



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00076

Matrícula: 203381643

DESESTABILIZACION DE LA  
TRIOSAFOSPATO ISOMERASA COMO  
RESULTADO DE LA MUTACION DE  
CISTEINAS CONSERVADAS Y NO  
CONSERVADAS

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 13 del mes de abril del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ  
DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA  
DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA  
DR. RUY PEREZ MONTFORT  
DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: MARIA EUGENIA CRUCES ANGELES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



MARIA EUGENIA CRUCES ANGELES  
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES  
HEREDIA

PRESIDENTE

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ

VOCAL

DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

VOCAL

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ  
CARDOZA

VOCAL

CANCELADO

DR. RUY PEREZ MONTFORT

SECRETARIO

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**División de Ciencias Básicas e Ingenierías**

Desestabilización de la triosafosfato isomerasa  
como resultado de la mutación de cisteínas  
conservadas y no conservadas

Tesis que presenta:  
**Q. María Eugenia Cruces Ángeles**  
Para obtener el grado académico de  
**Doctora en Ciencias (Química)**

**Área de Biofísicoquímica**

**Posgrado en Ciencias (Química)**  
Doctorado Directo

**Dr. Andrés Hernández Arana**  
Asesor del Departamento de Química

México, D. F., abril de 2012

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Andrés Hernández Arana en el área de Biofísicoquímica del Departamento de Química, Ciencias Básicas e Ingenierías de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Para la realización de éste proyecto se contó con el apoyo económico otorgado por CONACYT mediante la Beca de Doctorado con el número de registro **179692**, así como el apoyo financiero otorgado por CONACYT al Dr. Andrés Hernández Arana a través del convenio número 2007-80457

## **Este trabajo esta dedicado**

A mis padres Jesús y Guadalupe que con su amor y consejos, me motivaron a no darme por vencida

A mis hijos Alejandra, Omar, Amy, Santiago y Pumara, a quienes les robe parte de su tiempo.

A mis hermanas Estelita, Gwi, Rosy, Lupita, Shirga, Apún y mi hermano Jesús, que con su apoyo constante y sus palabras de aliento, me ayudaron a no rendirme,

A mis sobrinas y sobrinos los quiero mucho, gracias por su apoyo

## **Agradecimientos**

Mi eterna gratitud al Dr. Andrés Hernández Arana, por su dedicación, paciencia y confianza, para llevar a cabo este trabajo de investigación. Agradezco todo el apoyo brindado por sus consejos como investigador y como persona, por su alta calidad humana, que con su guía y sabiduría, se logró el objetivo propuesto.

Agradezco a los miembros del jurado: Dr. Arturo Rojo Domínguez, Dr. Rafael Zubillaga Luna, Dra. Claudia Benítez Cardoza, Dra. Silvia Solís Mendiola y Dr. Ruy Pérez Montfort, por el tiempo brindado, en la lectura, corrección y comentarios que contribuyeron a la culminación de este trabajo.

Un reconocimiento al Dr. Ruy Pérez Montfort, del Instituto de Fisiología de la UNAM, quien con el apoyo financiero otorgado por CONACYT a través del convenio número 2005-49872, pudo facilitarme los medios, y asesorías, para la construcción de las mutantes utilizadas en este trabajo,

Con respeto a la Dra. Adela Rodríguez Romero del Instituto de Química de la UNAM, quien proporcionó el equipo para llevar a cabo la purificación de las proteínas utilizadas en este proyecto.

Agradezco al Dr. D. Alejandro Fernández Velasco de la Facultad de Medicina de la UNAM, por sus consejos y sugerencias para el enriquecimiento de la investigación del proyecto.

A la Bióloga Nallely Cabrera González, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su enseñanza en la introducción a la biología molecular y su asesoría en la construcción de las mutantes utilizadas.

Al Dr. Cesar A. Reyes López, por su contribución en el inicio de la creación de algunas de las mutantes que fueron utilizadas en este proyecto.

A la Dra. Teresa Ramírez por ser tan paciente conmigo y apoyarme en todo momento

A mis hermanas académicas Citlali Toledo y Ariana Labastida por apoyarme y hacerme sentir como hermanas de verdad.

A mis compañeros y amigos del área de biofísicoquímica: Los antiguos Ezequiel, Lety y Rosy; los actuales; Iris Serratos, Francisco Reyes, Menandro Camarillo, Juan Carlos Martínez, Ponci García, Viviana y a los nuevos; Izlia, Sandra, David, Alexandro y Lety, por hacer del laboratorio una segunda casa.

En especial a Arnulfo Vidrio y Leonardo Herrera por asesorarme en los temas bioinformáticos

A mis amigas Silvia Cortes y Conchita por compartir esas comidas tan agradables.

A mis amigos del Departamento de Química: Manuel Islas, Salomón Alas, Adrián Azul, Juanito, Israel Chapas, Israel Castro, Toñita, Claudia, Marina, María Luisa, Mariana, Ommar, Miguelón, Ricardo, Mireya, Salomón Cordero, Armando Domínguez, Marquitos, Fernando Rojas, Alejandro L. Gaona, Miguel Ángel García, Tzompantzin por su valiosa amistad y su apoyo.

Si por olvido excluyó a alguna persona, mil disculpas, pero ustedes saben que los aprecio.

**Gracias Dios por permitirme alcanzar mis sueños  
y darme la oportunidad de seguir aquí, con mi familia.**

# Índice

Abreviaturas	vii
Resumen	1
Capítulo 1: Introducción	3
Evolución molecular	3
Cisteínas conservadas y no conservadas	4
Generalidades de la triosafosfato isomerasa	6
Características estructurales	6
Propiedades catalíticas	9
Características de los residuos de cisteína de la triosafosfato isomerasa de levadura	11
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Capítulo 2: Materiales y Métodos	17
Metodología de DNA recombinante	17
Determinación de parámetros catalíticos	20
Métodos espectroscópicos para el estudio de cambios conformacionales	21
Transiciones térmicas	22
Estudios cinéticos de desplegamiento	23
Estudios cinéticos de replegamiento	24
Capítulo 3: Resultados	26
Alineamiento	26
Estructura	27
Expresión y purificación de las mutantes de TIM	30
Efectos de las mutaciones en la función de TIM	31
Propiedades espectroscópicas de las mutantes de la enzima triosafosfato isomerasa de levadura	32
Barrido de temperatura	34
Efecto de DTT en el replegamiento	36



---

Cinética de desplegamiento	38
Cinética de replegamiento	42
Estimación de la estabilidad global de la TIM	45
Capítulo 4. Discusión	49
El papel de la Cys126 en la actividad enzimática	49
Efectos de la mutación de las cisteínas en la estabilidad de ScTIM	50
Estabilidad cinética como principal determinante para la aptitud de una proteína	55
Capítulo 5: Conclusión y Perspectivas	61
Apéndice A	63
Apéndice B	64
Apéndice C	66
Bibliografía	69

## Abreviaturas

DC	Dicroísmo circular
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminatetracético
EMBL-EBI	The European Molecular Biology Laboratory–European Bioinformatics Institute
FPLC	Fast Protein Liquid Cromatography
$\alpha$ -GDH	$\alpha$ -glicerofosfato-deshidrogenasa
G3P	gliceraldehído-3-fosfato
IPTG	Isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosido
$k_{cat}$	Constante de catalítica
$K_M$	Constante de Michaelis
$k_i$	Constante cinética de irreversibilidad
$k_r$	Constante cinética de replegamiento
$k_u$	Constante cinética de desplegamiento
MOE	Molecular Operating Environment
PDB	Protein Data Bank
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
ScTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
TEA	Trietanolamina
TIM	Triosafosfato isomerasa
VMD	Visual Molecular Dynamics

## Resumen

En varias familias de proteínas se han encontrado residuos conservados de cisteína ocultos del disolvente que no forman puentes disulfuro ni participan en la actividad biológica de la proteína. Se cree que estas cisteínas libres tienen una tasa de mutación baja durante la evolución porque son relevantes para la estabilidad de la molécula nativa. Con el propósito de determinar los efectos resultantes de la mutación de residuos de cisteínas conservadas y no conservadas, estudiamos la actividad y estabilidad de diversas variantes de la enzima triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. La forma silvestre de esta proteína contiene dos cisteínas libres ocultas: Cys41 (no conservada) y a la invariante Cys126. Las mutantes puntuales investigadas contienen sustituciones de estas Cys por Ala, Val y Ser (los tres cambios más conservativos para una cisteína oculta, de acuerdo a las matrices de sustitución); se examinaron su actividad enzimática y su estabilidad. Nuestros ensayos indican que ninguno de los residuos de Cys es esencial para la catálisis enzimática. La determinación de estabilidad global de las mutantes indica que, independientemente de cuál Cys fue reemplazada, las mutaciones individuales Cys → Ala y Cys → Val disminuyeron la energía libre de desplegamiento en 13 a 18 kJ mol<sup>-1</sup> (a 37 °C, pH 7.4), en comparación con la enzima silvestre. Se encontró, además, una reducción algo mayor en la estabilidad (23 kJ mol<sup>-1</sup>) en el caso de la mutación C41S. En contraste, hubo una desestabilización sustancialmente mayor (37 kJ mol<sup>-1</sup>) en la mutante C126S. Estos resultados sugieren que, con la excepción de Cys126Ser, todas estas mutaciones pueden considerarse como neutrales (es decir, mutaciones toleradas que no causan

daño en eventos reproductivos del organismo). En consecuencia, el residuo Cys126 ha permanecido invariante a través de la evolución porque las sustituciones neutrales por Ala o Val en el aminoácido 126 requerirían una doble mutación concertada en cualquiera de los codones de Cys, un evento con una probabilidad virtualmente de cero.

## Introducción

### Evolución molecular

Darwin sentó las bases de la Teoría Moderna Evolutiva en su tratado “Origen de las especies” (1859), al plantear el concepto de que todas las formas de vida se han desarrollado a través de un proceso lento de selección natural. Esta selección natural constituye la fuerza motriz que dirige los cambios evolutivos de las especies. Sin embargo, esta teoría no es capaz de explicar como se transmite la información biológica de una generación a otra.

El descubrimiento del DNA fue fundamental, porque conlleva al conocimiento de la base molecular de la herencia y constituye el nacimiento de la genética molecular y a su vez, la deducción del código genético. Nirenberg y Matthaes (1961) mostraron que la secuencia de un codón puede codificar un aminoácido.

En la década de los sesenta surgen bases de datos de secuencias de proteínas. Pauling y Zuckerkandl (1965) hicieron estudios comparativos de la secuencia de hemoglobina de diferentes especies, en donde observaron regiones que son altamente conservadas a lo largo de la evolución y regiones en las que los cambios se acumulaban rápidamente. Esta observación de variabilidad proteica intraespecífica condujo a Kimura a proponer la Teoría Neutralista de la Evolución Molecular (1968). Kimura propuso que la mayoría de los cambios observados en las secuencias de aminoácidos de proteínas correspondían a mutaciones neutras, es decir que, sin ser

perjudiciales, no tienen selectivamente para el organismo ni más ni menos ventajas que los aminoácidos a los que sustituyen. En el caso de mutaciones neutrales, el aminoácido insertado es distinto, pero con propiedades fisicoquímicas similares; por ejemplo, la sustitución del residuo Glu (GAA) por Asp (GAU), puede no tener efectos funcionales en la proteína, debido a que los dos son aminoácidos cargados negativamente. Hay mutaciones neutras que son silenciosas (o sinónimas) y estas no modifican al aminoácido codificado; Glu (GAA) por Glu (GAG). En estos dos casos la mutación se da en la posición de la tercera base del codón. También hay mutaciones no silenciosas (o no sinónimas), que si modifican el aminoácido y el cambio se da ya sea en la primera o segunda base del codón: Ile (AUU) por Leu (CUU) o Thr (ACU) por Ser (AGU). Algunos aminoácidos, tal como Leu, Ile, Asn y Met son considerados aminoácidos típicos ya que tienen un número alternativo de aminoácidos similares con los que puede ser sustituido mediante una sola sustitución no sinónima. Otros aminoácidos, como Trp, Tyr, Gly y Cys, son considerados aminoácidos particulares ya que tienen pocas alternativas de aminoácidos similares por los que pueden reemplazarse (Graur, 1985).

### **Cisteínas conservadas y no conservadas**

La cisteína es uno de los aminoácidos menos frecuentes en las proteínas. Este residuo muestra también muy poca variabilidad en la divergencia de proteínas homólogas. Los residuos de Cys son altamente conservados, cuando forman puentes disulfuro intra o intermoleculares (Smith y col., 2006) y cuando juegan un papel activo en el mecanismo

catalítico de la enzima, por medio del grupo sulfhidrilo libre (por ejemplo, en el caso de varias proteasas vegetales; Baker y col., 1987). Curiosamente, varios residuos de Cys libres, que parecen ser no esenciales para la actividad enzimática, se han identificado como conservados en un gran número de familias de proteínas, incluyendo la 1, 2- $\alpha$ -manosidasa (Tatara y col., 2005), la aspartato aminotransferasa (Gloss y col., 1996; Jeffery y col., 2000) y la trifosfato isomerasa (González-Mondragón y col., 2004). En estos casos las mutaciones en una Cys conservada que, no es accesible al solvente con frecuencia induce a la desestabilización de la enzima nativa. Del mismo modo, la sustitución de una cisteína conservada afecta negativamente la estructura y auto-ensamblaje de los dominios de trimerización de la proteína clatrina (Ybe y col., 2003).

En consecuencia, parece que algunos residuos de Cys se conservaron evolutivamente porque confieren estabilidad conformacional significativa en determinadas proteínas. Se han observado efectos desestabilizantes de una mutación en cisteínas ocultas (pero no conservadas) en las siguientes proteínas:  $\alpha$ -amilasa de *Pyrococcus furiosus* (Savchenko y col., 2002), RecQ helicase de *E. coli* (Liu y col., 2004), subunidad  $\alpha$  de la triptófano sintasa de *E. coli* (Hiraga y col., 1996) y superóxido dismutasa (McRee y col., 1990). Los papeles de los residuos de Cys de las dos primeras enzimas están relacionados con su capacidad de actuar como ligando de  $Zn^{2+}$ . Sin embargo, las dos últimas proteínas no tienen ninguna actividad de unión de metal. Es importante señalar que las cisteínas libres prefieren formar parte de los interiores de las moléculas de la proteína plegada (Richardson y col., 1989), donde suelen estar rodeados por residuos

típicamente hidrofóbicos tales como Leu, Ile, Val, Phe (Karlin y col., 1994). Además, los grupos SH de cisteínas ocultas también pueden formar enlaces de hidrógeno, como aquellos encontrados en  $\beta$ -lactoglobulina (Burova y col., 1998) y triosafosfato isomerasa (Kursula y col., 2003).

### **Generalidades de la triosafosfato isomerasa**

La triosafosfato isomerasa (TIM, E. C. 5.3.1.1.) es la quinta enzima en la vía de la glucólisis, y cataliza la interconversión de los productos que provienen de la catálisis de la aldolasa (gliceraldehído 3 fosfato (G3P) y el fosfato de dihidroxiacetona (DHAP)). Sólo el G3P puede continuar en el camino de la glucólisis, hasta piruvato. TIM desempeña un papel importante en varias vías metabólicas y es esencial para la producción eficiente de la energía. Deficiencias en la TIM de humano, causadas por mutaciones, producen un aumento en los niveles de DHAP provocando (con una simple mutación puntual (I170V)) anemia hemolítica crónica (Orosz y col., 2009); la mutación E104D produce un grave trastorno neurológico progresivo y (Rodríguez-Almazán y col., 2008)

### **Características estructurales**

En la base datos de The European Molecular Biology Laboratory–European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)), se tienen registradas



4044 secuencias de enzimas de la familia de la TIM, provenientes de diferentes especies. De éstas, 2995 secuencias pertenecen a bacterias, 985 a eucariotas y 64 a arqueas.

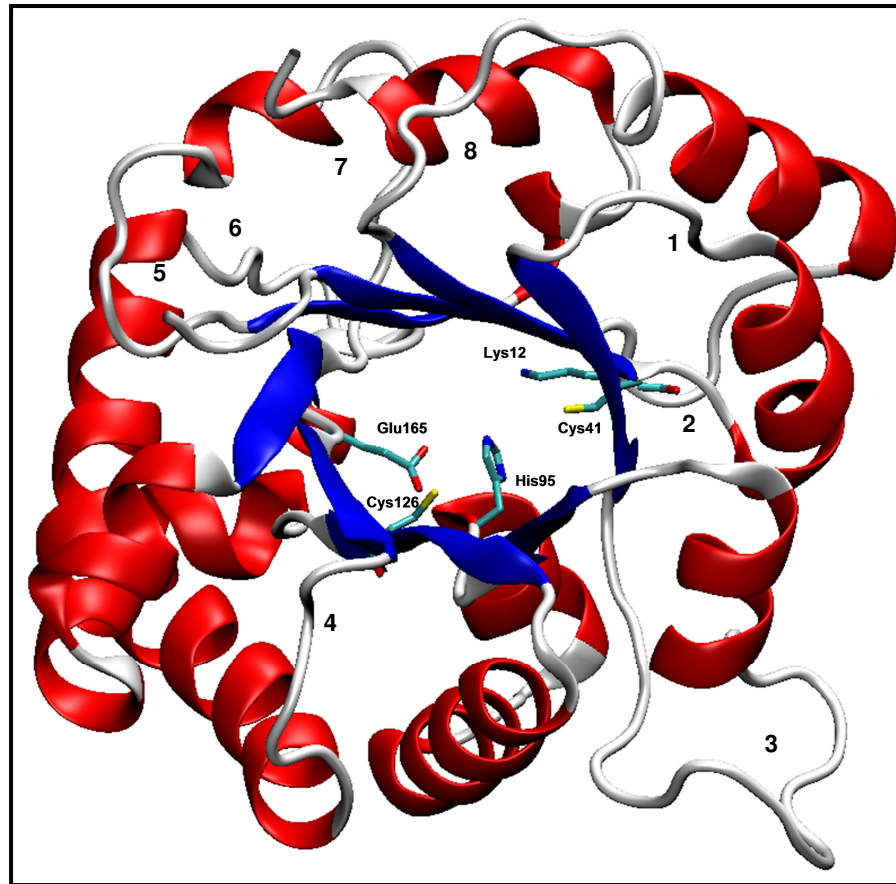
Hasta la fecha se han reportado en el PDB (Protein Data Bank) 130 estructuras cristalográficas de la TIM, tanto de tipo silvestre como variantes con algún tipo de ligando, y un monómero artificial. En estos datos también se incluyen 25 estructuras de diferentes organismos: *Gallus gallus* (Banner y col., 1975), *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis y col., 1990), *Trypanosoma brucei brucei* (Wierenga y col., 1991), *Escherichia coli* (Noble y col., 1993), *Homo sapiens* (Mande y col., 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni y col., 1995), *Plasmodium falciparum* (Velanker y col., 1997), *Moritella marina* (Alvarez y col., 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado y col., 1998), *Leishmania mexicana* (Williams y col., 1999), *Thermotoga maritima* (Maes y col., 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden y col., 2001), *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero y col., 2002), *Caenorhabditis elegans* (Symersky y col., 2003), *Orytolagus cuniculus* (Aparicio y col., 2003), *Thermoproteus tenax* (Walden y col., 2004), *Tenebrio molitor* (Knobeloch y col., 2006), *Methanocaldococcus jannaschii* (Gayathri y col., 2007), *Helicobacter pylori* (Chu y col., 2008) *Bartonella henselae* (Abendroth y col., 2009), *Giardia intestinalis* (Enríquez-Flores y col., 2011) *Mycobacterium tuberculosis* (Connor y col., 2011), *Cryptosporidium parvum* (Nguyen y col., 2011), *Staphylococcus aureus* (Murkherjee y col., 2011), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Moraes y col., 2011).

En la mayoría de las especies, la TIM es un homodímero de aproximadamente 500 residuos, con pesos moleculares cercanos a 54 kDa; pero, en algunos organismos

termófilos, la enzima es un tetrámero. Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Ambos monómeros tienen un sitio activo completo localizado cerca de la interfase, y los residuos catalíticos de cada subunidad están ubicados en las asas 1, 4 y 6. Ya que sólo la especie dimérica presenta actividad biológica, se piensa que los residuos de una subunidad son decisivos para mantener la integridad o la estabilidad del sitio activo de la otra subunidad (Wierenga y col., 2010).

Los monómeros adoptan un plegamiento de barril  $\alpha/\beta$  (barril TIM), donde 8 hebras  $\beta$  paralelas forman la parte interna del barril rodeado por 8 hélices  $\alpha$ , unidas mediante asas (Lolis, y col., 1990; Davenport y col, 1991) (Figura 1). La interfase del dímero se compone principalmente por las asas 1, 2, 3, 4 y 8. Las asas 3, 4, 5, 6 y 8 tienen al menos ocho residuos. Las asas 5, 6 y 7 muestran flexibilidad conformacional. El asa 3 y la 6 sobresalen en la superficie del monómero (Wierenga y col., 1992).

El asa 3 (formada por los residuos 68 al 79) se le conoce como asa de la interfase o interdigitante; se acopla a un hueco cercano del sitio activo de la otra subunidad entre las asas 1 y 4 (Wierenga y Noble, 1992). El asa 6 (residuos 165 al 177), que es llamada asa flexible o catalítica, forma una especie de tapa que se abre y se cierra sobre el sitio activo; esta asa catalítica sufre un cambio conformacional notable, llegando a moverse hasta 7 Å desde una posición “abierta” hacia una “cerrada”. Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) muestran que la unión del sustrato (o ligando) o la salida del producto no inducen el movimiento del asa 6, sino que éste es un movimiento natural de la proteína (Williams y McDermott, 1995).



**Figura 1.** Estructura tridimensional de un monómero de la ScTIM. Se observa la estructura característica de un barril TIM. Las 8 hélices  $\alpha$  (listones rojos), rodean a las hebras  $\beta$  (flechas azules) dispuestas en el centro y se unen por 8 asas. Se muestran los residuos catalíticos y las dos cisteínas libres. (Archivo de Protein Data Bank; 1YPI (Lolis y col., 1990)).

### Propiedades catalíticas

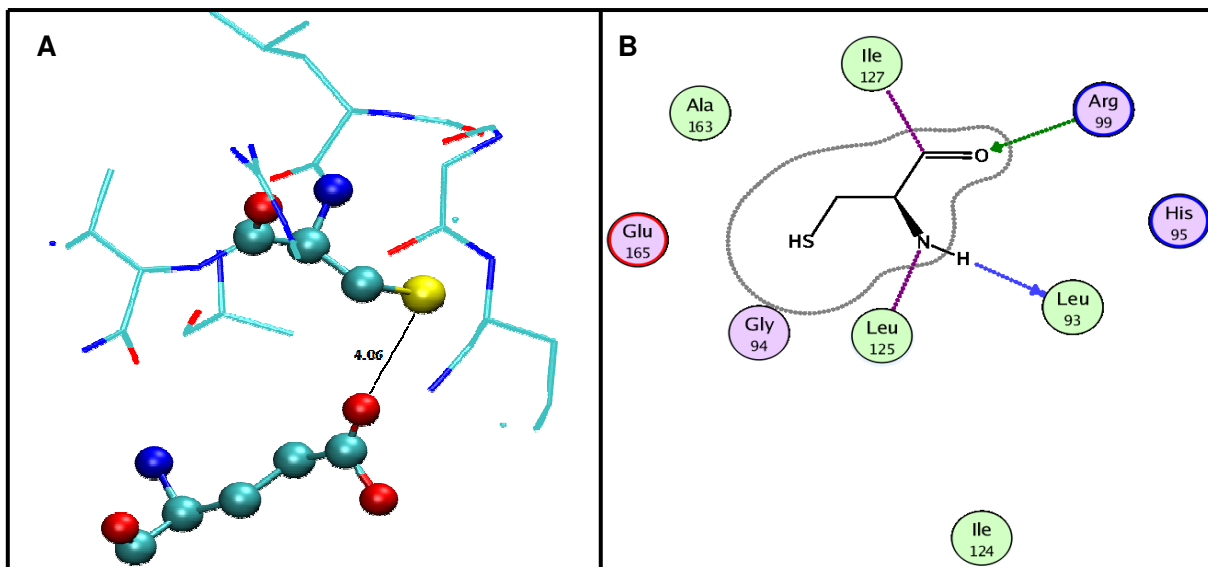
El mecanismo catalítico de la TIM se conoce en detalle (Knowles & Albery, 1977). La TIM es una enzima muy eficiente, es decir, que la velocidad de conversión de G3P a DHAP se controla por difusión, lo que significa que la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) en esa dirección se encuentra cerca de su máximo valor:  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Albery y Knowles, 1976; Blacklow y col., 1988; Knowles, 1991); la  $k_{cat}$  es aproximadamente de  $5000 \text{ s}^{-1}$  y

la  $K_M$  presenta un valor promedio de 0.5 mM. Sin embargo, experimentalmente la eficiencia catalítica que presenta la enzima TIM es del orden  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ya que sólo el 3.4% del sustrato es reactivo; el 96.6% restante se encuentra hidratado en condiciones del experimento y no es reconocido por la enzima (Trentham y col., 1969)

Son tres los aminoácidos que están involucrados directamente en la catálisis: Lys12, His95 y Glu165. La reacción de isomerización comienza cuando el carboxilo del Glu165 y el anillo imidazol de la His95 realizan las protonaciones y desprotonaciones necesarias para la formación del intermediario cis-enodiol (Knowles, 1991). Por su parte, la función que realiza la Lys12 es la de neutralizar las cargas del sustrato, permitiendo así la unión al sitio activo correcta. Adicionalmente, existen otros residuos que se han considerado importantes para la catálisis de la TIM: Asn10, Ser96, Glu97 y Cys126 (de acuerdo a la numeración de ScTIM (Lolis y col., 1990)). Sin embargo, el papel que juegan estos dos últimos residuos en la catálisis parece ser de muy poca importancia para la referida actividad. En estudios realizados por González-Mondragón y col. (2004), se encontró que la sustitución de la Cys126 de la ScTIM por Ala o Ser no afectó la eficiencia catalítica de la enzima. Con respecto al residuo Glu97, se hicieron estudios en nuestro laboratorio de la mutación Glu97Gln (resultados no publicados), encontrándose que la eficiencia catalítica es del mismo orden de magnitud que la enzima silvestre.

