



UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA
POSGRADO EN CIENCIAS (QUÍMICA)

**ESTRUCTURA RESIDUAL EN EL DESPLEGAMIENTO DE UNA
PROTEÍNA DIMÉRICA TIPO β/α . INFLUENCIA EN LA
EFICIENCIA DE REPLEGAMIENTO.**

ALUMNA: ARIANA LABASTIDA PÓLITO.

ASESOR: DR. ANDRÉS HENÁNDEZ ARANA.

SINODALES: DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA (PRESIDENTE).
DRA. DOLORES SILVIA SOLÍS MENDIOLA (SECRETARIA).
DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENÍTEZ CARDOZA (VOCAL).
DR. ARTURO ROJO DOMÍNGUEZ (VOCAL).
DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELAZCO (VOCAL).

UAM Unidad Iztapalapa a 02 de agosto del 2018.

Agradecimientos.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Andrés Hernández Arana en el área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la división de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana en la Unidad Iztapalapa.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico por parte de CONACyT con el número de registro 208217 / CUV 216768; así como con el apoyo financiero otorgado al Dr. Andrés Hernández Arana con número de expediente 6297247. También agradezco el apoyo económico por parte del COMECyT el número de registro 11BCD0057-II.

A las doctoras Dolores Silvia Solís Mendiola, Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y a los doctores Daniel Alejandro Fernández Velazco, Arturo Rojo Domínguez y Rafael Arturo Zubillaga Luna por sus observaciones y comentarios al manuscrito de esta tesis los cuales contribuyeron a mejorar su contenido y presentación.

A mi asesor el doctor Andrés Hernández Arana por su apoyo incondicional en el desarrollo del trabajo experimental y del producto de la tesis.

Quiero agradecer a mis padres por ser mi ejemplo de trabajo y coraje ante la vida.

A mis Manueles por enseñarme lo importante que es el amor de nuestra familia.

A las familias Labastida y Pólito, en especial a mis abuelas por ser o haber sido los pilares de cada una de ellas y cada una a su peculiar forma me han transmitido su sabiduría.

A mis hermanos por apoyarme incondicionalmente en este camino llamado vida.

A mis amigos (esos hermanos que elegimos) por acompañarme en cada etapa de la vida y enseñarme a vivir esta única vida desde otra perspectiva.

Abreviaturas

α -GP	α -glicerofosfato
α -GPH	α -glicerofosfato deshidrogenasa
A_i	Amplitud observable
ΔC_p^\ddagger	Capacidad calorífica específica de activación
C_0	Concentración molar inicial de la proteína
DC	Dicroísmo Circular
DGAP	Gliceraldehído-3-fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DM	Dinámica molecular
DTT	Ditiotreitol
E	Factor preexponencial
EDTA	Ácido etilendiaminatetracético
EXC	Columna de exclusión molecular
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
f_I	Fracción del intermediario I
f_U	Fracción de la especie desplegada
f_X	Fracción del intermediario X
Glu	Ácido glutámico
His	Histidina
ΔH^\ddagger	Entalpía de activación
I, X	Especies intermediarias
IPTG	Isopropil- β -tiogalactopiranosido

k	Constante de velocidad para una reacción elemental
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante cinética de Michaelis-Menten
k_r	Constante cinética de replegamiento
Lys	Lisina
LB	Luria-Bertani
λ_i	Contante de velocidad para la i-ésima fase exponencial
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a detector de iones
MONO Q	Columna de intercambio aniónico Mono Q
N_2	Dímero plegado
NADH	Nicotinadenin dinucleótido reducido
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fluoruro de p-metilsulfonio
θ_i	Elipticidad de la i-ésima especie
R	Constante de los gases
[S]	Concentración molar de sustrato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
STD	Estándar
ΔS^\ddagger	Entropía de activación
T	Temperatura absoluta
t	Tiempo
TIM	Triosafosfato isomerasa

yTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Sccharomyces cerevisiae</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminoetano
2U	Monómeros desplegados
UV	Ultravioleta
V_{max}	Velocidad máxima
y	Propiedad observable monitorizada
y_0	Propiedad observable monitorizada a tiempo cero
y_f	Propiedad observable monitorizada a tiempo infinito

Índice.

Abreviaturas	I
Resumen.	1
Summary.	3
I. Introducción.	5
1.1 Estabilidad.	5
1.2 Estudios cinéticos.	7
1.3 Modelos cinéticos de desdoblamiento para proteínas homodiméricas.	9
II. Antecedentes.	10
2.1 Generalidades de la enzima triosafosfato isomerasa.	10
2.2 Estructura de la TIM.	11
2.3 Propiedades catalíticas de la TIM.	13
2.4 Estudios cinéticos desplegamiento y replegamiento de TIM.	13
III. Objetivos del trabajo.	16
IV. Materiales y métodos.	17
4.1 Expresión y purificación de la TIM de levadura.	17
4.2 Determinación de concentración de TIM de levadura.	18
4.3 Determinación de actividad catalítica.	19
4.4 Electroforesis en gel.	19
4.5 Espectrometría de masas.	20
4.6 Dicroísmo circular.	20
4.6.1 Obtención de espectros.	20
4.6.2 Transiciones térmicas.	21
4.6.3 Estudios cinéticos.	21
4.7 Estudios cinéticos por fluorescencia intrínseca.	23
4.8 Simulaciones de dinámica molecular.	23
V. Resultados.	25
5.1 Caracterización de la yTIM.	25
5.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.	25
5.1.2 Espectrometría de masas.	26
5.1.3 Actividad catalítica de la yTIM.	27
5.2 Transiciones térmicas.	28
5.3 Estudios cinéticos: Desplegamiento.	34
5.3.1 Dicroísmo circular.	34
5.3.2 Fluorescencia intrínseca.	40
5.4 Influencia de la temperatura en las constantes cinéticas de desplegamiento.	44
5.5 Efecto del pH en λ_2 y λ_3 .	46
5.6 Estudios de replegamiento de la yTIM.	47
5.7 Dinámica molecular.	50

VI. Análisis y discusión de los resultados.	51
6.1 Modelo cinético para el desplegamiento (desnaturalización) de yTIM.	51
6.2 Efecto del pH en las constantes cinéticas.	56
6.3 Efecto del pH en el replegamiento de yTIM.	58
6.4 Predicción de estructura residual en simulaciones de dinámica molecular.	61
VII. Conclusiones y perspectivas.	65
7.1 Conclusiones.	65
7.2 Perspectivas.	67
VIII. Referencias.	69
IX. Apéndice I.	79

Resumen

La enzima tiosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (γ TIM) es una proteína dimérica formada por dos monómeros idénticos de 248 residuos amino acilo cada uno. En estudios de barrido térmico, esta proteína muestra transiciones conformacionales de desplegamiento y replegamiento que no son coincidentes (histéresis), lo cual es indicio de que las reacciones del proceso entre los estados nativo y desplegado son muy lentas, al menos en cierta región de temperatura. Los barridos de desplegamiento térmico de γ TIM no sugieren la presencia de intermediarios estable durante el proceso; sin embargo, en estudios previos se ha mencionado la posible presencia de estructura residual en los monómeros desnaturalizados a temperaturas altas.

En el presente trabajo se encontró que cuando el pH disminuye desde 8.0 hasta 6.0 la γ TIM desnaturalizada térmicamente es propensa a agregarse, mostrando también una clara tendencia a formar estructura residual del tipo segmentos β . No obstante, los perfiles de desplegamiento térmico parecen corresponder a una transición simple (monofásica) independientemente del valor de pH. Estudios cinéticos realizados dentro de un intervalo relativamente amplio de temperatura (54 a 64 °C) revelaron que el mecanismo de desnaturalización consiste de hasta tres fases cinéticas observables con diferentes constantes de tiempo y acompañadas por cambios en la estructura secundaria. Además, la variación con la temperatura de las amplitudes de las fases y de las constantes de tiempo indican que el mecanismo es más complejo que un mecanismo secuencial sencillo; esto es, los resultados sugieren que el mecanismo cinético involucra intermediarios fuera de la vía secuencial y, tal vez, vías cinéticas paralelas. La complejidad del mecanismo, sin embargo, no está

relacionada con la aparición de estructura residual en la proteína desnaturalizada. Por otra parte, la estabilidad cinética de la γ TIM, reflejada en la constante de velocidad de la fase principal de desplegamiento, mostró una disminución significativa en el intervalo de pH de 7.5 a 9.5, intervalo en el cual la conformación de la proteína desplegada es semejante a la que adquieren proteínas pequeñas desplegadas térmicamente. Esto significa que la formación de estructura residual tipo β no está relacionada con cambios importantes en la estabilidad cinética. En contraste, la presencia de estructura residual en la γ TIM desnaturalizada sí parece acelerar el replegamiento a temperaturas bajas (42 °C), pero también está asociada con un aumento de la irreversibilidad cuando, después de ser desnaturalizada, la proteína se lleva a 25 °C.

Summary

Saccharomyces cerevisiae triosephosphate isomerase (yTIM) is a dimeric protein comprised by two identical monomers of 248 residues each. This enzyme shows noncoincident unfolding and refolding transitions (hysteresis) in temperature scans, a phenomenon indicative of the slow forward and backward reactions of the native–unfolded process. Thermal unfolding scans suggest that no stable intermediates appear in the unfolding of yTIM. However, reported evidence points to the presence of residual structure in the denatured monomer at high temperature.

In this work, it was found that thermally-denatured yTIM displays a clear trend to form aggregation-prone, β -strand-like residual structure when pH decreased from 8.0 to 6.0, even though thermal unfolding profiles retained a simple monophasic appearance regardless of pH. However, kinetic studies performed over a relatively wide temperature range (54–64 °C) revealed a complex unfolding mechanism comprising up to three observable phases, with largely different time constants, each accompanied by changes in secondary structure. Furthermore, a simple sequential mechanism is unlikely to explain the observed variation of amplitudes and rate constants with temperature. Rather than a simple sequential pathway, a complex mechanism involving off-pathway intermediates or even parallel pathways may be operating. This kinetic complexity is, however, not linked to the appearance of residual structure. On the other hand, the kinetic stability of yTIM (as reflected in the value of the rate constant for the main unfolding phase) showed a significant decrease in the pH range from 7.5 to 9.5, a range in which the conformation of the unfolded protein is typical of thermally-unfolded small proteins. That is, the appearance of β -strand residual structure is not related

to significant changes in kinetic stability. In contrast, the presence of residual structure in denatured γ TIM does apparently accelerate refolding at lower temperatures (42 °C), though it is clearly associated with increased irreversibility when the protein is brought back to 25 °C.

I. Introducción.

1.1 Estabilidad.

El plegamiento es el proceso por el cual una proteína adquiere una estructura tridimensional específica llamada forma nativa (o estado nativo) la cual es la única con actividad biológica importante. Los mecanismos por los cuales las proteínas se pliegan son de peculiar interés y constituyen un problema aún sin resolver por completo. Experimentalmente se ha visto que la secuencia de aminoácidos contiene una cantidad sustancial de información necesaria para dirigir el plegamiento de la cadena polipeptídica; *in vivo* este proceso puede requerir de chaperonas, enzimas o ligandos que ayudan o contribuyen en el proceso de plegamiento [Thorton JM, 1992; Creighton TE, 1994].

La estabilidad y el mecanismo de plegamiento y desplegamiento de las proteínas son frecuentemente analizados modificando ciertas condiciones ambientales como son:

- Altas concentraciones de un agente químico desnaturalizante
- Temperatura
- Presión hidrostática
- Cambios de pH
- Fuerza iónica
- Combinaciones de algunas de las anteriores.

En el proceso de plegamiento y desplegamiento se monitorizan los cambios en la conformación de la proteína. Para ello se utilizan técnicas calorimétricas y espectroscópicas.

Un propósito de estudiar el plegamiento y desplegamiento de las proteínas es entender los mecanismos por los cuales se forma la estructura nativa al plegarse. Estudiando las características termodinámicas y cinéticas de las reacciones de plegamiento y desplegamiento es posible determinar si existen intermediarios parcialmente plegados y sus características estructurales [Benítez-Cardoza CG, 1997; Creighton TE, 1994; Knowles JR, 1991].

Para experimentos en equilibrio es posible medir las fracciones de especies nativa y desnaturalizada (así como de intermediarios, si los hay). A partir de estas determinaciones se calcula la constante de equilibrio y la energía libre del proceso.

1.2 Estudios cinéticos.

Se sabe que las proteínas se pliegan y despliegan siguiendo modelos cinéticos complejos (Sánchez IE y Kiefhaber T, 2003). En muchos estudios cinéticos realizados en proteínas de pequeño peso molecular usualmente se observa que estas moléculas se pliegan y despliegan reversiblemente con tiempos de relajación que alcanzan tiempos de milisegundos hasta pocos segundos [Ferguson N y Fersht A, 2003; Kamagata K et al., 2004; Tsong TY, 1973]. También se han demostrado la presencia de poblaciones de intermediarios transitorios, diferentes de las especies nativas y desdobladas (que son los estados inicial y final en un proceso de desplegamiento y replegamiento) [Sánchez IE y Kiefhaber T, 2003; Kamagata K y AraiM, Kuwajima K, 2004]. Los estados intermediarios se han encontrado ya sea dentro o fuera de la ruta de reacción, y sus interconexiones incluso pueden resultar en la aparición de vías paralelas de desplegamiento/replegamiento [Balwin RL, 1996; Aghera N y Udgaonkar JB, 1996]. Además, la combinación de estudios experimentales y simulaciones de dinámica molecular han proveído una descripción detallada de la estructura de los múltiples intermediarios y estados de transición involucrados [Travaglini-Allocatelli C et al., 2009].

Recientemente se ha hecho mucho énfasis en la caracterización estructural de los estados desplegados, debido a la presencia de estructuras parecidas a la nativa, en partes de la cadena polipeptídica desplegada. Se piensa que estas formas de *estructura residual* pueden afectar la velocidad de desplegamiento, así como estar implicadas en la formación de moléculas mal plegadas (misfolded) [Wong KB et al., 2000; Pearce MC et al., 2004]. Por otra parte, hay ejemplos de proteínas que muestran cinéticas de desplegamiento y replegamiento muy lentas en la región de transición (es decir, en condiciones donde tanto el estado nativo como el

desplegado están poblados significativamente en el equilibrio). Específicamente, cuando el desdoblamiento es promovido por la adición de GuHCl o urea, las proteínas con un desdoblamiento lento toman desde días hasta semanas para equilibrarse, mientras que para proteínas con un desdoblamiento rápido bajo las mismas condiciones, el equilibrio es restablecido en unas pocas horas [Sawano M et al., 2008; Vázquez-Pérez AR y Fernández-Velasco DA, 2007; Shirley BA, 1995]. Por lo tanto, si los tiempos de incubación en el agente desnaturizante no son lo suficientemente largos, una proteína con un desplegamiento lento mostrará un comportamiento no coincidente en las trayectorias (perfiles) de desnaturización y renaturalización (histéresis) cuando se varía la concentración del agente desnaturizante. Igualmente, la presencia de histéresis ha sido claramente demostrada en las transiciones inducidas térmicamente de al menos cuatro proteínas: una inmunoglobulina de cadena ligera (monómero) [Blancas-Mejía LM et al., 2014], el Lpp-56 tres cadenas (trimero) α helicoidal enrolladas [Dragan AI, et al, 2004] y dos trifosfato isomerasas diméricas (TIM) [Benítez-Cardoza CG et al., 2001; Samanta M et al., 2011]. En estos casos, las transiciones térmicas detectadas por dicroísmo circular (DC) parecen ser consistentes con un modelo de dos estados sin intermediarios.

1.3 Modelos cinéticos de desdoblamiento para proteínas homodiméricas.

Para el plegamiento de proteínas homodiméricas, el modelo más sencillo considera en el estado inicial dos monómeros desplegados ($2U$) y como producto final un dímero plegado (N_2). Sin embargo, el camino en el que se ensambla la proteína en el proceso de plegamiento puede ocurrir vía diferentes mecanismos. Estos pueden ser mecanismos simples de dos estados o muy complejos, donde se involucren varios intermediarios monoméricos o intermediarios diméricos. Las especies parcialmente plegadas pueden ser estables, o pueden ser intermediarios transitorios que sólo son detectables por análisis cinéticos. [Zamorano-Carrillo A et al., 2010].

II. Antecedentes.

2.1 Generalidades de la enzima triosafosfato isomerasa.

La triosafosfato isomerasa (TIM) es la quinta enzima que participa en la vía metabólica de la glucólisis, catalizando con alta eficiencia la reacción de isomerización reversible de gliceraldehído-3-fosfato (DGAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a través de un intermediario enediol [Knowles JR, 1991]. La relación k_{cat}/K_M con el DGAP como sustrato es del orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Únicamente el DGAP puede continuar con la ruta de la transformación de la glucosa hasta piruvato, siendo así que la TIM desempeña un papel importante y esencial para la producción eficiente de la energía en los organismos (Figura 2.1). Varios grupos de investigadores han considerado a la TIM como un blanco fundamental para el diseño de fármacos que puedan actuar a nivel molecular contra la enzima de parásitos que habitan la sangre de los mamíferos, donde consumen la glucosa presente causando varias enfermedades [Longo DL, 2012].

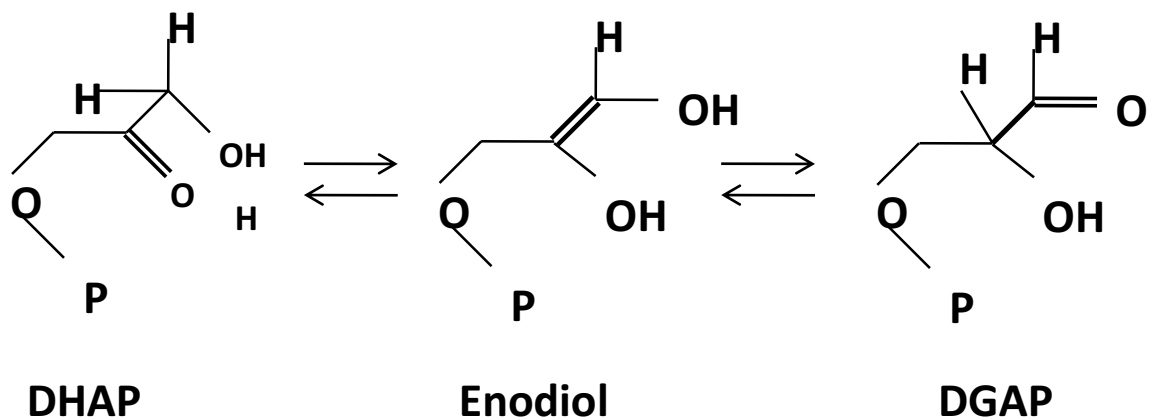


Figura 2.1 Mecanismo de reacción de la TIM. La TIM cataliza la interconversión de DHAP a DGAP.

