul, K.A.; Larsen, S.B.; Rode, S.; Aslam, A.A.; Heroux, A.; Wetzel, R.; VanDeMark, A.P.; Palladino, M.J. Triosephosphate isomerase I170V alters catalytic site, enhances stability and induces pathology in a *Drosophila* model of TPI deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1852*, 61-69.
- [90] Guix, F.X.; Ill-Raga, G.; Bravo, R.; Nakaya, T.; de Fabritiis, G.; Coma, M.; Miscione, G.P.; Villà-Freixa, J.; Suzuki, T.; Fernández-Busquets, X.; Valverde, M.A.; de Strooper, B.; Muñoz, F.J. Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain*, **2009**, *132*, 1335-1345.
- [91] Knowles J.R. Enzyme catalysis: Not different, just better. *Nature*, **1991**, *350*, 121-124.
- [92] Rozovsky, S.; McDermott, A.E. The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *310*, 259-270.
- [93] Gao, W.; Zhao, J.; Li, H.; Gao, Z. Triosephosphate isomerase tyrosine nitration induced by heme - NaNO₂ - H₂O₂ or peroxyxynitrite : effects of different natural phenolic compounds. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **2017**, *31*, doi: 10.1002/jbt.21893.
- [94] Ill-Raga, G.; Ramos-Fernández, E.; Guix, F.X.; Tajés, M.; Bosch-Morató, M.; Palomer, E.; Godoy, J.; Belmar, S.; Cerpa, W.; Simpkins, J.W.; Inestrosa, N.C.; Muñoz, F.J. Amyloid-β peptide fibrils induce nitro-oxidative stress in neuronal cells. *J. Alzheimers Dis.*, **2010**, *22*, 641-652.
- [95] Kim, C.; Lim, Y.; Yoo, B.C.; Won N.H.; Kim, S.; Kim, G. Regulation of post-translational protein arginine methylation during HeLa cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1800*, 977-985.
- [96] Lee, W.H.; Choi, J.S.; Byun, M.R.; Koo, K.T.; Shin, S.; Lee, S.K.; Surh Y.J. Functional inactivation of triosephosphate isomerase through phosphorylation during etoposide-induced apoptosis in HeLa cells: Potential role of Cdk2. *Toxicology*, **2010**, *278*, 224-228.
- [97] Sultana, R.; Butterfield, D.A. Identification of the oxidative stress proteome in the brain. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *50*, 487-494.
- [98] Contreras, C.F.; Canales, M.A.; Alvarez, A.; Ferrari, G.V.; Inestrosa, N.C. Molecular modeling of the amyloid-β peptide using the homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid *in vitro*. *Protein Eng.*, **1999**, *12*, 959-966.
- [99] Butterfield, D.A. Proteomics: A new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.*, **2004**, *1000*, 1-7.
- [100] Ralser, M.; Heeren, G.; Breitenbach, M.; Lehrach, H.; Krobitsch, S. Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization--not catalytic inactivity--of the mutant enzymes. *PLoS One*, **2006**, *1*, e30.
- [101] Orosz, F.; Oláh, J.; Ovádi, J. Triosephosphate isomerase deficiency: Facts and doubts. *IUBMB Life*, **2006**, *58*, 703-715.
- [102] Orosz, F.; Oláh, J.; Ovádi, J. Reappraisal of the triosephosphate isomerase deficiency. *Eur. J. Haematol.*, **2011**, *86*, 265-267.
- [103] Serdaroglu, G.; Aydinok, Y.; Yilmaz, S.; Manco, L.; Özer, E. Triosephosphate isomerase deficiency: A patient with Val231Met mutation. *Pediatr. Neurol.*, **2011**, *44*, 139-142.
- [104] Cabrera, N.; Torres-Larios, A.; García-Torres, I.; Enríquez-Flores, S.; Perez-Montfort, R. Differential effects on enzyme stability and kinetic parameters of mutants related to human triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **2018**, *1862*, 1401-1409.
- [105] Hollán, S.; Magócsi, M.; Fodor, E.; Horányi, M.; Harsányi, V.; Farkas, T. Search for the pathogenesis of the differing phenotype in two compound heterozygote Hungarian brothers with the same genotypic triosephosphate isomerase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 10362-10366.
- [106] Hollán, S.; Dey, I.; Szollár, L.; Horányi, M.; Magócsi, M.; Harsányi, V.; Farkas, T. Erythrocyte lipids in triose-phosphate isomerase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 268-271.
- [107] Rodríguez-Almazán, C.; Arreola, R.; Rodríguez-Larrea, D.; Aguirre-López, B.; de Gómez-Puyou, M.T.; Pérez-Montfort, R.; Costas, M.; Gómez-Puyou, A.; Torres-Larios, A. Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 23254-23263.
- [108] Görlich, A.; Wolf, M.; Zimmermann, A.M.; Gurniak, C.B.; Al Banhaabouchi, M.; Sassoè-Pognetto, M.; Witke, W.; Friauf, E.; Rust, M.B. N-cofilin can compensate for the loss of ADF in excitatory synapses. *PLoS One*, **2011**, *6*, e26789.
- [109] Wolf, M.; Zimmermann, A.M.; Görlich, A.; Gurniak, C.B.; Sassoè-Pognetto, M.; Friauf, E.; Witke, W.; Rust, M.B. ADF/Cofilin con-

- trols synaptic actin dynamics and regulates synaptic vesicle mobilization and exocytosis. *Cereb. Cortex*, **2015**, *25*, 2863-2875.
- [110] Jung, J.; Yoon, T.; Choi, E.C.; Lee, K.; Interaction of cofilin with triose-phosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na,K-ATPase via Rho-mediated signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 48931-48937.
- [111] Knull, H.R.; Walsh, J.L. Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Curr. Top. Cell. Regul.*, **1992**, *33*, 15-30.
- [112] Chen, G.; Gharib, T.G.; Huang, C.C.; Thomas, D.G.; Shedden, K.A.; Taylor, J.M.; Kardia, S.L.; Misek, D.E.; Giordano, T.J.; Iannettoni, M.D.; Orringer, M.B.; Hanash, S.M.; Beer, D.G. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: Identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2002**, *8*, 2298-2305.
- [113] Wawrzyniak, M.; O'Mahony, L.; Akdis, M. Role of regulatory cells in oral tolerance. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **2017**, *9*, 107-115.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

PMID: 30370845