## **Características de los residuos de cisteína de la triosafosfato isomerasa de levadura**

En este proyecto de investigación nos centramos en el estudio de estabilidad y actividad de la enzima triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM). Esta enzima contiene dos residuos de cisteína libres (Figura 1); uno de ellos se conserva en todas las secuencias de organismos conocidos: desde arquea hasta mamífera. Esta cisteína (Cys126) está localizada al final de la quinta hebra  $\beta$  y su átomo de azufre se encuentra a una distancia van der Waals del oxígeno del glutámico catalítico (aproximadamente 4.06 Å (Figura 2A)). La Figura 2B muestra, de manera esquemática, las interacciones entre el residuo 126 y otros residuos de la proteína, entre las cuales destacan las siguientes: el grupo amino de la Cys126 forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno de la cadena principal del residuo Leu93; el oxígeno del grupo carbonilo de dicha cisteína forma otro puente de hidrógeno con grupo NH de la cadena lateral del residuo Arg99.

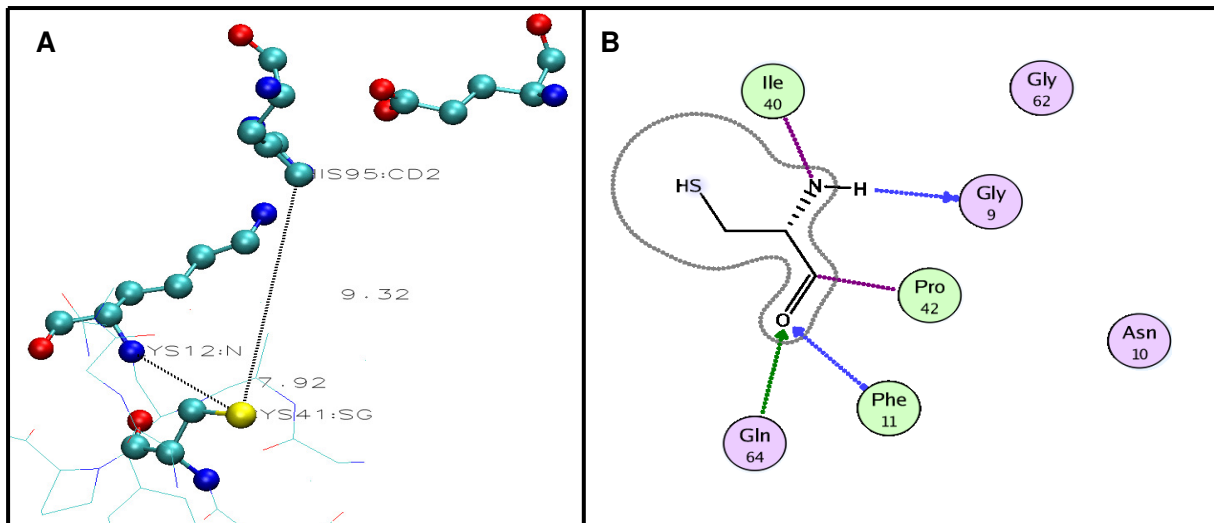


**Figura 2.** (A) Localización espacial de la interacción tipo van der Waals formada entre el Glu165 (base catalítica) y la Cys126, empleando el programa de visualización molecular VMD. (B). Representación en dos dimensiones de las interacciones que tiene la Cys126 con residuos cercanos a menos de 5 Å, usando la herramienta bioinformática MOE (datos tomados del archivo PDB, de la estructura cristalográfica de la enzima de TIM de levadura 1YPI (Lolis y col., 1990)). La flecha azul indica que el grupo NH de la Cys126 interacciona (como H-donador) con la cadena principal del residuo Leu93, y la flecha verde indica la interacción del CO, como H-aceptor de la cadena lateral del residuo Arg99.

No obstante que el residuo conservado Cys126 no es esencial para la actividad catalítica de la ScTIM (González-Mondragón y col., 2004), en el estudio de las mutantes C126A y C126S se encontró que éstas presentan un desplegamiento más rápido y un repliegamiento más lento que la enzima silvestre, lo que indica que estas variantes de ScTIM son menos estables que la enzima silvestre. En términos de diferencias de energía libre de desplegamiento ( $\Delta G_{mut}^{2U-N} - \Delta G_{silvestre}^{2U-N}$ ), la variante C126S fue mucho más inestable que la mutante C126A a 27 °C, pH 8.5. Posteriormente se midieron valores similares para estas mutantes en condiciones fisiológicas (pH 7.4 y 37 °C, resultados de

nuestro laboratorio no publicados). Si el papel de la Cys126 está relacionado principalmente con la estabilidad molecular, pensamos que sería interesante estudiar los efectos de la sustitución de este residuo con valina, un aminoácido marcadamente hidrofóbico con una cadena lateral ligeramente mayor que la cisteína. Es importante mencionar que las tablas de sustitución de aminoácidos indican que la mutación Cys → Val es la segunda sustitución más probable (precedida solamente por la mutación Cys → Ala) cuando la cisteína está oculta (Overington y col., 1992). Otro tipo de matrices de sustitución colocan las mutaciones Cys → Ser y Cys → Ala como las más probables (Dayhoff, 1978; Henikoff y Henikoff, 1992).

Asimismo, se planteó realizar la determinación de estabilidad de las tres mutantes equivalentes (es decir, sustitución de Cys por Ala, Ser y Val) en la Cys41, el otro residuo de este tipo encontrado en ScTIM. Este residuo está poco conservado en las secuencias homólogas de la TIM, encontrándose presente en algunos sacaromicetales y en muchas bacterias. El residuo Cys41, se encuentra al final de la segunda hebra  $\beta$ , formando parte del interior del barril, y no tiene interacciones directas con los residuos del sitio catalítico, ya que la distancia más pequeña del átomo de azufre a un residuo catalítico es de más de 7 Å (Figura 3A). La cisteína 41 forma puentes de hidrógeno con el átomo de oxígeno de la Gly9 y con el átomo de nitrógeno de la Phe11, y también con el átomo de nitrógeno de la Gln64. No forma puente disulfuro con la otra cisteína de la posición 126 de esa misma subunidad, ni con la cisteína de la otra subunidad del dímero.



**Figura 3.** (A) Representación en tres dimensiones de las distancias entre los residuos catalíticos y el residuo Cys41, utilizando VDM. (B) Modelo en dos dimensiones de las interacciones a menos de 5 Å del residuo de Cys 41 con otros residuos, usando MOE. La flecha azul indica que el CO de la Cys41 interacciona (como H-aceptor) con cadena principal del residuo Phe11 y la otra flecha azul indica que el grupo NH de la Cys41 interacciona (como H-donador) con la cadena principal del residuo Gly9 y la flecha verde muestra la interacción del CO, como H-aceptor de la cadena lateral del residuo Gln64 (Archivo de Protein Data Bank; 1YPI (Lolis y col., 1990)).



## Objetivo General

Completar los estudios de la mutación puntual del residuo conservado Cys126 y realizar los estudios de las mutaciones Cys41 → Ala, Ser, Val y la doble mutante C41V/C126V de la enzima triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM). Se determinará el efecto que producen las mutaciones de ScTIM en la catálisis enzimática, así como en su estabilidad

## Objetivos específicos

- Construir, expresar y purificar las enzimas mutantes C41A, C41S, C41V, C126V y C41V/C126V de la TIM de levadura.
- Determinar los parámetros catalíticos ( $K_M$  y  $k_{cat}$ ) de todas las mutantes.
- Determinar, mediante técnicas de dicroísmo circular (DC) y fluorescencia intrínseca, si la estructura secundaria y terciaria se vieron afectadas por las mutaciones con respecto a la enzima silvestre.
- Analizar si las mutaciones mencionadas afectan la estabilidad térmica de la TIM, así como su capacidad de replegamiento.

- Estimar las constantes cinéticas de desplegamiento ( $k_u$ ) y replegamiento ( $k_f$ ) y establecer los parámetros de activación que caracterizan estas reacciones en todas las mutantes de la TIM de levadura.
- Calcular la estabilidad global de las mutantes construidas y purificadas de la TIM de levadura y comparar sus valores.

## Materiales y Métodos

### Metodología de DNA recombinante

Las mutantes de ScTIM C41S, C41V, y C126V se prepararon mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el kit “Expand High Fidelity PCR System” (Boehringer). Los siguientes oligonucleótidos mutagénicos se construyeron de la siguiente manera: 5' T GTC ATC TTG GTG ATC GGT GAA ACT 3' (C126V, directo) y 5' AGT TTC ACC GAT CAC CAA GAT CAC A 3' (C126V, reverso); 5' AA GTT GTT ATC GTG CCT CCA GCT AC 3' (C41V, directo) y 5' GT AGC TGG AGG CAC GAT AAC AAC TT 3' (C41V, reverso); 5' AAG TTG TTA TCA GGC CTC CAG CTA C 3' (C41S, directo) y 5' G TAG CTG GAG GGC TGA TAA CAA CTT 3' (C41S, reverso). Los oligonucleótidos externos utilizados fueron el promotor T7 y el terminador T7 (Novagen). Las mutaciones se introdujeron de la siguiente manera: 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 46.4°C, 1 min a 72°C, y la extensión de incubación por 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron clonados en el vector de expresión pET3a después de la digestión con NdeI y las sustituciones de codones se confirmaron por secuenciación de genes. Los genes con mutaciones correctas se introdujeron para su transformación dentro de células *E. coli* BL21 (DE3) pLys (Novagen).

Las otras mutantes (C41A y C41V/C126V) se prepararon utilizando el método de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Stratagene). Estas mutaciones se introdujeron de la siguiente manera: 18 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 10 min a 68°C, y la

extensión por 10 min a 72°C. Los oligonucleótidos mutagénicos utilizados para la mutante C41A fueron 5' GTC GAA GTT GTT ATC GCG CCT CCA GCT ACC 3' (directo) y 5' GGT AGC TGG AGG CGC GAT AAC AAC TTC GAC 3' (reverso); la doble mutante se construyó con el plásmido que contiene la secuencia de la simple mutante C126V como molde, y los oligonucleótidos mutagénicos fueron los siguientes: 5' GTC GAA GTT GTT ATC GTG CCT CCA GCT ACC 3' (directo) y 5' GGT AGC TGG AGG CAC GAT AAC AAC TTC GAC 3' (reverso).

La construcción, sobreexpresión y parte de la purificación de las mutantes de la enzima TIM de levadura fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular, en el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort, y la otra parte de la purificación se realizó en el Instituto de Química, en el laboratorio de la Dra. Adela Rodríguez Romero.

La sobreexpresión y purificación de la TIM de levadura, tanto de la enzima silvestre como de las variantes, se llevó a cabo como describe el protocolo de Benítez-Cardoza y col (2001), y Vázquez-Contreras y col (2000). El crecimiento celular se llevó a cabo a 37°C en medio Luria-Bertani complementado con 100 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina. La sobreexpresión de la proteína se indujo cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor entre 0.8 y 1.0, mediante la adición de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. El crecimiento celular continuó 12 hrs. Las células se separaron por centrifugación y se resuspendieron en el amortiguador de lisis (tris 10 mM, pH 8.0, fluoruro de p-metilsulfonilo 0.2 mM). Las células se lisaron por medio de ultrasonido en ciclos de 40 segundos por 90 segundos de descanso en baño de hielo. El lisado se centrifugó a 45000 rpm a 4°C por una hora. El sobrenadante se precipitó

con sulfato de amonio  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  al 64% de saturación en un baño de hielo con agitación suave y se dejó en reposo; las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se llevó a 90% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Después de separar las proteínas por centrifugación a 12000 rpm por 20 minutos, el precipitado se resuspendió en amortiguador A [Trietanolamina (TEA) 10 mM, ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, pH 7.6] y se dializó contra el mismo regulador.

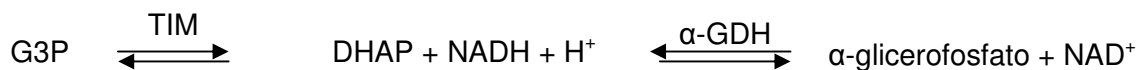
La muestra dializada y filtrada se inyectó a una columna de exclusión molecular (Superdex 200 16/60) previamente equilibrada con el amortiguador A y controlada por un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Amersham Pharmacia Biotech. A las fracciones resultantes se les determinó la actividad, y aquellas con mayor actividad específica se juntaron. Posteriormente, la muestra se aplicó a una columna de intercambio aniónico MonoQ 5/50, equilibrada con el mismo amortiguador A. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio (NaCl) de 0 a 100 mM en regulador A. Las fracciones que presentaron mayor actividad específica se reunieron y se dializaron contra el regulador B (TEA 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 8.0).

La columna de intercambio iónico MonoQ nuevamente se equilibró con el mismo regulador B y se inyectó la solución de proteína. La TIM se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 – 100 mM en regulador B. A las fracciones obtenidas se les cuantificó el contenido de proteína por su absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar calculado  $\epsilon_{280} = 2.55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Shirley, 1995) y se determinó su

actividad enzimática. Las fracciones con mayor actividad de esta última etapa se dializaron contra regulador C (TEA 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.4). En todas las etapas de purificación se analizaron las fracciones obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras.

### Determinación de los parámetros catalíticos

La actividad enzimática de la TIM de levadura se determinó espectrofotométricamente, midiendo la velocidad de conversión del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), el cual a su vez se convierte a  $\alpha$ -glicerofosfato ( $\alpha$ -GP) por acoplamiento con la enzima  $\alpha$ -glicerofosfato-deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH). Esta última reacción consume un mol de nicotinadenin dinucleótido reducido (NADH) por cada mol de DHAP que reacciona (Rozacky y col., 1971). Con un exceso de deshidrogenasa, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la velocidad de oxidación de NADH, lo cual se determina por la disminución de absorbancia a 340 nm ( $\epsilon_{NADH}^{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Lo anterior se resume en la siguiente reacción:



La actividad específica de la enzima se expresó en  $\mu$ moles de sustrato transformado por minuto por miligramo ( $\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg}$ ). El volumen total de la reacción fue 1.0 mL en

amortiguador D (TEA 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4); 0.2 mM NADH; 0.019 mg  $\alpha$ -GDH. Para determinar  $K_M$  y  $k_{cat}$  ( $k_{cat} = V_{max}/[E_T]$ ), la concentración del G3P se varió en un intervalo de concentraciones de 0.05 a 4.0 mM. La reacción se inició con la adición de 4 ng para las mutantes C41A, C41S y C41V, y para los ensayos de las mutantes C126V y la doble mutante C41V/C126V se utilizaron 40 ng. Los ensayos se realizaron a 25°C, regulando la temperatura de la celda mediante un sistema tipo Peltier. Los valores de actividad específica obtenidos a diferentes concentraciones del G3P fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1).

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

En esta ecuación  $v$  es la velocidad inicial,  $V_{max}$  la velocidad máxima,  $K_M$  la constante de Michaelis y  $[S]$  la concentración de sustrato.

### **Métodos espectroscópicos para el estudio de cambios conformacionales**

Existen diversas técnicas para medir los cambios estructurales de una proteína, siendo las más empleadas dicróismo circular (DC) y la fluorescencia intrínseca. Estas técnicas pueden dar información sobre los cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína en solución, respectivamente.

Los experimentos de fluorescencia se hicieron en un espectrofluorómetro PC1 de ISS (Champaign, IL) equipado con un sistema Peltier para el control de temperatura. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a 25°C, usando muestras con una concentración de enzima de 0.050 mg mL<sup>-1</sup>, preparadas en una solución amortiguadora E (TEA 50 mM, EDTA 5 mM a pH 7.4). La longitud de onda de excitación para el estudio de fluorescencia intrínseca fue de 280 nm y la emisión fue colectada en el intervalo de 300 a 400 nm. Para el cálculo del centro de masa espectral se utilizó la ecuación:  $CME = \Sigma(F_i \lambda_i) / \Sigma F_i$  donde  $F_i$  es la intensidad de fluorescencia a longitud de onda  $\lambda_i$ .

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un portacelda tipo Peltier PTC-348WI para el control de temperatura y agitación magnética. Las soluciones de TIM se equilibraron a 25°C en amortiguador F (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4). La concentración de proteína fue 0.10 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando una celda de recorrido óptico de 0.100 cm. Los espectros de dicroísmo circular se registraron en la región del UV-lejano, en un intervalo de longitud de onda de 190 a 250 nm.

### **Transiciones térmicas**

Las transiciones de desplegamiento y replegamiento térmicos fueron registradas siguiendo los cambios de elipticidad, a una longitud de onda fija de 220 nm, mientras



que la temperatura de la muestra se determinó directamente en la celda introduciendo en ella el termopar del equipo Peltier. El calentamiento se efectuó a  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Para la etapa del estudio del desplegamiento y replegamiento térmico de las mutantes, se definieron las condiciones experimentales que consistieron en el empleo de soluciones de proteína con una concentración de  $0.010 \text{ mg mL}^{-1}$  (en amortiguador F), colocadas en una celda con recorrido óptico de 1.00 cm. Empleando el mismo procedimiento, se realizaron transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento utilizando amortiguador G (fosfato de sodio 10 mM, ditiotretitol 1.00 mM, pH 7.4) para estudiar el efecto del DTT en el replegamiento; en estos experimentos se incubó la muestra 30 minutos a alta temperatura, después del desplegamiento, y posteriormente fue replegada.

### **Estudios cinéticos del desplegamiento**

La cinética de desplegamiento de todas las mutantes fue estudiada siguiendo el protocolo reportado por Benítez-Cardoza y col (2001). El experimento se realizó en una celda de recorrido óptico de 1.00 cm, conteniendo el amortiguador F, previamente equilibrado a la temperatura de trabajo y con agitación constante; se le adicionó una alícuota de la mutante concentrada, monitorizando los cambios de elipticidad a 220 nm con respecto al tiempo. Los datos cinéticos fueron ajustados a una ecuación de decaimiento exponencial simple:

$$\theta_t = \theta_f + (\theta_o - \theta_f)\exp(-k_u t) \quad (2)$$

donde  $\theta_t$  es la elipticidad medida al tiempo  $t$ ,  $\theta_f$  es el valor final de la elipticidad,  $\theta_o$  representa el valor correspondiente al tiempo cero y  $k_u$  es la constante de velocidad del desplegamiento.

### Estudios cinéticos del replegamiento

El registro de las curvas cinéticas de replegamiento para todas las mutantes de ScTIM se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por Benítez-Cardoza y colaboradores (2001). Se equilibró el regulador a la temperatura de desplegamiento (temperatura seleccionada para que la proteína bajo estudio se despliegue más de un 95% en aproximadamente 90 segundos), se adicionó la proteína y se incubó 90 segundos. Posteriormente, la temperatura en el portaceldas tipo Peltier se ajustó aproximadamente 5°C abajo de la temperatura deseada para estudiar el replegamiento; con esto se logra un enfriamiento muy rápido de la solución enzimática (aproximadamente 15°C min<sup>-1</sup>). Cuando se alcanzó aproximadamente el valor esperado (0.5°C por arriba), se ajustó la temperatura requerida para el experimento. Los datos cinéticos se ajustaron a una ecuación de una reacción de segundo orden:

$$\theta_t = \theta_f + (\theta_o - \theta_f)/(2C_o k_r t + 1) \quad (3)$$

donde  $C_o$  es la concentración molar total de monómeros de TIM,  $k_r$  es la constante de velocidad de replegamiento; los otros parámetros ya fueron definidos anteriormente. Los experimentos se llevaron a cabo variando la concentración de TIM en un intervalo de 7.5 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en amortiguador F.

## Resultados

### Alineamiento

En la base de datos de EMBL-EBI se encontraron 4044 secuencias de TIM, a las cuales se les realizó un acotamiento de redundancia basándonos en el grado de homología y cuidando que, por lo menos, se tuviera una secuencia representativa de cada organismo; el intervalo de acotamiento estuvo entre el 70 y el 40%. El número de secuencias obtenidas mediante la herramienta bioinformática *Decrease Redundancy* ([http://web.expasy.org/decrease\\_redundancy/](http://web.expasy.org/decrease_redundancy/)) fue de 793

Posteriormente se efectuó un alineamiento múltiple de las 793 secuencias de la TIM, utilizando la herramienta bioinformática ClustalW XXL (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>), en donde se encontró que el residuo en la posición 41 de TIM de levadura no presentó alta conservación (Tabla 1). Con respecto al residuo 126, éste presentó el 100% de conservación (véase Apéndice C); además de los residuos catalíticos (Lys12, His95 y Glu165) se encontraron otros residuos invariantes: Thr75, Glu97 y Pro166.

Residuos	% de presencia en la posición 41
Cys	41
Ala	25
Phe	11
Ile	6
Pro	5
Leu	4
Gly	4
Ser	3
Met, Val, Thr	menos del 1 %

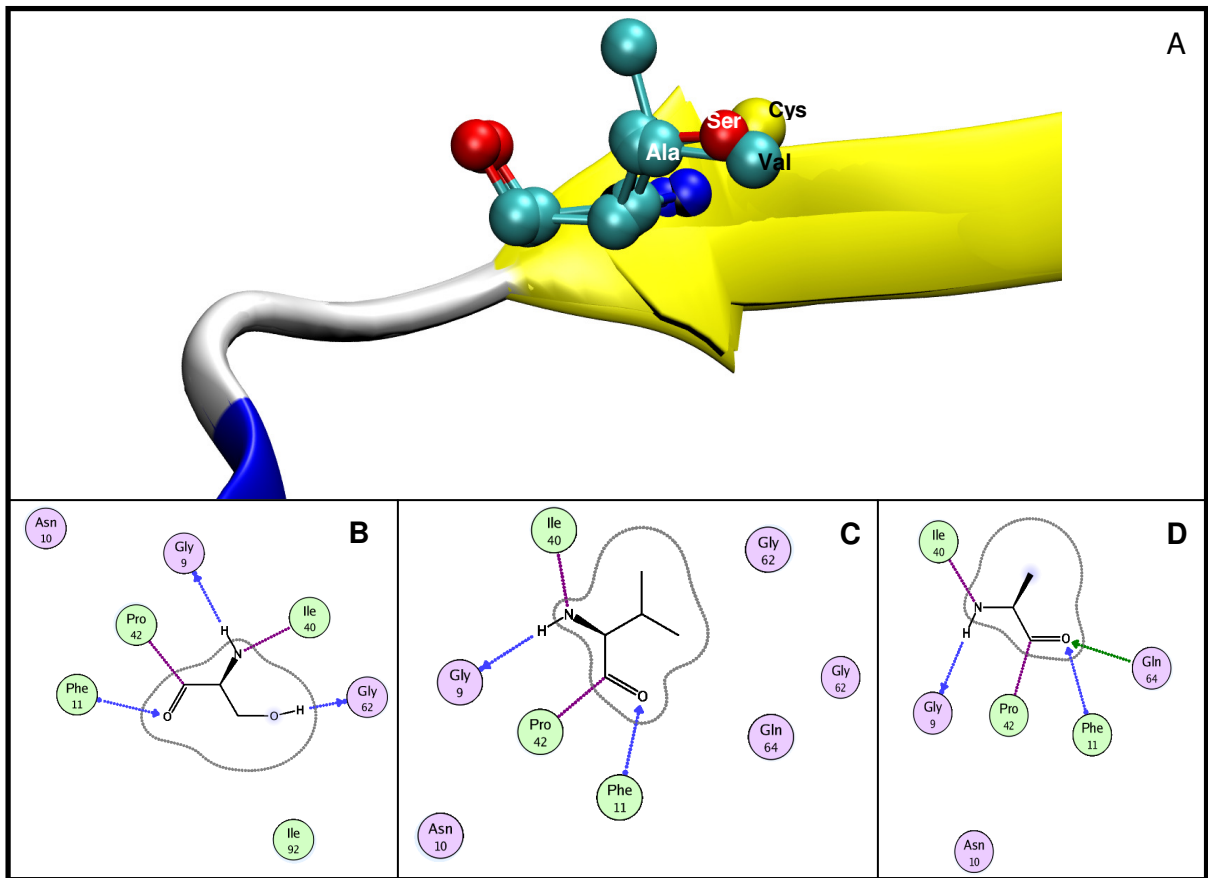
**Tabla 1.** Resultados encontrados en un alineamiento de TIM de 793 especies

## Estructura

Utilizando el programa MOE (Molecular Operating Environment), se realizó una minimización local de energía (antes y después de la mutación) alrededor de 10 Å de distancia al sitio donde se realizaron las mutaciones puntuales (41 y 126) usando la molécula de la TIM de levadura reportada en el PDB; se empleó primeramente la estructura cristalográfica de la forma silvestre y, posteriormente, se hicieron las mutaciones en la posición 41 de Cys por Ala, Ser y Val (Figura 4). Posteriormente se realizó la mutación de Cys126 → Val (Figura 5).