La TIM es un homodímero de 53.3 kDa con 250 residuos aproximadamente en cada una de sus unidades y no requiere de iones metálicos o cofactores para realizar su función biológica. Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Las dos subunidades tienen un sitio activo completo que se localiza cerca de la interfase, donde únicamente el dímero presentan actividad biológica [Lolis E et al., 1990].

2.2 Estructura de la TIM.

La TIM se compone de dos monómeros iguales, plegados en forma de barril $(\beta/\alpha)_8$, donde las 8 hebras β paralelas forman la parte interna del barril el cual está rodeado por 8 hélices α conectadas entre sí por asas [Lolis E y Petsko GA, 1990; Davenport RC et al., 1991] (Figura 2.2). Los aminoácidos estrictamente conservados lisina 12 (Lys12), histidina 95 (His95) y ácido glutámico 165 (Glu165) son fundamentales para la actividad catalítica de la TIM, y constituyen la base del sitio catalítico. El ácido glutámico 165 actúa como nucleófilo catalítico que atrae el protón del sustrato iniciando la isomerización. Los lazos 3 y 6 son importantes en la estructura del sitio activo; el lazo 6 está constituido por los residuos 166 al 176 y forma una tapa que se cierra y abre sobre el sitio activo con el objeto de mantener un entorno hidrofóbico para el sustrato. Otra característica estructural importante es el lazo 3, formado por los residuos 71 al 78, que contribuye a la mayoría de las interacciones no covalentes que mantienen unidos a los monómeros [Lolis E y Petsko GA, 1990].

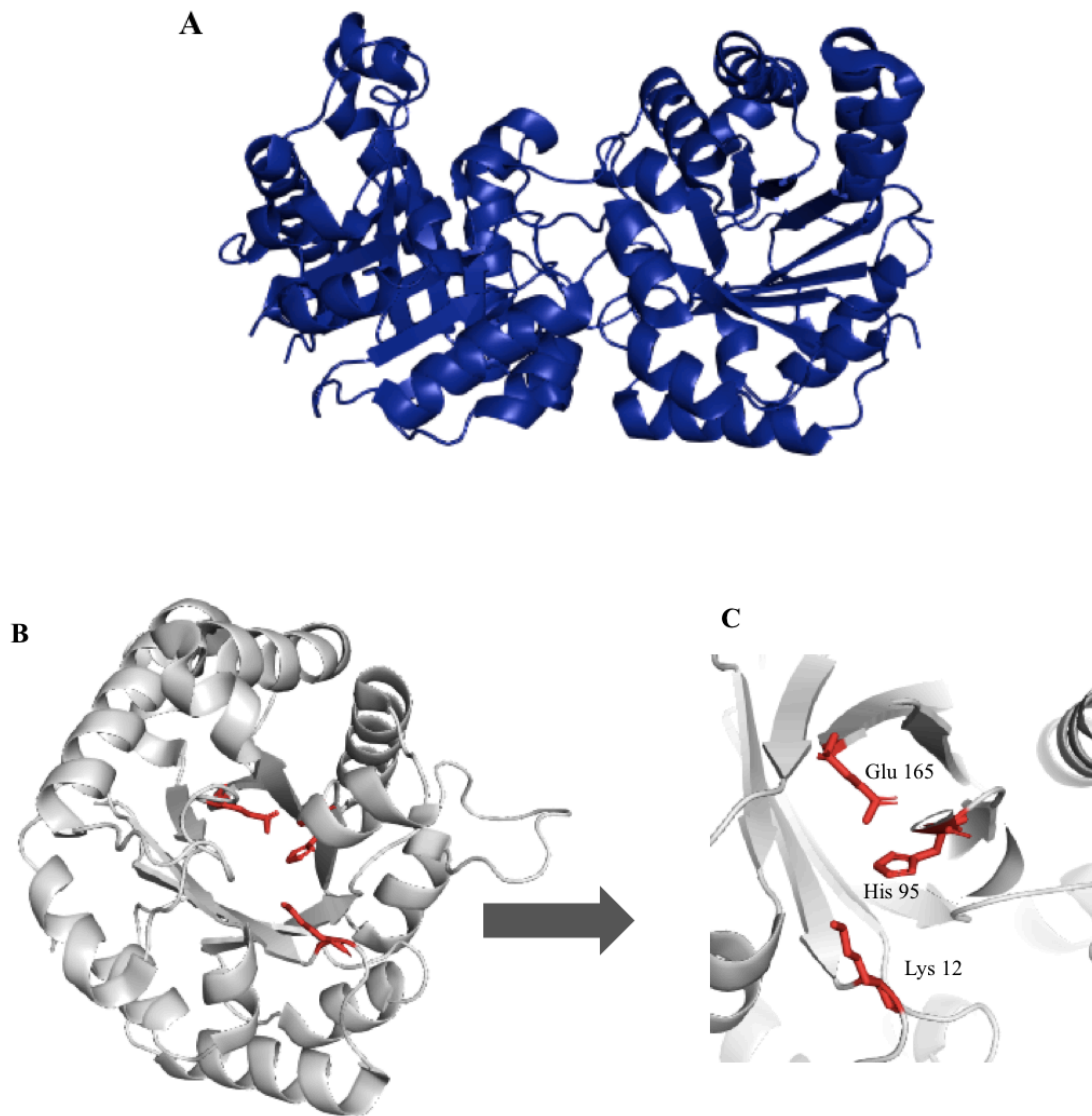


Figura 2.2 Estructura tridimensional de la TIM. A) Dímero. B) Monómero de una de las subunidades. C) Residuos que participan en la catálisis en un monómero: lisina 12 (Lis12), histidina (His 95) y ácido glutámico (Glu165).

2.3 Propiedades catalíticas de la TIM.

Se ha estudiado extensivamente el mecanismo catalítico de la TIM [Albery JR y Knowles WJ, 1977]. La TIM convierte el DGAP a DHAP en una reacción que está controlada por difusión, lo que significa que la eficiencia catalítica k_{cat}/K_M en la dirección de la reacción se encuentra cerca de su máximo en el valor de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Albery JR y Knowles WJ, 1976; Blacklow SC et al., 1988; Knowles JR, 1991]; la k_{cat} es aproximadamente de $5,000 \text{ s}^{-1}$ y la K_M presenta un valor promedio de 0.5 mM . Sin embargo, experimentalmente la eficiencia catalítica que presenta la enzima TIM es de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 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 DR et al., 1969].

2.4 Estudios cinéticos del desplegamiento y replegamiento de TIM.

En cuanto a la TIM, muchos miembros mesófilos que pertenecen a esta familia de enzimas han mostrado desplegarse lentamente en estudios de desnaturalización química, con la presencia de uno o más intermediarios cinéticos o en equilibrio (Vázquez-Pérez AR et al., 2007; Pan H et al., 2004; Guzman-Luna V y Garza-Ramos G, 2012). En contraste, transiciones térmicas de desnaturalización de las TIM (sin un agente desnaturalizante presente) usualmente se manifiestan como transiciones monofásicas (una curva sigmoideal sin evidencia de intermediarios) [Benítez-Cardoza CG et al., 2001; Mixcoha-Hernández E et al., 2007; Cabrera N et al., 2008; Dhaunta N et al., 2013]. Desafortunadamente, la irreversibilidad

aparece como una característica común en el desplegamiento térmico de muchas proteínas, incluidas varias TIM, lo que impide el estudio de la renaturalización de la TIM en barridos de enfriamiento. Sin embargo, se ha demostrado que el desplegamiento térmico de la yTIM (TIM de levadura) es altamente reversible a bajas concentraciones de proteína ($\approx 0.20 \mu\text{M}$). Sin embargo, las transiciones de desplegamiento y replegamiento (registradas con una velocidad de $2^\circ\text{C}/\text{min}$) siguen caminos diferentes; esto es, se presenta un fenómeno de histéresis. En intentos por alcanzar condiciones muy cercanas al equilibrio en las transiciones térmicas, [Benítez-Cardoza CG et al., 2001] disminuyeron la velocidad de barrido buscando que las curvas de desplegamiento y replegamiento se acercaran entre sí; sin embargo, al disminuir la velocidad de barrido el desplegamiento se vuelve intensamente irreversible, lo que impide observar ciclos completos desplegamiento y replegamiento.

A temperaturas fijas, las curvas cinéticas para desdoblamiento de la yTIM, registradas por DC en el UV lejano, muestran una forma que se ajusta muy bien a un modelo exponencial simple, al menos cuando el tiempo del experimento es relativamente limitado; en contraste, cuando se registra el desplegamiento con DC en el UV cercano, así como con emisión de fluorescencia, se han reportado curvas cinéticas con dos fases. Por otra parte, en concentraciones pequeñas (de 10 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la yTIM térmicamente desplegada es capaz de replegarse casi por completo, siguiendo una cinética de segundo orden que lleva a la enzima dimérica con adecuada actividad catalítica [Benítez-Cardoza CG et al., 2001]. Estos resultados demuestran que la enzima desplegada está presente en forma monomérica. A diferencia de la yTIM, la enzima de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) muestra completa irreversibilidad en el desplegamiento inducido por aumento de la temperatura, incluso a bajas

concentraciones de proteína. En estudios cinéticos de esta proteína se encontró que la desnaturalización es un proceso cinético complejo en donde dos o tres pasos se aprecian claramente [Mixcoha-Hernández E et al., 2007]. Un hallazgo común entre yTIM y Tc TIM es que para ambas enzimas el estado desplegado parece conservar algo de *estructura residual* (es decir, regiones parcialmente plegadas o mal plegadas); esta propuesta deriva del análisis de datos calorimétricos, así como de la forma de los espectros DC en el UV-lejano [Benítez-Cardoza CG et al., 2001; Mixcoha-Hernández E et al., 2007].

III. Objetivos del trabajo.

Este trabajo se enfoca principalmente en la determinación del mecanismo de desplegamiento térmico de la γ TIM en ausencia de agentes desnaturalizantes; el estudio del efecto que tiene el pH en la aparición de estructura residual en el estado final del desplegamiento y desnaturalización; y, en la influencia de la estructura residual en el proceso de replegamiento.

En forma específica, el trabajo tiene los siguientes objetivos:

1. Determinar las características generales de las transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento de la enzima en diferentes valores de pH.
2. Estudiar los espectros de dicroísmo circular, en la región del UV lejano, del estado final de la enzima que se forma a alta temperatura, infiriendo de estos resultados la presencia o no de *estructura residual*, así como determinar el efecto del pH en la formación de este tipo de estructura.
3. Proponer un mecanismo de desplegamiento y desnaturalización de la γ TIM a partir de estudios cinéticos clásicos (temperatura constante) realizados por métodos espectroscópicos (dicroísmo circular y fluorescencia, principalmente).
4. Determinar la influencia del pH en el mecanismo propuesto.
5. Estudiar de qué manera afecta la presencia de *estructura residual* a la velocidad y la eficiencia del proceso de replegamiento.
6. Explorar si las simulaciones de dinámica molecular funcionan como un predictor de la formación de *estructura residual*.

IV. Materiales y métodos.

4.1 Expresión y purificación de la TIM de levadura.

La purificación y expresión de la TIM de levadura se llevó a cabo con la metodología descrita en el protocolo de Benítez-Cardoza CG et al., 2001 y Vázquez-Contreras E et al., 2000. El crecimiento celular de *E. coli* (cepa JM103) se llevó a cabo a 37°C en un litro de medio Luria-Bertani (LB) en presencia de ampicilina (100 µg/mL), en agitación orbital a 220 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.8 a 600 nm se indujo la expresión con isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.40 mM. El tiempo total de incubación continuó por 12 hr. Las células fueron concentradas por centrifugación a 6,000 rpm por 10 min. El precipitado de las células se resuspendió con regulador de tris(hidroximetil)aminoetano (TRIS) 10 mM pH 8.0, fluoruro de p-metilsulfonio (PMSF) 0.2 mM. Las células se lisaron por sonicación con ciclos de 40 a 50 pulsos por un tiempo 40 s y un descanso de 90 s, siempre mantenidas en un baño de hielo. El lisado se centrifugó a 45,000 rpm y 4°C por una hora. El sobrenadante, que contiene la TIM de levadura, se separó por dos precipitaciones diferenciales, en un baño de hielo y con agitación suave. En la primera precipitación se adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar el 64% de saturación, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C. Después de 12 horas el sobrenadante se saturó con sulfato de amonio hasta alcanzar el 90%; posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos. El precipitado que contiene la TIM de levadura se resuspendió en el amortiguador A (trietanolamina (TEA) 10 mM, ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM y ditiotreitól (DTT) 1 mM pH 7.6) y se dializó contra el mismo regulador.

El proceso de purificación se realizó en un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Amersham Pharmacia Biotech. La muestra se filtró a través de membranas de 0.45 μm de poro y se inyectó a una columna de exclusión molecular (Superdex 200 16/60) previamente equilibrada con amortiguador A. Las fracciones que presentaron mayor actividad específica se juntaron e inyectaron a una columna de intercambio aniónico MonoQ 5/50, equilibrada con amortiguador A. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 100 mM disuelto en amortiguador A. Las fracciones con mayor actividad específica se dializaron en amortiguador B (trietanolamina (TEA) 100 mM, ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 10 mM y ditioneitol (DTT) 1 mM, pH 8.0). En cada etapa de purificación se evaluó el contenido y pureza de TIM mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

4.2 Determinación de la concentración de TIM de levadura.

La concentración se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 10.0$ [Norton IL y Hartman FC, 1972]). Las proteínas de los diferentes lotes utilizados mostraron características idénticas en actividad enzimática, sus propiedades espectroscópicas y sus curvas de desnaturalización.

4.3 Determinación de la actividad catalítica.

La actividad enzimática de la TIM de levadura se determinó espectrofotométricamente, midiendo la velocidad de conversión del gliceraldehído-3-fosfato (DGAP) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), el cual a su vez se convierte a α -glicerofosfato (α -GP) por acoplamiento con la enzima α -glicerofosfato-deshidrogenasa (α -GDH). Esta última reacción consume un mol de nicotinadenin dinucleótido reducido (NADH), por cada mol de DHAP que reacciona [Rozacky EE et al.,1971]. Con 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 ($\epsilon_{NADH}^{340} = 6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los valores de actividad catalítica a diferentes concentraciones del DGAP fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten, Ecuación 1.

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

4.4 Electroforesis en gel.

Se determinó la pureza de la yTIM por medio de electroforesis en gel SDS-PAGE. Se preparó una solución de polímero de acrilamida al 10% para el gel de separación y de 4% para el gel de compactación. Se utilizó una fuente de 180 V y el tiempo de corrimiento fue de 60 min. Una vez migradas las muestras se reveló el gel con tinción de azul de Coomassie.

4.5 Espectrometría de masas.

En la realización de este experimento se utilizó un espectrómetro de masas Auto Flex Bruker y se utilizó el método MALDI-TOF/TOF en una matriz de 2,5 ácido dihidroxibenzoico. La proteína tenía una concentración de 1.0 mg ml^{-1} en agua.

4.6 Dicroísmo circular.

4.6.1 Obtención de espectros.

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron con un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc. Easton, MD) equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier y con un portaceldas con agitación magnética. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1.00 cm de longitud de paso óptico para mantener la concentración de la proteína cercana a $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.19 \text{ } \mu\text{M}$). Aunque esto restringe el registro de datos en el límite de bajas longitudes de onda, el mantener una concentración baja es fundamental para observar transiciones térmicas reversibles. Los espectros de dicroísmo circular se registraron en la región del UV-lejano, en un intervalo de longitud de onda de 200 a 250 nm. Los datos de espectros de dicroísmo circular son reportados como elipticidad molar por residuo promedio $[\theta]$, el cual fue calculado como $[\theta]=100 \theta/(C l)$, donde θ es la medida de elipticidad en grados, C es la concentración molar por residuo (el residuo medio tiene $M_r = 107.5$) y l cm la longitud de paso óptico de la celda.

4.6.2 Transiciones térmicas.

Los cambios conformacionales inducidos por calentamiento o enfriamiento de la yTIM fueron continuamente monitorizados siguiendo la señal de elipticidad a 220 nm, mientras la temperatura fue variando a una razón de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Las muestras (aproximadamente 0.19 μM) fueron colocadas en una celda de 1.00 cm de paso óptico con agitación magnética y la temperatura en el interior de la celda fue registrada por un termopar externo del accesorio Peltier. Las transiciones de replegamiento fueron registradas inmediatamente después de una desnaturalización térmica completa.

4.6.3 Estudios cinéticos.

Los estudios cinéticos de desplegamiento térmico de la yTIM se realizaron monitorizando los cambios en la señal de elipticidad a 220 nm en función del tiempo [Benítez-Cardoza CG et al., 2001; Reyes-López CA et al., 2008]. El desdoblamiento fue iniciado por la adición de una pequeña alícuota de solución concentrada de yTIM a una celda de 1.00 cm de paso óptico que contenía buffer previamente equilibrado a la temperatura elegida para cada experimento. Dentro de la celda, la temperatura alcanzó $\pm 0.15^{\circ}\text{C}$ de la temperatura final de equilibrio en aproximadamente 15 s. La concentración final de la proteína fue de 0.19 μM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en la mayoría de los casos. Los datos cinéticos fueron analizados usando un modelo de decaimiento exponencial triple, Ecuación 2:

$$y = y_0 + A_1[\exp(-\lambda_1 t) - 1] + A_2[\exp(-\lambda_2 t) - 1] + A_3[\exp(-\lambda_3 t) - 1] \quad (2)$$

donde y es la propiedad física observable monitoreada en función del tiempo (t), y y_0 es el valor inicial de la propiedad física observable. A_i y λ_i representan la amplitud observable y la constante de velocidad, respectivamente, para la i -ésima fase exponencial. En muchos casos, sólo dos términos exponenciales fueron requeridos para un ajuste satisfactorio de los datos experimentales.