Se observa en la Figura 4A la sobreposición de la enzima silvestre con las mutaciones realizadas en la posición 41; éstas no se vieron afectadas en lo que respecta a su estructura ya que no se observan alteraciones significativas (lo cual se confirma más

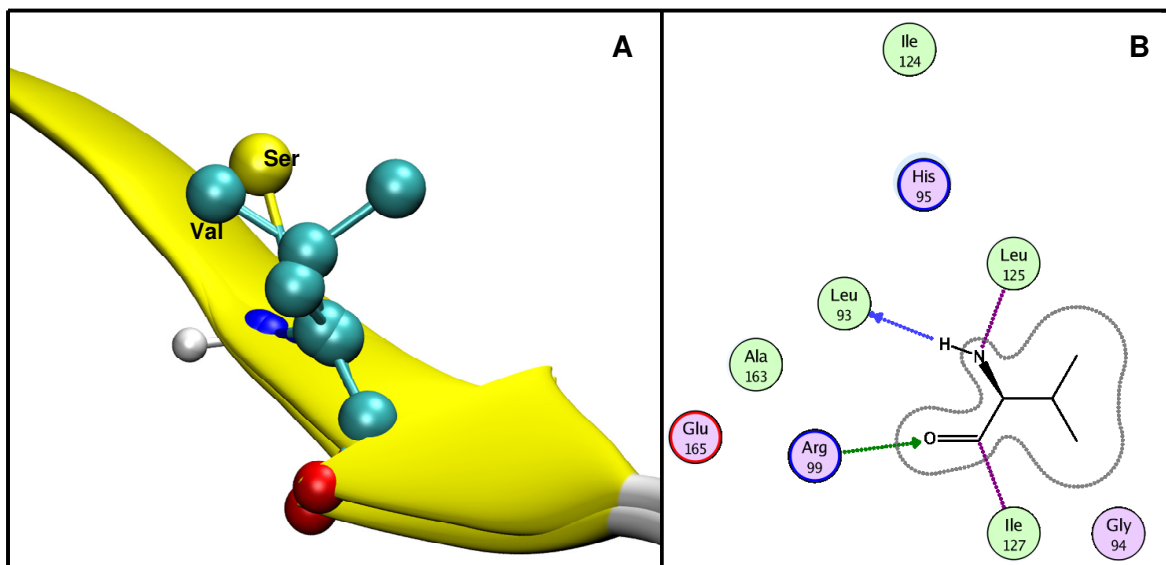
adelante con los espectros de dicroísmo circular y fluorescencia). Las Figuras 4B, C y D muestran las interacciones, en dos dimensiones, después de las sustituciones de Cys por Ser, Val y Ala, respectivamente; las interacciones presentes en la enzima silvestre aparecen conservadas después de la mutación Cys41 → Ala (Figura 4D); en la mutación Cys41 → Val se pierde un puente de hidrógeno con la Gln64 (Figura 4C), y en la mutación Cys41 → Ser se pierde el puente de hidrógeno con Gln64 y se forma uno nuevo a partir del grupo OH de la serina (residuo introducido) con el nitrógeno de la cadena principal del residuo Gly62 (Figura 4B).



**Figura 4.** (A) Sobreposición en tercera dimensión de las mutaciones realizadas a la estructura cristalográfica de la enzima ScTIM en la posición 41. Modelo en dos dimensiones de las interacciones a menos de 5 Å, de las mutaciones en la posición 41: (B) serina, (C) valina, (D) alanina, usando MOE. (Archivo de Protein Data Bank; 1YPI (Lolis y col., 1990)).

Se analizó también la mutación de Cys126 por Val (Figura 5). La Figura 5A muestra la sobreposición de Cys126 y Val126; aunque la mutación se llevó a cabo por un residuo de mayor volumen, se observa que no hay cambios significativos en la estructura. La Figura 5B muestra las interacciones en dos dimensiones después de la mutación Cys126 → Val, observándose las mismas interacciones antes y después de la mutación (véase también Figura 2); sin embargo, se pierde la interacción van der Waals con el

glutámico catalítico. Las imágenes de las figuras 4A y 5A se realizaron con el visualizador VMD (Visual Molecular Dynamics).

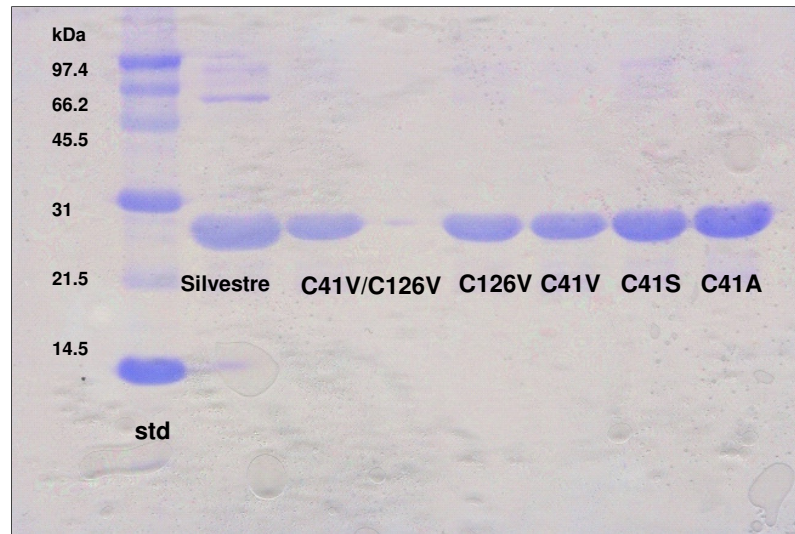


**Figura 5.** (A) Sobreposición en tercera dimensión del residuo Cys126 de la TIM silvestre con mutación puntual por Val. (B) Modelo en dos dimensiones de las interacciones a menos de 5 Å, de la mutante Cys126 → Val, usando MOE. (PDB: 1YPI (Lolis y col., 1990)).

### Expresión y purificación de las mutantes de TIM

Los rendimientos de la expresión de las enzimas mutantes de TIM de levadura C41A, C41S, C41V, C126V y la doble mutante C41V/C126V fueron aproximadamente de 18, 8, 40, 24, y 9 mg por litro de medio de cultivo, respectivamente. La pureza de las muestras de proteínas se verificó utilizando gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Todas las muestras de TIM purificadas mostraron una sola banda de proteína (Figura 6)





**Figura 6.** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de la ScTIM y sus variantes

### Efecto de las mutaciones en la función de TIM

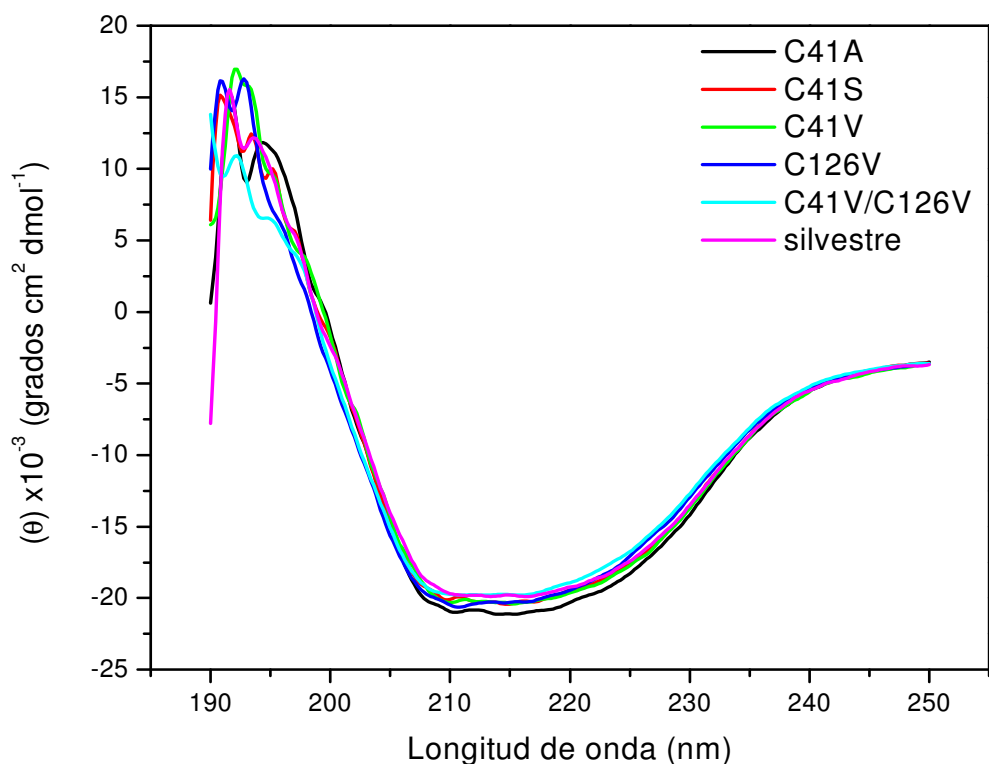
Las velocidades iniciales de catálisis a diferentes concentraciones de sustrato (G3P) se ajustaron mediante la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1), obteniéndose los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $k_{cat}$ , así como la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) para todas las mutantes. No se observaron cambios significativos en los parámetros catalíticos de las mutantes en la posición 41 de la TIM cuando se reemplazó por Ala, Ser o Val (Tabla 2). En contraste, la sustitución de la Cys126 con valina disminuyó el valor de  $k_{cat}$  más de 10 veces; un cambio más dramático que el observado previamente con las mutantes C126A y C126S (González-Mondragón y col., 2004).

ScTIM variantes	$k_{\text{cat}} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (mM)}$	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^6 \text{ (s}^{-1} \text{ M}^{-1}\text{)}$
<sup>a</sup> Silvestre	5.8 (0.4)	1.1 (0.3)	5.3
<sup>a</sup> C126A	3.1 (0.2)	0.8 (0.3)	3.9
<sup>a</sup> C126S	1.1 (0.2)	0.3 (0.1)	3.7
C126V	0.29 (0.02)	0.3 (0.04)	0.97
C41A	4.4 (0.3)	0.6 (0.1)	7.3
C41S	4.1 (0.3)	0.7 (0.1)	5.8
C41V	2.3 (0.2)	0.7 (0.1)	5.4
C41V/C126V	0.27 (0.2)	0.3 (0.04)	0.9

**Tabla 2.** Comparación de parámetros cinéticos de ScTIM y diferentes mutantes. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis. <sup>a</sup>González-Mondragón y col., 2004

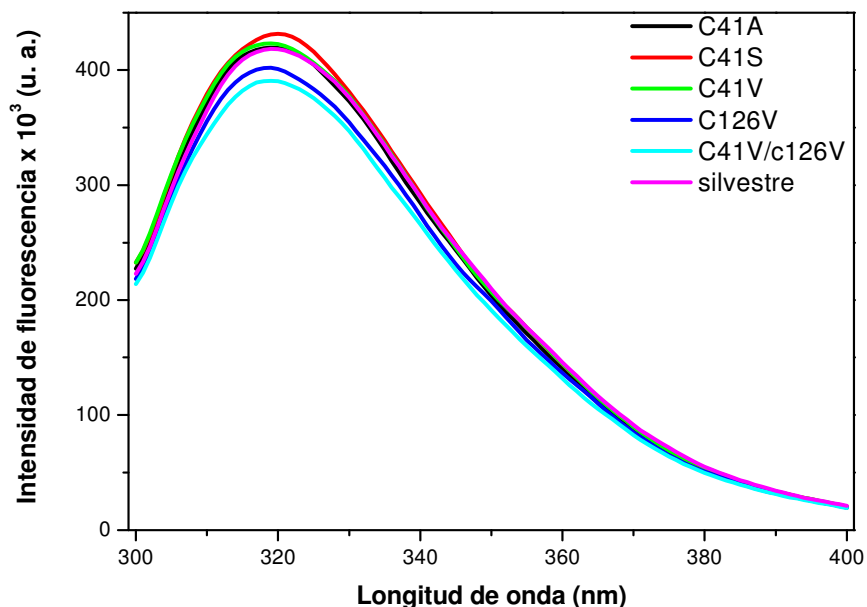
### Propiedades espectroscópicas de las mutantes de la enzima TIM de levadura

En la Figura 7 se muestran los espectros de dicroísmo circular de ScTIM y de todas las mutantes estudiadas (C41A, C41S, C41V, C126V y C41V/C126V); se puede observar que la estructura secundaria no se vio afectada de forma importante por ninguna de las mutaciones, ya que todas las variantes muestran un espectro muy similar al obtenido para la enzima silvestre.



**Figura 7.** Espectros de dicroísmo circular en la región de UV-lejano de la enzima ScTIM y sus mutantes, obtenidos a una temperatura de 25°C, usando solución de proteína de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> (en regulador de fosfatos 10 mM, pH 7.4), y una celda de 1.0 mm de recorrido óptico.

Los espectros de intensidad de fluorescencia intrínseca de la enzima silvestre y todas las mutantes se midieron a 25°C. La ausencia de diferencias significativas en estos espectros indica que ninguna de las mutantes estudiadas tiene cambio alguno en la estructura terciaria en el dímero nativo (Figura 8). El promedio del centro de masa espectral de todas las muestras es  $332.28 \pm 0.15$  nm.

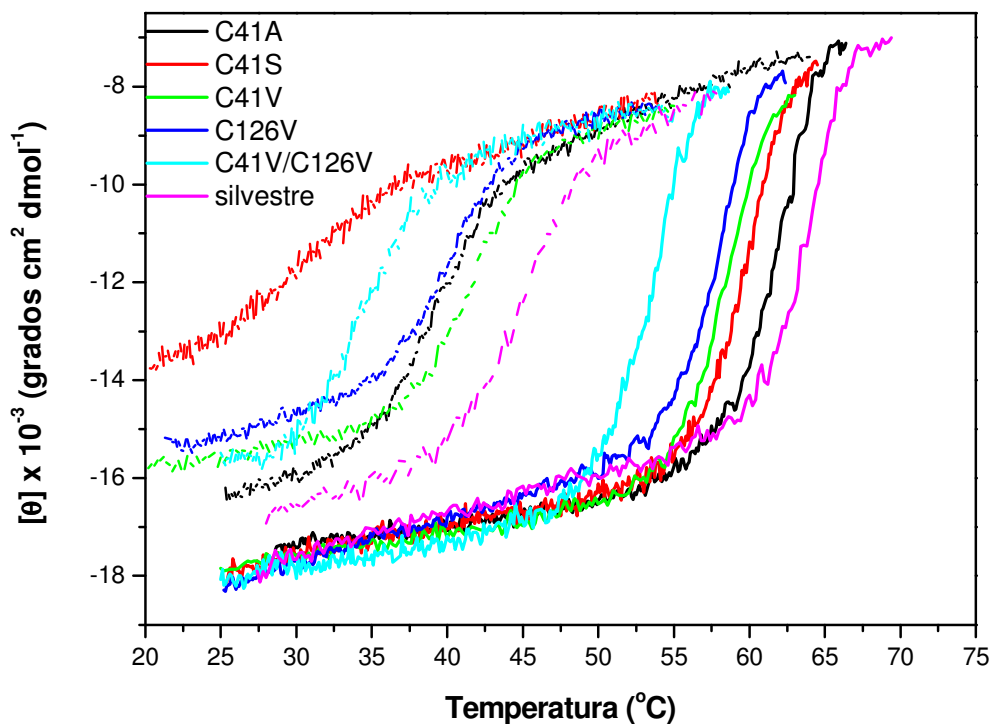


**Figura 8.** Espectros de intensidad de fluorescencia para las enzimas ScTIM silvestre y sus mutantes. Los espectros se obtuvieron a 25°C en regulador de TEA 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.4. Se usaron concentraciones de enzima de 0.050 mg mL<sup>-1</sup>, en una celda de 1.00 cm de recorrido óptico.

### Barrido de temperatura

La Figura 9 muestra las transiciones térmicas de desplegamiento (líneas continuas) y de replegamiento (líneas punteadas) registradas para las variantes de la TIM y la enzima silvestre, a una velocidad de barrido de 2°C min<sup>-1</sup>. Como ya se ha demostrado (Benítez-Cardoza y col., 2001; Hernández-Arana, 2008), la histéresis que aparece durante los ciclos de calentamiento–enfriamiento se debe a un desplegamiento y replegamiento lento de la proteína dimérica dentro de una región de temperatura en particular. Así, el segmento del desplegamiento de estos ciclos está controlado por la velocidad de barrido y la dependencia de la constante de velocidad de desplegamiento

con la temperatura, mientras que en el segmento del replegamiento refleja la variación de la velocidad de replegamiento con la temperatura. Ya que la temperatura a la mitad de cada curva de transición ( $T_m$ ) depende de la velocidad de barrido, se esperaría que ambas curvas, desplegamiento y replegamiento, de la misma proteína se unieran en una sola curva de equilibrio a bajas velocidades de calentamiento y enfriamiento. Sin embargo, cuando se usan velocidades de barrido por debajo de  $2^\circ\text{C min}^{-1}$ , en el proceso de desplegamiento de la TIM, se incrementa su irreversibilidad, por lo que no es posible registrar una curva experimental en equilibrio. A pesar de ello, los valores de  $T_m$  pueden tomarse como indicadores de la estabilidad cinética relativa de la proteína. La TIM silvestre de levadura, que muestra un valor grande de  $T_m$  en la zona de desplegamiento y replegamiento (Figura 9), puede considerarse como la variante con menor velocidad de desplegamiento y una mayor velocidad de replegamiento, dentro de un rango de temperatura cubierto por los ciclos de histéresis. Asimismo, a juzgar por las curvas de la Figura 9, la doble mutante (C41V/C126V) es cinéticamente más inestable que las otras proteínas probadas (es decir, con una constante de desplegamiento grande), mientras que la mutante C41S muestra el replegamiento más lento de todas las variantes de la TIM de levadura estudiada. Cabe mencionar que la recuperación de actividad fue más de 95% en la TIM silvestre y aproximadamente un 90% para todas las variantes, excepto para la mutante C41S que recuperó menos del 80% de actividad.

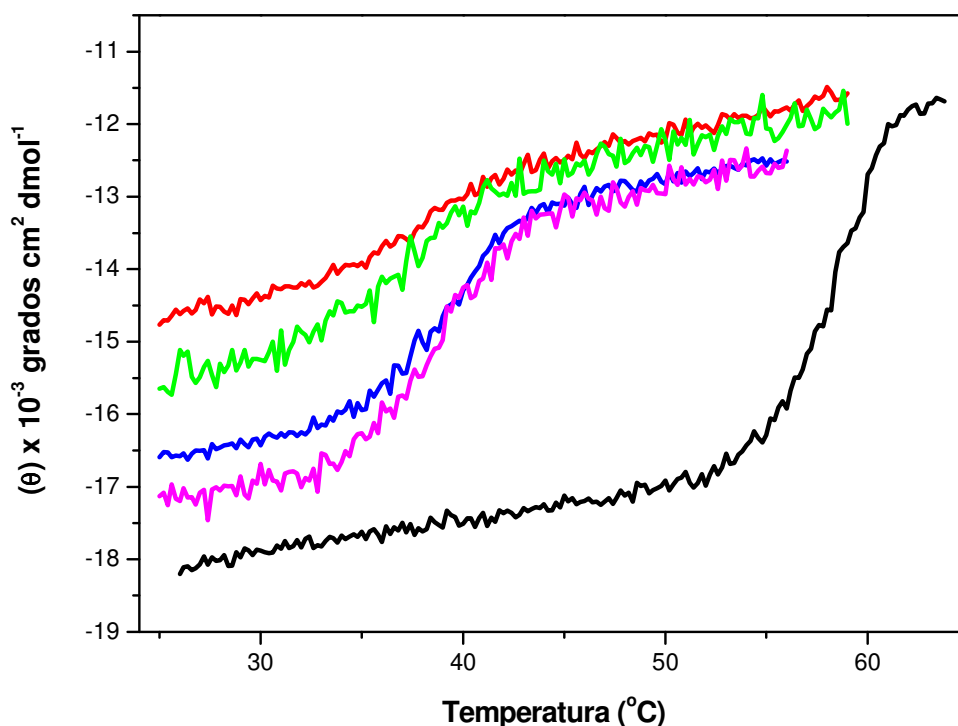


**Figura 9.** Perfil de transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento de la ScTIM y sus mutantes. Curvas individuales de desplegamiento (líneas sólidas) y Las líneas punteadas son las curvas de replegamiento. Las transiciones fueron monitorizadas a 220 nm, con una velocidad de barrido de calentamiento y enfriamiento de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Se utilizó una celda de 1.00 cm con agitación continua y concentración de proteína de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM a pH 7.4.

### Efecto de DTT en el replegamiento

Se obtuvieron las transiciones térmicas de desplegamiento-replegamiento de la ScTIM y sus mutantes; en la Figura 10 sólo se muestran las transiciones de la mutante C126V en amortiguador de fosfatos (fosfato de sodio 10 mM, pH 7.4), tanto en ausencia como en presencia de DTT 1 mM; se omiten todas las transiciones de desplegamiento, salvo la obtenida con el amortiguador de fosfatos sin DTT, ya que el agente reductor no

ocasionó ningún efecto en ellas. En la Figura 10 se indican las transiciones de replegamiento con y sin DTT, pero dos de ellas se registraron inmediatamente después de que terminó el desplegamiento; las otras dos curvas se registraron después de 30 minutos de incubación a temperatura alta. Se puede observar que el agente reductor (DTT) ayuda a un replegamiento mayor. Cabe señalar que cuando la enzima ya tiene mucho tiempo almacenada, solamente se repliega menos del 70% de dicha enzima, aunque su actividad a 25°C permanece constante.



**Figura 10.** Curvas de transiciones térmicas de la mutante C126V. Se obtuvieron a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; se usó amortiguador de fosfatos sin (F) y con DTT (G), celda de recorrido óptico de  $1.00\text{ cm}$  y concentración de proteína de  $0.010\text{ mg mL}^{-1}$ ; se registró la elipticidad a  $220\text{ nm}$ . Los barridos de replegamiento (rojo y verde en amortiguador F y G respectivamente) se incubaron a  $30\text{ min}$  a temperatura alta. Los otros dos barridos, azul (F) y magenta (G), se registraron inmediatamente después del desplegamiento (barrido negro).

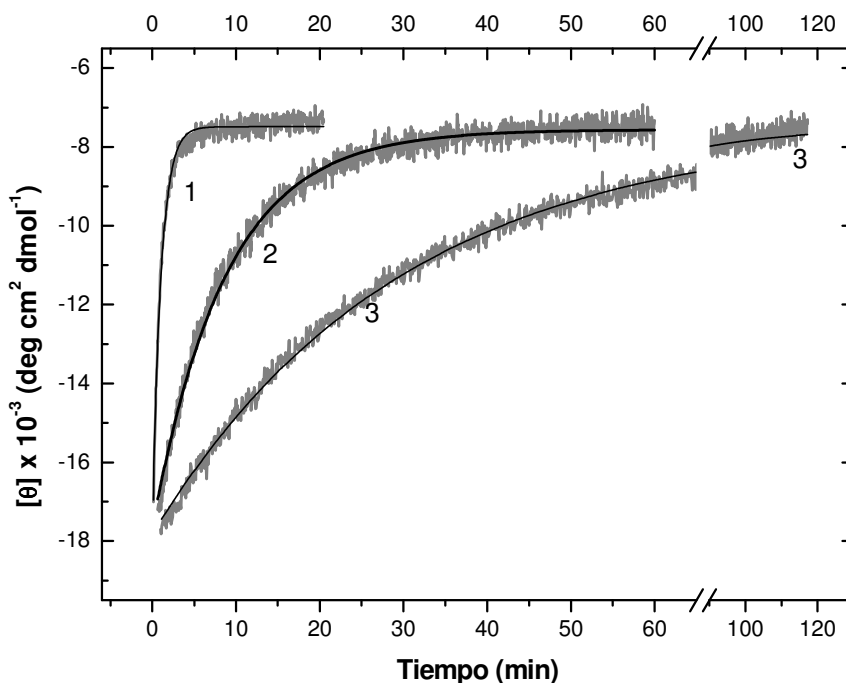
A pesar que las transiciones térmicas corresponden a un proceso reversible, están lejos de representar condiciones de equilibrio; por lo tanto, es necesario determinar las constantes de velocidad y su dependencia con la temperatura para cuantificar la estabilidad relativa.

### **Cinética de desplegamiento**

En reportes anteriores (González-Mondragón y col., 2004; Benítez-Cardoza y col., 2001; Reyes-López y col., 2008) se demostró que la pérdida de estructura secundaria de la TIM silvestre y sus mutantes obedece a una cinética simple de primer orden. Por otra parte, la reacción de desplegamiento procede hasta completarse, independientemente de la temperatura a la cual se estudió. Este comportamiento se observó para todas las mutantes en este trabajo. Por ejemplo, la Figura 11 muestra el cambio de elipticidad en función del tiempo para la mutante C126V a tres diferentes temperaturas. Como se discutió anteriormente (González-Mondragón y col., 2004; Benítez-Cardoza y col., 2001), el hecho de que todas las curvas cinéticas procedan hasta un valor similar final de  $[\theta]$ , indica no solamente la ausencia de equilibrio entre las moléculas plegadas y desplegadas sino, también la presencia de otras reacciones que conducen a la formación de especies desnaturalizadas irreversiblemente (agregados). A pesar de que es indetectable por DC UV-lejano, la formación de proteína desnaturalizada irreversiblemente puede seguirse mediante la incubación de la muestra a alta temperatura, después de que los cambios de elipticidad han cesado, y antes de



inducir el replegamiento de la proteína a bajas temperaturas. Por ejemplo el desplegamiento de la mutante C126V a 58°C es prácticamente completo a los cinco minutos (véase Figura 11) y aproximadamente, el 85% de la proteína se puede replegar (monitorizada por DC o por actividad enzimática) si la solución se enfría rápidamente ( $\approx 15^\circ\text{C min}^{-1}$ ) a 25°C. Sin embargo, la cantidad de enzima replegada decrece a aproximadamente 65% después de 30 min de incubación a 58°C (véase Figura 10).

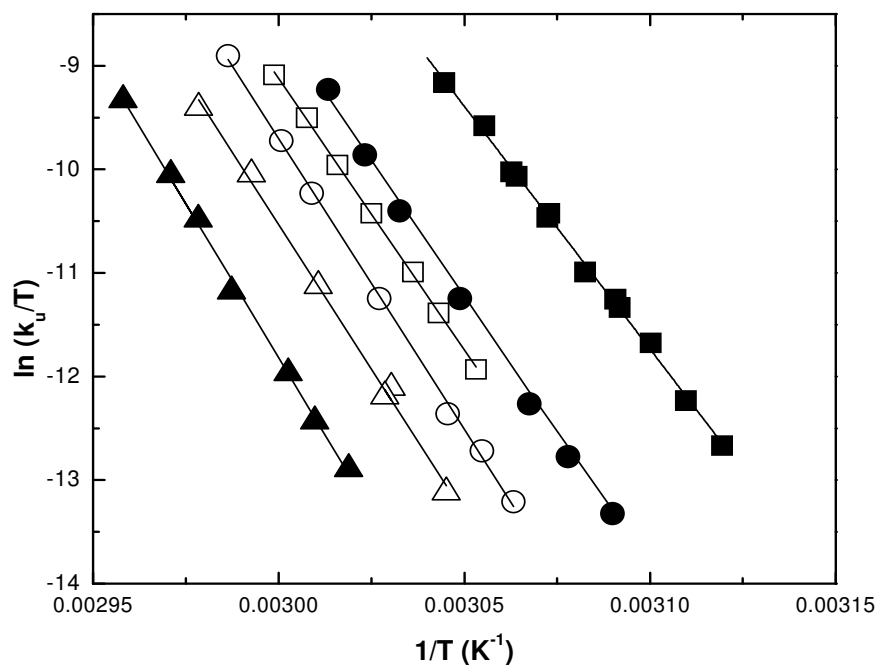


**Figura 11.** Cinéticas de desplegamiento térmico de la mutante C126V de la TIM de levadura a diferentes temperaturas siguiendo el cambio de elipticidad a 220 nm. Los trazos 1, 2, y 3 corresponden a 58.1, 54.2 y 52.3°C, respectivamente. Las líneas continuas son el ajuste de datos experimentales a curvas de decaimiento exponencial simple (Ec. 2). La concentración de la proteína fue  $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$  en fosfato de sodio, pH 7.4

La dependencia con la temperatura de la constante de velocidad de desplegamiento ( $k_u$ ) para cada una de las variantes de la TIM se ilustra en la Figura 12. Todos estos gráficos se ajustan a la ecuación de Eyring (Ec. 4)

$$\ln(k_u / T) = \ln E + \Delta S^{ET-N} / R - (\Delta H^{ET-N} / R)(1/T) \quad (4)$$

En este caso, la entalpía y la entropía de activación se consideran independientes de la temperatura;  $E$  representa un factor preexponencial ( $E = k_B / h$ , donde  $k_B$  y  $h$  corresponden a las constantes de Boltzman y Planck, respectivamente). El ajuste mediante regresión lineal de la Ecuación 4 para los datos de  $k_u$  proporcionó los valores de  $\Delta H^{ET-N}$  y  $\Delta S^{ET-N}$  enlistados en la Tabla 3. Como se muestra en la Figura 12, en términos de desplegamiento del estado nativo, la TIM silvestre es la proteína más estable y la doble mutante (C41V/C126V) muestra la menor estabilidad cinética. En general, nuestros resultados del estudio de la cinética de desplegamiento como una función de la temperatura concuerdan con las tendencias observadas para el valor de  $T_m$  de los barridos de calentamiento mostrados en la Figura 9.



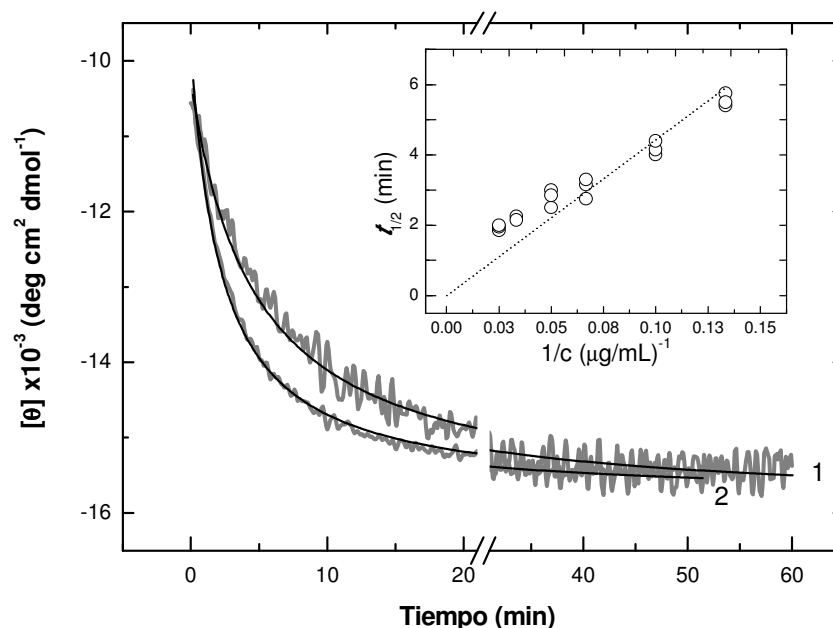
**Figura 12.** Gráfico de Eyring para la constante de desplegamiento ( $k_u$ ) de la enzima silvestre y sus mutantes. Los valores de  $k_u$  fueron determinados a pH 7.4 en fosfato de sodio 10 mM, por experimentos cinéticos en DC UV-lejano. Las líneas representan el ajuste de la Ecuación 4 a los datos experimentales. Los datos corresponden tanto a la enzima silvestre como a las variantes: silvestre ( $\blacktriangle$ ), C41A ( $\triangle$ ), C41S ( $\circ$ ), C41V ( $\square$ ), C126V ( $\bullet$ ), y C41V/C126V ( $\blacksquare$ ).

### Cinética de replegamiento

La recuperación de estructura secundaria a temperatura constante se monitorizó usando una muestra de proteína previamente desplegada a altas temperaturas a la que se le permitió re-equilibrarse a una temperatura inferior de replegamiento, de acuerdo a los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. La Figura 13 muestra el curso de  $[\theta]_{220}$  en el tiempo para el replegamiento de la enzima C126V a 43°C y diferentes concentraciones de muestra. Los datos indican que los tiempos de replegamiento

decrecen cuando la concentración de la proteína aumenta. Además, el gráfico en el recuadro de la Figura 13 muestra que la dependencia del tiempo de vida media del replegamiento con la concentración de TIM,  $C_0$ , es consistente con lo esperado para una reacción de segundo orden [es decir,  $t_{1/2} = 1/(2k_r C_0)$ ] cuando  $C_0$  es inferior a  $0.75 \mu\text{M}$  ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Es importante señalar que los valores iniciales de la cinética de segundo orden mostrados en la Figura 13 no corresponden a los valores de  $[\theta]_{220}$  esperados para la proteína completamente desplegada a la misma temperatura. En concreto, hay una fase cinética rápida que se pierde dentro del tiempo muerto de los experimentos; dicha fase representa la recuperación de aproximadamente el 15% de elipticidad. Reyes-López y col. recuperaban un porcentaje igual de actividad enzimática dentro del tiempo muerto experimental, indicando que la fase rápida probablemente se deba a caminos paralelos de plegamiento. Nosotros observamos un comportamiento similar para todas las mutantes estudiadas en este trabajo; en todos los casos, la mayor proporción de proteína (80 – 90%) se replegó a través de una fase lenta que obedece una cinética de segundo orden.



**Figura 13.** Efecto de la concentración de la proteína en la constante de replegamiento de la mutante C126V. Los trazos corresponden a 10 (curva 1) y 30 (curva 2)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ambos a 43°C. El replegamiento se monitorizó mediante el cambio de elipticidad a 220 nm en una celda de 1.0 cm. Las líneas continuas son el ajuste de una ecuación de velocidad de segundo orden a los datos experimentales. El recuadro muestra la dependencia del tiempo de vida media del replegamiento de C126V,  $t_{1/2}$ , con el recíproco de la concentración de proteína,  $c$ ; la línea punteada es la tendencia esperada para una reacción de segundo orden.

La variación de las constantes de velocidad de replegamiento con respecto a la temperatura para cada una de las variantes de TIM se muestra en la Figura 14. Esta figura ilustra claramente la curvatura típica de la constante de replegamiento, o de eventos acoplados de asociación–replegamiento, observada en un gran número de proteínas (véase Benítez-Cardoza y col., 2001 y referencias ahí citadas). Los datos fueron analizados usando una forma de la ecuación de Eyring que considera una capacidad calorífica de activación,  $\Delta C_p^{ET-2U}$ , diferente de cero:

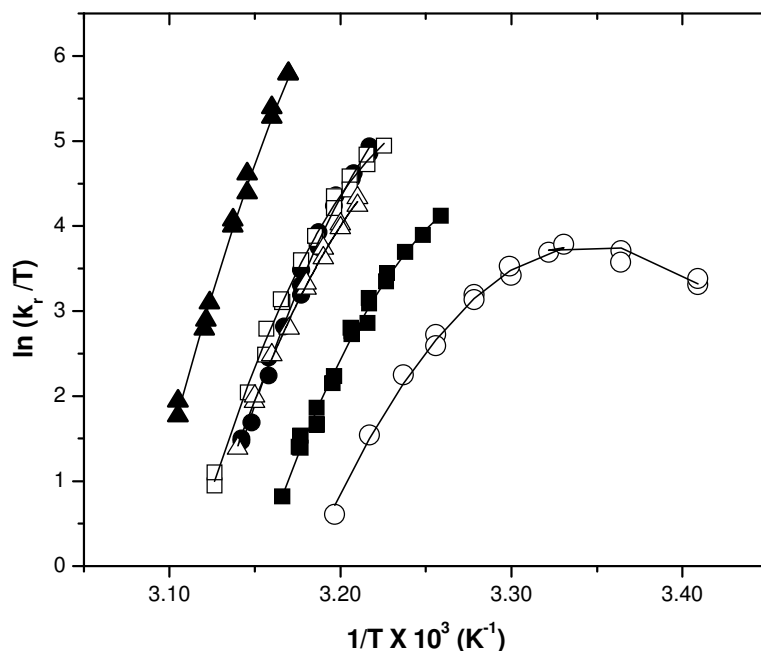
$$\ln(k_r / T) = A - B(1/T) - (\Delta C_p^{ET-2U} / R) \ln(1/T) \quad (5)$$

Los coeficientes  $A$  y  $B$  se expresan como combinaciones de los parámetros de activación, en este caso representados como:

$$A = \ln E + (\Delta S^{ET-2U} - \Delta C_p^{ET-2U} \ln T_R) / R$$

$$B = (\Delta H_{T_R}^{ET-2U} - \Delta C_p^{ET-2U} T_R) / R$$

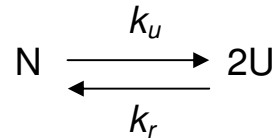
Por medio de estas relaciones, las funciones  $\Delta H^{ET-2U}$  y  $\Delta S^{ET-2U}$  se pueden evaluar a cualquier temperatura en particular,  $T_R$ , a partir de los coeficientes  $A$ ,  $B$  y  $\Delta C_p^{ET-2U}$  que se determinaron utilizando regresión de mínimos cuadrados de la Ecuación 5 con los datos experimentales. La Tabla 3 muestra los valores calculados de los parámetros de activación a 37°C.



**Figura 14.** Gráfico de Eyring para la constante de velocidad de replegamiento ( $k_r$ ) de las mutantes de TIM. Las constantes cinéticas de replegamiento se determinaron a pH 7.4 y a una concentración de proteína de  $0.010 \text{ mg mL}^{-1}$ . Las líneas corresponden a la curva ajustada a la Ecuación 5. TIM silvestre ( $\blacktriangle$ ), C41A ( $\triangle$ ), C41S ( $\circ$ ), C41V ( $\square$ ), C126V ( $\bullet$ ), y C41V/C126V ( $\blacksquare$ ).

### Estimación de la estabilidad global de la TIM

A pesar de que las curvas térmicas de desplegamiento–replegamiento en equilibrio no se pueden obtener para la proteína TIM de levadura, los valores de  $k_u$  y  $k_r$  se pueden utilizar para calcular la estabilidad termodinámica de la molécula dimérica si se supone un modelo de dos estados, sin intermediarios estables, que opera bajo las condiciones experimentales impuestas.



En este modelo, la constante de equilibrio para el desplegamiento y el correspondiente cambio de energía libre estándar están dados por:

$$K_u = \frac{k_u}{k_r} \quad \text{y} \quad \Delta G^{2U-N} = -RT \ln K_u$$

La evidencia a favor de este modelo de dos estados es: (1) la comparación de los datos experimentales cinéticos y calorimétricos para la enzima tipo silvestre (Benítez-Cardoza y col., 2001); (2) el efecto de un ligando específico en las cinéticas de desplegamiento y replegamiento de la TIM de levadura indica que el estado de transición es dimérico (González-Mondragón y col., 2007); y (3) la detección de ciclos de histéresis térmicos se pueden reproducir por la dependencia de la temperatura de  $k_u$  y  $k_r$  (Hernández-Arana, 2008). Hemos aplicado el mismo modelo de dos estados para calcular  $\Delta G^{2U-N}$  (Tabla 3) en todos los casos, ya que las mutantes de la TIM de levadura se comportan en forma similar a la enzima silvestre en nuestros estudios cinéticos.



	Desplegamiento			Replegamiento			
	$\Delta H^{ET-N}$	$\Delta S^{ET-N}$	$\Delta G^{ET-N}$	$\Delta H^{ET-2U}$	$\Delta S^{ET-2U}$	$\Delta G^{ET-2U}$	$\Delta Cp^{ET-2U}$
<b>silvestre</b>	495 (11)	1.19 (0.04)	126 (1.5)	-230 (35)	-0.87 (0.11)	41 (2.0)	-32
<b>C41A</b>	464 (9)	1.11 (0.03)	121 (2.4)	-177 (21)	-0.73 (0.07)	49 (1.1)	-34
<b>C41S</b>	462 (7)	1.11 (0.02)	117 (2.3)	-279 (17)	-1.08 (0.05)	55 (1.0)	-25
<b>C41V</b>	436 (6)	1.04 (0.02)	115 (2.6)	-159 (18)	-0.67 (0.06)	48 (1.3)	-36
<b>C126A</b>	439 (8)	1.03 (0.03)	120 (2.4)	-229 (14)	-0.90 (0.05)	50 (1.3)	-31
<b>C126S</b>	300 (10)	0.64 (0.03)	102 (2.0)	-251 (17)	-0.98 (0.05)	54 (0.9)	-25
<b>C126V</b>	444 (8)	1.06 (0.03)	115 (2.3)	-236 (17)	-0.92 (0.06)	48 (1.2)	-35
<b>C41V/C126V</b>	390 (5)	0.91 (0.03)	107 (2.0)	-257 (16)	-1.00 (0.05)	52 (0.8)	-34

**Tabla 3.** Parámetros de activación de desplegamiento y replegamiento de la enzima TIM de mol de dímero.  $\Delta H^{ET-N}$  y  $\Delta S^{ET-N}$  para el desplegamiento son independientes de la temperatura ( $\Delta Cp^{ET-N} = 0$ ). Todos los otros valores referidos son a 37 °C.  $\Delta H$  y  $\Delta G$  de activación están en kJ mol<sup>-1</sup>;  $\Delta S$  de activación y  $\Delta Cp^{ET-2U}$  en kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.  $\Delta G$  fue calculado a partir de la ecuación de Eyring  $\Delta G^\ddagger = -\ln(k_i h / k_B T) RT$ , donde  $k_i$  es  $k_u$  o  $k_r$ ,  $h$  es la constante de Planck y  $k_B$  es la constante de Boltzmann. Las desviaciones estándar se encuentran entre paréntesis.

Observando los valores de  $\Delta G$  de activación en la Tabla 3, se puede notar que las mutaciones C41V y C126V tienen, en buena medida, un carácter aditivo que se manifiesta tanto en el desplegamiento como en el replegamiento de la doble mutante C41V/C126V. Esto sugiere que en el estado de transición principal la zona de alteración estructural abarca, por lo menos, desde la hebra  $\beta 2$ , donde se localiza el residuo 41, hasta la  $\beta 5$ , en la cual se encuentra el residuo 126.

## Discusión

### El papel de la Cys126 en la actividad enzimática

Como se ha mencionado anteriormente (González-Mondragón y col., 2004) el residuo C126 conservado no es esencial para la actividad catalítica de la TIM. De hecho, la sustitución de este residuo por Ala o Ser no causa cambios significativos en el valor de  $k_{cat}/K_M$ , el parámetro relevante para medir la actividad de la TIM en concentraciones de sustrato encontradas *in vivo* (González-Mondragón y col., 2004; Albe y col., 1990). Sin embargo, en el presente trabajo encontramos que la mutación C126V ocasionó que decreciera cinco veces el valor de  $k_{cat}/K_M$ , como resultado de la disminución de 15 veces en  $k_{cat}$  (Tabla 2). Al parecer la introducción de una cadena lateral más grande e hidrofóbica en la posición 126 perturba considerablemente el ambiente cercano al Glu165 catalítico. Esta perturbación puede ser el resultado de un efecto estérico o de cambios de polaridad del sitio catalítico. Entonces, parece ser que hay algunas restricciones en cuanto al tamaño e hidrofobicidad de la cadena lateral que ocupa la posición 126 para mantener una eficiencia catalítica apropiada, pero la presencia de un grupo sulfhidrilo no es requerida en este sitio.

La mutación de la otra cisteína (Cys41) de la TIM de levadura por Ala, Ser o Val no tuvo efectos significativos en la actividad enzimática (Tabla 2), probablemente porque el residuo 41 está localizado a más de 7 Å de cualquiera de los residuos del sitio catalítico.

## Efectos de la mutación de las cisteínas en la estabilidad de ScTIM

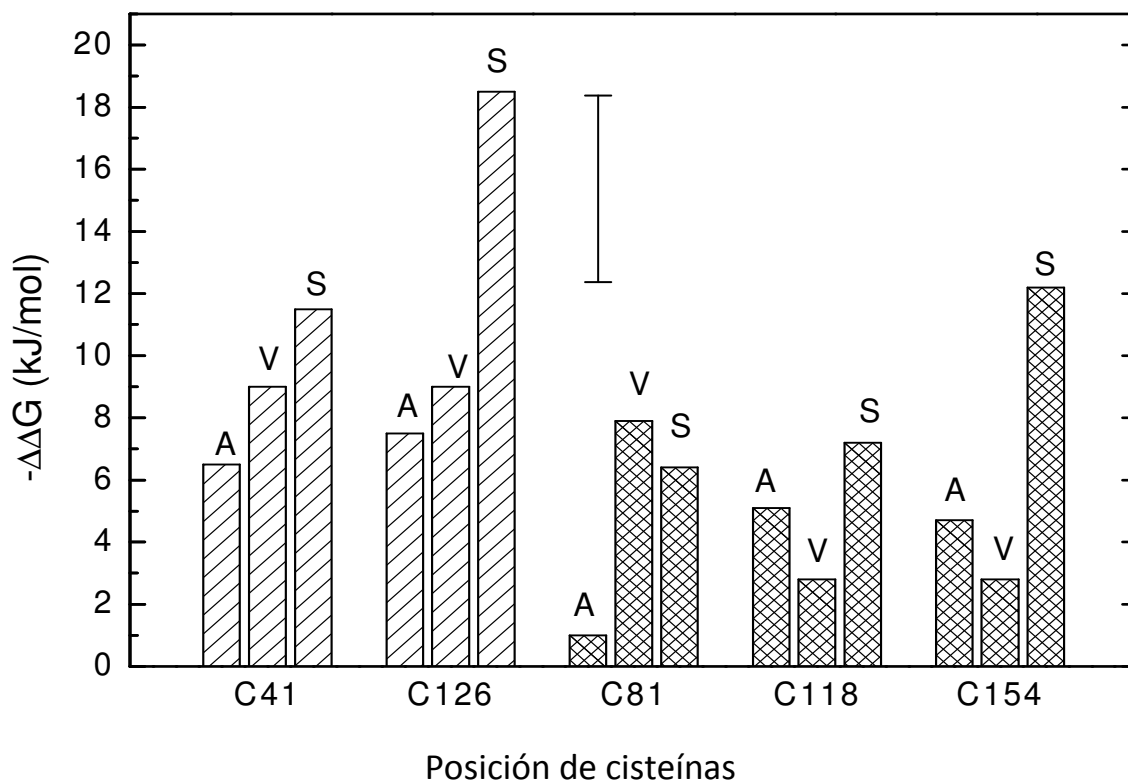
Una inspección de los valores de  $\Delta\Delta G$  ( $\Delta G_{mut}^{2U-N} - \Delta G_{silvestre}^{2U-N}$ ) presentados en la Tabla 4 indica claramente que la mutación C126S tuvo como resultado una desestabilización sustancial en el dímero de la TIM. El nivel de esta desestabilización es solamente comparable al inducido por la doble mutante C41V/C126V. En efecto, el decrecimiento en la energía libre de desplegamiento encontrado para la variante C126S (aproximadamente de  $-18 \text{ kJ mol}^{-1}$  de monómero de TIM) es por lo menos 60% mayor que el valor correspondiente para cualquiera de las mutantes puntuales en las posiciones 41 y 126. Es interesante notar que los valores de  $\Delta\Delta G$  presentados en la Tabla 4 indican que para las cisteínas ocultas de la TIM de levadura, las mutaciones Cys  $\rightarrow$  Ala y Cys  $\rightarrow$  Val son más conservativas que el reemplazo Cys  $\rightarrow$  Ser, en concordancia con consideraciones de hidrofobicidad relativa y con las frecuencias de sustituciones de cisteínas ocultas (Overington y col., 1992).

Sin embargo, en general nuestros resultados no concuerdan con aquellos reportados por Silverman y Harbury (2002), quienes usaron un método de intercambio protón-alquilo con residuos incorporados como sondas para estudiar la termodinámica del plegamiento de la TIM de levadura. Por ejemplo, ellos reportaron que las sustituciones de Ala, Val o Ser en la posición 126 resultaron todas en un nivel similar de desestabilización, reflejado en el valor de  $\Delta\Delta G$  de  $-33.6 \text{ kJ}$  ( $-5.4 \text{ kcal}$ ) por mol de monómero de la mutante C126A. Por otra parte, ellos reportaron un  $\Delta\Delta G$  de solamente

-1.3 kJ mol<sup>-1</sup> (-0.3 kcal) para la mutación C41V, un efecto mucho menor al que nosotros medimos (-9 kJ mol<sup>-1</sup> de monómero).

La falta de consistencia entre nuestros resultados y los de Silverman y Harbury puede ser debido, en parte, a las diferencias de inducción de desplegamiento y las diferencias en temperatura. Específicamente, el  $\Delta\Delta G$  presentado en la Tabla 4 corresponde a 37°C, mientras los reportados por Silverman y Harbury se derivan a partir de experimentos hechos (presumiblemente) a temperatura ambiente usando cloruro de guanidinio como agente desnaturalizante.

Los datos relativos a la desestabilización de la subunidad  $\alpha$  de la triptófano sintasa de *E. coli*, en respuesta a la mutación de cisteína (Hiraga y Yutani, 1996), podrían ser informativos comparándolos con nuestros resultados. La triptófano sintasa es una proteína monomérica con estructura tipo  $\beta/\alpha$  que tiene tres residuos de cisteína libres ocultas (Cys81, 118 y 154) localizados en las hélices 2 y 3, y en la quinta hebra  $\beta$ , respectivamente. Ninguno de estos residuos de Cys está conservado dentro de los miembros de la familia de esta enzima. Hiraga y Yutani (1996) estudiaron el desplegamiento térmico de varias mutantes puntuales en las posiciones ocupada por los residuos de cisteína de esta proteína, utilizando calorimetría diferencial de barrido.



**Figura 15.** Efecto de la sustitución de Cys en la estabilidad de dos proteínas con estructura tipo barril  $\beta/\alpha$ . Residuos de Cys libre presentes en la secuencia de TIM de levadura (barras transversales) y en la subunidad  $\alpha$  de la triptófano sintasa de *E. coli* (barras cuadrículadas) fueron reemplazados por Ala, Val y Ser. Los datos se expresan como la diferencia de energía libre de desplegamiento ( $\Delta\Delta G = \Delta G_{mut}^{2U-N} - \Delta G_{silvestre}^{2U-N}$ ) y se calcularon a 37°C. La barra de error es el promedio de error de los valores de  $\Delta\Delta G$  enunciados en la Tabla 4. Los datos de la subunidad  $\alpha$  de la triptófano sintasa de *E. coli* se calcularon a partir de los reportados por Hiraga y Yutani (1996).

Aunque los autores reportan valores a 50°C, ellos proporcionan suficiente información para calcular  $\Delta\Delta G$  a 37°C. Los datos para la subunidad  $\alpha$  de la triptófano sintasa, junto con los datos de la TIM, tomada como monómero, son ilustrados en la Figura 15. Además de mostrar que las mutaciones de Cys  $\rightarrow$  Ala y Cys  $\rightarrow$  Val son generalmente más conservativas (menos desestabilizantes) que las mutaciones Cys  $\rightarrow$  Ser, la

Figura 15 sugiere que hay un umbral de  $\Delta\Delta G$  de  $\approx 12 \text{ kJ mol}^{-1}$  que separa los residuos conservados y los no conservados. Este valor definiría, entonces, la llamada amplitud del corredor neutral en la Teoría Neutral de la Evolución Molecular.