En los experimentos de replegamiento, las muestras de yTIM primeramente se sometieron a desplegamiento térmico por 10 minutos a 63.0°C, en una celda de 1.00 cm. Después, el control de temperatura del accesorio Peltier del espectrómetro de DC se ajustó a un valor de 4.0°C por debajo de la temperatura deseada para el estudio de replegamiento (42.0°C) para así permitir un enfriamiento rápido de la muestra (aproximadamente 15°C min⁻¹). El valor de la temperatura final (42.0°C) fue ajustado en el controlador de temperatura cuando la temperatura de la celda se encontraba 0.5°C por debajo del valor deseado, y la señal de DC (220 nm) se comenzó a registrar inmediatamente después. Dentro de la celda, la temperatura alcanzó el equilibrio ($\pm 0.15^\circ\text{C}$) en aproximadamente 40 s. Los datos cinéticos se analizaron usando la ecuación para una reacción de segundo orden:

$$y = y_f + (y_0 - y_f) / (2C_0k_r t + 1) \quad (3)$$

En la Ecuación 3, y es la propiedad observable monitorizada en función del tiempo, t ; y_0 y y_f son los valores del observable a tiempo cero y tiempo infinito, respectivamente. C_0 es la concentración molar inicial de monómeros de la proteína y k_r es la constante cinética de replegamiento.

4.7 Estudios cinéticos por fluorescencia intrínseca.

Los estudios cinéticos se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro ISS K2 (Urbana USA) equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier y un portaceldas con agitador magnético. Se utilizó una celda de 1.00 cm de paso óptico para efectuar las mediciones de la intensidad de fluorescencia de la γ TIM con respecto del tiempo. La concentración de proteína fue de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.96 \mu\text{M}$). Las muestras fueron excitadas con luz de 292 nm y la emisión de luz se colectó a 318 nm.

4.8 Simulaciones de dinámica molecular.

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) fueron realizadas usando el software GROMACS 4.5.4 [Hess B et al., 2008] con el campo de fuerza GROMOS96 53 A6 [Oostenbrink C et al. 2004]. Los estados de ionización simulados de las cadenas laterales de la proteína a diferentes valores de pH (6.7, 7.4 y 8.0) fueron establecidos usando valores de pKa estimados con PROPKA [Li H et al. 2005]. La γ TIM (PDB ID: 1YPI) dimérica fue colocada en el centro de una caja periódica dodecahédrica con una distancia de 1 \AA entre la proteína y el borde de la caja. Para simular las condiciones del solvente a pH 6.7 (7.4; 8.0) se necesitaron un total de 21,763 (21,757; 21,751) moléculas de agua SPC, 12 (16; 20) iones de sodio y 7 (10; 12) iones de cloro para llenar la caja, neutralizando la carga neta de la proteína y alcanzando la fuerza iónica experimental de 0.015 M (0.022 M; 0.027 M). Antes de iniciar las simulaciones de DM, el sistema fue relajado por minimización de energía,

seguida por 100 ps de equilibrio térmico bajo restricciones de posición de átomos pesados de la proteína a través de una fuerza armónica constante de $1,000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. La simulación de dinámica molecular fue realizada usando un conjunto NPT a 423 K y 1.0 bar por 100 ns. El algoritmo LINCS fue aplicado para mantener la longitud de todos los enlaces covalentes [Hess B et al., 1997] y fueron usados 2 fs de tiempo de paso. Un corte de 1 nm fue aplicado para interacciones electrostáticas de corto alcance y de van der Waals, mientras que las fuerzas electrostáticas de largo alcance fueron tratadas mediante el método de malla de partículas de Ewald. Dos réplicas fueron simuladas para cada condición de solvente.

V. Resultados.

5.1 Caracterización de la yTIM.

La yTIM se sobreexpresó utilizando el método mencionado en la sección IV de Materiales y Métodos. El rendimiento obtenido en el aislamiento de la enzima recombinante fue de 9.0 mg por litro de cultivo. La muestra se purificó haciéndola pasar por dos columnas, una de exclusión molecular y otra de intercambio aniónico.

5.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Conforme se realizaron los diferentes pasos de purificación, la homogeneidad de la muestra de yTIM fue verificada mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). Las muestras de yTIM obtenidas después de la purificación en la columna de intercambio aniónico mostraron una banda principal de proteína (Figura 5.1) con bandas mucho menos intensas correspondientes a otras proteínas. Se procedió entonces a hacer una segunda corrida cromatográfica en la misma columna de intercambio aniónico y la muestra obtenida de ésta se sometió a un análisis por espectrometría de masas.

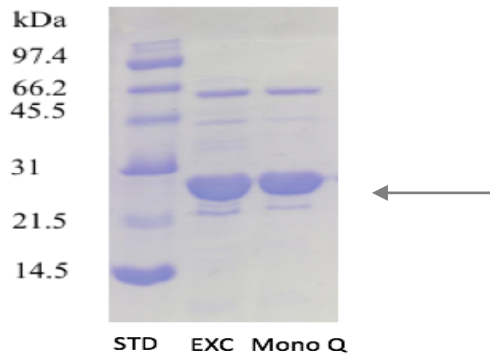


Figura 5.1 Gel de poliacrilamida de la γ TIM en condiciones desnaturalizantes. Se analizan muestras en las distintas etapas de purificación EXC (columna de exclusión molecular), MONO Q (columna de intercambio aniónico Mono Q).

5.1.2 Espectrometría de masas.

La masa molecular de la γ TIM previamente purificada fue determinada por espectrometría de masas en un equipo AutoFlex Bruker, usando el método MALDI-TOF/TOF en una matriz de ácido 2,5 dihidroxibenzoico. La proteína tenía una concentración de 1.0 mg/ml en agua. El peso molecular por monómero estimado fue de 26,680 g/mol, el cual difiere en aproximadamente 1% del peso molecular calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima.

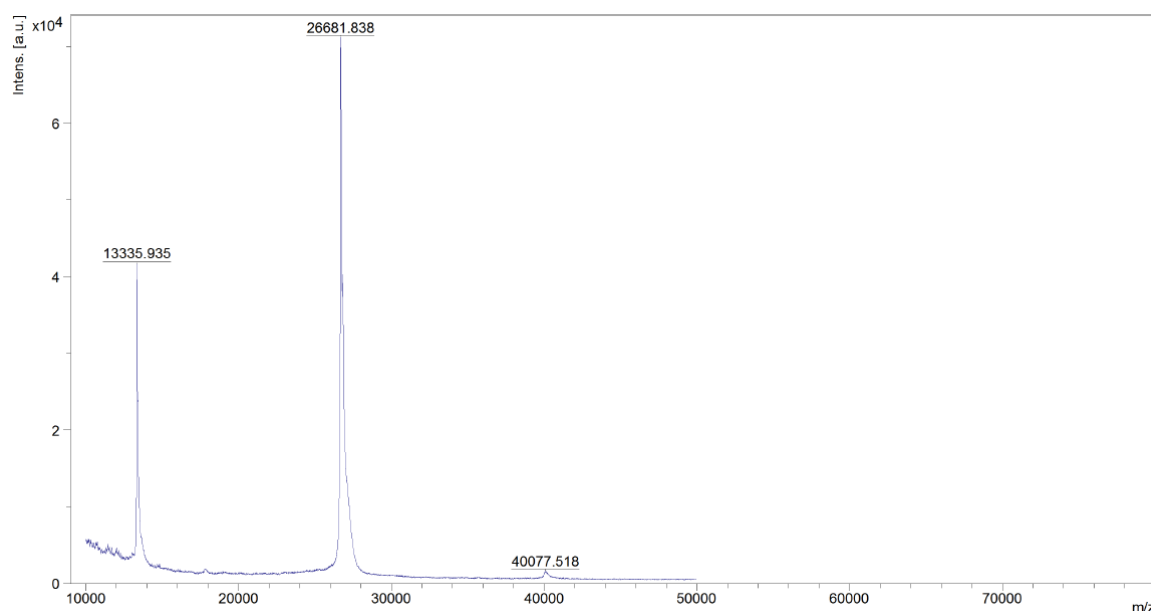


Figura 5.2 Espectro de masas de la yTIM desarrollado por el método de MALDI-TOF/TOF en una matriz de ácido 2,5 dihidroxibenzoico.

Es apropiado notar que el espectro de masas mostró solamente dos picos intensos correspondientes al monómero con cargas +1 y +2, y un pico contaminante muy pequeño. Estos resultados demostraron que la yTIM purificada constituía esencialmente una muestra homogénea como se muestra en la figura 5.2.

5.1.3 Actividad catalítica de la yTIM.

La actividad específica de la yTIM se expresó en milimoles de sustrato que reaccionó por minuto por miligramo ($\text{mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Para determinar K_M y k_{cat} , la concentración del DGAP se fue variando en un intervalo de concentraciones entre 0.05 a 4.00 mM. La reacción

inició con la adición de 4 ng de yTIM. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 25°C, imponiendo la temperatura de la celda constante mediante un sistema Peltier. Los valores de actividad específica obtenidos a diferentes concentraciones del DHAP fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. La Tabla 5.1 muestra los valores determinados para las constantes cinéticas (k_{cat} , K_M y k_{cat}/K_M) en este trabajo, así como las constantes determinadas experimentalmente en otros trabajos (para fines de comparación).

Tabla 5.1 Parámetros cinéticos de la yTIM del presente trabajo y el de otros autores.

	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
En el presente trabajo	2.9×10^3	1.1	2.6×10^6
Cruces-Ángeles et al. 2011	4.7×10^3	1.1	4.3×10^6
González-Mondragón et al. 2004	4.7×10^3	1.1	4.3×10^6
Serratos-Álvarez et al. 2011	5.6×10^3	0.81	6.9×10^6

5.2 Transiciones térmicas.

Las transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento de la yTIM se realizaron monitorizando la señal de elipticidad a 220 nm, con una velocidad de calentamiento y enfriamiento constante de $2.0^\circ C \text{ min}^{-1}$. Los perfiles de calentamiento registrados en tres valores de pH se muestran en la Figura 5.3 (pH 6.7, 7.0 y 8.5). Estas transiciones muestran un comportamiento de histéresis, en los tres diferentes valores de pH, como previamente ha

sido observado en la yTIM [Benítez-Cardoza C et al., 2001; Samanta M et al., 2011; Réyes-López CA et al., 2008]. Esto indica que los eventos de desplegamiento y replegamiento están bajo control cinético con el valor de la velocidad de calentamiento impuesta [Dragan AI, et al. 2004 y Benítez-Cardoza C, et. al., 2001]. Estos resultados indican que el pH tiene una influencia en la estabilidad cinética de la proteína, ya que la curva de desnaturalización es desplazada hacia valores bajos de temperatura en pH 8.5, en comparación con las curvas a los otros valores de pH.

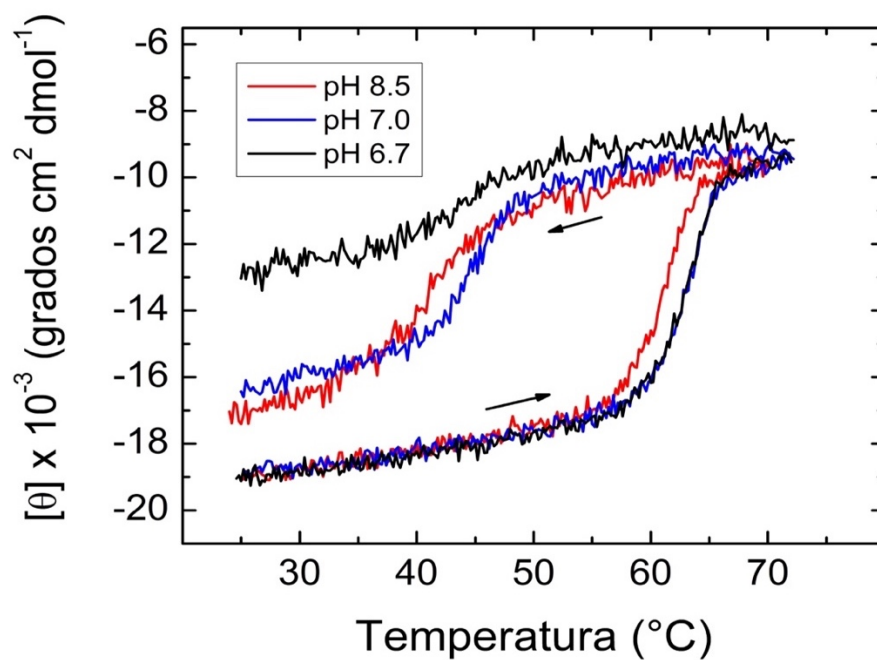


Figura 5.3 Transiciones térmicas de desplegamiento y replegamiento de la yTIM a pH 6.7, 7.0 y 8.5. La elipticidad fue monitorizada a 220 nm, a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Las flechas indican el sentido del enfriamiento o del calentamiento.

Por otra parte, los tres trazos de calentamiento de la yTIM muestran todos una forma sigmoideal sencilla, sin evidencia de la presencia de estados intermediarios. Debe notarse que en los *barridos* de calentamiento de la Figura 5.3 la temperatura máxima alcanzada no

excedió los 70°C, con el fin de evitar al máximo que reacciones irreversibles (agregación o mal plegamiento) disminuyeran el grado de replegamiento que la proteína alcanzara durante el “barrido” de enfriamiento. No obstante, esta precaución, la curva de enfriamiento en pH6.7 muestra claramente que la cantidad de enzima replegada a este pH es considerablemente menor que en los otros dos pH estudiados. Es evidente, entonces, que la desnaturalización de yTIM se vuelve considerablemente irreversible a medida que el pH disminuye por debajo de 7.0. Como el pI de la proteína es de 5.74, muy posiblemente la agregación parcial (oligomerización no específica) de la forma desplegada tiene un papel importante en la irreversibilidad. Debe notarse así mismo que la concentración total de enzima en los experimentos fue de únicamente 10 µg/mL.

En una serie de experimentos diferentes, las muestras nativas de la enzima fueron calentados hasta alcanzar 70°C y se incubaron a esta temperatura por 10 minutos para así asegurarnos que el desplegamiento había sido completo, a juzgar por la señal de DC. Los espectros que se muestran en la Figura 5.4, indican que la conformación nativa de la enzima (25.0°C) es poco sensible al pH, aunque se pierde en gran medida tras el calentamiento en todos los valores de pH, como puede notarse por la disminución de la magnitud en la región de 208 a 222 nm a alta temperatura (Figura 5.4).

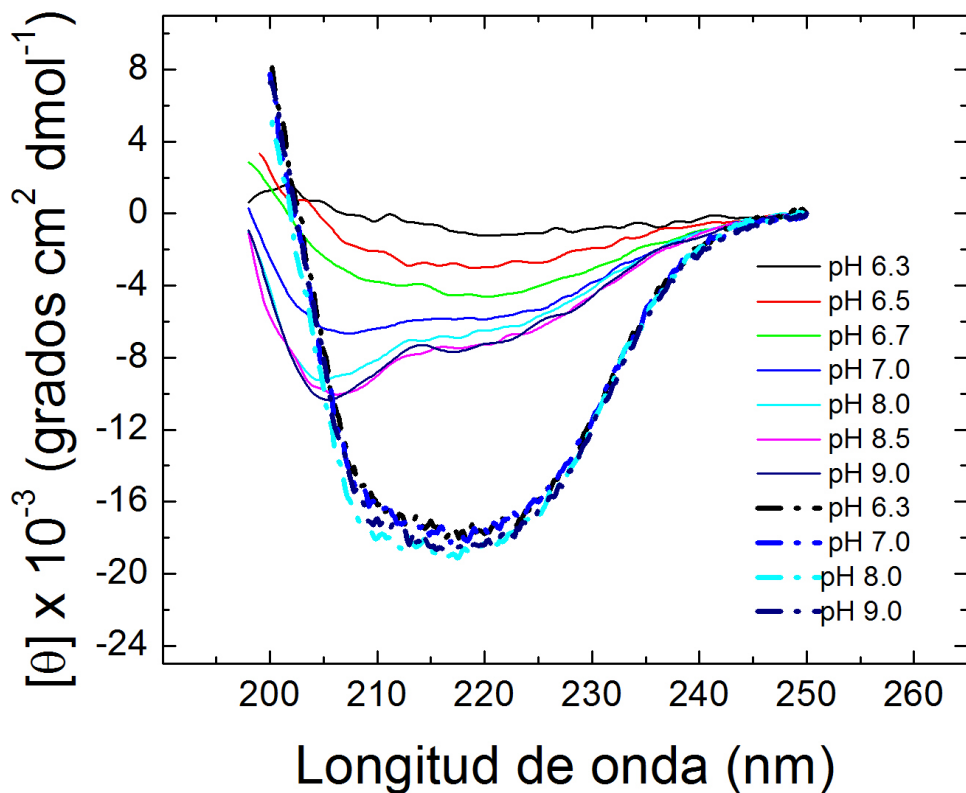


Figura 5.4 Espectros de DC en la región del UV-lejano de yTIM nativa y desplegada térmicamente a diferentes valores de pH. Las muestras desplegadas por temperatura se calentaron a una velocidad de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta llegar a 70.0°C , y después de ser mantenidas 10 minutos a esta temperatura se obtuvo su espectro de DC (líneas sólidas). Para su comparación, espectros de yTIM nativa fueron obtenidos a diferentes pH (líneas de puntos), a 25.0°C .

Sin embargo, el espectro de yTIM desplegada térmicamente muestra cambios sorprendentes a medida que se varía el pH. Por encima de pH 8.0, la forma espectral y la magnitud de la señal de la enzima desplegada son típicas de proteínas de tamaño pequeño y mediano (por ejemplo, lisozima de huevo de gallina, ribonucleasa A, citocromo C, nucleasa estafilocócica, proteinasas cisteínicas) cuando se despliegan a altas temperaturas en ausencia de agentes

desnaturalizantes (espectros de DC de la lisozima nativa y térmicamente desnaturalizada se presentan en la Figura 5.5). Este tipo de espectro se caracteriza por una banda negativa de aproximadamente 10×10^3 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ centrada en 202-204 nm, junto con un hombro ancho negativo con magnitud alrededor de 5×10^3 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ a mayor longitud de onda [Privalov PL et al., 1989; Arroyo-Reina A et al., 1995]. Por debajo de pH 8.0, los espectros de la yTIM desplegada térmicamente disminuyen progresivamente en magnitud y adquieren una forma típica de las proteínas tipo β [Manavalan P y Johnson WC, 1983], señalando así la presencia de estructura secundaria residual en la estructura de la enzima a altas temperaturas. Cabe hacer notar que, desde el punto de vista de la estructura secundaria de la yTIM, la especie molecular presente a altas temperaturas podría ser referida como una forma desplegada térmicamente (pH > 8.0), o bien una forma parcialmente desplegada (pH < 8.0). Como ambos conceptos implican una pérdida de la conformación nativa, el proceso asociado a dichos cambios estructurales puede ser descrito, en general, indistintamente como *desplegamiento* o *desnaturalización*.