De acuerdo a lo anterior, podría pensarse que la Cys126 ha permanecido como residuo invariante en todas las secuencias de TIM conocidas porque una sustitución neutral de Ala o Val en el residuo 126 requeriría una mutación (muy poco probable) de dos bases en el codón de la Cys (véase Gloss y col., 1996 para una discusión sobre los codones de Cys). En esta posición, el cambio de Cys  $\rightarrow$  Ser (el cual se podría conseguir a través de una mutación no sinónima de una sola base; UGU  $\rightarrow$  AGU (Figura 16)) sería extremadamente desestabilizante para la enzima nativa. En contraste, la mutación Cys  $\rightarrow$  Ser en el residuo 41 sería neutral (según el valor de  $\Delta\Delta G$ ), lo que habría conducido a una variabilidad evolutiva en secuencias de TIM en esta posición si la cisteína fuese el residuo “original”

		Segunda base					
		U	C	A	G		
P r i m e r a  b a s e	U	Phe UUU	Ser UCU	Tyr UAU	Cys UGU	U C A G	T e r c e r a  b a s e
		Phe UUC	Ser UCC	Tyr UAC	Cys UGC		
		Leu UUA	Ser UCA	Stop UAA	Stop UGA		
		Leu UUG	Ser UCG	Stop UAG	Trp UGG		
	C	Leu CUU	Pro CCU	His CAU	Arg CGU	U C A G	
		Leu CUC	Pro CCC	His CAC	Arg CGC		
		Leu CUA	Pro CCA	Gln CAA	Arg CGA		
		Leu CUG	Pro CCG	Gln CAG	Arg CGG		
	A	Ile AUU	Thr ACU	Asn AAU	Ser AGU	U C A G	
		Ile AUC	Thr ACC	Asn AAC	Ser AGC		
		Ile AUA	Thr ACA	Lys AAA	Arg AGA		
		Met AUG	Thr ACG	Lys AAG	Arg AGG		
G	Val GUU	Ala GCU	Asp GAU	Gly GGU	U C A G		
	Val GUC	Ala GCC	Asp GAC	Gly GGC			
	Val GUA	Ala GCA	Glu GAA	Gly GGA			
	Val GUG	Ala GCG	Glu GAG	Gly GGG			

**Figura 16.** El Código genético está formado por 64 codones y cada uno especifica un aminoácido.

Con respecto al nivel máximo de desestabilización permitido en una mutación neutral, es conveniente recordar que estudios recientes de mutagénesis muestran que hay buena correlación entre el  $\Delta\Delta G$  originado por sustitución de un solo aminoácido y la frecuencia de incidencia del residuo reemplazado en el alineamiento de secuencias. Por ejemplo, Sánchez y col. (2006) clasificaron un gran número de mutantes puntuales como “permitidas” o “prohibidas”, encontrando que una mutación “prohibida” es más desestabilizante (un promedio de  $\Delta\Delta G$  de  $-8 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) que las mutaciones “permitidas” (promedio de  $\Delta\Delta G \approx -4 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Resultados similares se han encontrado por Di Nardo y col., 2003 en sus estudios del dominio SH3 de la tirosina cinasa. Específicamente, estos autores determinaron que secuencias con residuos de aminoácidos que aparecen con una frecuencia de menos del 1% (en un alineamiento de



266 dominios SH3) en una posición en particular muestran un  $\Delta\Delta G$  de  $-11 \pm 6 \text{ kJ mol}^{-1}$ , mientras secuencias con residuos presentes con más del 1% de frecuencia muestran un  $\Delta\Delta G$  promedio de solamente  $-6 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}$  (valores promedio calculados de  $\Delta\Delta G$  en la Tabla 2 en la referencia de Di Nardo y col., 2003). Por otra parte, a través del análisis de la estabilidad observada en mutantes sencillas de la tioredoxina de *E. coli*, Godoy-Ruiz y col., 2006 propusieron que un valor de  $\Delta\Delta G$  de -2 a  $-10 \text{ kJ mol}^{-1}$  es el nivel máximo de desestabilización evolutiva permitida para las mutaciones en esta proteína. En otro tipo de estudio, Tokuriki y Tawfik (2009) realizaron recientemente una deriva mutacional aleatoria de varias enzimas sobreexpresadas en *E. coli*. Según sus resultados, las mutaciones encontradas en genes de una deriva neutral tendrían un valor de  $\Delta\Delta G$  (calculado por FoldX, Schymkowitz y col., 2005) no mayor de -4 a  $-5 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $-17$  a  $-21 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Así, de acuerdo a los datos publicados hasta la fecha, el valor de que limita el corredor neutral podría ser tan pequeño como  $-2 \text{ kJ mol}^{-1}$  o tan grande como  $-20 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Nuestro valor sugerido de  $-12 \text{ kJ mol}^{-1}$  está incluido dentro de este amplio rango, sugiriendo que dicha magnitud parece ser razonable.

### **Estabilidad cinética como el principal determinante para la aptitud de una proteína**

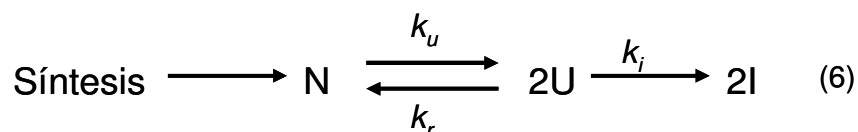
Tomando en cuenta la gran variación de los valores reportados para la desestabilización máxima permitida en mutaciones neutrales, es importante preguntarse qué efecto tendría una mutación en particular sobre el nivel de concentración de una

enzima nativa en condiciones fisiológicas. Una consecuencia inmediata del decrecimiento del valor del  $\Delta G^{2U-N}$  es una mayor fracción de moléculas de proteína desplegada,  $f_u$ , en equilibrio. Sin embargo, los valores relativos de  $f_u$  para diferentes variantes de la TIM no dependen solamente del  $\Delta\Delta G$ , sino también del valor absoluto de  $\Delta G^{2U-N}$ , y de la concentración de la proteína total. Usando la relación  $K_u = k_u / k_r = \exp(-\Delta G^{(2U-N)}/RT)$ , y  $K_u = 2C_t[f_u^2/(1-f_u)]$  (véase apéndice A), calculamos el valor de  $f_u$  para la enzima silvestre y sus mutantes de la TIM de levadura en condiciones fisiológicas (es decir, 37°C y pH 7.4). La concentración de la proteína total (expresada en términos de monómero),  $C_t$ , se tomó de 37.6  $\mu\text{M}$  (1.0 mg mL<sup>-1</sup>), que es un valor representativo de concentración de la TIM de levadura *in vivo* (Albe y col., 1990; Ghaemmaghami y col., 2003). Nuestros resultados (ver Tabla 4) muestran que todas las variantes diferentes de TIM estarían plegadas en más del 99% en equilibrio; sin embargo, la fracción de proteína desplegada sería al menos 20 veces más grande para la mutante C126S que para cualquier otra variante de la ScTIM.

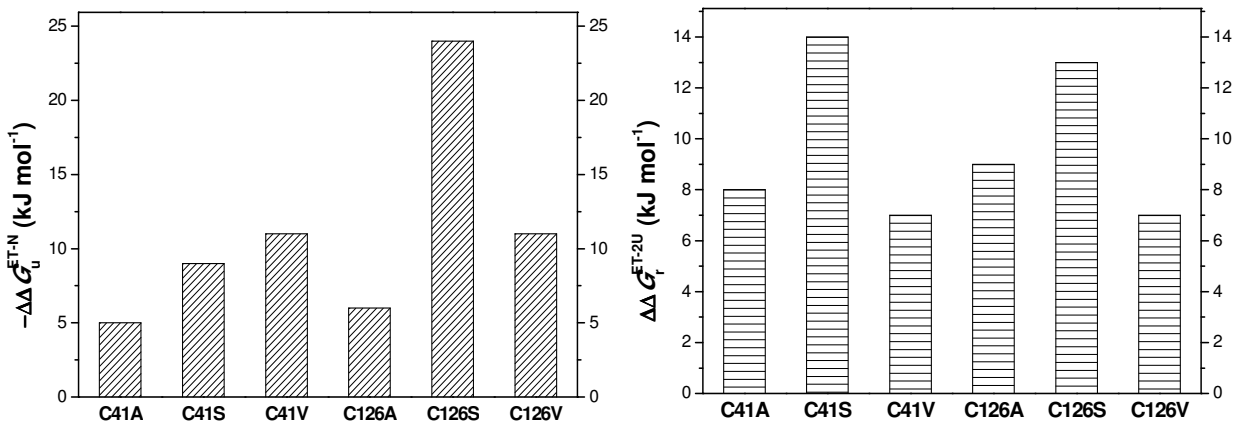
	$k_u$ (s <sup>-1</sup> )	$k_r$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{2U-N}$	$-\Delta\Delta G$	$f_{N,eq}$	$f_{U,eq}$
Silvestre	$4.0 \times 10^{-9}$	$8.8 \times 10^5$	85 (3.2)	----	0.999	$7.8 \times 10^{-6}$
C41A	$2.7 \times 10^{-8}$	$3.1 \times 10^4$	72 (2.6)	13	0.999	$1.1 \times 10^{-4}$
C41V	$2.2 \times 10^{-7}$	$5.5 \times 10^4$	67 (2.9)	18	0.999	$2.4 \times 10^{-4}$
C41S	$5.9 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^3$	62 (2.5)	23	0.999	$6.3 \times 10^{-4}$
C126A	$4.4 \times 10^{-8}$	$3.0 \times 10^4$	70 (2.7)	15	0.999	$1.4 \times 10^{-4}$
C126V	$3.6 \times 10^{-7}$	$6.5 \times 10^4$	67 (2.6)	18	0.999	$2.7 \times 10^{-4}$
C126S	$4.5 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^3$	48 (2.2)	37	0.990	$1.0 \times 10^{-2}$

**Tabla 4.** Constantes de velocidad de desplegamiento ( $k_u$ ) y replegamiento ( $k_r$ ) y energías libres de desplegamiento para la ScTIM silvestre y sus mutantes, bajo condiciones fisiológicas (determinadas a 37°C, en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH = 7.4).  $\Delta\Delta G$  está definido como  $\Delta G_{mut}^{2U-N} - \Delta G_{silvestre}^{2U-N}$ . Los valores de  $\Delta G^{2U-N}$  y  $\Delta\Delta G$  están determinados en kilojoules por mol de dímero.  $f_{N,eq}$  y  $f_{U,eq}$  indican la fracción de la proteína nativa y desplegada, respectivamente, en equilibrio.

El valor relativamente alto de  $f_u$  para la variante C126S puede ser perjudicial para la célula si la agregación irreversible del monómero desplegado (o mal plegado) en el citoplasma saturado resulta en una reducción de enzima nativa (van den Berg y col., 1999). Para probar esta idea, establecimos un modelo de una cinética simple que da cuenta de la irreversibilidad:



donde, como en algunos modelos usados para la agregación de proteínas (Morris y col., 2008; Andrews & Roberts, 2007), el primer paso irreversible se representa como una reacción de primer orden. Por otra parte, nuestro modelo asume que la enzima entra en el citoplasma una vez que ha sido correctamente plegada. Es decir, el modelo mostrado en la Ecuación 6 supone que, el desplegamiento de TIM y las reacciones irreversibles posteriores en el citoplasma, juegan un papel crucial en la determinación de adaptabilidad diferencial del organismo cuyo genoma lleva una mutación en particular. La razón de este postulado es que la variante C126S de la TIM se distingue claramente de las otras por sus valores de  $k_u$  ( $-\Delta\Delta G_u^{ET-N}$ ), en lugar de sus valores de  $k_r$  ( $\Delta\Delta G_r^{ET-2U}$  (véase Figura 17)).



**Figura 17.** Representación grafica de los valores de  $-\Delta\Delta G_u^{ET-N}$  ( $\Delta\Delta G_u = \Delta G_{mut}^{ET-N} - \Delta G_{silvestre}^{ET-N}$ ) y  $\Delta\Delta G_r^{ET-2U}$  ( $\Delta\Delta G_r = \Delta G_{mut}^{ET-2U} - \Delta G_{silvestre}^{ET-2U}$ ) para las mutantes de TIM.

Además, para tener en cuenta el crecimiento y la duplicación de la célula de levadura, se supone que la TIM se sintetiza continuamente y el volumen de la célula se

incrementa linealmente con el tiempo,  $t$ . Como se muestra en el Apéndice B, las ecuaciones de velocidad para la concentración de enzima nativa ( $C_N$ ), desplegada ( $C_U$ ) e irreversiblemente desnaturalizada ( $C_I$ ) son:

$$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{C_N}{(t+t_d)} + \frac{C_t}{t+t_d} + k_r C_U^2 - k_u C_N \quad (7)$$

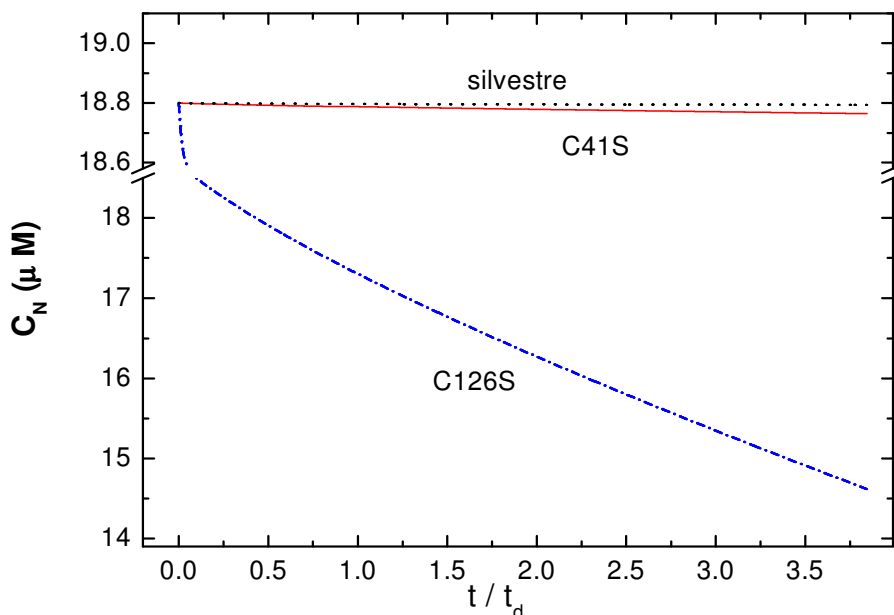
$$\frac{dC_U}{dt} = -\frac{C_U}{t+t_d} + 2k_u C_N - 2k_r (C_U)^2 - k_i C_U \quad (8)$$

$$\frac{dC_I}{dt} = -\frac{C_I}{t+t_d} + k_i C_U \quad (9)$$

donde  $C_t$  es el valor promedio intracelular de  $C_N$  (es decir, 18.8  $\mu\text{M}$ , véase página 56) y  $t_d$  es el tiempo de duplicación celular. Bajo un régimen de crecimiento oxidativo, el valor común para la tasa de crecimiento específico de *S. cerevisiae* es de 0.2  $\text{h}^{-1}$  (van Hoek y col., 1998; Bellgardt, 1994), dando un valor de  $t_d$  de  $\approx 208$  min. Con respecto a  $k_i$ , solamente podemos aproximar un valor razonable para esta constante cinética; fijamos a  $k_i$  en  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , cerca del valor medio para un gran número de reacciones de agregación, según la recopilación hecha por Du Bay y col. (2004). Las ecuaciones 7, 8 y 9 fueron resueltas numéricamente usando valores de  $k_u$  y  $k_r$  para la proteína silvestre y las mutantes C41S y C126S.

Como se muestra en la Figura 18, los resultados para la proteína silvestre y la mutante C41S muestran que la concentración de la enzima nativa permanece cerca del nivel medio, lo que indica que después de tres divisiones celulares, las células hijas

contienen esencialmente la misma cantidad de TIM que la célula madre. En contraste, el nivel de la TIM nativa disminuirá rápidamente en la descendencia de una célula que expresa la variante C126S, afectando así la adaptabilidad y supervivencia de estas mutantes bajo presión selectiva.



**Figura 18.** Simulación de la evolución de la concentración de la TIM nativa *in vivo*, asumiendo que una reacción irreversible se lleva a cabo después de haberse desplegado (véase el modelo cinético que se ilustra en la Ecuación 6). Los trazos representan el valor de  $C_N$  para la enzima silvestre (línea de puntos), la mutante C41S (línea continua en color rojo) y la mutante C126S (línea azul de puntos y guiones). La variación de  $C_N$  con el tiempo,  $t$ , se calculó mediante la solución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales acopladas (7), (8) y (9), usando el algoritmo de Runge–Kutta implementado en el paquete de software Sigma Plot. La coordenada del tiempo es el cociente de  $t$  sobre el tiempo de duplicación,  $t_d$ , de una célula de levadura. Los valores de las constantes cinéticas calculadas a 37°C son: TIM silvestre,  $k_u = 4.0 \times 10^{-9}$  y  $k_r = 8.8 \times 10^{-1}$ ; C41S,  $k_u = 5.9 \times 10^{-8}$  y  $k_r = 2.2 \times 10^{-3}$ ; y C126S,  $k_u = 4.5 \times 10^{-5}$  y  $k_r = 6.0 \times 10^{-3}$ . Las unidades de  $k_u$  y  $k_r$  están expresadas  $s^{-1}$  y  $s^{-1} \mu M^{-1}$ , respectivamente.

## Conclusiones y Perspectivas

El residuo invariante de Cys presente en las enzimas de TIM (Cys126, numeración de acuerdo a la secuencia de ScTIM) puede ser sustituido por Ser o Ala sin afectar significativamente la eficiencia catalítica de la enzima. Sin embargo, la mutación C126S provoca gran desestabilización (en términos de energía libre de desplegamiento) del dímero nativo. De hecho el  $\Delta\Delta G$  para esta mutación casi duplica el valor correspondiente a las otras mutaciones realizadas en Cys126 por Val y Ala o en la otra cisteína (Cys 41) no conservada. Es interesante notar que ninguna de las sustituciones estudiadas (ni en Cys41 ni en Cys126), provocaron cambios importantes en la conformación secundaria ni terciaria, a juzgar por los espectros de DC y fluorescencia (Figuras 7 y 8). De hecho, las estructuras generadas computacionalmente sugieren que sólo ocurren cambios locales de menor importancia en cualquiera de las mutaciones generadas en la posición 41 y 126.

A pesar de esta gran desestabilización, la mutante C126S está plegada en 99% en condiciones fisiológicas (37°C, pH 7.4, y una concentración total de enzima como la encontrada *in vivo*).

No obstante, la aptitud *in vivo* de la mutante C126S podría verse afectada negativamente por su baja estabilidad cinética (es decir, una velocidad de desplegamiento grande) si el monómero desplegado se ve involucrado en reacciones irreversibles posteriores al desplegamiento.

## Perspectivas

Del estudio de mutantes puntuales en un residuo conservado (Cys126) y en uno no conservado (Cys41), ambos en regiones ocultas al solvente, encontramos que una mutante en especial provocó una gran desestabilización (C126S). Sin embargo, nos preguntamos que pasaría si se efectuaran mutaciones en residuos conservados y no conservados en la interfase del dímero. Se hicieron ya estudios preliminares del efecto de sustitución de un residuo altamente conservado (E97) de la interfase de ScTIM; hemos encontrado hasta el momento que la mutación E97Q no afecta la eficiencia catalítica; posteriormente se hará el estudio de la estabilidad de dicha mutante. Por otra parte, se planea hacer otra mutación en la interfase de un residuo no conservado (E77Q).

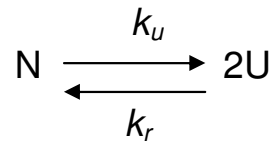
También sería interesante investigar que pasaría con la mutación puntual de Cys126 → Gly, ya que ésta implicaría el cambio de una sola base (UGU → GGU), como sucede en el caso de la mutante C126S. Considerando que la glicina es el residuo más pequeño de los 20 aminoácidos, la introducción de éste en lugar de la cisteína 126 acarrearía una reducción importante de volumen (el volumen van der Waals de la glicina ( $48 \text{ \AA}^3$ ) es aproximadamente la mitad con respecto al volumen del residuo de Cys ( $86 \text{ \AA}^3$ ; Darby y Creighton, 1993).



## Apéndice A

### Modelo reversible de dos estados

El modelo más simple para describir el desplegamiento de una enzima dimérica (TIM) es un mecanismo reversible de dos estados, sin intermediarios estables.



donde de N y U representan a los estados nativo y desplegado respectivamente, y  $k_u$  y  $k_r$  constituyen a las constantes de velocidad de desplegamiento y la de replegamiento. La constante de equilibrio ( $K_u$ ) está dada por la relación:

$$K_u = \frac{2[U]^2}{[N]} \quad (\text{A1})$$

Por otra parte, la concentración total de proteína,  $C_t$  (expresada por monómero) y las fracciones de proteína nativa y desplegada están relacionadas mediante las expresiones siguientes:

$$C_t = 2[N] + [U] \quad (\text{A2})$$

$$f_N + f_U = 1 \quad (\text{A3})$$

$$\begin{aligned} C_t f_U &= U \\ C_t f_N &= N \end{aligned} \quad (\text{A4})$$

Entonces, utilizando las ecuaciones A1 y A4 es posible expresar la constante de equilibrio en términos de  $f_U$  :

$$K_U = \frac{2(C_t f_U)^2}{C_t f_N} = \frac{2C_t f_U^2}{1 + f_U}$$

El cambio de energía libre ( $\Delta G^{2U-N}$ ) se puede calcular, como es común, a partir de la constante de equilibrio.

$$\Delta G^{2U-N} = -RT \ln K_U$$

## Apéndice B

Debido a que la concentración molar de la proteína nativa en cualquier tiempo está dada por  $C_N = n_N / V$  (donde  $n_N$  es el número de moles de N y  $V$  es el volumen de la célula), el cambio de velocidad de esta concentración se describe como:

$$\begin{aligned} \frac{dC_N}{dt} &= -\left(\frac{n_N}{V^2}\right)\left(\frac{dV}{dt}\right) + \left(\frac{1}{V}\right)\left(\frac{dn_N}{dt}\right) \\ &= -\left(\frac{rC_N}{V}\right) + \left(\frac{1}{V}\right)\left(\frac{dn_N}{dt}\right) \end{aligned} \quad (B1)$$

donde el volumen se supone que aumentará linealmente con el tiempo (es decir,  $V = V_0 + rt$ ,  $V_0$  es el volumen en el tiempo cero). Un valor estimado para  $r$  sería aproximadamente igual a la relación  $V_0 / t_d$ , donde  $t_d$  es el tiempo de duplicación celular. De forma análoga pueden escribirse expresiones similares para el cambio de concentración de U y de I; por otra parte, con referencia al modelo de la Ecuación 4, podemos expresar el término  $(dn_N / dt)$  como:

$$\frac{dn_N}{dt} = v_s + k_r(C_U)^2V - (k_u C_N)V \quad (\text{B2})$$

Y los términos análogos para  $(dn_U/dt)$  y  $(dn_I/dt)$  serían:

$$\frac{dn_U}{dt} = (2k_u C_N)V - 2k_r(C_U)^2V - (k_i C_U)V \quad (\text{B3})$$

$$\frac{dn_I}{dt} = (k_i C_U)V \quad (\text{B4})$$

En la ecuación B2,  $v_s$  representa la velocidad de síntesis (y plegado) de la TIM. Si la ecuación (B2) es sustituida por  $(dn_N/dt)$  dentro de la ecuación (B1) se obtiene:

$$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{rC_N}{V} + \frac{v_s}{V} + k_r(C_U)^2 - k_u C_N \quad (\text{B5})$$

Para las especies U e I, el cambio de concentración con el tiempo se expresa como sigue:

$$\frac{dC_U}{dt} = -\frac{rC_U}{V} + 2k_u C_N - 2k_r(C_U)^2 - k_i C_U \quad (\text{B6})$$

$$\frac{dC_I}{dt} = -\frac{rC_I}{V} + k_i C_U \quad (\text{B7})$$

Usando  $r = V_0/t_d$ , y reorganizando, tenemos:

$$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{C_N}{(t+t_d)} + \left(\frac{v_s}{V_0}\right)\left(1 + \frac{t}{t_d}\right) + k_r(C_U)^2 - k_u C_N \quad (\text{B8})$$

$$\frac{dC_U}{dt} = \frac{(V_0/t_d)C_U}{V_0 + (V_0/t_d)t} + 2k_u C_N - 2k_r(C_U)^2 - k_i C_U \quad (\text{B9})$$

$$\frac{dC_I}{dt} = \frac{(V_0/t_d)C_I}{V_0 + (V_0/t_d)t} + k_i C_U \quad (\text{B10})$$

Por otra parte, ya que el número de moles de una enzima nativa en una célula típica de levadura se duplicará antes de que la división celular se produzca, entonces  $v_s = V_0 C_o / t_d$ , donde  $C_o$  es el promedio de la concentración intracelular de la enzima nativa. Por lo tanto,  $v_s / V_0 = C_o / t_d$ . Introduciendo esta última expresión en (B8) obtenemos la Ecuación (7) del texto (p. 53).

## Apéndice C

Del alineamiento de las 793 secuencias de la TIM se tomó una parte del total de ellas, con el objetivo de mostrar los aminoácidos que el servidor ClustalW XXL marcas como conservados. El símbolo (\*) indica que el aminoácido es conservado; los dos puntos (:) indican aminoácidos con propiedades fisicoquímicas iguales; y un solo punto (.) indica aminoácidos con propiedades fisicoquímicas parecidas

```
P00942|TPIS_YEAST          -----MARTFFVGGNFKLN-GSKQSIKEIVERLNTA 30
A0B570|A0B570_METTP      -----MRWSQSLGGMALTLIVLNFKTYR-EATGDSAVALSKICE
A2SSN5|TPIS_METLZ        -----MSSPLILVNFKSYR-EGAGNAAGQIASAAE
B1L6Y5|B1L6Y5_KORCO      -----MHIPRLILNFKAYM-ESSGDRIVEISKSAE
D1JBZ7|D1JBZ7_9ARCH      -----MGRKIDLPVIVLNEKTYL-ESAGDRGFELAKICE
D2RGB2|D2RGB2_ARCPA      -----MGVILINFKAYA-EGSGKKAMEIARAVL
D3DZJ4|D3DZJ4_METRM      -----MSLKTVPVILNFKTYL-ESSGQKALDLANALE
E0SPU7|E0SPU7_IGNAA      -----MKHLKVPVLAINFKAYP-TSFGVKALEIAKAAE
E1QRE3|E1QRE3_VULDI      -----MKLPILINMKVYP-EVLGKRALELAKVAE
E6N8A3|E6N8A3_9ARCH      -----MNIRYPLIVLNFKTFR-ESIGKKALELAKIAE
E8R769|E8R769_9CREN      -----MVKPILAVNFKAYYPHSGGNAYRIALDAV
O27120|TPIS_METTH        -----MLEDELKDTPIVILNFKTYL-ESTGERALELASICG
O28965|TPIS_ARCFU        -----MRKMGVVIINFKAYK-EGFGKRALELAKIAE
Q12UK2|TPIS_METBU        -----MKPLIVLNLKTYL-EGTGEGAVRIARACK
Q58923|TPIS_METJA        -----MLIVINYKTYN-ESIGNRGLEIAKIAE
Q8TUT9|TPIS_METKA        -----MLRVPPVIVNFKAYS-EAVGENALRLARVAA
*
```

```
P00942|TPIS_YEAST          SIPE-----NVEVVICPPATYLDYSVSLVKK-----PQ-VTVGAQNAYLKA-S 71
A0B570|A0B570_METTP      SIASEY-----GVDIAVAPQAADIR---AVASAVS-----IPVYAQHVDPV-GF
A2SSN5|TPIS_METLZ        LVMQES-----GVTIGIAPQFVELH---PFCKHYE-----IPVYAQHIDAV-EG
B1L6Y5|B1L6Y5_KORCO      RIWREM-----GVLIGVSPNIVDLR---LISSSVE-----IPVFAQHVDPV-PA
D1JBZ7|D1JBZ7_9ARCH      AVSAEQ-----GMSIVICPQQVELA---KIASVVK-----IPCFAQHVEAV-EP
D2RGB2|D2RGB2_ARCPA      EVSDKV-----DDYIAVAPNFLDLA---EIARIG-----VDVYAQHVDPV-EF
D3DZJ4|D3DZJ4_METRM      SAGEES-----GITMVAVPQAIDY---RIKEETS-----IPVLAQHIDAV-SP
E0SPU7|E0SPU7_IGNAA      KVAQEY-----GVEVIVIPPATELR---KIVESVS-----IPVYAQHADPV-EY
E1QRE3|E1QRE3_VULDI      AVSREL-----GVSIAVAPPITELR---LVAENVG-----IPVYAQQGADPV-EP
```

```

E6N8A3|E6N8A3_9ARCH      RAAEET-----GVSVAVCPSLVDLA---TVAANVS-----VHVFAQHCDPY-MP
E8R769|E8R769_9CREN      RVWRET-----GVEVILAPPFTELRRILEAVSGTE-----VKVYAQHADPV-EP
O27120|TPIS_METTH        DVADET-----GVNMAVAPQHMDLH---RVSDAVE-----IPVLAQHIDAV-DA
O28965|TPIS_ARCFU        NVASRC-----DEYVGIASFLDLP---VIAREVS-----IDVYAQHVDVAV-GF
Q12UK2|TPIS_METBU        EVGEAS-----GIEIAIAPQFCDIY---RVASQVD-----VPVYSQHLDGV-GA
Q58923|TPIS_METJA        KVSEES-----GITIGVAPQFVDLR---MIVENVN-----IPVYAQHIIDNI-NP
Q8TUT9|TPIS_METKA        EVSEET-----GVEVGICPPHVDLR--DVVREVGDE-----VTVLAQAVDAA-EP
    
```

```

P00942|TPIS_YEAST        GAFTGENSVQIKDVGAKWVILGHSERRSYFHE---DDKF-----IADKTKFALGQ 119
A0B570|A0B570_METTP      GSFTGHITAASVKAAGASGSLINHSERRRLAD-----IEASLRACRS
A2SSN5|TPIS_METLZ        -AFTGRIPAFTVRAAGCVGSLINHSERRLTIAE-----IEACVEAAKF
B1L6Y5|B1L6Y5_KORCO      GAYTGHVPPILVKEAGARGSLLNHSEKQIPLRH-----IAESINMMRD
D1JBZ7|D1JBZ7_9ARCH      GSHTGFVTLDSIKAAGATGTLVNHSEHRLKIAD-----VEFIIIGKAAS
D2RGB2|D2RGB2_ARCPA      GSYTGRITAEMIKKAGKAGSLINHSERRKLAD-----IDFLIQKFKK
D3DZJ4|D3DZJ4_METRM      GGHTGSLNLFESFVANGVDGTLNHNHSECRMTLAD-----IAEVVQKTKG
E0SPU7|E0SPU7_IGNAA      GAYTGWLPVVALKDIGVIGLIVNHSEHRLRLDE-----IVAIVEAAK
E1QRE3|E1QRE3_VULDI      GARTGHVPPPEFIKEAGASGVLNHNSENRLLLND-----LGLVNVNRAKN
E6N8A3|E6N8A3_9ARCH      GAYTGSVVVAEALKEGSAAGSLLNHSEKLLKLSL-----LSEAVNRLRA
E8R769|E8R769_9CREN      GAVTGFIPLEGLKDAGIHHVILNHNHSEHKLKRVSE-----VNYLVKKAKS
O27120|TPIS_METTH        GGHTGSLAECARDAGAAGTLINHSEKRMQLAD-----IEWVISRMKE
O28965|TPIS_ARCFU        GSHTGRINADMIAEYGAKGSLVNHSERRKLAD-----IEFNVSRLRE
Q12UK2|TPIS_METBU        GSFTGHAFKACIKDAGAGTLINHSECRKLAD-----IEASVTAAG
Q58923|TPIS_METJA        GSHTGHILAEAIKDCGCKGTLINHSEKRMLLAD-----IEAVINKCKN
Q8TUT9|TPIS_METKA        GGRTGHVTPPEMVEAGADGTLNHNHSERRMLLED-----LKDVCRCACIN
    
```

\* . \* \*

```

P00942|TPIS_YEAST        G-VGVILCIGETLEEKKAG---KTLDDVVERQLNAVLEEVEK---DWTN----- 159
A0B570|A0B570_METTP      EGLTSIICTNNVATTRAAA-----ALRP-----
A2SSN5|TPIS_METLZ        NHLESVVCNTNNVGVSAAAA-----AFSP-----
B1L6Y5|B1L6Y5_KORCO      LNLISIVCSPTPSESAAVA-----ALLP-----
D1JBZ7|D1JBZ7_9ARCH      LDLLTIVCTNNIAVSKAVA-----ELKP-----
D2RGB2|D2RGB2_ARCPA      VGLVSVCTNNVNTTKAVA-----VLDP-----
D3DZJ4|D3DZJ4_METRM      ADLISCVCTNNIETSMAAA-----TLAP-----
E0SPU7|E0SPU7_IGNAA      YGLETLVCACTPIAAAAIA-----AIKP-----
E1QRE3|E1QRE3_VULDI      LGLETLVCAPDPTYSAAAA-----ALEP-----
E6N8A3|E6N8A3_9ARCH      NGLVSVCAADHYAATAAAA-----ALGP-----
E8R769|E8R769_9CREN      LGLKTLVCACTPETGAAVA-----VLEP-----
O27120|TPIS_METTH        LEMMSVCTNNVMTAAAA-----ALGP-----
O28965|TPIS_ARCFU        LGLTSVVCNTNNVPTAAAA-----ALNP-----
Q12UK2|TPIS_METBU        EGLRTIICTNNIATAAAA-----ALGP-----
Q58923|TPIS_METJA        LGLETIVCTNNINTSKAVA-----ALSP-----
Q8TUT9|TPIS_METKA        EGLLTIVCASDALAARAAG-----ALSP-----
    
```

\*

```

P00942|TPIS_YEAST        ----VVVAYEPVWAIGTG--LAATPEDAQDIHA--SIRKFLASKLGDK----AASELRILY 208
A0B570|A0B570_METTP      ----DYVAVEPPELIGSG--IPVSKADPEVVVRSVEAVRAIEKDVG-----VLCG
A2SSN5|TPIS_METLZ        ----TYVAVEPPELIGSG--ISVAKADPDIIRNSVAAVKKISSDVK-----VLCG
B1L6Y5|B1L6Y5_KORCO      ----DAIAVEPPELIGSG--IPVSKAKPEVILNLSRSVKAINSAIP-----LLCG
D1JBZ7|D1JBZ7_9ARCH      ----YAVAVEPPELIGSG--RSVSKVDPGIVEETVKEVKQVYADCV-----VLCG
D2RGB2|D2RGB2_ARCPA      ----DYVAVEPPELIGTG--IPVSKAEPEVVENSVKAVKDLNPKVK-----VLCG
D3DZJ4|D3DZJ4_METRM      ----DFVAVEPPELIGTG--IPVSKADPEVVEGVSVKVKAINKDVQ-----VLCG
E0SPU7|E0SPU7_IGNAA      ----VALAVEPPELIGTG--IAVSKAKPEVITNTVQRVREVNKEVI-----ILTG
E1QRE3|E1QRE3_VULDI      ----TAVAVEPPELIGTG--KAVSREKPDVIVKTVELVKRVNPSIP-----VITG
E6N8A3|E6N8A3_9ARCH      ----DMLAVEPPELIGTG--ISVSRKPEVVTETVSRVKAIAPSVR-----VLCG
E8R769|E8R769_9CREN      ----DMVAVEPPELIGTG--VSVSRKPEVVTNSVNMIRRVNEKVT-----VLTG
O27120|TPIS_METTH        ----DFVAVEPPELIGSG--IPVSRAEPEVITGSVDAVKKVNPEVS-----VLCG
O28965|TPIS_ARCFU        ----DFVAVEPPELIGSG--IPVSKAEPEVVENSVKAAKEVNKSVR-----VLCG
Q12UK2|TPIS_METBU        ----DYVAVEPPELIGSG--IPVSKADPEVVTGSVAAVERIDPAVK-----VLCG
Q58923|TPIS_METJA        ----DYIAVEPPELIGTG--IPVSKANPEVVEGTVRAVKEINKDVK-----VLCG
Q8TUT9|TPIS_METKA        ----HAVAVEPPELIGTG--TPVSKADPEVVERSVEVVKEVSEETA-----VLCG
    
```

.. \*\* :.

```

P00942|TPIS_YEAST        GGSANGSNAVTFKDKA-DVDGFLVGGASLKPFEVDIINSRN----- 248
A0B570|A0B570_METTP      AGITHGDDLRAAIELG--AVGVLLASGIVKAKDQRKALEDLVTGV-----
A2SSN5|TPIS_METLZ        AGIQSGECVKTAVDLG--ADGVLLASSVVKAKDPEAVLRDLVSL-----
B1L6Y5|B1L6Y5_KORCO      AGISSGDDVKAALG--SYGVLVASAVTKSPDPQRKIRELAEP IASFTRA-----
D1JBZ7|D1JBZ7_9ARCH      AGVTSGEDVKAAIELG--ADGVLLASGIVKAKDPRAALDLVSGV-----
D2RGB2|D2RGB2_ARCPA      AGITTHEDYVRALDLG--AEGVLLASGIVKAKDPKRALEELVGLR-----
D3DZJ4|D3DZJ4_METRM      AGISTGEDMAAIDLG--AEGVLLASGIIKAENPKDALDLVSKI-----
E0SPU7|E0SPU7_IGNAA      AGISTAEDVEAARLGL--TAGVLVASAIMKAQNPEKVIKDMAAVAKAAYK-----
    
```

E1QRE3   E1QRE3_VULDI	AGIESYEDVKRAVELG--TQGVLVASAIVKARDWRQKIMELAKALH-----
E6N8A3   E6N8A3_9ARCH	AGVSTAEDVSKALELG--TDGVLLASAFVKASDPFALLKMCCEAALR-----
E8R769   E8R769_9CREN	AGISNGEDAYMAVKLG--TMGVLVASGIVKAKDPYQVMKDMAEGMLKAL-----
O27120   TPIS_METTH	AGISTGDDMKAAVDLG--AEGVLLASGIILADSPRDALLDLVSKV-----
O28965   TPIS_ARCFU	AGITTHEDYVKALELG--AEGVLLASGVVKAEDQKRALEELVGLL-----
Q12UK2   TPIS_METBU	AGISKGEDLKAALIELG--SVGVLASGIVKAKDPKAALEDLVSLI-----
Q58923   TPIS_METJA	AGISKGEDVKAALDLG--AEGVLLASGVVKAKNVEEAIRELIKFI-----
Q8TUT9   TPIS_METKA	AGITDGSVDVRAAVELG--ADGVLVASGVVLADDPKEALLDLISGLE-----

## Bibliografía

- Albe, K.R., Butler, M.H., Wright, B.E. (1990). Cellular concentrations of enzymes and their substrates. *J. Theor. Biol.* **143**: 163-195.
- Albery, J.W., Knowles, J.R. (1976). Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency? *Biochemistry.* **15**: 5631-5640.
- Alvárez, M., Wouters, J., Moes, D., Mainfroid, V., Rentier-Delrve, F., Wyns, L., Depiereux, E., Martial, J.A. (1998). Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J. Biol. Chem.* **274**: 19181-19187.
- Andrews, J.M., Roberts, C.J. (2007). A Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding. *J. Phys. Chem. B* **111**: 7897-7913.
- Aparicio, R., Ferreira, S.T., Polikarpov, I. (2003). Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: Evidence of conformational heterogeneity. *J. Mol. Biol.* **334**: 1023-1041.
- Baker, E.N., Drenth, J. (1987). The thiol proteases: structure and mechanism. In *Biological Macromolecules and Assemblies*, vol. 3: Active Sites of Enzymes (Jurnak, F. A. & Mc Pherson, A., eds.), pp. 314-368, John Wiley & Sons, New York.
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petkso, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution. *Nature.* **255**: 609-614.
- Benítez-Cardoza, C.G., 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.
- Bellgardt, K.H. (1994). Analysis of synchronous growth of baker's yeast. Part I: development of a theoretical model for sustained oscillations. *J. Biotechnol.* **35**: 19-33.
- Blacklow, S.C., Raines, R.T., Lim, W.A., Zamore, P.D., Knowles, J.R. (1988). Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by <sup>31</sup>P NMR. *Biochemistry.* **27**: 1158-1167.
- Burova, T.V., Choiset, Y., Tran, V., Haertlé, T. (1998). Role of free Cys 128 in stabilization of bovine β-lactoglobulin B. *Protein Eng.* **11**: 1065-1073.
- Chu, C.-H., Lai, Y.-J., Huang, H., Sun Y,-J (2008). Kinetic and structural properties of triosephosphate isomerase from *Helicobacter pylori*. *Proteins.* **71**: 396-406.

Connor, S.E., Capodagli, G.C., Deaton, M.K., Pegan, S.D. (2011). Structural and functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* triosephosphate isomerase. *Acta Crystallogr. Sect.D.* **67**: 1017-1022.

Creighton, T.E. (1993). *Proteins. Structures and Molecular Properties*, 2nd edit. W. H. Freeman, New York.

Darby, N.J., Creighton, T.E. (1993). *Protein Structure* (Oxford University Press), Oxford & New York.

Darwin, CH. (1859). *The origin of species*. Randon House, Inc. New York.

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

Dayhoff, M.O. (1978). *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, suppl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.

Delboni, L.F., Mande, S.C., Retier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, X., Vellieux, M.D., Martial, J.A., Hol, W.G.J. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of the hidrophobic intera. *Protein Sci.* **4**: 2594-2604.

Di Nardo, A.A., Larson, S.M., Davidson, AR. (2003). The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core. *J. Mol. Biol.* **333**: 641-655.

DuBay, K.F., Pawar, A.P., Chiti, F., Zurdo, J., Dobson, C.M., Vendruscolo, M. (2004). Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* **341**: 1317-1326.

Enríquez-Flores, S., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Alcántara, G., Oria-Hernández, J., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Hernández, G., de la Mora-de la Mora, I., Castillo-Villanueva, A., García-Torres, I., Méndez, S.T., Gómez-Manzo, S., Torres-Arroyo, A., López-Velázquez, G., Reyes-Vivas, H. (2011) Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins.* **79**: 2711-2724.

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



Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. **425**: 737-741.

Gloss, L.M., Spencer, D.E., Kirsch, J.F. (1996). Cysteine-191 in aspartate aminotransferases appears to be conserved due to the lack of a neutral mutation pathway to the functional equivalent, alanine-191. *Proteins*. **24**: 195-208.

Godoy-Ruiz, R., Ariza, F., Rodriguez-Larrea, D, Perez-Jimenez, R., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. (2006). Natural selection for kinetic stability is a likely origin of correlations between mutational effects on protein energetics and frequencies of amino acid occurrences in sequence alignments. *J. Mol. Biol.* **362**: 966–978.

González-Mondragón, E., Zubillaga, R.A., Saavedra, E., Chánez-Cárdenas, M.E., Pérez-Montfort, R., Hernández-Arana, A. (2004). Conserved cysteine 126 in triosephosphate is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*. **43**: 3255-3263.

González-Mondragón, E., Zubillaga, R.A., Hernández-Arana, A. (2007). Effect of a specific inhibitor on the unfolding and refolding kinetics of dimeric triosephosphate isomerase: establishing the dimeric and similarly structured nature of the main transition states on the forward and backward reactions. *Biophys. Chem.* **125**: 172-178.

Graur, D., Li, W. (1985). *Molecular Evolution*. (Sinaver Associates, Inc), pp. 123-131, Sunderland, Massachusetts.

Henikoff, S., Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10915-10919.

Hernández-Arana, A. (2008). Nonequilibrium temperature-induced unfolding and refolding transitions in proteins. In *Advances in Protein Physical Chemistry* (García-Hernández, E., Fernández-Velasco, D. A., eds), pp. 139–154, Transworld Research Network, Kerala, India.

Hiraga, K., Yutani, K. (1996). Study of cysteine residues in the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. 1. Role in conformational stability. *Protein Eng.* **9**: 425-431.

Jeffery, C.J., Gloss, L.M., Petsko, G.A., Ringe, D. (2000). The role of residues outside the active site: structural basis for function of C191 mutants of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Protein Eng.* **13**: 105-112.

Karlin, S., Zuker, M., Brocchieri, L. (1994). Measuring residue associations in protein structures. Possible implications for protein folding. *J. Mol. Biol.* **239**: 227-248.

Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**, 624-626.

- Knobeloch, D., Schmidt, A., Scheerer, P., Krauss, N., Wessner, H., Scholz, Ch., Küttner, G., von Rintelen, T., Wessel, A., Höhne, W. (2010). A coleopteran triosephosphate isomerase: X-ray structure and phylogenetic impact of insect sequences. *Insect Mol Biol.* **19**: 35-48.
- Kursula, I., Wierenga, R.K. (2003). Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **278**: 9544-9551.
- Knowles, J.R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature.* **350**: 121-124.
- Liu, J.L., Rigolet, P., Dou, S.X., Wang, P.Y., Xi, G.X. (2004). The zinc finger motif of *Escherichia coli* RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J. Biol. Chem.* **279**: 42794-42802.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C., Pestko, A.G. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry.* **29**: 6609-6618.
- Maes, D., Zeelen, J.P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M.H., Backmann, J., Martial, J.A., Wyns, L., Jaenicke, R., Wierenga, R.K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins.* **37**: 441-53.
- Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R. (1998). Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **283**: 193-203.
- Mande, S.C., Mainfroid, V., Kalk, K.H., Goraj, J., Martial, J.A., Hol, W.G.J. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase - related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci.* **3**: 810-821.
- McRee, D.E., Redford, S.M., Getzoff, E.D., Lepock, J.R., Hallewell, R.A., Tainer, J.A. (1990). Changes in crystallographic structure and tyhermostability of a Cu, Zn superoxide dismutase mutant resulting from removal of a buried cysteine. *J. Biol. Chem.* **265**: 14234-14241.
- Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., da Silva Vaz, I., Tuena de Gomez-Puyou, M., Perez-Montfort, R., Gomez-Puyou, A., Logullo, C. (2011). Structural and biochemical characterization triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of a recombinant. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **41**: 400-409.
- Morris, A.M., Watzky, M.A., Agar, J.N., Finke, R.G. (2008). Fitting neurological protein aggregation data via a 2-step, minimal/ "Ockham's razor" model: the Finke-Watzky

mechanism of nucleation followed by autocatalytic surface growth. *Biochemistry* **47**: 2413-2427.

Mukherjee, S., Roychowdhury, A., Dutta, D., Saha, B., Das, A.K., (2011) Crystal structure of Triosephosphate isomerase from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at 1.9 Angstrom resolution. No publicado

Nguyen, T.N., Abendroth, J., Leibly, D.J., Le, K.P., Guo, W., Kelley, A., Stewart, L., Myler, P.J., Van Voorhis, W.C. (2011). Structure of triosephosphate isomerase from *Cryptosporidium parvum*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **67**: 1095-1099.

Nirenberg, W., Matthaei, J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **47**: 1588-1602.

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

Norton, I.L., Hartman, F.C. (1972). Haloacetol phosphates. A comparative study of the active sites of yeast and muscle triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **11**: 4435-4441.

Orosz, F., Oláh, J., Ovádi, J. (2009). Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta.* **1792**: 1168-1174.

Overington, J., Donnelly, D., Johnson, M.S., Šali, A., Blundell, T.L. (1992). Environment-specific amino acid substitution tables: tertiary templates and prediction of protein folds. *Protein Sci.* **1**: 216-226.

Reyes-López, C.A., González-Mondragón, E., Benítez-Cardoza, C.G., Chánez-Cárdenas, M.E., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Hernández-Arana, A. (2008). The conserved salt bridge linking two C-terminal  $\beta/\alpha$  units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins* **72**: 972-979.

Richardson, J.S., Richardson, D.C. (1989). Principles and patterns of protein conformation. In Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation (Fasman, G. D., ed), pp. 1-98, Plenum Press, New York.

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. (2008). 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.* **283**: 23254-23263.

- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo, Y.L., Kornhauser, A., Fernández-Velazco, D.A. (2002). Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**: 669-675.
- Rozacky, E.E. Sawyer, T.H., Barton, R.A., Gracy, R.W. (1971). Studies of human triosephosphate isomerase: isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **146**: 312-320.
- Sánchez, I.E., Tejero, J., Gómez-Moreno, C., Medina, M., Serrano, L. (2006). Point mutations in protein globular domains: contributions from function, stability and misfolding. *J. Mol. Biol.* **363**: 422-432.
- Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S., Zeikus, G. (2002). *Pyrococcus furiosus*  $\alpha$ -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry.* **41**: 6193-6201.
- Shirley, B. A. (1995). Protein and folding: theory and practice, (Bret A. Shirley ed.) pp. 95. Human Press. Totowa, New Jersey.
- Silverman, J.A., Harbury, P.B. (2002). The equilibrium unfolding pathway of a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel. *J. Mol. Biol.* **324**: 1031-1040.
- Smith, B.D., Raines, J. (2006). Genetic selection for critical residues in ribonucleases. *J. Mol. Biol.* **362**: 459-478.
- Symersky, J., Li, S., Carson, M., Lou, M. (2003). Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins.* **15**: 484-486.
- Tatara, Y., Yoshida, T., Ichishima, E. (2005). A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2- $\alpha$ -mannosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 2101-2108.
- Trentham, D.R., McMurray, C.H., Pogson, C.I. (1969). The active Chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* **114**: 19-24.
- van den Berg, B., Ellis, R.J., Dobson, C.M. (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* **18**: 6927-6933.
- van Hoek, P., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4226-4233.
- Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R.A., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., Fernández-Velasco, A. (2000). Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomer intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.* **7**: 57-64.

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

Walden, H., Taylor, G., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjadem, B., Hensei, R. (2004). Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* **342**: 861-872.

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

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

Wierenga, R.K., Kapetaniou, E.G., Venkatesan, R. (2010). Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci.* **67**: 3961-3982.

Williams, J.C., McDermott, A.E. (1995). Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry*. **34**: 8309-8319.

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

Ybe, J.A., Ruppel, N., Mishra, S., VanHaaften, E. (2003). Contribution of cysteines to clathrin trimerization domain stability and mapping of light chain binding. *Traffic* **4**: 850-856.

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

Zuckerandl, E., Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving Genes and Proteins*, (V. Bryson and H. J. Vogel, eds) pp. 97-166, Academic Press, New York.

# Thermodynamic and Kinetic Destabilization of Triosephosphate Isomerase Resulting from the Mutation of Conserved and Non-conserved Cysteines

Ma. Eugenia Cruces-Ángeles<sup>1</sup>, Nallely Cabrera<sup>2</sup>, Ruy Pérez-Montfort<sup>2</sup>, César A. Reyes-López<sup>3</sup> and Andrés Hernández-Arana<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, D.F. 09340, México, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, D.F. 04510, México, <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación Bioquímica, Postgrado Institucional en Biomedicina Molecular, ENMyH, Instituto Politécnico Nacional. Gustavo A. Madero, D.F. 07320, México

**Abstract:** Several variants of *Saccharomyces cerevisiae* triosephosphate isomerase ( $\gamma$ TIM) were studied to determine how mutations of conserved and non-conserved Cys residues affect the enzyme. Wild-type  $\gamma$ TIM has two buried free cysteines: Cys 41 (non-conserved) and the invariant Cys 126. Single-site mutants, containing substitutions of these cysteines with Ala, Val, or Ser (the three most conservative changes for a buried Cys, according to substitution matrices), were examined for stability and enzymatic activity. Neither of the Cys residues was found to be essential for enzyme catalysis. Determination of the global stability of the mutants indicated that, regardless of which Cys was substituted, individual Cys→Ala and Cys→Val mutations, as well as the C41S substitution, all decrease the unfolding free energy of the dimeric protein by less than 23 kJ mol<sup>-1</sup> (at 37 °C, pH 7.4), as compared to the wild-type enzyme. In contrast, a substantially larger destabilization (37 kJ mol<sup>-1</sup>) was found in the C126S mutant. These results suggest that, with the exception of C126S, all of these mutations can be regarded as neutral (i.e., mutations that do not impair the reproductive success of the organism). Accordingly, Cys 126 has remained invariant across evolution because its neutral substitutions by Ala or Val would require a highly unlikely, concerted double mutation at any of the Cys codons. Furthermore, detrimental effects to a cell expressing the C126S TIM mutant more likely arise from the high unfolding rate of this enzyme.

**Keywords:** protein stability, protein evolution, cysteine mutation, invariant residues, unfolding–refolding kinetics, kinetic stability.

## INTRODUCTION

Cysteine is one of the least frequently occurring of the 20 amino acids usually found in proteins. This amino acid residue also displays one of the lowest variabilities across the divergence of homologous proteins [1]. Cys residues are highly conserved when they form intra- or inter-molecular disulfide bridges [2] and when they play an active role in the catalytic mechanism of an enzyme (through a free SH group) [3]. Interestingly, several free Cys residues, which appear to be non-essential for enzymatic activity, have been identified as conserved in a number of protein families, including 1,2- $\alpha$ -mannosidase [4], aspartate aminotransferase [5, 6], and triosephosphate isomerase [7]. In these cases, site-specific mutations at the conserved Cys residues (which are not solvent-accessible) often induce destabilization of the native enzyme. Similarly, substitution of conserved cysteines adversely affects the structure and self-assembly of clathrin trimerization domains [8].