Con el fin de obtener información detallada sobre la influencia del pH en los procesos de desplegado y repliegado, se llevaron a cabo experimentos cinéticos, los cuales se describen en las secciones siguientes.

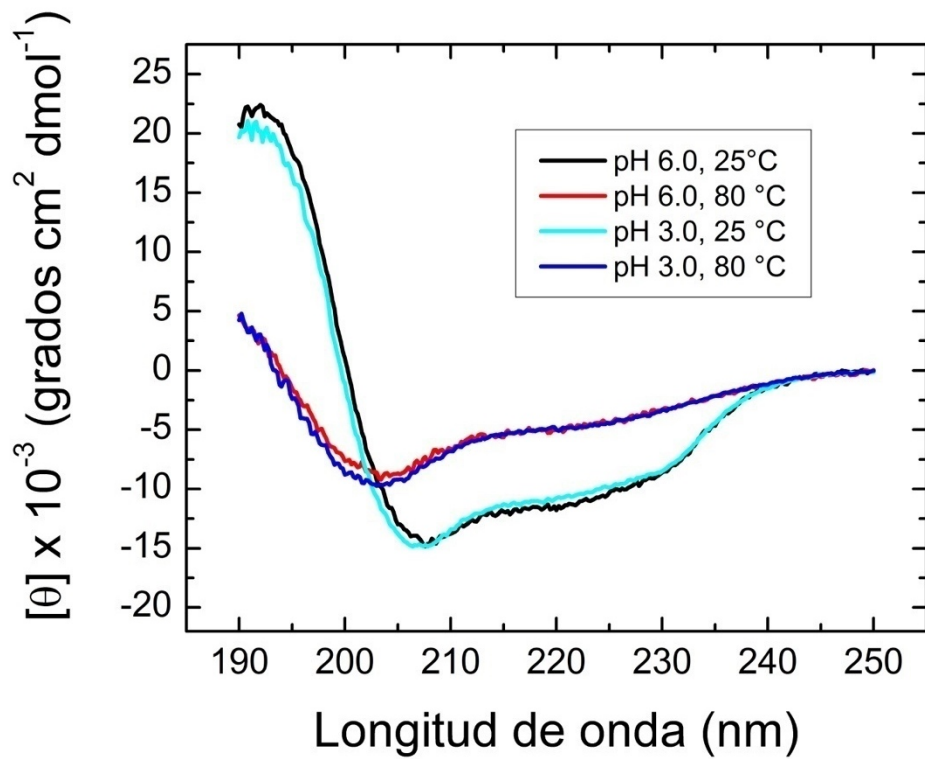


Figura 5.5 Espectro de DC en la región de UV-lejano de lisozima de huevo de gallina en solución acuosa, en sus formas nativa y desplegada térmicamente.

5.3 Estudios cinéticos: Desplegamiento

5.3.1 Dicroísmo circular.

Los experimentos cinéticos se realizaron monitorizando la elipticidad a 220 nm con respecto del tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo a tiempos largos (400 min aproximadamente en cada experimento). Estas mediciones se examinaron en un intervalo relativamente amplio de temperaturas y se llevaron a cabo a pH 6.7 y 8.0, en donde los espectros de DC de la yTIM desplegada mostraron características distintas.

Una característica común observada en las curvas cinéticas, y que fue descrita desde el trabajo de Benítez-Cardoza et al. (2001), es que, independientemente de la temperatura, la amplitud observada es aproximadamente constante; esto es, la reacción o reacciones que tienen lugar son operativamente irreversibles (a pesar que el proceso de desplegado térmico muestra reversibilidad considerable a temperaturas más bajas) debido a lo siguiente: en primer lugar, en la zona de temperatura en la que se estudia el desplegado la constante de velocidad de replegado es tan pequeña que el replegado prácticamente no ocurre; en segundo lugar, después del desplegado tienen lugar reacciones que conducen a la pérdida de la capacidad de replegado.

En el presente trabajo, los resultados de los experimentos realizados a pH 8.0 indicaron que a temperaturas relativamente altas (de 60°C y mayores), la pérdida de estructura secundaria se ajusta a un comportamiento de decaimiento exponencial doble con fases bien separadas en la escala de tiempo (Figura 5.6). De hecho, en un intervalo de tiempo bastante restringido, los datos se ajustan razonablemente bien a una ecuación de decaimiento exponencial simple.

Sólo cuando los datos se registraron durante largos tiempos, una segunda fase se hace evidente, pero ésta es de amplitud pequeña.

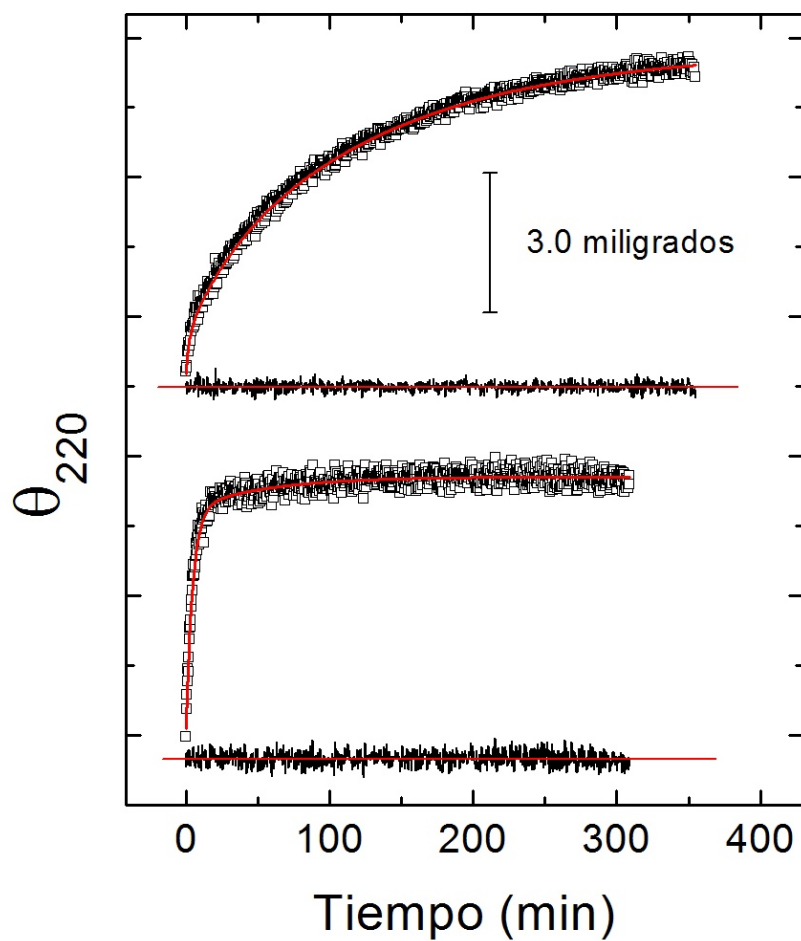


Figura 5.6 Curvas cinéticas de desplegamiento de la yTIM a pH 8.0, obtenidas registrando cambios en señal de DC a 220 nm. Los datos se presentan como miligrados de elipticidad, y corresponden a 54.5°C (trazo superior) y 60.0°C (trazo inferior). Las líneas en rojo son los ajustes a una ecuación de triple decaimiento exponencial (curva superior) y de doble decaimiento exponencial (curva inferior) para los datos experimentales. Los residuos del ajuste son mostrados debajo de cada cinética.

Sin embargo, a baja temperatura se observó un decaimiento exponencial triple. La fase más rápida, que se aprecia por un pequeño cambio en la elipticidad, ocurre tan rápidamente que no es posible determinar la constante cinética por el método de mezclado manual (manual-mixing); es decir, la constante de tiempo de la fase rápida es de aproximadamente 20 a 100 s). Esta fase pareciera estar oculta dentro del tiempo muerto en experimentos a alta temperatura. Las constantes de velocidad de las tres fases son referidas de aquí en adelante como λ_1 , λ_2 y λ_3 , en orden descendente de sus magnitudes. Los experimentos cinéticos a pH 6.7 tuvieron un comportamiento similar mostrando dos y tres fases cinéticas a alta temperatura y a baja temperatura, respectivamente, como se muestra en la Figura 5.7.

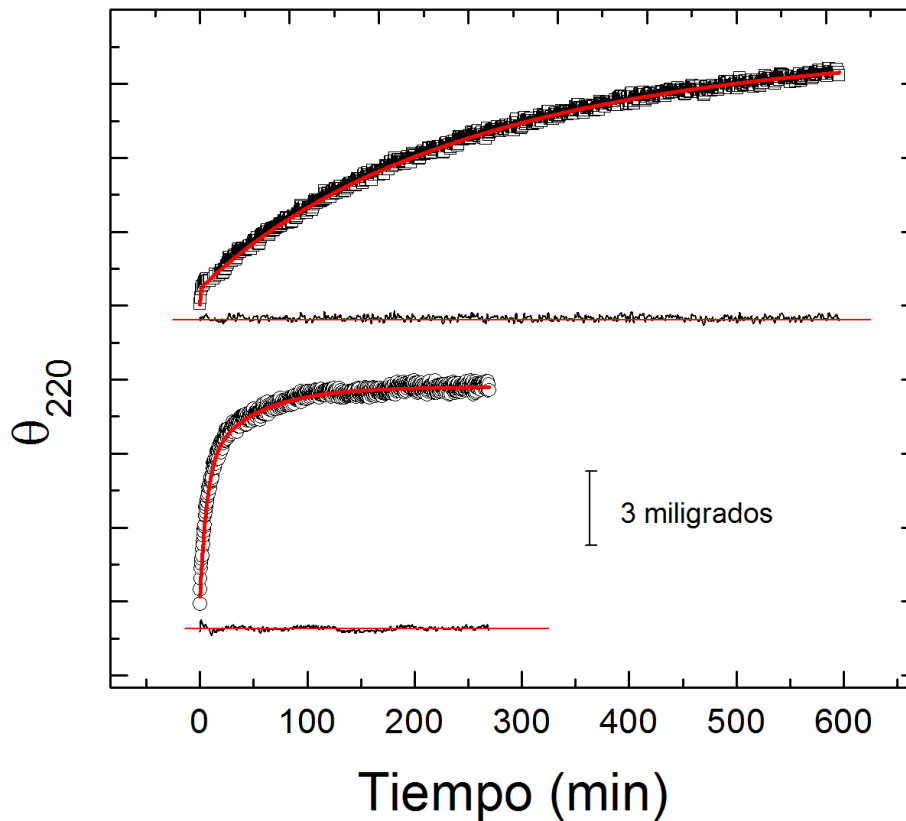


Figura 5.7 Curvas cinéticas de desplegamiento de la yTIM a pH 6.7, obtenidas registrando cambios en señal de DC a 220 nm. Los datos se presentan como miligrados de elipticidad, y corresponden a 54.5°C (trazo superior) y 60.0°C (trazo inferior). Las líneas en rojo son los ajustes a una ecuación de triple decaimiento exponencial (curva superior) y de doble decaimiento exponencial (curva inferior) para los datos experimentales. Los residuos del ajuste son mostrados debajo de cada cinética.

Se registraron espectros de DC al final del proceso de desplegamiento, cuando la fase más lenta se había completado en un 98% (para el caso de los experimentos realizados a temperaturas bajas se requirió registrar los datos por lo menos por nueve horas). Los espectros de la enzima desnaturalizada al final del proceso fueron casi idénticos, independientemente de la temperatura a la que se estudió la desnaturalización (los espectros

a pH 8.0 se presentan en la Figura 5.8). Además, a un pH dado, la forma espectral y la magnitud observada al final del desplegamiento eran similares a las ilustradas en la Figura 5.4. En otras palabras, la conformación final alcanzada por la proteína parece ser independiente de la temperatura (en el rango estudiado), pero al mismo tiempo es fuertemente afectada por el pH.

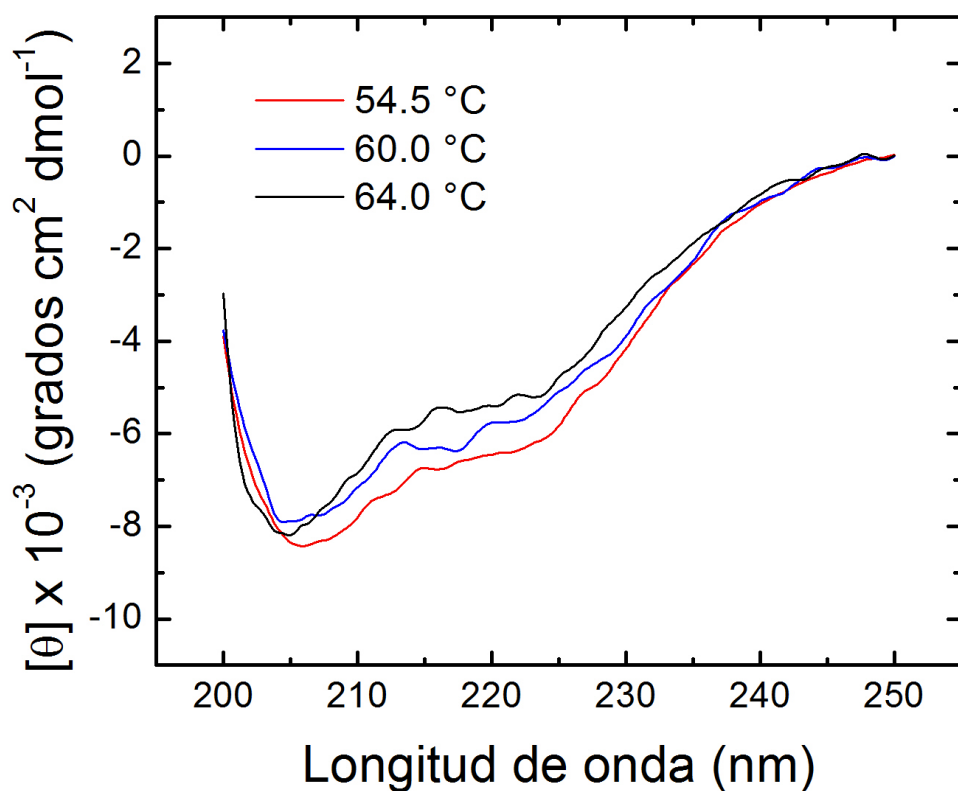


Figura 5.8 Espectros de DC en el intervalo de UV-lejano de la yTIM desplegada a diferentes temperaturas (pH 8.0). Los espectros se registraron cuando la fase cinética más lenta había alcanzado un 98% de avance en todos los casos.

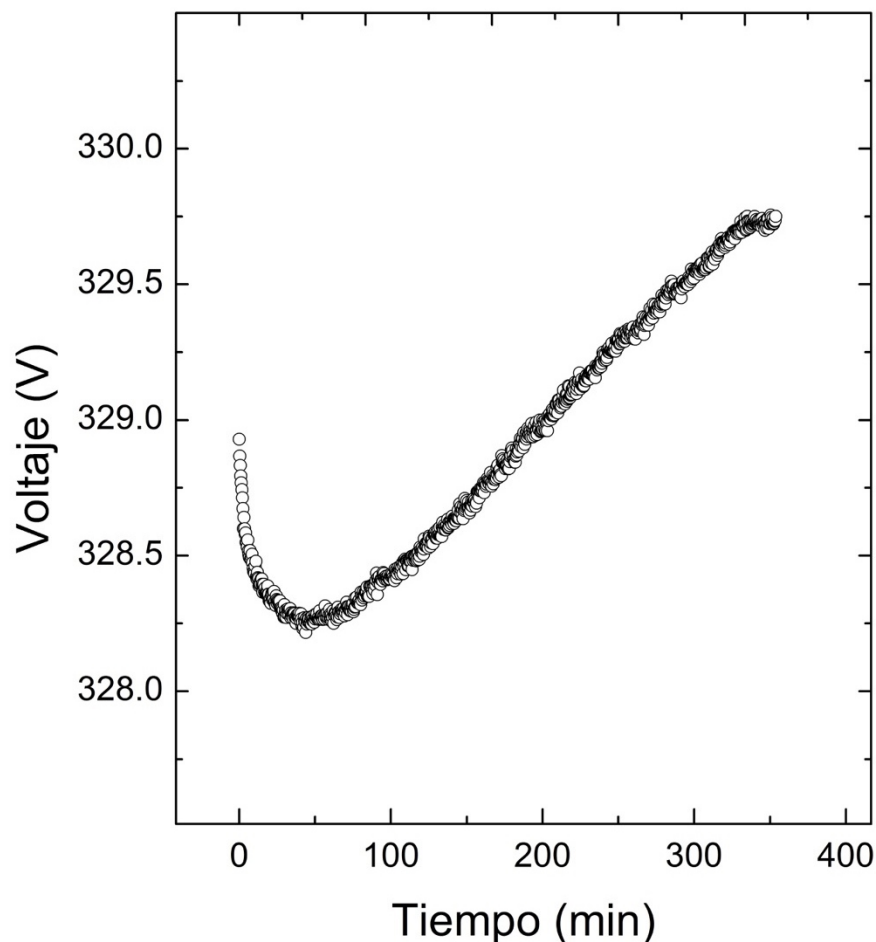


Figura 5.9 Cinética de desplegamiento de yTIM siguiendo la absorción de luz a 220 nm. Los datos mostrados corresponden a un experimento en condiciones de 54.4°C y pH 8.0, en el cual el voltaje aplicado al fototubo del instrumento de DC fue registrado en función del tiempo.

El voltaje aplicado al fototubo del equipo de DC, que es proporcional a la absorbancia, se registró simultáneamente con la señal de elipticidad. Las mediciones indicaron que los cambios en la elipticidad asociados con las dos primeras fases se acompañan sólo de pequeños cambios (5.0% o menos) en la absorbancia de la solución de proteína (Figura 5.9). Se sabe que estos pequeños cambios se producen debido a alteraciones en la estructura secundaria y, en menor medida, a alteraciones en la estructura terciaria de proteínas y polipéptidos [Van Holde KE y Johnson WC, 1998]. Sin embargo, un gran incremento en la

absorbancia (aproximadamente del 10% de la absorbancia de la proteína) ocurrió al mismo tiempo que la fase lenta detectada en la cinética de desnaturalización por DC (Figura 5.6). Probablemente este aparente incremento se deba a la dispersión de luz por agregados de moléculas de proteína desplegada.