Thus, it appears that some Cys residues are evolutionarily conserved because they confer significant conformational

stability on particular proteins. Destabilizing effects upon mutation of buried (but otherwise non-conserved) Cys residues have been observed in *Pyrococcus furiosus*  $\alpha$ -amylase [9], *Escherichia coli* RecQ helicase [10], the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase [11], and bovine superoxide dismutase [12]. The roles of the Cys residues in the former two enzymes are linked to their ability to act as Zn<sup>2+</sup> ligands. However, the latter two proteins do not appear to have any metal binding activity. It is important to note that free SH cysteines preferentially form parts of the interiors of folded protein molecules [13] where they are usually surrounded by typical hydrophobic residues such as Leu, Ile, Val and Phe [14]. Besides, the SH groups of buried cysteines can also form hydrogen bonds, such as those found in  $\beta$ -lactoglobulin B [15] and triosephosphate isomerase [16].

Triosephosphate isomerase (TIM), a homodimeric enzyme with monomers that display the ubiquitous ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel structure, contains a free Cys residue that is conserved across all known sequences from Archaea to mammals [7]. This cysteine (Cys126 of the sequence numbering of *Saccharomyces cerevisiae* TIM,  $\gamma$ TIM) is located near the end of  $\beta$ -strand 5 and its sulfur atom, which is within the van der Waals distance of one oxygen of the catalytic Glu, forms part of the  $\beta$ -barrel inner core and displays hydrogen bonds to main-chain oxygen atoms of the Ile124 and Leu93 residues [7, 16]. Although this conserved Cys residue was formerly

\*Address correspondence to this author at Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, D.F. 09340, México; Tel: +52 (55) 58044674; Fax: +52 (55) 58044666; E-mail: aha@xanum.uam.mx

regarded as a constituent of the enzyme's active site, recent studies have shown that substitutions of the residue with Ala or Ser do not significantly affect the catalytic parameters of yTIM [7]. However, both of the studied mutants (i.e., C126A and C126S) were found to unfold more quickly and refold more slowly than wild-type yTIM, indicating that these mutants are less stable than the wild type enzyme. In terms of the difference in unfolding free energy of the dimer ( $\Delta\Delta G = \Delta\Delta G^{2U-N}_{mutant} - \Delta\Delta G^{2U-N}_{wild-type}$ ), C126S was much more unstable ( $\Delta\Delta G = -36 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) than C126A ( $\Delta\Delta G = -20 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) at 27 °C, pH 8.5. Similar  $\Delta\Delta G$  values for these mutants were later measured under physiological conditions (i.e., pH 7.4 and 37°C; unpublished results from our laboratory). If the role of Cys126 is primarily related to molecular stability, we felt that it would be interesting to study the effects of replacing this residue with valine, a markedly hydrophobic amino acid with a side-chain volume only slightly larger than that of cysteine. Importantly, amino acid substitution tables indicate that the Cys→Val mutation is the second most probable substitution (preceded only by the Cys→Ala mutation) when the cysteine is buried [17]. Other substitution matrices rate either the Cys→Ser or the Cys→Ala mutations as the most probable [18, 19].

In this study, we examined the properties of yTIM C126V. The level of destabilization induced by this mutation ( $\Delta\Delta G = -18 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) was similar to that caused by the C126A mutation ( $\Delta\Delta G = -15 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Thus, from the point of view of molecular stability, the C126A and C126V variants seem to be equivalent phenotypes of the yTIM enzyme. For the sake of comparison, we also studied three single-point mutants of Cys41 (C41A, C41V, and C41S), which is a non-conserved residue present in TIM sequences from a few Saccharomycetales and many bacteria. Results showed that mutant C126S stands out as the more unstable mutant, the magnitude of its  $\Delta\Delta G$  being about 60% larger than that of any other of the Cys mutants, either at position 41 or 126. These findings suggest that Cys126 is conserved because the most conservative amino-acid change resulting from a *single one-base* mutation (i.e., Cys→Ser) leads to substantial destabilization of the TIM dimer, a phenomenon that is not observed for mutation of the non-conserved Cys41 residue.

## MATERIALS AND METHODS

### Protein Expression and Purification

Mutants of yTIM studied in this work were prepared by means of the polymerase chain reaction (PCR). Details of site-directed mutagenesis methods and mutagenic oligonucleotides used, as well as protocols for introducing mutations are given as supplementary material (methods description). PCR products were cloned into the pET3a vector after digestion with NdeI, and codon substitutions were confirmed by gene sequencing. Genes with the appropriate mutations were introduced by transformation into *E. coli* BL21(DE3) pLys cells (Novagen).

Overexpression and purification of wild-type and the variants of yTIM were carried out as described elsewhere [20, 21]. The purity of protein samples was checked by SDS-PAGE with Coomassie blue staining. All purified TIM samples showed a single protein band (data not shown). Protein

concentrations were determined by absorbance measurements at 280 nm, using  $A_{1 \text{ cm}, 1\%} = 10.0$  [22].

### Enzymatic Assay

TIM activity was assayed at 25 °C by means of a coupled reaction in which D-glyceraldehyde 3-phosphate (DGAP) was used as substrate. The product formed (dihydroxyacetone phosphate) was then reduced by  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (GDH) and an excess of NADH, oxidation of which was detected by light absorption at 380 nm [23]. Routinely, 1.0 mL of reaction solution was prepared in 100 mM triethanolamine buffer (pH 7.4) containing 10 mM EDTA, 0.20 mM NADH, 2.0 mM DGAP, and 0.02 mg of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase. The reaction was started by adding 4.0 ng of TIM to the reaction cell. For assays of the C126V and C41V/126V mutants, 40 ng of protein was added to the reaction cell. DGAP concentrations ranged from 0.5 to 4.0 mM for determination of catalytic constants. Kinetic parameters were calculated from the initial velocities at each substrate concentration.

### Spectroscopic Methods

Fluorescence spectra were obtained at 25°C in a PC1 spectrofluorometer from ISS (Champaign, IL). All experiments were performed in 50 mM triethanolamine, 5 mM EDTA buffer (pH 7.4). TIM samples ( $0.050 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were excited at 280 nm and emission was collected from 300 to 400 nm. Circular dichroism (CD) spectra were recorded using a J-715 spectropolarimeter (JASCO, Easton, MD) equipped with PTC-348WI Peltier-type holder for temperature control and magnetic stirring. TIM solutions were equilibrated using 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. Protein solutions of  $0.10 \text{ mg mL}^{-1}$  were used in a 0.100-cm cell. Ellipticities are reported as mean residue values.

### Thermal Scans

Thermal unfolding transitions were monitored by following ellipticity changes at a fixed wavelength of 220 nm while the sample temperature was increased at a rate of  $2.0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Typically,  $0.010 \text{ mg mL}^{-1}$  TIM solutions, prepared in 10 mM phosphate buffer, were used with 1.00-cm cells. The actual temperature inside the cell was measured with the external probe of the Peltier accessory. After unfolding was completed, the samples were cooled at the same rate to measure refolding profiles.

### Unfolding and Refolding Kinetics

Unfolding and refolding kinetics of the yTIM proteins were studied according to the protocol reported by Benítez-Cardoza *et al.* [20]. Unfolding was initiated by adding a small aliquot of concentrated protein solution to a 1.00-cm cell containing phosphate buffer equilibrated at the temperature desired for the experiment. The ellipticity at 220 nm was continuously registered. Kinetic data were analyzed using a single exponential decay equation,  $\theta_t = \theta_f + (\theta_0 - \theta_f) \exp(-k_u t)$ , where  $\theta_t$  is the ellipticity measured at time  $t$ ,  $\theta_f$  is the final ellipticity value,  $\theta_0$  represents the corresponding value at zero time, and  $k_u$  is the unfolding rate constant. In the refolding experiments, TIM samples were first subjected

to a high enough temperature to induce unfolding in 2–3 min. Next, the temperature control of the Peltier accessory was set to a value 5 °C below the desired refolding temperature. This approach allowed for fast cooling ( $\sim 15$  °C  $\text{min}^{-1}$ ) of the sample. When the temperature in the cell was 0.5 °C above the desired refolding value, the setting was raised to its final value. The temperature came to equilibrium ( $\pm 0.15$  °C) within the cell in  $\sim 40$  s and the CD signal was measured. Kinetic data were adjusted to a second-order reaction equation,  $\theta_t = \theta_f + (\theta_0 - \theta_f)/(2C_0k_r t + 1)$ , where  $C_0$  is the total molar concentration of TIM monomers,  $k_r$  is the refolding rate constant, and the other parameters are the same as described above. The value of  $C_0$  varied between 0.0075 and 0.040  $\text{mg mL}^{-1}$ .

## RESULTS

### Spectroscopic and Catalytic Properties of TIM Mutants

Far-UV CD and fluorescence spectra were measured at 25.0 °C for wild type and mutant yeast TIM. These spectra showed only minor differences among them, indicating that none of the studied mutations leads to major structural changes in the native dimer of the enzyme (Fig. 1S in Supplementary Material).

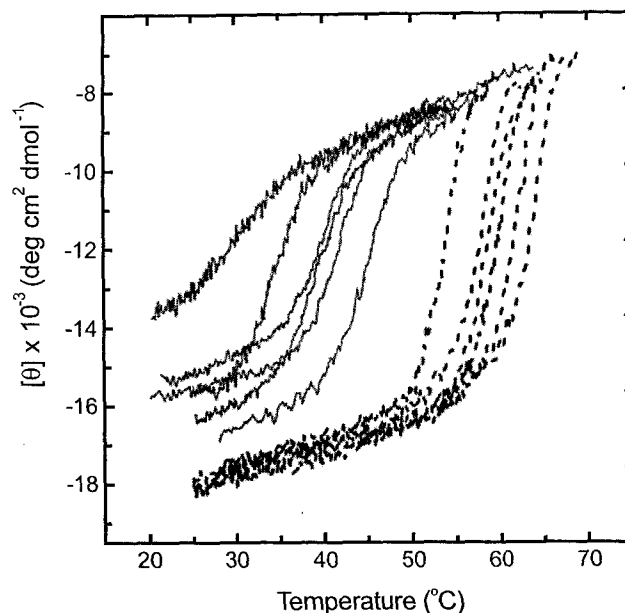
Excepting mutant C126V, all the other single mutants showed catalytic parameters similar to those of wild-type yTIM (Table 1); in particular, differences in the catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) values listed in Table 1 are smaller than the variation found among TIM enzymes from different organisms [7]. In contrast, variants C126V and C41V/C126V displayed considerable reductions in their  $k_{\text{cat}}$  (15-fold) and  $k_{\text{cat}}/K_M$  (four-fold).

### Temperature Scans

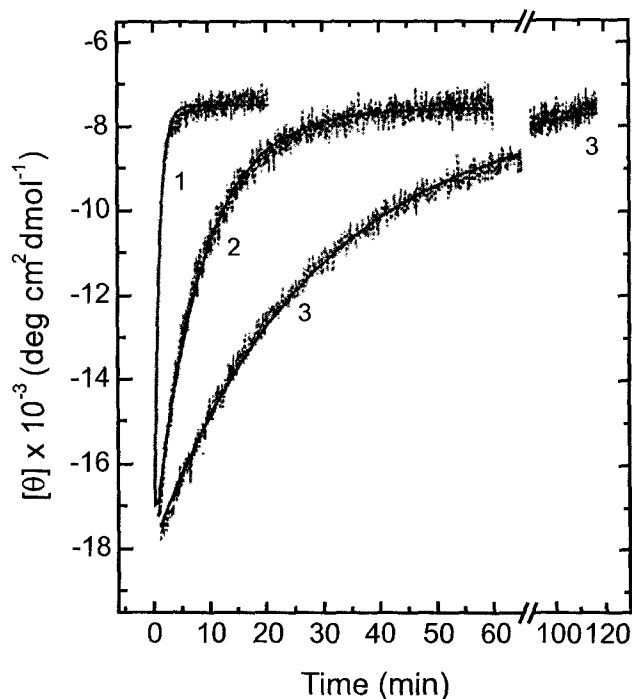
Figure 1 shows the temperature-induced unfolding (dotted lines) and refolding (solid lines) transitions measured for the TIM variants at a scan rate of 2.0 °C  $\text{min}^{-1}$ . As previously demonstrated [7, 20], the hysteresis that appears during the heating–cooling cycles is due to the slow unfolding and refolding of the dimeric protein within a particular temperature region. Thus, the unfolding segment of these cycles is controlled mainly by the rate and temperature dependence of unfolding, whereas the refolding segment reflects the variation of the refolding rate with temperature. Although unfolding of yTIM proteins is reversible to a large extent, their up- and down-temperature scans represent systems far from equilibrium. Therefore, it is necessary to determine individual rate constants for unfolding and refolding in order to quantify the relative stabilities of the mutants [7, 20].

### Unfolding Kinetics

Previous reports [7, 20, 24] have shown that the loss of secondary structure in both wild type and mutant yTIM obeys simple first-order kinetics. The same behavior was observed for all mutants studied in this work. For instance, Fig. 2 displays the time course of ellipticity change for the C126V mutant at three different temperatures. As previously discussed [7, 20], thermally unfolded monomers engage in further reactions leading to the formation of irreversibly



**Figure 1.** Temperature-induced unfolding and refolding profiles of wild-type and mutants of yTIM at pH 7.4. Individual unfolding curves (dashed lines) correspond, from left to right, to the following TIM samples: C41V/C126V, C126V, C41V, C41S, C41A, and wild-type TIM. Solid lines are the refolding curves of (from left to right): C41S, C41V/C126V, C126V, C41A, C41V, and wild-type TIM. Profiles were monitored by recording the ellipticity at 220 nm, with heating or cooling rates of 2.0 °C  $\text{min}^{-1}$ ; a 1.00-cm cuvette with continuous stirring was used. Protein concentration was ca. 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figure 2.** Unfolding kinetics of mutant C126V at different temperatures. Curves 1, 2, and 3 correspond to 58.1, 54.2, and 52.3 °C, respectively. The ellipticity (at 220 nm) of 10- $\mu\text{g mL}^{-1}$  samples was followed as function of time. Single exponential curves (smooth lines) were fitted to experimental data.



Table 1. Catalytic constants for wild-type and mutants of  $\gamma$ TIM<sup>a</sup>

	$k_{cat} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M \times 10^6$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
<sup>b</sup> wild -type	4.7 (0.5)	1.1 (0.4)	4.3
C41A	4.4 (0.3)	0.6 (0.1)	7.3
C41V	2.3 (0.2)	0.7 (0.1)	5.4
C41S	4.1 (0.3)	0.7 (0.1)	5.8
<sup>b</sup> C126A	3.1 (0.2)	0.8 (0.3)	3.9
C126V	0.29 (0.02)	0.3 (0.04)	1.0
<sup>b</sup> C126S	1.1 (0.2)	0.3 (0.1)	3.7
C41V/C126V	0.27 (0.2)	0.3 (0.04)	0.9

<sup>a</sup>Catalytic parameters were determined in 100 mM TEA, 10 mM EDTA buffer, pH 7.4 at 25 °C. Standard deviations are given in parentheses. <sup>b</sup>Previously published data [7].

denatured species (aggregates). Although it is undetectable by far-UV CD, appearance of irreversibly denatured protein can be monitored by incubating the sample for various times after ellipticity changes have ceased before inducing refolding of the protein at low temperature. As expected, refolding ability decreases with the time of incubation at high temperature. For example, unfolding of the C126V mutant at 58.1 °C is essentially complete in 5 min (cf. Fig. 2) and about 85% of the protein can be refolded (as monitored by CD or enzymatic activity) if the solution is rapidly cooled ( $\approx 15$  °C min<sup>-1</sup>) to 25 °C. However, the amount of refolded enzyme decreases to 65% after 30-min incubation at 58.1 °C.

The temperature dependence of the unfolding rate constant ( $k_u$ ) for each of the TIM variants is illustrated in Fig. 3A. All of these plots conform to Eyring's equation

$$\ln(k_u/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R - (\Delta H^\ddagger/R)(1/T) \quad (1)$$

for the case in which the activation enthalpy ( $\Delta H^\ddagger$ ) and entropy ( $\Delta S^\ddagger$ ) are independent of temperature;  $k_B$  and  $h$  stand for Boltzmann's and Planck's constants, respectively. A

linear fit of Eq. (1) to  $k_u$  data provided the values of  $\Delta H^\ddagger$  and  $\Delta S^\ddagger$  listed in Table 2. As shown in Fig. 3A, in terms of unfolding of the native state, wild-type TIM is the most stable protein and the double mutant displays the least stability.

### Refolding Kinetics

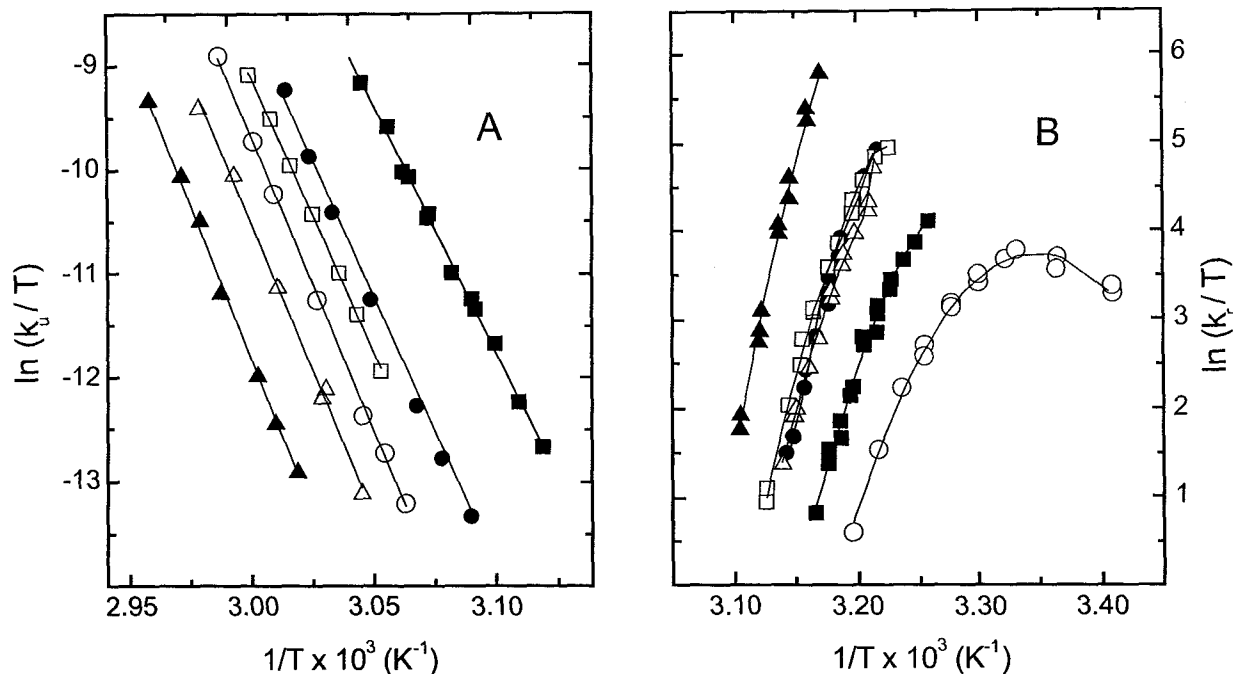
The recovery of secondary structure at a constant temperature was monitored using protein samples that had been previously unfolded at high temperature and were then allowed to re-equilibrate at a lower refolding temperature according to procedures described in the Materials and Methods. Fig. 4 shows the time course of  $[\theta]_{220}$  upon refolding of the C126V enzyme at 43.0 °C with samples at different concentrations. The data indicate that refolding times decrease as protein concentrations increase. Furthermore, the plot in the inset to Fig. 4 indicates that the dependence of the refolding half-life,  $t_{1/2}$ , on the total concentration of TIM monomers,  $C_0$ , is consistent with that expected for a second-order reaction [i.e.,  $t_{1/2} = 1/(2k_r C_0)$ ] when  $C_0$  is less than 0.75  $\mu$ M (20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

Table 2. Unfolding and refolding activation parameters for wild-type and mutants of  $\gamma$ TIM at positions 41 and 126.<sup>a</sup>

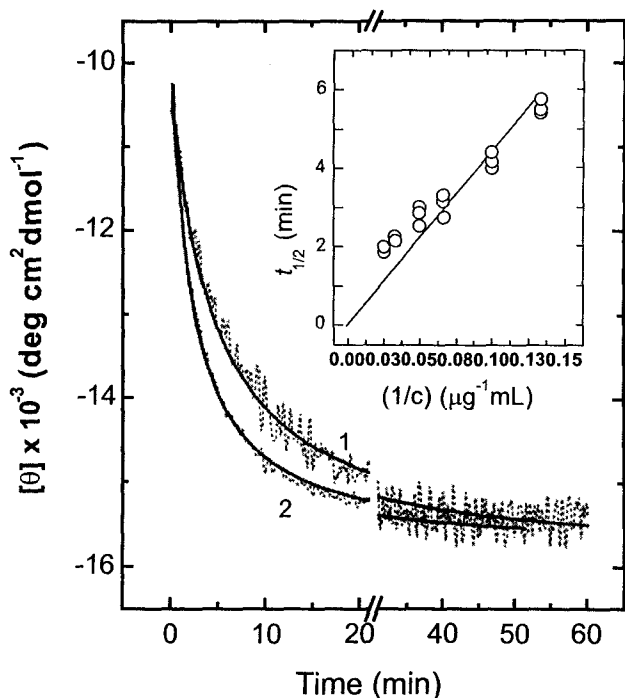
	Unfolding			Refolding			
	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$\Delta C_p^\ddagger$
wild-type	495 (11)	1.19 (0.04)	126 (1.5)	-230 (35)	-0.87 (0.11)	41 (2.0)	-32
C41A	464 (9)	1.11 (0.03)	121 (2.4)	-177 (21)	-0.73 (0.07)	49 (1.1)	-34
C41V	436 (6)	1.04 (0.02)	115 (2.6)	-159 (18)	-0.67 (0.06)	48 (1.3)	-36
C41S	462 (7)	1.11 (0.02)	117 (2.3)	-279 (17)	-1.08 (0.05)	55 (1.0)	-25
C126A <sup>b</sup>	439 (8)	1.03 (0.03)	120 (2.4)	-229 (14)	-0.90 (0.05)	50 (1.3)	-31
C126V	444 (8)	1.06 (0.03)	115 (2.3)	-236 (17)	-0.92 (0.06)	48 (1.2)	-35
C126S <sup>b</sup>	300 (10)	0.64 (0.03)	102 (2.0)	-251 (17)	-0.98 (0.05)	54 (0.9)	-25
C41V/126V	390 (5)	0.91 (0.03)	107 (2.0)	-257 (16)	-1.00 (0.05)	52 (0.8)	-34

<sup>a</sup>All values expressed on a per mole of dimer basis.  $\Delta H^\ddagger$  and  $\Delta S^\ddagger$  for unfolding are temperature independent ( $\Delta C_p^\ddagger = 0$ ). All other values refer to 37.0 °C.  $\Delta H^\ddagger$  and  $\Delta G^\ddagger$  are in kJ mol<sup>-1</sup>;  $\Delta S^\ddagger$  and  $\Delta C_p^\ddagger$  in kJ (mol $\cdot$ K)<sup>-1</sup>.  $\Delta G^\ddagger$  was calculated from Eyring's equation:  $\Delta G^\ddagger = -\ln(k_i h/k_B T)RT$ , where  $k_i$  is either  $k_u$  or  $k_r$ ,  $h$  is Planck's constant, and  $k_B$  Boltzmann's constant.

<sup>b</sup>Unpublished data from our laboratory. Standard deviation is shown in parenthesis.



**Figure 3.** Eyring plots for the unfolding ( $k_u$ ) and refolding ( $k_r$ ) of wild-type and mutants of yeast TIM. (A) Unfolding and (B) refolding rate constants were determined from far-UV CD kinetic experiments carried out in phosphate buffer, pH 7.4. Data shown correspond to the following TIM variants: wild-type (▲), C41A (Δ), C41S (○), C41V (□), C126V (●), and C41V/C126V (■). Lines shown are least-squares regressions to Eqs. (1) and (2) for  $k_u$  and  $k_r$ , respectively.



**Figure 4.** Effect of protein concentration on the refolding kinetics of the C126V mutant. Tracings correspond to 10 (curve 1) and 30 (curve 2)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , both at 43.0 °C. Refolding was monitored by the change in ellipticity at 220 nm in a 1.00-cm cell. Smooth lines are fittings of a second-order rate equation to experimental data. The inset shows the dependence of the half-life of C126V refolding,  $t_{1/2}$ , on the reciprocal of protein concentration,  $c$ ; the dotted line is the trend expected for a second-order reaction.

It is important to note that the initial values of the second-order kinetic tracings shown in Fig. 4 do not correspond with the  $[\theta]_{220}$  value expected for the completely unfolded protein at the same temperature. Specifically, there is a fast kinetic phase that is lost within the dead time of the experiments that accounts for a recovery of  $\approx 15\%$  of the ellipticity. Reyes-López *et al.* [24] recovered a similar percentage of enzymatic activity within experimental dead time, indicating that the fast phase is most likely due to parallel folding pathways. We observed similar behavior for all mutants studied in this work; in all cases, the major proportion of protein (80–90%) refolded through the slower second-order kinetic phase.

The variation of the refolding rate constants with respect to temperature for each of the TIM protein variants is shown in Fig. 3B. This figure clearly illustrates the downward curvature typical of refolding or coupled refolding–association events (see reference [20] and references cited therein). Data were analyzed using a form of Eyring's equation that considers a non-zero activation heat capacity,  $\Delta C_p^\ddagger$ :

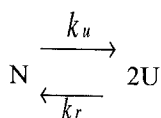
$$\ln(k_r/T) = A - B(1/T) - (\Delta C_p^\ddagger/R) \ln(1/T) \quad (2)$$

Coefficients  $A$  and  $B$  can be expressed as the following combinations of activation functions for refolding [7,20,24]:  $A = \ln(k_B/h) + (\Delta S^\ddagger - \Delta C_p^\ddagger - \Delta C_p^\ddagger \ln T_R)/R$ ;  $B = (\Delta H^\ddagger - \Delta C_p^\ddagger T_R)/R$ . By means of these relationships, the functions  $\Delta S^\ddagger$  and  $\Delta H^\ddagger$  can be evaluated at any particular temperature,  $T_R$ , once the coefficients  $A$ ,  $B$  and  $\Delta C_p^\ddagger$  are determined by fitting Eq. (2) to the experimental data. Table 2 lists values computed at 37.0 °C.

#### Estimation of TIM Global Stability

Even though equilibrium temperature-induced unfolding–refolding curves cannot be obtained for the yeast TIM

proteins, values of  $k_u$  and  $k_r$  can be used to calculate the thermodynamic stability of the dimeric molecule if one assumes that a two-state model with no stable intermediates is operating under the experimental conditions imposed:



In this model, the equilibrium constant for unfolding and the corresponding standard free energy change are given by  $K_{\text{unf}} = k_u/k_r$ , and  $\Delta G^{2\text{U-N}} = -RT \ln K_{\text{unf}}$ . Evidence in favor of the two-state model has come from: (1) the comparison of kinetic and calorimetric data for wild-type TIM [20], (2) the effect of a specific ligand on the kinetics of unfolding and refolding [25], and (3) the finding that temperature-induced hysteresis cycles can be reproduced by the temperature dependence of  $k_u$  and  $k_r$  [26]. We applied the same two-state model to compute  $\Delta G^{2\text{U-N}}$  (Table 2) because the TIM mutants behaved so similarly to the wild-type enzyme in our kinetic studies.

## DISCUSSION

### Role of Cys126 in Enzymatic Activity

As discussed by González-Mondragón *et al.* [7], the conserved residue Cys126 is not essential for the catalytic activity of TIM, because its substitution with Ala or Ser causes only a minor change in the value of  $k_{\text{cat}}/K_M$ ; this catalytic parameter seems to be determinant for TIM activity at substrate concentrations found *in vivo* [7, 27]. Indeed, in mutants C126A and C126S  $k_{\text{cat}}/K_M$  decreases only to 90% of its value in wild-type TIM (i.e., a 1.1-fold reduction). In comparison, mutation of residues recognized as essential for TIM activity (E165D, H95Q, K12R) leads to 140- to 4000-fold drops in  $k_{\text{cat}}/K_M$  [28–30]. On the other hand, we have observed that the C126V mutation results in a decrease of about four fold in the value of  $k_{\text{cat}}/K_M$  as a result of the 15-fold drop in  $k_{\text{cat}}$  (Table 1). It appears that introducing a larger and more hydrophobic side chain at position 126 considerably perturbs the environment of the nearby catalytic Glu165. This perturbation may result from steric effects or changes in

the polarity of the catalytic site [7, 31]. Thus, there seem to be some restrictions regarding the size and hydrophobicity of the side chain that occupies position 126 in order to maintain appropriate catalytic efficiency, but the presence of a sulfhydryl group is not required at this site.

Mutation of the other cysteine (Cys41) of yeast TIM to Ala, Ser, or Val was expected to have no significant effects on enzyme activity because it is not conserved and is located more than 10 Å away from any active-site residue. Results presented in Table 1 confirm this expectation.

### Effects of Cysteine Mutation on the Global Stability of TIM

An inspection of the  $\Delta\Delta G$  ( $\Delta\Delta G^{2\text{U-N}}_{\text{mutant}} - \Delta G^{2\text{U-N}}_{\text{wild-type}}$ ) values presented in Table 3 clearly demonstrates that the C126S mutation results in substantial destabilization of the TIM dimer. The level of this destabilization is only comparable to that induced by the double C126V/C41V mutation. Indeed, the decrease in unfolding free energy found for the C126S variant ( $\approx -37$  kJ per mole of TIM dimer) is at least 60% larger than the corresponding values for any of the single point mutants at positions 126 or 41. Interestingly, the  $\Delta\Delta G$  values presented in Table 3 indicate that for the buried free cysteines of yeast TIM, Cys→Ala and Cys→Val mutations are more *conservative* than the Cys→Ser replacement, in concordance with hydrophobicity considerations [13, 14] and known amino acid substitution frequencies [17, 19].

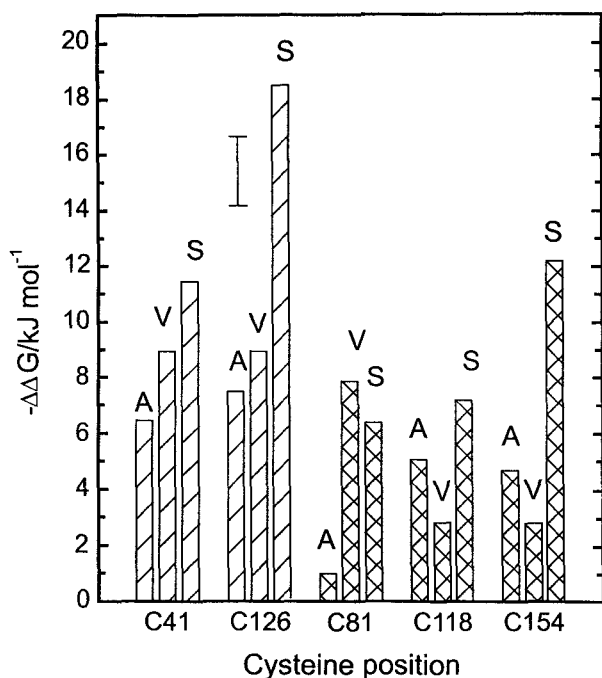
Data regarding the destabilization of the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase in response to Cys mutation [11] might be instructive when compared with our results. Tryptophan synthase is a monomeric protein with a  $\beta/\alpha$  barrel type structure and has three free buried cysteine residues (Cys81, 118, and 154, which are located in helix 2, helix 3, and strand 5, respectively). None of these Cys residues is conserved across members of the enzyme family. Hiraga and Yutani [11] studied the thermal unfolding of a number of point mutants at positions occupied by Cys residues of this protein using differential scanning calorimetry. Although their study reports  $\Delta\Delta G$  values at 50.0 °C, the authors provided sufficient information to compute values corresponding to 37.0 °C. The data for the  $\alpha$  subunit of tryp-

**Table 3.** Unfolding–Refolding Rate Constants and Free Energies for Wild-Type and Mutants of  $\gamma$ TIM Under Physiological Conditions.<sup>a</sup>

	$k_u$ (s <sup>-1</sup> )	$k_r$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{2\text{U-N}}$	$-\Delta\Delta G$	$f_{\text{N,eq}}$	$f_{\text{U,eq}}$
wild-type	$4.0 \times 10^{-9}$	$8.8 \times 10^5$	85 (3.2)	---	0.999	$7.8 \times 10^{-6}$
C41A	$2.7 \times 10^{-8}$	$3.1 \times 10^4$	72 (2.6)	13	0.999	$1.1 \times 10^{-4}$
C41V	$2.2 \times 10^{-7}$	$5.5 \times 10^4$	67 (2.9)	18	0.999	$2.4 \times 10^{-4}$
C41S	$5.9 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^3$	62 (2.5)	23	0.999	$6.3 \times 10^{-4}$
C126A	$4.4 \times 10^{-8}$	$3.0 \times 10^4$	70 (2.7)	15	0.999	$1.4 \times 10^{-4}$
C126V	$3.6 \times 10^{-7}$	$6.5 \times 10^4$	67 (2.6)	18	0.999	$2.7 \times 10^{-4}$
C126S	$4.5 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^3$	48 (2.2)	37	0.990	$1.0 \times 10^{-2}$

<sup>a</sup>Determined at 37.0 °C, in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4.  $\Delta\Delta G$  is defined as  $\Delta\Delta G^{2\text{U-N}}_{\text{mutant}} - \Delta G^{2\text{U-N}}_{\text{wild-type}}$ .  $\Delta\Delta G^{2\text{U-N}}$  and  $\Delta\Delta G$  values in kilojoules per mole of dimer.  $f_{\text{N,eq}}$  and  $f_{\text{U,eq}}$  refer to the fraction of native and unfolded protein, respectively, at equilibrium.

tophan synthase, together with data for yTIM (which in this case are expressed on a per-monomer basis to give the average effect of a single Cys mutation) are displayed in Fig. 5. In addition to showing that Cys→Ala and Cys→Val mutations are generally more conservative (less destabilizing) than Cys→Ser mutations, Fig. 5 suggests there is a  $\Delta\Delta G$  threshold, with a magnitude between 12 and 18 kJ mol<sup>-1</sup>, separating conserved from non-conserved Cys residues. This approximate value would then define the width of the so-called neutral corridor in the Neutral Theory of Molecular Evolution [32, 33]. Accordingly, it might be thought that Cys126 has remained an invariable residue in almost all TIM sequences because neutral substitutions of Ala or Val at residue 126 would require a highly unlikely two-base mutation [33] in the Cys codon (see reference 5 for a discussion on mutations in Cys codons). At this position, the Cys→Ser change, which can be achieved through a single one-base mutation, would be extremely destabilizing for the native enzyme. In contrast, Cys→Ser mutation at residue 41 would be neutral, thus leading to evolutionary variability in TIM sequences at this position.



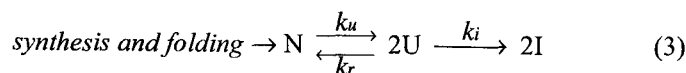
**Figure 5.** Effect of cysteine substitution on the stability of  $\beta/\alpha$  barrel proteins. Free Cys residues present in the sequences of wild-type yeast TIM (striped bars) and the  $\alpha$  subunit of *E. coli* tryptophan synthase (crosshatched bars) were replaced by Ala, Val, or Ser.  $\Delta\Delta G$  values for TIM are expressed per mole of monomer. The error bar is the average error in  $\Delta\Delta G$  values listed in Table 3. Data for the  $\alpha$  subunit of *E. coli* tryptophan synthase were computed from information reported by Hiraga and Yutani (11).

Regarding the level of maximum destabilization permitted for neutral mutations, it is convenient to recall that recent mutagenesis studies have shown there is good correlation between the  $\Delta\Delta G$  caused by a single amino acid substitution and the frequency of occurrence of the replacing residue in sequence alignments. For instance, Sanchez *et al.* [34], who classified a large number of point mutants as “allowed” or “forbidden”, found that the “forbidden” mutations are more

destabilizing (average  $\Delta\Delta G$  of  $-8 \pm 8$  kJ mol<sup>-1</sup>) than the “allowed” mutations (average  $\Delta\Delta G = -4 \pm 5$  kJ mol<sup>-1</sup>). Similar results have been found by Di Nardo *et al.* [35] in their study of the SH3 domain of tyrosine kinase. Specifically, they determined that sequences with amino acid residues occurring with a frequency of less than 1% (in an alignment of 266 SH3 domains) at a particular position display an average  $\Delta\Delta G$  of  $-11 \pm 6$  kJ mol<sup>-1</sup>, whereas sequences with residues present at more than 1% frequency display average  $\Delta\Delta G$  values of only  $-6 \pm 4$  kJ mol<sup>-1</sup> (average  $\Delta\Delta G$  values were computed from Table 2 in reference [35]). By analyzing stability effects observed in point mutants of *E. coli* thioredoxin, Godoy-Ruiz *et al.* [36] proposed that a  $\Delta\Delta G$  of  $-2$  to  $-10$  kJ mol<sup>-1</sup> is the maximum level of destabilization evolutionary permitted for mutations in this protein. Furthermore, Tokuriki and Tawfik [37] have recently performed a random mutational drift of several enzymes overexpressed in *Escherichia coli*. According to their results, mutations found in neutral drifting genes have predicted (computed by FoldX [35])  $\Delta\Delta G$  values not larger than  $-4$  to  $-5$  kcal mol<sup>-1</sup> ( $-17$  to  $-21$  kJ mol<sup>-1</sup>). Thus, according to reports published so far, the  $\Delta\Delta G$  value that limits a neutral corridor might be as low as  $-2$  kJ mol<sup>-1</sup> or as large as  $-20$  kJ mol<sup>-1</sup>. Our suggested value of  $-12$  kJ mol<sup>-1</sup> is comprised within such a wide range.

#### Kinetic Stability as the Main Determinant of Protein Fitness

Considering the large variation in reported values for the maximum destabilization allowed in neutral mutations, it is important to ask what effect a particular mutation would have on the level of native, active enzyme under *in vivo* conditions. An immediate consequence of decreasing the value of  $\Delta G^{2U-N}$  is a larger fraction of unfolded protein molecules,  $f_U$ , at equilibrium. However, the relative values of  $f_U$  for different TIM variants depend not only on  $\Delta\Delta G$ , but also on the absolute values of  $\Delta G^{2U-N}$ , and on the total protein concentration. By using the relationships  $K^{2U-N} = k_u/k_r = \exp(-\Delta G^{2U-N}/RT)$ , and  $K^{2U-N} = 2C_i[f_U^2/(1-f_U)]$ , we have computed the value of  $f_U$  for wild-type and mutants of yTIM under physiological conditions (i.e., 37.0 °C and pH 7.4). Total protein concentration expressed in terms of monomer,  $C_i$ , was taken as 37.6  $\mu$ M (1.0 mg/mL), a representative value of yTIM concentration *in vivo* [27, 39]. Our results (see Table 3) show that the different protein variants would all be more than 99% folded at equilibrium, even though the fraction of unfolded protein would be at least 20-fold larger for C126S yTIM than for any other yTIM variant. The relatively high  $f_U$  value for the C126S variant could be detrimental for a cell if aggregation of the unfolded (or misfolded) monomer in the crowded cytoplasm [40] results in depletion of the native enzyme. To test this idea, we set forth a simple kinetic model that accounts for irreversibility:



in which, as in some models used for protein aggregation [41, 42], the first irreversible step is represented as a first-order reaction (Eq. (3)). Furthermore, our model assumes that the enzyme enters the cytoplasm once it has been correctly folded. That is, the model shown in Eq. (3) assumes that yTIM unfolding (and the subsequent irreversible reac-

tions) in the cytoplasm, rather than folding in the endoplasmic reticulum, plays a crucial role in determining the differential fitness of the organism whose genome carries a particular mutation. The reason for this postulate is that the different yTIM variants are clearly distinguished from each other by their  $k_u$ , rather than by their  $k_f$  (see Table 3). Furthermore, to account for growth and duplication of the yeast cell, we assume that yTIM is continuously synthesized and the volume of the cell increases linearly with time,  $t$ . As shown in Supplementary Material, the rate equations for the concentration of native ( $C_N$ ) and unfolded ( $C_U$ ) protein can be expressed as:

$$dC_N/dt = (\hat{C}_N/t_d)/(1 + t/t_d) - C_N/(t + t_d) + k_f(C_U)^2 - k_u C_N \quad (4)$$

$$dC_U/dt = 2k_u C_N - 2k_f(C_U)^2 - k_i C_U \quad (5)$$

where  $\hat{C}_N$  is the average intracellular value of  $C_N$  (i.e., 18.8  $\mu\text{M}$ ; see above) and  $t_d$  is the cell doubling time. Under an oxidative growth regime, a common value for the specific growth rate of *S. cerevisiae* is 0.20  $\text{h}^{-1}$  [43, 44], giving a  $t_d$  value of  $\approx 208$  min. We can only approximate a reasonable value for  $k_i$ . We set  $k_i$  as  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , close to the mean value for a large number of aggregation rates compiled by DuBay *et al.* [45]. Eqs. (4) and (5) were solved numerically using the values of  $k_f$  and  $k_u$  for wild-type and the C41S and C126S mutants of yTIM. Results from these simulations (Fig. 2S in Supplementary Material) show that after three cell-doubling times the concentration of native enzyme would remain essentially at its initial level (i.e., less than 0.1% below the average concentration in the yeast cell), in the cases of wild-type yTIM and the C41S mutant. In contrast, the level of native enzyme would decrease to 80% of the average concentration in the offspring of a cell expressing the C126S variant. Such a reduction in the amount of native enzyme could likely impair the fitness and survival of these yeast cells under selective pressure.

## CONCLUSION

The invariant cysteine residue present in TIM enzymes (Cys 126 of yeast TIM sequence numbering) may be mutated to Ser with essentially no change in the catalytic efficiency of the enzyme. Mutation C126S, on the other hand, causes large destabilization (in terms of unfolding free energy) of the native dimer. Indeed,  $\Delta\Delta G$  for this mutant almost doubles those for other mutations of Cys 126 or of the other, non-conserved cysteine (Cys 41). Despite this large destabilization, mutant C126S would remain 99% folded under physiological conditions (37 °C, pH 7.4, and total TIM concentration found *in vivo*). However, fitness of mutant C126S may be adversely affected by its low kinetic stability (i.e., high unfolding rate) if the unfolded monomer engages in further irreversible reactions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported in part by grants from Fondo Sectorial SEP-CONACYT, México (project numbers 2007-80457 and 2005-49872). The authors are grateful to Adela Rodríguez-Romero for her help with protein purification.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material consists of five files: (1) methods description, in which details of DNA methods used to prepare yTIM mutants are given; (2) figure showing CD spectra of wild-type yTIM and its mutants (Fig. 1S); (3) figure showing simulations of the evolution in time of the native enzyme concentration [according to Eqs. (4) and (5)] for wild-type yTIM and mutants C41S and C126S (Fig. 2S); (4) figure showing the temperature dependence of unfolding and refolding rate constants for mutants C126A and C126S (Fig. 3S); and (5) mathematical appendix, in which Eqs. (4) and (5) in the main text are derived.

## ABBREVIATIONS

TIM	=	Triosephosphate isomerase
yTIM	=	Triosephosphate isomerase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DGAP	=	D-glyceraldehyde 3-phosphate
CD	=	Circular dichroism

## REFERENCES

- [1] Creighton, T.E. *Proteins. Structures and Molecular Properties*, second ed.; W. H. Freeman: New York, 1993.
- [2] Smith, B.D.; Raines, J. Genetic selection for critical residues in ribonucleases. *J. Mol. Biol.*, **2006**, *362*, 459–478.
- [3] Baker, E.N.; Drenth, J. In: *Biological Macromolecules and Assemblies*; Jurnak, F.A.; Mc Pherson, A., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1987; Vol. 3, pp. 314–368.
- [4] Tataru, Y.; Yoshida, T.; Ichishima, E. A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2- $\alpha$ -mannosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2005**, *69*, 2101–2108.
- [5] Gloss, L.M.; Spencer, D.E.; Kirsch, J.F. Cysteine-191 in aspartate aminotransferases appears to be conserved due to the lack of a neutral mutation pathway to the functional equivalent, alanine-191. *Proteins*, **1996**, *24*, 195–208.
- [6] Jeffery, C.J.; Gloss, L.M.; Petsko, G.A.; Ringe, D. The role of residues outside the active site: structural basis for function of C191 mutants of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Protein Eng.*, **2000**, *13*, 105–112.
- [7] González-Mondragón, E.; Zubillaga, R.A.; Saavedra, E.; Chánez-Cárdenas, M.E.; Pérez-Montfort, R.; Hernández-Arana, A. Conserved cysteine 126 in triosephosphate is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 3255–3263.
- [8] Ybe, J.A.; Ruppel, N.; Mishra, S.; VanHaasten, E. Contribution of cysteines to clathrin trimerization domain stability and mapping of light chain binding. *Traffic*, **2003**, *4*, 850–856.
- [9] Savchenko, A.; Vieille, C.; Kang, S.; Zeikus, G. *Pyrococcus furiosus*  $\alpha$ -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 6193–6201.
- [10] Liu, J.L.; Rigolet, P.; Dou, S.X.; Wang, P.Y.; Xi, G.X. The zinc finger motif of *Escherichia coli* RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 42794–42802.
- [11] Hiraga, K.; Yutani, K. Study of cysteine residues in the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. 1. Role in conformational stability. *Protein Eng.*, **1996**, *9*, 425–431.
- [12] McRee, D.E.; Redford, S.M.; Getzoff, E.D.; Lepock, J.R.; Hallewell, R.A.; Tainer, J.A. Changes in crystallographic structure and tyhermostability of a Cu, Zn superoxide dismutase mutant resulting from removal of a buried cysteine. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 14234–14241.
- [13] Richardson, J.S.; Richardson, D.C. In: *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*; Fasman, G.D., Ed.; Plenum Press: New York, 1989, pp. 1–98.

- [14] Karlin, S.; Zuker, M.; Brocchieri, L. Measuring residue associations in protein structures. Possible implications for protein folding. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *239*, 227–248.
- [15] Burova, T.V.; Choiset, Y.; Tran, V.; Haertlé, T. Role of free Cys 128 in stabilization of bovine  $\beta$ -lactoglobulin B. *Protein Eng.*, **1998**, *11*, 1065–1073.
- [16] Kursula, I.; Wierenga, R.K. Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 9544–9551.
- [17] Overington, J.; Donnelly, D.; Johnson, M.S.; Šali, A.; Blundell, T.L. Environment-specific amino acid substitution tables: tertiary templates and prediction of protein folds. *Protein Sci.*, **1992**, *1*, 216–226.
- [18] Dayhoff, M.O. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 5, Suppl. 3; National Biomedical Research Foundation: Washington, D.C., **1978**.
- [19] Henikoff, S.; Henikoff, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 10915–10919.
- [20] Benítez-Cardoza, C.G.; Rojo-Domínguez, A.; Hernández-Arana, A. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 9049–9058.
- [21] Vázquez-Contreras, E.; Zubillaga, R.A.; Mendoza-Hernández, G.; Costas, M.; Fernández-Velasco, A. Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomer intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept. Lett.*, **2000**, *7*, 57–64.
- [22] Norton, I.L.; Hartman, F.C. Haloacetyl phosphates. A comparative study of the active sites of yeast and muscle triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **1972**, *11*, 4435–4441.
- [23] Rozacky, E.E.; Sawyer, T.H.; Barton, R.A.; Gracy, R.W. Studies of human triosephosphate isomerase: isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1971**, *146*, 312–320.
- [24] Reyes-López, C.A.; González-Mondragón, E.; Benítez-Cardoza, C.G.; Cháñez-Cárdenas, M.E.; Cabrera, N.; Pérez-Montfort, R.; Hernández-Arana, A. The conserved salt bridge linking two C-terminal  $\beta/\alpha$  units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins*, **2008**, *72*, 972–979.
- [25] González-Mondragón, E.; Zubillaga, R.A.; Hernández-Arana, A. Effect of a specific inhibitor on the unfolding and refolding kinetics of dimeric triosephosphate isomerase: establishing the dimeric and similarly structured nature of the main transition states on the forward and backward reactions. *Biophys. Chem.*, **2007**, *125*, 172–178.
- [26] Hernández-Arana, A. In: *Advances in Protein Physical Chemistry*; García-Hernández, E.; Fernández-Velasco, D.A., Eds.; Transworld Research Network: Kerala, India, **2008**, pp. 139–154.
- [27] Albe, K.R.; Butler, M.H.; Wright, B.E. Cellular concentrations of enzymes and their substrates. *J. Theor. Biol.*, **1990**, *143*, 163–195.
- [28] Raines, R.T.; Sutton, E.L.; Straus, D.R.; Gilbert, W.; Knowles, J.R. Reaction energetics of a mutant triosephosphate isomerase in which the active-site glutamate has been changed to aspartate. *Biochemistry*, **1986**, *25*, 7142–7154.
- [29] Komives, E.A.; Chang, L.C.; Lolis, E.; Tilton, R.F.; Petsko, G.A.; Knowles, J.R. Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 3011–3019.
- [30] Lodi, P.J.; Chang, L.C.; Knowles, J.R.; Komives, E.A. Triosephosphate isomerase requires positively charged active site: the role of lysine-12. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 2809–2814.
- [31] Zhang, Z.; Komives, E.A.; Sugio, S.; Blacklow, S.C.; Narayana, N.; Xuong, N.H.; Stock, A.M.; Petsko, G.A.; Ringe, D. The role of water in the catalytic efficiency of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 4389–4397.
- [32] Kimura, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **1968**, *217*, 624–626.
- [33] Ohno, S. Ancient linkage groups and frozen accidents. *Nature*, **1973**, *244*, 259–262.
- [34] Sánchez, I.E.; Tejero, J.; Gómez-Moreno, C.; Medina, M.; Serrano, L. Point mutations in protein globular domains: contributions from function, stability and misfolding. *J. Mol. Biol.*, **2006**, *363*, 422–432.
- [35] Di Nardo, A.A.; Larson, S.M.; Davidson, A.R. The relationship between conservation, thermodynamic stability, and function in the SH3 domain hydrophobic core. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *333*, 641–655.
- [36] Godoy-Ruiz, R.; Ariza, F.; Rodríguez-Larrea, D.; Perez-Jimenez, R.; Ibarra-Molero, B.; Sanchez-Ruiz, J.M. Natural selection for kinetic stability is a likely origin of correlations between mutational effects on protein energetics and frequencies of amino acid occurrences in sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, **2006**, *362*, 966–978.
- [37] Tokuriki, N.; Tawfik, D.S. Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution. *Nature*, **2009**, *459*, 668–675.
- [38] Schymkowitz, J.; Borg, J.; Stricher, F.; Nys, R.; Rousseau, F.; Serrano, L. The FoldX web server: an online force field. *Nucl. Acids Res.*, **2005**, *33*, W382–W388.
- [39] Ghaemmaghami, S.; Huh, W.K.; Bower, K.; Howson, R.W.; Belle, A.; Dephoure, N.; O’Shea, E.K.; Weissman, J. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **2003**, *425*, 737–741.
- [40] van den Berg, B.; Ellis, R.J.; Dobson, C.M. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.*, **1999**, *18*, 6927–6933.
- [41] Morris, A.M.; Watzky, M.A.; Agar, J.N.; Finke, R.G. Fitting neurological protein aggregation data via a 2-step, minimal/“Ockham’s razor” model: the Finke-Watzky mechanism of nucleation followed by autocatalytic surface growth. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 2413–2427.
- [42] Andrews, J.M.; Roberts, C.J. A Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: I. Aggregation with pre-equilibrated unfolding. *J. Phys. Chem.*, **2007**, *B 111*, 7897–7913.
- [43] van Hoek, P.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker’s yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, *64*, 4226–4233.
- [44] Bellgardt, K.H. Analysis of synchronous growth of baker’s yeast. Part I: development of a theoretical model for sustained oscillations. *J. Biotechnol.*, **1994**, *35*, 19–33.
- [45] DuBay, K.F.; Pawar, A.P.; Chiti, F.; Zurdo, J.; Dobson, C.M.; Vendruscolo, M. Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J. Mol. Biol.*, **2004**, *341*, 1317–1326.