5.3.2 Fluorescencia intrínseca.

Al estudiar la cinética de desnaturalización por cambios en la intensidad de fluorescencia también se demostró que este es un proceso complejo (ver Figura 5.10) en el que hay una disminución progresiva de la intensidad (a la longitud de onda máxima de emisión de la yTIM nativa). En general, comparando las gráficas mostradas en las Figuras 5.6 y 5.10 se observa que la pérdida progresiva en la estructura secundaria en la desnaturalización es acompañada por un apagamiento de la señal de fluorescencia de los residuos de triptófano, lo que a su vez refleja la exposición de estos residuos al disolvente acuoso, o que el entono en el que se encuentran dichos residuos impone sobre ellos menores restricciones estructurales [Campbell ID y Dwek RAR, 1984].

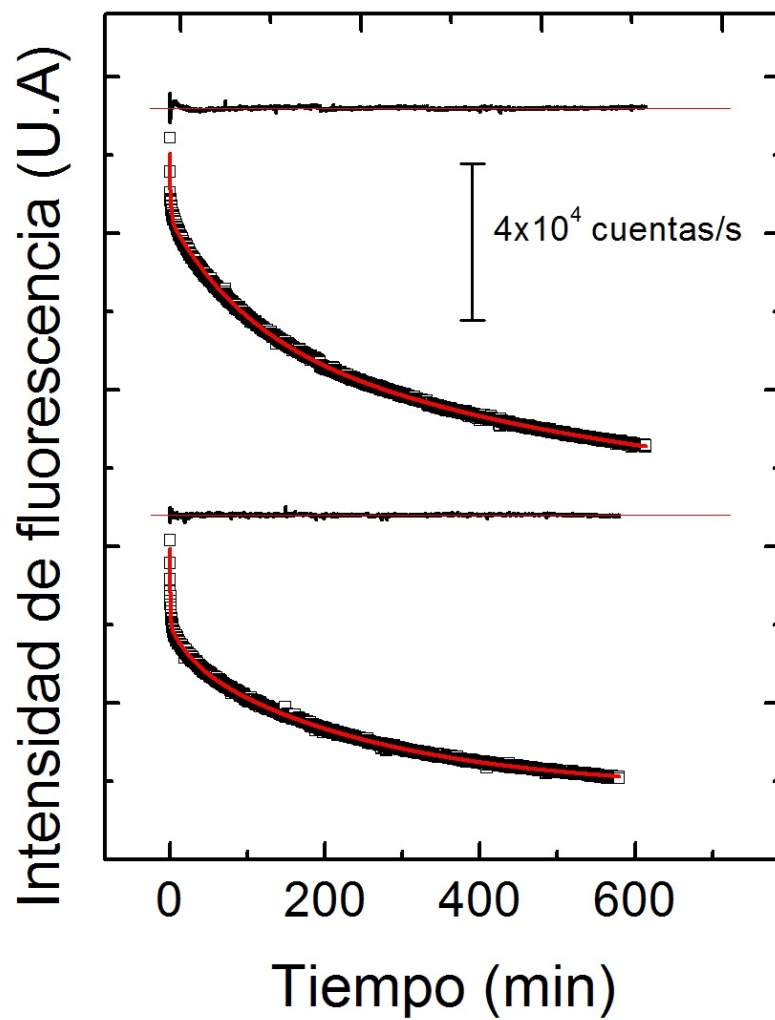


Figura 5.10 Cinéticas de desplegamiento de yTIM a pH 8.0, seguidas por cambios en la intensidad de fluorescencia. Los datos mostrados corresponden a 55.0°C (trazo superior) y a 60.0°C (trazo inferior). Las muestras de la proteína fueron excitadas a 292 nm y la luz emitida a 318 nm fue colectada. Las líneas rojas corresponden a un ajuste de triple decaimiento exponencial. Los residuos del ajuste son mostrados arriba de cada trazo de las cinéticas.

A todas las temperaturas establecidas, se requirieron tres términos exponenciales para ajustar los datos de las cinéticas de desnaturalización por fluorescencia. Al igual que en los experimentos de DC, la primera fase detectada por fluorescencia fue muy rápida (constante de tiempo de aproximadamente 25 s) para permitir una determinación precisa de las constantes de velocidad. A baja temperatura (55.0°C), la constante de velocidad para la segunda fase tuvo un valor similar al de λ_2 determinados en los experimentos por DC (los dos valores difirieron entre el 50 y 80%). De 62.0 a 64.0 °C, sin embargo, la primera constante de velocidad detectada por fluorescencia fue consistente con λ_2 para los experimentos de DC. Además, la disminución en la intensidad de fluorescencia se prolongó durante un mayor tiempo que el cambio en la elipticidad en DC (es decir, la constante de velocidad para la fase más lenta fue aproximadamente de tres a cuatro veces menor cuando se determinó a partir de fluorescencia que a partir de DC). Estos valores marcadamente diferentes sugieren que la fase más lenta comprende varios pasos elementales que responden de forma diferente a las sondas espectroscópicas empleadas, ver tabla 5.2.

Tabla 5.2. Valores de las constantes de velocidad para la desnaturalización de γ TIM determinadas por métodos diferentes (pH 8.0)^a

Dicroísmo circular			
Temperatura (°C)	$\lambda_1 \times 10^4$ (s ⁻¹)	$\lambda_2 \times 10^4$ (s ⁻¹)	$\lambda_3 \times 10^4$ (s ⁻¹)
55.0	700 (300)	21 (0.4)	6.0 (0.4)
60.2	nd ^b	120 (20)	15 (3)
62.3	nd ^b	300 (30)	20 (3)
Fluorescencia			
Temperatura (°C)	$\lambda_1 \times 10^4$ (s ⁻¹)	$\lambda_2 \times 10^4$ (s ⁻¹)	$\lambda_3 \times 10^4$ (s ⁻¹)
55.0	500 (250)	7.8 (2)	0.5 (0.02)
60.0	280 (70)	11 (3)	0.8 (0.02)
62.0	270 (60)	6 (5)	0.7 (0.1)

^aLos valores mostrados son el promedio de tres experimentos. La desviación estándar está entre paréntesis.

^bValor no determinado.

5.4 Influencia de la temperatura en las constantes cinéticas de desplegamiento.

Se llevaron a cabo estudios de la desnaturalización de la enzima a diferentes temperaturas (en un intervalo de pH de 6.0 a 8.5) para determinar los parámetros de activación que controlan la dependencia de λ_2 y λ_3 con la temperatura. Los resultados para valores de pH seleccionados se muestran en la Figura 5.11 como gráficos de Eyring, esto es, de acuerdo con la ecuación 4:

$$\ln(k/T) = \ln E + \Delta S^\ddagger/R - (\Delta H^\ddagger/R)(1/T) \quad (4)$$

donde k es la constante de velocidad para una reacción elemental, T es la temperatura absoluta (K), E representa un factor preexponencial y ΔS^\ddagger y ΔH^\ddagger representan la entropía y la entalpía de activación, respectivamente. La Figura 5.11A muestra las gráficas correspondientes a λ_2 , las cuales muestran tendencia lineal cuando se considera un intervalo de temperatura estrecho. Este comportamiento ya se había observado anteriormente para la yTIM y también se ha encontrado para un gran número de diferentes proteínas [Benítez-Cardoza CG et al., 2001]. Sin embargo, en los casos de pH 6.7 y 8.0, en donde se examinaron intervalos de temperaturas mayores, los gráficos de Eyring parecen “ligeramente” curvadas hacia arriba en la región de baja temperatura como se aprecia en la figura 5.11.

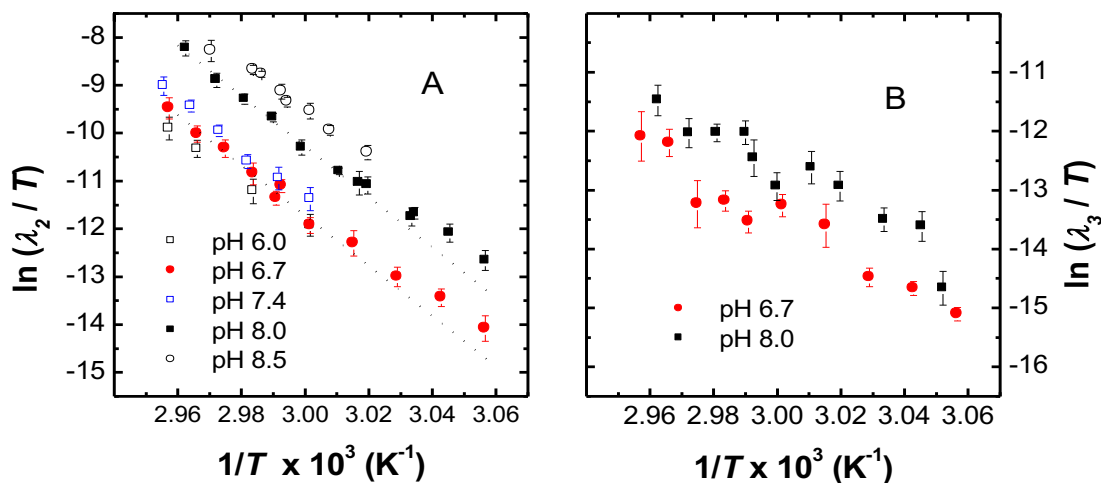


Figura 5.11 Gráficos de Eyring para las constantes de velocidad λ_2 (A) y λ_3 (B), para diferentes valores de pH seleccionados. Las constantes de velocidad fueron determinadas por experimentos de cinética monitorizando la señal de DC a 220 nm. Las líneas punteadas en (A) son los ajustes lineales de los datos correspondientes a temperaturas mayores de 60.0°C para pH 6.7 y 8.0.

De los gráficos de Eyring (Figura 5.11A) se determinaron los valores de ΔH_2^\ddagger que se muestran en la Figura 5.12. Como puede apreciarse, ΔH_2^\ddagger presenta un valor aproximadamente constante (variaciones de un 10%) de pH 6.3 a pH 7.4, mostrando una tendencia a disminuir cuando el pH fue menor o mayor del intervalo señalado. En cambio, en las gráficas de Eyring para λ_3 , puede notarse una tendencia, mal definida, de $\ln(\lambda_3/T)$ a disminuir en función de $1/T$ (veáse Figura 5.11B), lo que sugiere que la fase cinética más lenta está compuesta de varias etapas elementales. También se observa que λ_3 es mucho menos dependiente de la temperatura que λ_2 .

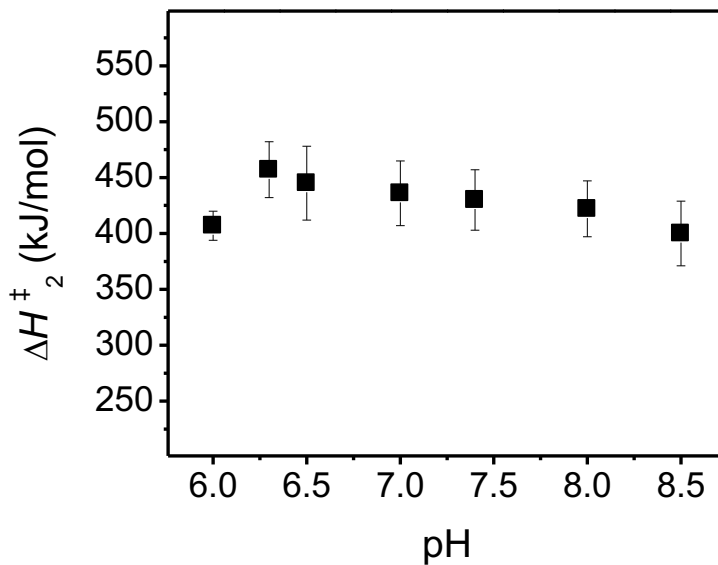


Figura 5.12 Gráfico que muestra la variación de ΔH_2^\ddagger con el pH.

5.5 Efecto del pH en λ_2 y λ_3 .

El efecto del pH en λ_2 y λ_3 se examinó en un intervalo más amplio de valores de pH, a temperatura constante de 60°C, debido a que a esta temperatura el proceso de desnaturalización fue suficientemente lento para permitir determinar λ_2 en un intervalo de pH amplio. Los resultados (Figura 5.13) muestran que los cambios inducidos por el pH en λ_2 se asemejan a la forma sigmoideal de una curva de titulación para un grupo ionizable con un pKa aproximado de 8.5.

En contraste, los valores de λ_3 no mostraron variación definida con el pH, sugiriendo de nuevo que la etapa lenta del proceso consta en realidad de múltiples reacciones individuales.

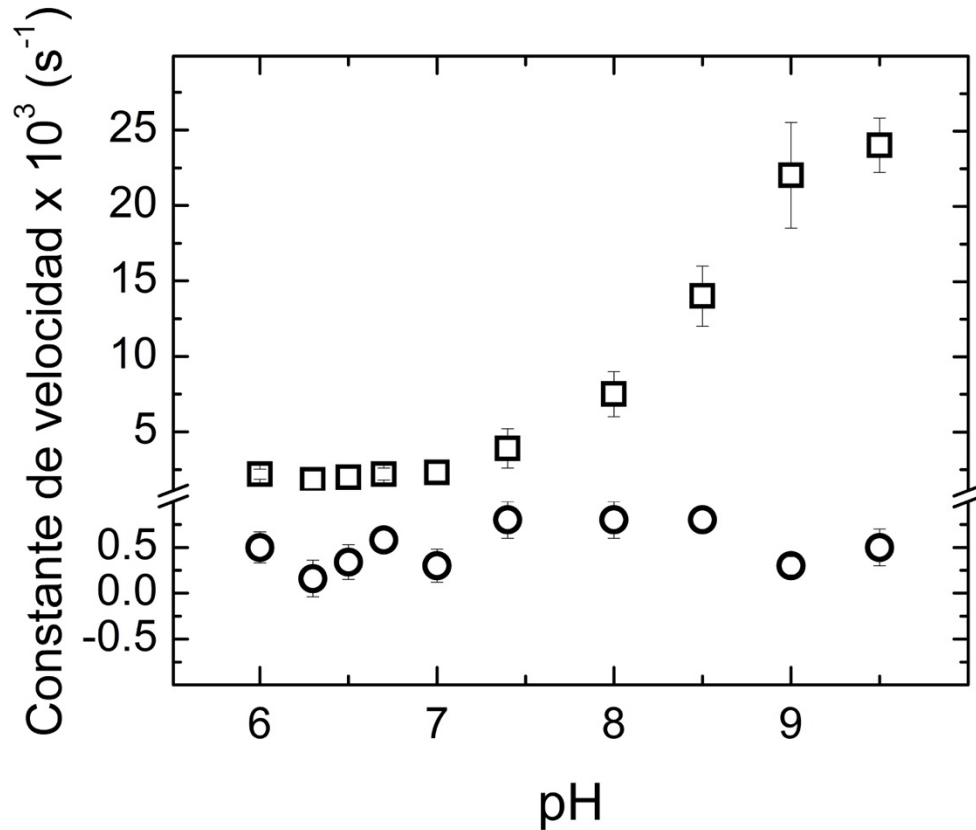


Figura 5.13 Variación de las constantes de velocidad con el pH. Los datos de λ_2 se representan con cuadros y los datos de λ_3 se muestran como círculos. Estos datos fueron determinados de experimentos de cinética a 60°C, siguiendo la señal de DC a 220 nm.

5.6 Estudios de repliegamiento de la γ TIM.

Como se ha reportado previamente en otros estudios [Benítez-Cardoza CG et al., 2001; González- Mondragón E et al., 2004; Reyes-López CA et al., 2008], la cinética de repliegamiento de la γ TIM a una baja concentración de proteína (0.13 - 0.75 μ M), y en un determinado rango de temperatura, es lo suficientemente lenta para ser monitorizada sin recurrir a técnicas de cinética rápidas con salto de temperatura. Utilizando el procedimiento

descrito en la sección de Materiales y Métodos, se siguió la recuperación de la estructura secundaria bajo dos condiciones de pH. Estos estudios tuvieron como objetivo determinar el efecto de la estructura residual nativa de la yTIM desnaturalizada (la cual se observa claramente a pH 6.7) sobre la capacidad de replegamiento de la enzima. Para este propósito, las muestras de yTIM se desplegaron (en la celda del equipo de DC) por 10 minutos a 63.0°C. En estas condiciones se aseguró que ocurriera un 85% (pH 6.7) o un 99% (pH 8.0) de desplegamiento, a juzgar por la señal de elipticidad alcanzada. Después de esto, la solución de proteína se enfrió a 42.0°C para registrar la reacción de replegamiento. La Figura 5.14 muestra que a pH 6.7 la enzima se repliega más rápidamente que a pH 8.0. En ambos casos, sin embargo, los gráficos de replegamiento se ajustan adecuadamente mediante una ecuación de cinética de segundo orden, tal como se determinó previamente [Benítez-Cardoza CG et al., 2001; González-Mondragón E et al., 2004].

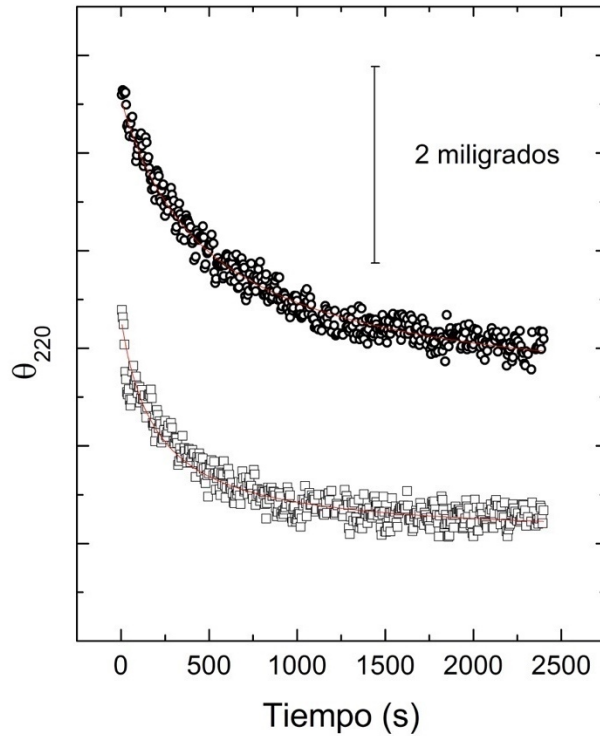


Figura 5.14 Curvas cinéticas de replegamiento de yTIM siguiendo la señal de DC a 220 nm. Los datos mostrados (en miligrados de elipticidad) corresponden a pH 6.7 (trazo inferior) y pH 8.0 (trazo superior). Las muestras de yTIM nativa (con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) fueron llevadas a 63.0°C , manteniendo esta temperatura durante 10 minutos; después se enfriaron hasta 42.0°C y entonces se registró la elipticidad en función del tiempo. Las líneas rojas son el ajuste a una ecuación de segundo orden de los datos experimentales. Los valores de las constantes determinados por los ajustes fueron $6,900$ (pH 6.7) y $2,700$ (pH 8.0) $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$; las amplitudes totales fueron -2.3 (pH 6.7) y -3.0 (pH 8.0) miligrados. En contraste, la diferencia de elipticidad (en miligrados) entre la proteína nativa y la proteína desplegada, en la misma concentración y temperatura, se estimó en -4.5 a -5.0 miligrados.

Por otra parte, para explorar el efecto de la estructura residual sobre la reversibilidad del proceso de desplegamiento y replegamiento las muestras de yTIM fueron desplegadas a 63°C durante diferentes tiempos, siendo enfriadas posteriormente hasta 25°C para registrar los espectros de DC de las muestras replegadas. Con los datos obtenidos se determinó el grado

de irreversibilidad presente en pH 6.7 y 8.0. El análisis de estos resultados se encuentra en la Sección 6.3.

5.7 Dinámica molecular.

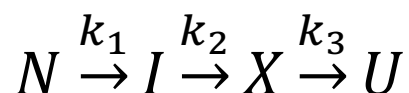
El objetivo de estos estudios (de tipo preliminar) fue determinar si este tipo de metodología proporciona resultados que concuerden con los resultados experimentales que describen las características del proceso de desplegamiento de la proteína. Las simulaciones de dinámica molecular de yTIM se llevaron a cabo a 400K durante 100 ns, seleccionando tres condiciones de pH (6.7, 7.4 y 8.0). Los resultados obtenidos se presentan en la Sección 6.4 (Capítulo VI), donde se discute su relevancia en función del análisis detallado de los datos experimentales.

VI. Análisis y discusión de los resultados.

6.1 Modelo cinético para el desplegamiento (desnaturalización) de yTIM.

Basándose en la forma sigmoïdal de las transiciones térmicas de calentamiento mostradas en la Figura 5.3, podría pensarse que la desnaturalización (desplegamiento) de yTIM obedece un modelo simple de dos estados (formas nativa y desnaturalizada o desplegada de la proteína). Sin embargo, los estudios cinéticos indican claramente la presencia de intermediarios en tal proceso.

El modelo más simple que explicaría los resultados obtenidos al seguir cinéticamente la desnaturalización de yTIM por DC sería el de tres reacciones consecutivas que son operativamente irreversibles (como se mencionó en la sección 5.3.1):



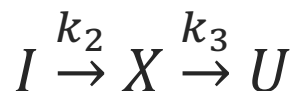
Esquema 1 Modelo cinético para tres reacciones consecutivas.

En el Esquema 1, la yTIM nativa es representada como N y el estado final por U . Este último estado puede ser descrito como una forma que posee estructura residual tipo β (y que aparece gradualmente a valores de pH menores de 8.0) y al que podríamos referirnos también como un estado parcialmente desplegado, o inclusive como un estado mal plegado (*misfolded*); a

pH 8.0 o mayor de 8.0, el estado U sería descrito entonces como un estado térmicamente desplegado, ya que muestra el espectro DC típico de proteínas de tamaño pequeño después de ser desplegadas térmicamente. Entre los estados N y U existirían dos especies intermedias (intermediarios) descritas como I y X . En el modelo propuesto, cada uno de los tres valores de λ determinados a partir de los análisis de los datos en la ecuación 1 (Materiales y Métodos) son idénticos a las constantes microscópicas k_1 , k_2 y k_3 [Gutfreund H, 1995 y Szabo ZG, 1969].

$$y = y_0 + A_1[\exp(-\lambda_1 t) - 1] + A_2[\exp(-\lambda_2 t) - 1] + A_3[\exp(-\lambda_3 t) - 1] \quad (1)$$

Como se ha mencionado, ni la amplitud ni la constante de velocidad de la fase más rápida se pudieron determinar con precisión a partir de experimentos a las temperaturas más bajas estudiadas. Además, esta fase aparentemente se pierde dentro del tiempo muerto de los experimentos realizados a alta temperatura. Afortunadamente, debido a que k_1 parece ser de 15 a 20 veces mayor que k_2 , el primer paso cinético ocurre en una escala de tiempo mucho más corta que los pasos subsecuentes, por lo que puede considerarse cinéticamente separado de los otros eventos, al menos en una primera aproximación. Esto implica que las amplitudes de A_2 y A_3 reflejan cambios involucrados en los pasos $I \rightarrow X \rightarrow U$. Por lo tanto, el modelo cinético puede simplificarse a un modelo de dos pasos (Esquema 2).



Esquema 2 Modelo cinético simplificado que incluye sólo dos pasos de reacciones de primer orden.

Las ecuaciones que describen la evolución en el tiempo de la fracción de cada especie son bien conocidas [Gutfreund H, 1995; Szabo ZG, 1969]. Por otra parte, si la elipticidad característica de cada especie se denota como θ_I , θ_X y θ_U , puede demostrarse que (Apéndice D):

$$(\theta_x - \theta_I)/(\theta_U - \theta_I) = k_3/k_2 - [(k_3 - k_2)/k_2] \times [A_2/(A_2 + A_3)] \quad (5)$$

$$(\theta_U - \theta_X)/(\theta_U - \theta_I) = -[(k_3 - k_2)/k_2] \times [A_3/(A_2 + A_3)] \quad (6)$$

Las dos ecuaciones arriba descritas relacionan las elipticidades características de cada especie intermediaria con los valores de las constantes cinéticas y las amplitudes determinadas experimentalmente. Estas ecuaciones, entonces, se utilizaron para calcular $\frac{\theta_X - \theta_I}{\theta_U - \theta_I}$ y $\frac{\theta_U - \theta_X}{\theta_U - \theta_I}$, las cuales representan los cambios de elipticidad de cada paso del Esquema 2, expresados como fracciones del cambio total. Los cálculos de los cambios fraccionarios se realizaron, de acuerdo las ecuaciones 5 y 6, usando datos obtenidos a pH 6.7 y 8.0. Estas dos condiciones fueron seleccionadas debido a que los espectros DC al final del proceso indican que la proteína desnaturalizada parece tener estructura secundaria residual (tipo β) a pH 6.7, mientras que a pH 8.0 la conformación del estado final sería semejante a la que alcanzan proteínas pequeñas al desplegarse térmicamente. Los resultados de los cálculos para pH 6.7 (Figura 6.1) indican que el grado de desplegamiento que se produce durante el paso $I \rightarrow X$ (normalizado según el cambio total) aumenta de 0.35 a 0.75 en un rango de temperatura de 11°C. Para el paso $X \rightarrow U$, se calculó una disminución en el cambio fraccionario (0.65 a 0.25) dentro del mismo intervalo de temperatura. En primera instancia, parece poco probable que la conformación de las especies intermediarias varíe tan drásticamente dentro de un intervalo

de temperatura tan estrecho. Alternativamente, los resultados de la Figura 6.1 pueden apuntar a la presencia de un intermediario fuera de la vía de desplegamiento (*off-pathway*), o también de rutas de desplegamiento paralelas; en este último caso, sería factible que, por ejemplo, una vía particular predominara a una cierta temperatura y otra vía fuera predominante a otra temperatura diferente.

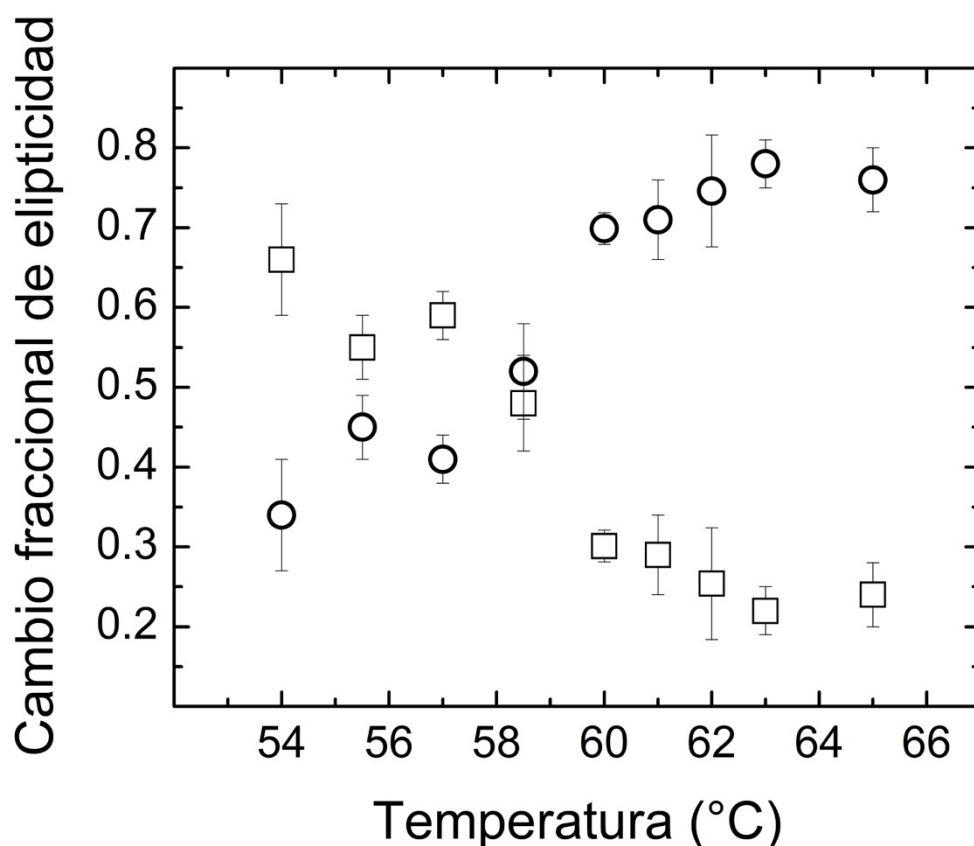


Figura 6.1 Variación con la temperatura de los cambios fraccionarios de elipticidad correspondientes a cada uno de los dos pasos cinéticos en el esquema 2. Los valores de los cambios fraccionarios fueron calculados de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3 usando los valores de las constantes y amplitudes determinadas a pH 6.7. Los datos para el paso $I \rightarrow X$ (esto es, $\frac{(\theta_x - \theta_I)}{(\theta_U - \theta_I)}$) son mostrados con círculos mientras que los datos para el paso $X \rightarrow U$ ($\frac{(\theta_U - \theta_X)}{(\theta_U - \theta_I)}$) son mostrados con cuadrados.

En el caso de pH 8.0, los cambios fraccionarios de elipticidad mostraron un comportamiento semejante al de pH 6.7 (Figura 6.2). Estos resultados señalan que la conformación estructural alcanzada en el estado final no es consecuencia de las características generales del modelo cinético de desnaturalización.

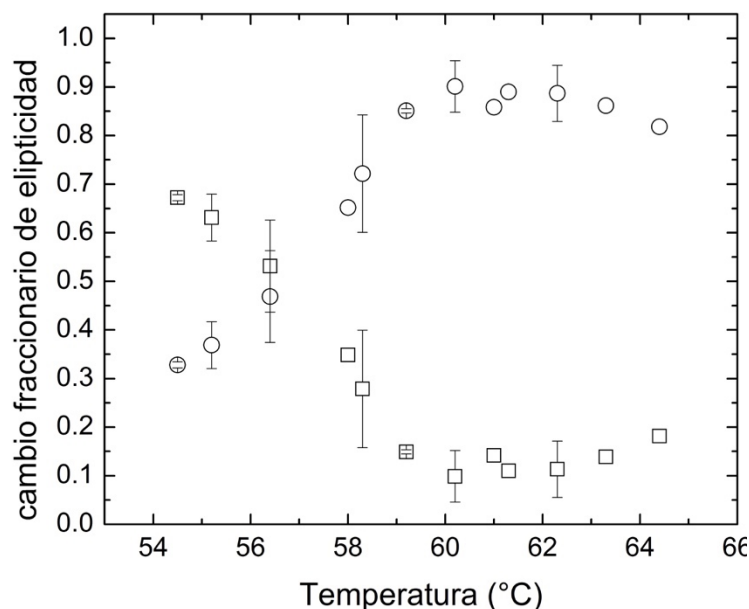


Figura 6.2 Variación de la temperatura de los cambios fraccionarios de elipticidad correspondientes a cada uno de los dos pasos cinéticos en el esquema 2. Los valores de los cambios fraccionarios fueron calculados de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3 usando los valores de las constantes y amplitudes determinadas a pH 8.0. Los datos para el paso $I \rightarrow X$ (esto es, $\frac{(\theta_X - \theta_I)}{(\theta_U - \theta_I)}$) son mostrados con círculos, mientras que los datos para el paso $X \rightarrow U$ (esto es, $\frac{(\theta_U - \theta_X)}{(\theta_U - \theta_I)}$) son mostrados con cuadrados.

Por otra parte, la presencia de vías paralelas parece ser apoyada por los gráficos de Eyring (Figura 5.11, Capítulo V) correspondientes a pH 6.7 y 8.0. En esos valores de pH, en los que la cinética de desnaturalización se estudió en un intervalo relativamente amplio de temperatura, los gráficos de Eyring para k_2 muestran una curvatura apreciable que indica un cambio gradual en la entalpía de activación. Esto podría deberse a la presencia de dos vías

de desplegamiento (con entalpías de activación diferentes) cuya importancia se desplaza de una a la otra, a medida que cambia la temperatura [Zaman MH et al., 2003]. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la curvatura de los gráficos de Eyring podría deberse también a que la capacidad calorífica de activación (ΔC_p^\ddagger) sea significativamente mayor que cero. Un valor positivo de ΔC_p^\ddagger implicaría que en el estado de transición una superficie considerable, originalmente oculta en el estado nativo, ha sido expuesta al disolvente acuoso. Hasta donde conocemos, la presencia de curvatura en un gráfico de Eyring o, alternativamente, de Arrhenius no ha sido reportada para alguna otra TIM.

Es necesario resaltar que los valores de ΔH_2^\ddagger mostrados en la Figura 5.12 (Capítulo V) fueron determinados a partir de datos correspondientes a una zona estrecha de temperatura (60-65 °C, aproximadamente) en la cual se observa linealidad en los gráficos de $\ln(k_2/T)$ vs $1/T$. Además, en dicha zona de temperatura el cambio fraccionario de elipticidad para la etapa $I \rightarrow X$ permanece aproximadamente constante, como puede verse en la Figura 6.1. De esta manera, k_2 y ΔH_2^\ddagger pueden ser asignados a una sola vía de desplegamiento (la vía predominante a mayor temperatura).

6.2 Efecto del pH en las constantes cinéticas.

El efecto del pH en k_2 y k_3 fue estudiado en un intervalo amplio de pH (6.0 a 9.5), con experimentos realizados a una misma temperatura de 60.0°C. Se eligió esta temperatura debido a lo siguiente: en primer lugar, en estas condiciones fue posible determinar los valores

de k_2 dentro del amplio intervalo de pH ya señalado; en segundo lugar, a 60.0°C el desplegamiento parece seguir una vía única (de acuerdo con los cambios fraccionarios de elipticidad de las Figuras 6.1 y 6.2). Los resultados de estos estudios (Figura 5.13, Capítulo V) indican que k_2 aumenta con el pH siguiendo una tendencia sigmoidal semejante a una curva de titulación que responde a la desprotonación de un grupo con pK aproximado de 8.5. Ya que este valor de pK sería cercano al de un grupo tiol de cisteína, puede sugerirse que un residuo aminoácido de este tipo es responsable del comportamiento de k_2 frente al pH. En relación a este punto, ha sido propuesto que la cisteína 126, que es un residuo conservado en la familia de las triosafosfato isomerasas, tiene un papel muy importante en la estabilidad de estas proteínas [González-Mondragón E et al., 2004]. En la referencia antes citada, se demuestra que al sustituir la cisteína 126 de γ TIM por alanina o serina la velocidad de desplegamiento aumenta, proponiéndose que el grupo $-SH$ es importante para la estabilidad de la enzima debido a que forma puentes de hidrógeno con dos residuos que forman parte del núcleo interno (*barrel inner core*) de cada monómero. Entonces, parece ser factible que al desprotonarse este grupo $-SH$ se pierdan o alteren dichos puentes de hidrógeno, conduciendo a una disminución de la estabilidad de la molécula que se vería reflejada en un aumento en la velocidad de desplegamiento.

En contraste con los resultados para k_2 , la variación de k_3 con el pH no mostró una tendencia definida, lo que sugiere que la etapa $X \rightarrow U$ está constituida por múltiples reacciones individuales.

6.3 Efecto del pH en el replegamiento de yTIM.

El primer objetivo de estos estudios fue investigar qué efecto tiene la estructura residual presente en la proteína desnaturalizada (observada a pH 6.7, pero no a pH 8.0) en la velocidad de replegamiento de yTIM. Como puede verse en la Figura 5.14 (Capítulo V), la constante de replegamiento, k_r , es 2.5 veces mayor a pH 6.7 que a pH 8.0, lo cual sugiere que la estructura residual en el estado desnaturalizado favorece de alguna manera la recuperación de estructura nativa.

En otros estudios se exploró el efecto de la estructura residual en la capacidad o eficiencia de replegamiento de yTIM. Para este fin se realizaron los experimentos mencionados en la Sección 5.6, cuyos resultados se presentan en la Figura 6.3 en la forma de un “observable” que representa el grado de irreversibilidad:

$$\text{irreversibilidad} = (\theta_{\text{renat}} - \theta_{\text{nativa}}) / \theta_{\text{nativa}}$$

En esta expresión, θ_{nativa} es la señal de elipticidad (220 nm, 25.0°C) de la yTIM nativa, mientras que θ_{renat} representa la elipticidad recuperada por una muestra de la enzima que fue sometida a una temperatura de 63.0 °C durante diferentes tiempos y posteriormente enfriada a 25 °C, registrándose entonces su espectro DC. Es evidente que mientras mayor sea la diferencia ($\theta_{\text{renat}} - \theta_{\text{nativa}}$), mayor será el número de moléculas de yTIM que perdieron la capacidad de replegarse.

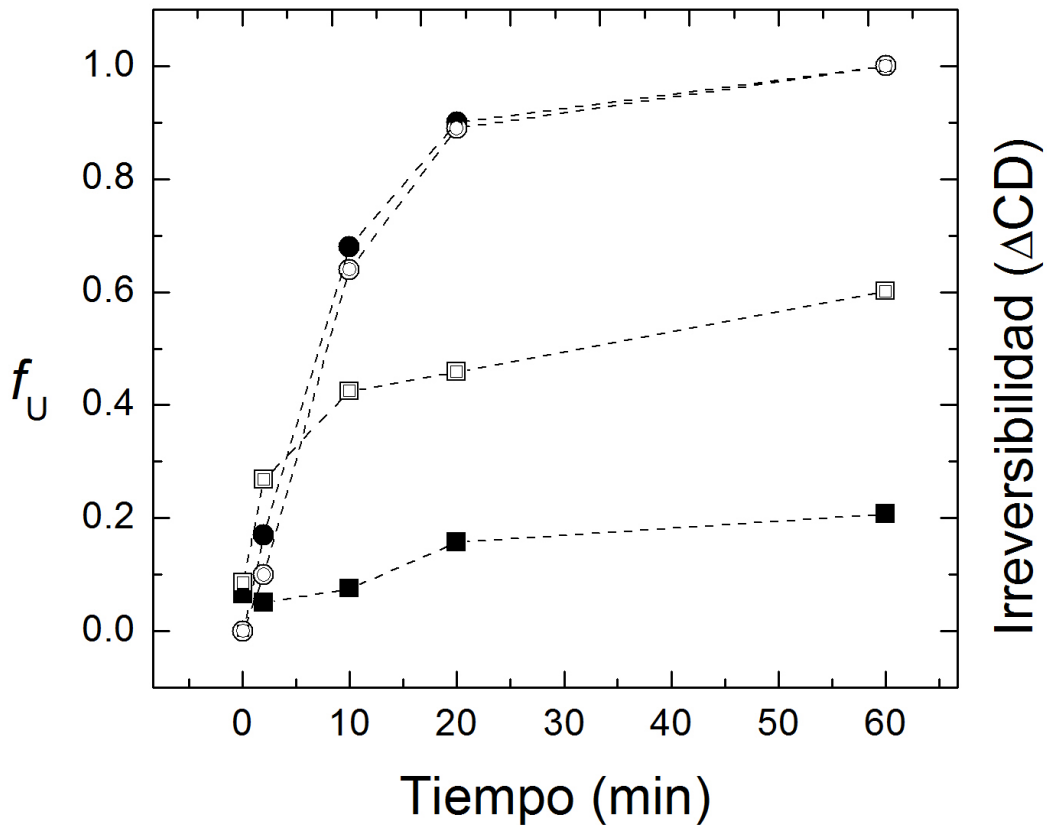


Figura 6.3 Efecto del tiempo de incubación (despliegamiento) en la capacidad de repliegamiento de yTIM. Muestras de yTIM fueron desplegadas (63.0°C) durante diferentes tiempos y después enfriadas rápidamente a 25°C para obtener su espectro de DC. Los datos de irreversibilidad son representados por cuadrados vacíos (pH 6.7) y por cuadrados sólidos (pH 8.0). Los círculos vacíos (pH 6.7) y los sólidos (pH 8.0) corresponden a la fracción de proteína desplegada en cada tiempo.

Los datos de la Figura 6.3 indican que, para un mismo tiempo de incubación a 63.0°C, la irreversibilidad es mayor a pH 6.7 que a pH 8.0, pudiendo pensarse entonces que la estructura residual en la enzima desnaturalizada (presente a pH 6.7) disminuye la capacidad de repliegamiento. Sin embargo, recordando que las constantes k_2 y k_3 cambian con el pH, el análisis de irreversibilidad debe compararse con la evolución en el tiempo de los estados que

aparecen en el modelo de desnaturalización (a 63.0°C), siendo importante en particular la formación del estado final del proceso. El valor de f_U (ver Esquema 2) en función del tiempo fue calculado a partir de la ecuación A3 en el Apéndice I, usando para ello los valores de las constantes cinéticas k_2 y k_3 determinados experimentalmente a 63.0°C, en ambas condiciones de pH. En la Figura 6.3 se presentan también estos resultados. Como puede observarse, el aumento de f_U ocurre casi paralelamente con la irreversibilidad en pH 6.7; sin embargo, en pH 8.0 la aparición de irreversibilidad muestra un retardo en comparación con f_U . Más aún, con un tiempo de incubación (a 63.0°C) de 60 min, la irreversibilidad es considerablemente menor a pH 8.0 que a pH 6.7, a pesar de que a este tiempo $f_U \approx 1.0$ para los dos valores de pH. Estos resultados son indicio de que el estado final alcanzado a pH 6.7, el cual muestra estructura residual, es altamente propenso a participar en reacciones que conducen a la irreversibilidad. En contraste, el estado desplegado térmicamente que se forma a pH 8.0, y que no presenta estructura residual aparente, sería menos propenso a la irreversibilidad.

Como se ha mencionado anteriormente, la evidencia experimental colectada en este trabajo apunta a que la etapa $X \rightarrow U$ no es una reacción elemental sino que está constituida por múltiples reacciones individuales. Algunas reacciones tardías de esta etapa conducen a la pérdida de la capacidad de replegamiento, probablemente debido a una asociación no específica entre los monómeros de la γ TIM y una posterior formación de agregados de gran tamaño (Figura 5.9); sin embargo, es razonable pensar que estos eventos no involucran cambios significativos en la conformación secundaria de los monómeros y, por lo tanto, son eventos “silenciosos” en mediciones de la señal de DC.

En resumen, los resultados y discusión de esta sección indican que la γ TIM se repliega más rápidamente a partir del estado desnaturalizado con estructura residual, aunque tal estado disminuye la eficiencia de replegamiento (esto es, la cantidad de enzima que puede recuperar su estructura nativa) con respecto a lo que ocurre cuando el estado final no forma estructura residual. Podría pensarse, entonces, que en ciertas condiciones (pH ca. 7.0, 37.0°C) la ventaja de un replegamiento rápido supera el obstáculo que representa una menor eficiencia de replegamiento. Más aún, debido a que la irreversibilidad parece estar relacionada al tiempo que el estado desplegado (desnaturalizado) permanece a temperaturas relativamente altas [Benítez-Cardoza CG et al., 2001], el problema de una baja eficiencia de replegamiento podría ser de poca importancia para organismos mesófilos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (siempre y cuando no sea sometida a un estrés térmico). En relación con estas observaciones, se debe destacar que, en un artículo reciente [Romero-Romero S et al., 2015] han propuesto que la reversibilidad en el replegamiento de algunas enzimas TIM parece estar correlacionada con la ausencia de estructura residual en el estado desplegado y con una baja temperatura de desplegamiento, entre otros factores.

6.4 Predicción de estructura residual en simulaciones de dinámica molecular.

Como un complemento de la investigación experimental, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el fin de discernir si esta metodología podía reproducir algunos de los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de desnaturalización (desplegamiento) de la γ TIM. Específicamente, se pretendía explorar la formación del estado desnaturalizado con estructura residual tipo β que empieza a aparecer a pH menor de 8.0 (ver espectros DC

en la Figura 5.4). Es conveniente mencionar que hay evidencia experimental que indica que en algunas proteínas, tanto termófilas como mesófilas, la estructura β es resistente al aumento de temperatura [Toledo-Núñez C et al., 2012; Ausili A et al., 2005], mientras que en otros casos, como la apomioglobina, este tipo de estructura parece formarse a temperatura elevada [Privalov PL et al., 1989], como resultado de una transición tipo $\alpha \rightarrow \beta$ [Fabiani E et al., 2009]. Según nuestros resultados, este tipo de transición ocurre al desnaturizar la yTIM a pH menor de 8.0. Por otra parte, en simulaciones de dinámica molecular se ha encontrado que ciertos péptidos y proteínas con estructura tipo α -hélice sufren cambios que transforman su conformación secundaria a un tipo β [GC JB et al., 2014; Kaur H et al., 2013].

Las simulaciones de dinámica molecular de yTIM se llevaron a cabo a 400K durante 100 ns, seleccionando tres condiciones de pH (6.7, 7.4 y 8.0). Los resultados, que se presentan en la Figura 6.4, indican que a los 75-80 ns la estructura de α -hélice se ha perdido por completo sin importar el pH impuesto en la simulación. En contraste, las tres simulaciones muestran un aumento de estructura β , si bien dicho aumento parece ser ligeramente menor en pH 8.0. Los resultados de las simulaciones son alentadores en el sentido de que predicen que la yTIM muestra una tendencia a experimentar una transición $\alpha \rightarrow \beta$ al desnaturizarse térmicamente; sin embargo, el método de dinámica molecular usado no distingue adecuadamente lo que ocurre cuando la proteína se desnaturiza a pH 6.7 en comparación a cuando lo hace a pH 8.0. Una razón para lo anterior podría ser que la carga eléctrica asignada a cada pH (la cual depende de los pK de los residuos protonables) se conserva durante la simulación, mientras que en realidad ésta podría cambiar durante el proceso de desplegamiento, ya que el pK de un residuo protonable depende del ambiente molecular en el que se encuentra el residuo.

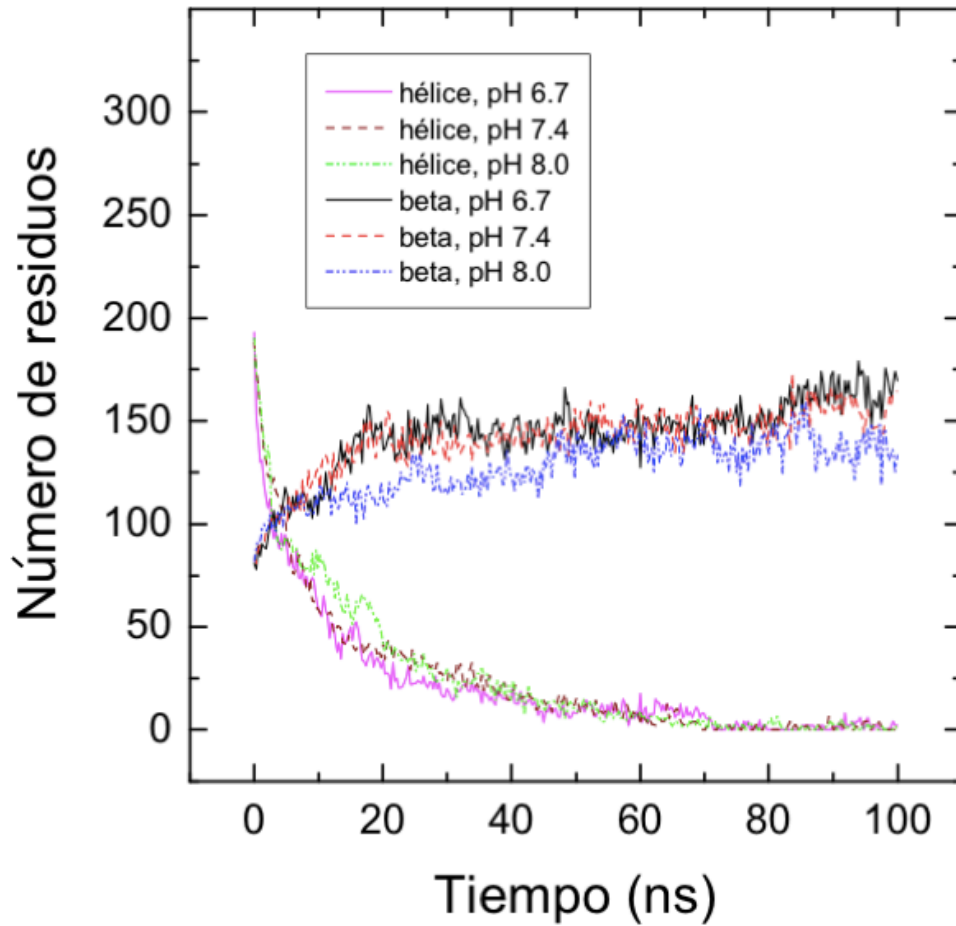
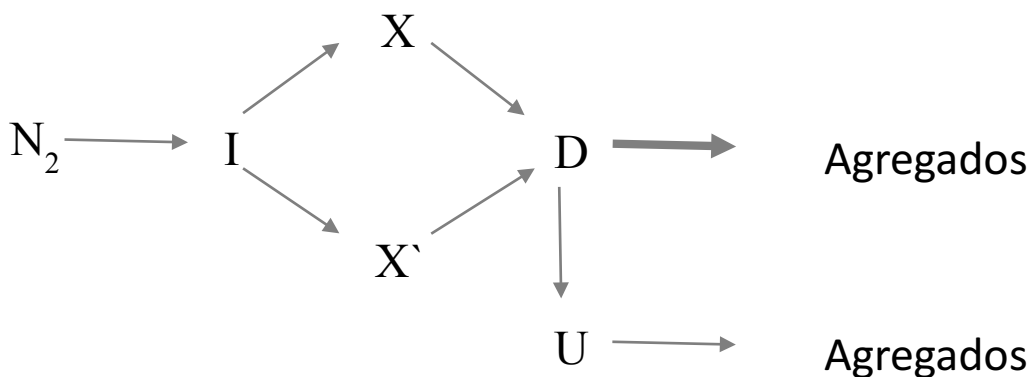


Figura 6.4 Simulación de dinámica molecular del proceso de desdoblamiento a 400 K de la yTIM. Las líneas sólidas describen el comportamiento de las hojas beta y las líneas punteadas a las hélices alfa con respecto del tiempo a los pH 6.7, 7.4 y 8.0.

Tomando en cuenta la información presentada y discutida en los párrafos anteriores de este capítulo, un modelo cinético más completo para el desplegamiento (desnaturalización) de yTIM se presenta en el Esquema siguiente:



Esquema 3 Modelo propuesto para el desdoblamiento de la yTIM.

En este esquema N_2 representa el dímero nativo de yTIM, I y X representan estados intermedios parcialmente desplegados, mientras que D y U simbolizan, respectivamente, la forma desnaturalizada con estructura residual tipo β y el estado térmicamente desplegado (ambos monoméricos). Con la información obtenida en este trabajo no es posible inferir cuál es el estado oligomérico de los intermedios I y X . Las reacciones que conducen a la pérdida de la capacidad de repliegamiento (irreversibilidad), probablemente debido a una asociación no específica, y eventualmente a la agregación, son representada por las flechas que aparecen en la parte derecha del Esquema 3; la flecha resaltada en negrilla significa que las reacciones de este tipo ocurren más rápidamente a partir del estado D que del U .

VII. Conclusiones y perspectivas.

7.1 Conclusiones.

Del análisis de los resultados experimentales obtenidos por el proceso de desplegamiento/replegamiento de la yTIM se desprenden las siguientes conclusiones principales.

1. Las transiciones estructurales de desplegamiento de la enzima, inducidas por cambios en la temperatura y seguidas mediante un registro continuo de la elipticidad, muestran un comportamiento sigmoideal que sugiere la ausencia de intermediarios en la vía *dímero nativo* → *monómeros desplegados*. La temperatura media de desplegamiento cambia con el pH, indicando que esta variable tiene un efecto sobre la estabilidad cinética de la yTIM. De la misma manera, las transiciones de replegamiento indican que el pH afecta la capacidad de replegamiento.
2. Considerando los espectros de dicroísmo circular, a valores de pH mayores de 8.0 la forma térmicamente desplegada de la yTIM tiene la conformación típica del estado desplegado que alcanzan proteínas pequeñas a alta temperatura. Sin embargo, cuando el pH es menor de 8.0 se aprecian características espectrales en el estado desnaturalizado que sugieren que ocurre una transición tipo $\alpha \rightarrow \beta$; esto es, el estado final es una forma parcialmente desplegada, con estructura residual, que es propensa a sufrir reacciones de agregación u oligomerización no específica.

3. A pesar de la forma sigmoideal simple de las transiciones inducidas por calentamiento, los estudios cinéticos, realizados a temperatura constante, indican la presencia de hasta tres fases cinéticas en el desplegamiento de yTIM. El análisis de las curvas cinéticas, así como del efecto de la temperatura en las constantes de reacción, sugieren que esta proteína sigue un mecanismo de desplegamiento secuencial, pero en el cual existen vías paralelas; este mecanismo está presente independientemente de si el estado final tiene estructura residual o no.
4. El estado final al que llega la enzima al ser desplegada a alta temperatura tiene una influencia notable tanto en la velocidad como en la eficiencia del replegamiento. Cuando el replegamiento se induce (por disminución de la temperatura), se observa una velocidad de replegamiento mayor, pero una menor eficiencia del replegamiento, cuando este proceso inicia a partir del estado desnaturalizado con estructura residual tipo β , que cuando lo hace del estado térmicamente desplegado típico.
5. Un modelo del desplegamiento de yTIM que toma en cuenta y resume las conclusiones anteriores se presenta en el Esquema III del Capítulo VI.
6. Las simulaciones preliminares de dinámica molecular sugieren que la yTIM muestra una tendencia a experimentar una transición $\alpha \rightarrow \beta$ al desnaturalizarse térmicamente en un intervalo de pH entre 6.7 y 8.0. En otras palabras, estos resultados concuerdan con las observaciones experimentales a pH 6.7, pero no a pH 8.0.

7.2 Perspectivas.

Para un futuro inmediato, una investigación importante sería realizar simulaciones de dinámica molecular de forma más amplia y detallada del desplegamiento de γ TIM. El objetivo de estos estudios sería establecer condiciones en las que los resultados de las simulaciones concuerden con las observaciones experimentales más importantes. Específicamente, se podrían probar varias temperaturas e intervalos de pH, buscando que las simulaciones reproduzcan la formación de estados finales con diferentes características estructurales. Un segundo objetivo sería determinar si la evolución en el tiempo de las diferentes clases de estructura secundaria que predicen las simulaciones concuerda con una sola o con más fases cinéticas. Hasta donde conocemos, los métodos de dinámica molecular aplicados a la descripción del desplegamiento de las proteínas no han sido probados en estos niveles de detalle.

Por otra parte, sería interesante tratar de determinar, experimentalmente, el estado de asociación de los intermediarios I y X de la vía de desplegamiento. Para este fin, podrían realizarse estudios cinéticos de desplegamiento, y posterior replegamiento, a concentraciones mayores de la γ TIM y en temperaturas menores a las aquí estudiadas.

Otra ramificación del trabajo realizado consistiría en el estudio detallado del efecto del pH, así como del tiempo de residencia a alta temperatura, en la eficiencia del replegamiento. El objetivo en este caso sería establecer mecanismos para los fenómenos de asociación no específica que conducen a la irreversibilidad, y también establecer que clases de residuos de

aminoácidos podrían estar involucrados en estos mecanismos. Posteriormente, estos estudios podrían afinarse mediante la preparación de mutantes específicas de la enzima.

VIII. Referencias.

1. Aghera N, Udgaonkar JB. The utilization of competing unfolding pathways of monellin is dictated by enthalpic barriers. *Biochemistry*. 2013;52(34): 5770-5779.
2. Albery WJ y Knowles JR. Efficiency and evolution of enzyme catalysis. *Angewandte Chemie*, 1977, 16(5), pp 285-293.
3. Albery WJ, Knowles JR. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry*, 1976, 15 (25), pp 5631-5640.
4. Arroyo-Reyna A, Hernández-Arana A. The thermal unfolding of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;1248:123-128.
5. Baldwin RL. On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding & Design*. 1996;1: R1-R8.
6. Benítez-Cardoza CG, 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.

7. Benítez-Cardoza CG. Estudio del desplegamiento de la triosafosfato isomerasa humana. Tesis de maestría en Ciencias (Química), 1997. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
8. Blacklow SC, Raines RT, Lim WA, Zamore PD, Knowles JR. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by ^{31}P NMR. *Biochemistry* 1988, 27, 1158-1167.
9. Blancas-Mejía LM, Tischer A, Thompson JR, Tai J, Wang L, Auton M, Ramirez-Alvarado M. Kinetic control in protein folding for light chain amyloidosis and the differential effects of somatic mutations. *Journal of Molecular Biology*. 2014;426:347-361.
10. Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Mendoza-Hernández G, Gómez-Puyou A, Perez-Montfort R. Key Residues of Loop 3 in the Interaction with the Interface Residue at Position 14 in Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*. 2008;47:3499-3506.
11. Campbell ID, Dwek RAR. *Biological Spectroscopy*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company;1984.
12. Creighton TE. The protein folding problem. *Mechanisms of Protein Folding*. Pain RH. (ed.) Oxford University Press. EUA. 1994, p.p. 1-25.

13. Davenport RC, Bash PA, Seaton BA, Karplus M, Petsko GA, Ringe D. Structure of the triosephosphate isomerase phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* 1991;30(24):5821-6.
14. Dhaunta N, Arora K, Chandrayan SK, Guptasarma P. Introduction of a thermophile-sourced ion pair network in the fourth beta/alpha unit of a psychrophile-derived triosephosphate isomerase from *Methanococcoides burtonii* significantly increases its kinetic thermal stability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1834:1023-1033.
15. Dragan AI, Potekhin SA, Sivolob A, Lu M, Privalov PL. Kinetics and thermodynamics of the unfolding and refolding of the three-stranded R-helical coiled coil, Lpp-56. *Biochemistry*. 2004;43:14891-14900.
16. Dragan AI, Potekhin SA, Sivolob A, Lu M, Privalov PL. Kinetics and thermodynamics of the unfolding and refolding of the three-stranded R-helical coiled coil, Lpp-56. *Biochemistry*. 2004;43:14891-14900.
17. Ferguson N, Fersht A. Early events in protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003;13: 75-81.
18. GC JB, Bhandari YR, Gerstman BS, Chapagain PP. Molecular Dynamics Investigations of the α -Helix to β -Barrel Conformational Transformation in the RfaH Transcription Factor. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014;118:5101-5108.

19. González-Mondragón E, Zubillaga RA, Saavedra E, Chánez-Cárdenas ME, Pérez-Montfort R, Hernández-Arana A. Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*. 2004;43:3255-3263.
20. Gutfreund H. Kinetics for the life sciences. Receptors, Transmitters and Catalysts. Cambridge: Cambridge University Press;1995.
21. Guzman-Luna V, Garza-Ramos G. The folding pathway of glycosomal triosephosphate isomerase: Structural insights into equilibrium intermediates. *Proteins*. 2012;80:1669-1682.
22. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije J GEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 1997;18:1463-1472.
23. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008;4(3):435-447.
24. Kamagata K, Arai M, Kuwajima K. Unification of the folding mechanisms of non-two state and two-state proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2004;339: 951-965.

25. Kaur H, Sasidhar YU. Molecular dynamics study of an insertion/duplication mutant of bacteriophage T4 lysozyme reveals the nature of α - β transition in full protein context. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013;15:7819-7830.
26. Knowles, J. R. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*. 1991;350:121-124.
27. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and interpretation of protein pKa values. *Proteins*. 2005;61:704-721.
28. Lolis E y Petsko GA. Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry*, 1990, 29(28), pp 6619-6625.
29. Lolis E, Albert T, Davenport DR, Rose D, Hartman FC, Petsko AG. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*. 1990;29(28): pp 6609-6618.
30. Longo DL. Harrison: Principios de medicina interna. Mecanismos moleculares de la patogenia bacteriana. Volumen 1. Editado por McGraw Hill. México; 2012 p. 1013-1023.
31. Manavalan P, Johnson WC. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature*. 1983 305:831-832.

32. Mixcoha-Hernández E, Moreno-Vargas LM, Rojo-Domínguez A, Benítez-Cardoza CG. Thermal-unfolding reaction of triosephosphate isomerase from trypanosoma cruzi. *Protein Journal*. 2007;26:491-498.
33. Norton IL, Hartman FC. Haloacetol phosphates. A comparative study of the active sites of yeast and muscle triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 1972;11: 4435-4441.
34. Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*. 2004;25(13):1656-1676.
35. Pan H, Raza AS, Smith DL. Equilibrium and Kinetic Folding of Rabbit Muscle Triosephosphate Isomerase by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Journal of Molecular Biology*. 2004;336:1251-1263.
36. Pearce MC, Cabrita LD, Rubin H, Gore MG, Bottomley SP. Identification of residual structure within denatured antichymotrypsin: implications for serpin folding and misfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324: 729-735.

37. Privalov PL, Tiktopulo EI, Venyaminov SY, Griko YV, Makhatadze GI, Khechinashvili, NN. Heat capacity and conformation of proteins in the denatured State. *Journal of Molecular Biology*. 1989;205:737-750.
38. Reyes-López CA, González-Mondragón E, Benítez-Cardoza CG, Chánez-Cárdenas ME, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Hernández-Arana A. The conserved salt bridge linking two C-terminal b/a units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins*. 2008;72(3):972-979.
39. Romero-Romero S, Costas Miguel, Rodríguez-Romero A, Fernández-Velazco DA. Reversibility and two state behavior in the thermal unfolding of oligomeric TIM barrel proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015; 17:20699-20714.
40. Rozacky EE, Sawyer TH, Barton RA, Gracy RW. Studies of human triosephosphate isomerase: isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1971;146: 312-320.
41. Samanta M, Banerjee M, Murthy MRN, Balaram H, Balaram P. Probing the role of the fully conserved Cys 126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis— distal effects on dimer stability. *FEBS Journal*. 2011;278:1932-1943.

42. Sánchez IE, Kiefhaber T. Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *Journal of Molecular Biology*. 2003;325: 367-376.
43. Sawano M, Yamamoto H, Ogasahara K, Kidokoro S, Katoh S, Ohnuma T, Katoh E, Yokoyama S, Yutani K. Thermodynamic basis for the stabilities of three CutA1s from *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus*, and *Oryza sativa*, with unusually high denaturation temperatures. *Biochemistry*. 2008;47:721-730.
44. Shirley BA. Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Protein Stability and Folding. Theory and Practice*. Edited by Shirley BA. Totowa: Humana Press;1995. p.177- 190.
45. Szabo ZG. Kinetic characterization of complex reaction systems. In *Comprehensive Chemical Kinetics. Volume 2*. Edited by Bamford CH, Tipper CFH. Amsterdam: Elsevier;1969. p. 1-80.
46. Thornton JM. The end point of the folding path way. *Protein Structures. Protein Folding*. Editor Creighton, T.E. W.H. Freeman and Company. EUA 1992. p.p.1-58.
47. Travaglini-Allocatelli C, Ivarsson Y, Jemth P, Gianni S. Folding and stability of globular proteins and implications for function. *Current Opinion in Structural Biology*. 2009;19: 3-7

48. Trentham DR, McMurray CH, Pogson CI. The active Chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochemical Journal*. 1969, 114: 19-24.
49. Tsong TY. Detection of three kinetic phases in the thermal unfolding of ferricytochrome c. *Biochemistry*. 1973;12:2209-2214.
50. Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. *Principles of Physical Biochemistry*. Upper Saddle River: Prentice Hall International;1998.
51. Vázquez-Contreras E, Zubillaga RA, Mendoza-Hernández G, Costas M, Fernández-Velasco DA. Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein and Peptide Letters*. 2000, 7:57-64.
52. Vázquez-Pérez AR, Fernández-Velasco DA. Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: the monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoebahistolytica*. *Biochemistry*. 2007;46:8624-8633.

53. Wong KB, Clarke J, Bond CJ, JoseÂ Luis Neira J, Freund SMV, Fersht AR, Daggett V. Towards a Complete Description of the Structural and Dynamic Properties of the Denatured State of Barnase and the Role of Residual Structure in Folding. *Journal of Molecular Biology*. 2000;296: 1257-1282.
54. Zaman MH, Sosnick TR, Berry RS. Temperature dependence of reactions with multiple pathways. *Phys Chem Chem Phys*. 2003;5:2589-2594.
55. Zamorano-Carrillo A, Carrillo-Vázquez JP, Chimal-Vega B, Daniel-García Oscar, López Cruz RI, Maya-Martínez RC, Mirasol-Meléndez E, Benítez-Cardoza CG. Protein Folding. How homodimeric proteins fold and assembly? Eric C Walters. Nova Publishers, 2010: 217-260.

IX. Apéndice I.

Derivación de las ecuaciones 5 y 6 en el texto principal.

Si se considera un modelo cinético con dos reacciones consecutivas irreversibles, como el modelo del Esquema 1 en el texto, $N \rightarrow I \rightarrow X \rightarrow U$, las ecuaciones que expresan la variación en el tiempo de la concentración de las especies moleculares involucradas (I, X y U) se pueden encontrar en la literatura [Gutfreund H, 1995 y Szabo ZG, 1969]. Dichas ecuaciones pueden modificarse fácilmente para expresar las fracciones de cada especie molecular (esto es, f_I , f_X , y f_U). Las ecuaciones A1, A2 y A3 son las funciones que indican cómo cambian tales fracciones:

$$f_I = \exp(-k_2 t) \quad (A1)$$

$$f_X = [k_2 / (k_3 - k_2)] [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_3 t)] \quad (A2)$$

$$f_U = 1 - [1 / (k_3 - k_2)] [k_3 \exp(-k_2 t) - k_2 \exp(-k_3 t)] \quad (A3)$$

Ahora bien, a cualquier tiempo, t , el valor de la elipticidad, θ , estará dado por

$$\theta = \theta_I f_I + \theta_X f_X + \theta_U f_U \quad (A4)$$

donde θ_I , θ_X , y θ_U son los valores característicos de θ para los estados I, X y U, respectivamente. Si en la ecuación A4 se sustituyen los valores de f_I , f_X , y f_U dados por (A1), (A2) y (A3), se obtiene la expresión siguiente,

$$\begin{aligned} \theta = & \theta_I \exp(-k_2 t) + \theta_X [k_2 / (k_3 - k_2)] [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_3 t)] \\ & + \theta_U \{1 - [1 / (k_3 - k_2)] [k_3 \exp(-k_2 t) - k_2 \exp(-k_3 t)]\} \end{aligned}$$

Después de factorizar los términos exponenciales comunes, la ecuación previa puede escribirse como

$$\begin{aligned} \theta = & \{\theta_1 + \theta_X [k_2/(k_3 - k_2)] - \theta_U [k_3/(k_3 - k_2)]\} \exp(-k_2t) \\ & + \{\theta_U [k_2/(k_3 - k_2)] - \theta_X [k_2/(k_3 - k_2)]\} \exp(-k_3t) + \theta_U \end{aligned} \quad (A5)$$

Rearreglando la ecuación A5 se obtiene:

$$\begin{aligned} \theta - \theta_1 = & \{(\theta_X - \theta_1) [k_2/(k_3 - k_2)] - (\theta_U - \theta_1) [k_3/(k_3 - k_2)]\} \exp(-k_2t) \\ & + (\theta_U - \theta_X) [k_2/(k_3 - k_2)] \exp(-k_3t) + (\theta_U - \theta_1) \end{aligned} \quad (A6)$$

Si ambos lados de (A6) se dividen entre $\theta_U - \theta_1$ (que es igual al cambio total observado en la elipticidad) se obtiene la ecuación A7, que expresa el cambio fraccionario de θ en función del tiempo.

$$\begin{aligned} (\theta - \theta_1)/(\theta_U - \theta_1) = & \{(\theta_X - \theta_1)/(\theta_U - \theta_1) [k_2/(k_3 - k_2)] - k_3/(k_3 - k_2)\} \exp(-k_2t) \\ & + (\theta_U - \theta_X)/(\theta_U - \theta_1) [k_2/(k_3 - k_2)] \exp(-k_3t) + 1 \end{aligned} \quad (A7)$$

Por otra parte, la ecuación 2 del Capítulo IV, que fue usada para el análisis de los datos experimentales, se convierte en la ecuación A8 cuando los datos se refieren a medidas de elipticidad.

$$\theta = \theta_0 + A_1[\exp(-\lambda_1t) - 1] + A_2[\exp(-\lambda_2t) - 1] + A_3[\exp(-\lambda_3t) - 1] \quad (A8)$$

Sin embargo, debido a que la primera fase cinética está prácticamente desacoplada de las otras dos fases, sólo los dos últimos términos exponenciales se conservaron para el análisis. Tomando esto en consideración, la ecuación A8 se puede modificar para expresar el cambio fraccionario como:

$$(\theta - \theta_0)/(\theta_f - \theta_0) = [-A_2/(A_2 + A_3)] \exp(-\lambda_2t) + [-A_3/(A_2 + A_3)] \exp(-\lambda_3t) + 1 \quad (A9)$$

donde $\theta_f - \theta_0 = -(A_2 + A_3)$ es igual al cambio total de θ asociado con los dos últimos términos exponenciales en (A9). Recordando que para un modelo secuencial $\lambda_2 = k_2$ y $\lambda_3 = k_3$, y ya que $\theta_0 = \theta_I$ and $\theta_f = \theta_U$, entonces la comparación de (A7) y (A9) nos conduce a lo siguiente:

$$-A_2/(A_2 + A_3) = (\theta_X - \theta_I)/(\theta_U - \theta_I) [k_2/(k_3 - k_2)] - k_3/(k_3 - k_2)$$

y
$$-A_3/(A_2 + A_3) = (\theta_U - \theta_X)/(\theta_U - \theta_I) k_2/(k_3 - k_2)$$

A partir de las dos últimas ecuaciones se pueden calcular los cambios fraccionarios de la elipticidad, a partir de las amplitudes $A_2 + A_3$, determinadas del análisis de los datos cinéticos, como sigue:

$$(\theta_X - \theta_I)/(\theta_U - \theta_I) = k_3/k_2 - [(k_3 - k_2)/k_2] [A_2/(A_2 + A_3)] \quad (\text{A10})$$

$$(\theta_U - \theta_X)/(\theta_U - \theta_I) = - [(k_3 - k_2)/k_2] [A_3/(A_2 + A_3)] \quad (\text{A11})$$

Las ecuaciones A10 y A11 son las ecuaciones (5) y (6) que se encuentran en el Capítulo VI.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Complex kinetics and residual structure in the thermal unfolding of yeast triosephosphate isomerase

Ariana Labastida-Polito¹, Georgina Garza-Ramos², Menandro Camarillo-Cadena¹, Rafael A. Zubillaga¹ and Andrés Hernández-Arana^{1*}

Abstract

Background: *Saccharomyces cerevisiae* triosephosphate isomerase (yTIM) is a dimeric protein that shows noncoincident unfolding and refolding transitions (hysteresis) in temperature scans, a phenomenon indicative of the slow forward and backward reactions of the native-unfolded process. Thermal unfolding scans suggest that no stable intermediates appear in the unfolding of yTIM. However, reported evidence points to the presence of residual structure in the denatured monomer at high temperature.

Results: Thermally denatured yTIM showed a clear trend towards the formation of aggregation-prone, β -strand-like residual structure when pH decreased from 8.0 to 6.0, even though thermal unfolding profiles retained a simple monophasic appearance regardless of pH. However, kinetic studies performed over a relatively wide temperature range revealed a complex unfolding mechanism comprising up to three observable phases, with largely different time constants, each accompanied by changes in secondary structure. Besides, a simple sequential mechanism is unlikely to explain the observed variation of amplitudes and rate constants with temperature. This kinetic complexity is, however, not linked to the appearance of residual structure. Furthermore, the rate constant for the main unfolding phase shows small, rather unvarying values in the pH region where denatured yTIM gradually acquires a β -strand-like conformation. It appears, therefore, that the residual structure has no influence on the kinetic stability of the native protein. However, the presence of residual structure is clearly associated with increased irreversibility.

Conclusions: The slow temperature-induced unfolding of yeast TIM shows three kinetic phases. Rather than a simple sequential pathway, a complex mechanism involving off-pathway intermediates or even parallel pathways may be operating. β -strand-type residual structure, which appears below pH 8.0, is likely to be associated with increased irreversible aggregation of the unfolded protein. However, this denatured form apparently accelerates the refolding process.

Background

It is now accepted that many proteins fold and unfold following complex kinetic models [1]. The most detailed kinetic studies of conformational change have been performed on small monomeric proteins by means of rapid mixing or fast temperature jumps, because protein molecules of this sort usually unfold reversibly but with

relaxation times ranging from less than a millisecond to a few seconds [2–4]. Previous studies have demonstrated the presence of transiently populated intermediates, apart from the native and unfolded end-states [1, 3]. Intermediate states may be found either on- or off-pathway, and their interconnections may even result in the consolidation of parallel, competing folding-unfolding pathways [5, 6]. Furthermore, the combination of experimental studies and molecular dynamics simulations has provided detailed structural descriptions of the multiple intermediates and transition states involved [7]. Recently, strong emphasis has been placed on the structural characterization of

* Correspondence: aha@xanum.uam.mx

¹Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa D.F. 09340, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

unfolded states, because the presence of residual, native-like structure in parts of an otherwise unfolded polypeptide chain may be implicated in the speed of folding, as well as in the formation of misfolded molecules [8, 9].

However, there are examples of proteins that show very slow unfolding-refolding kinetics in the transition region (i.e., under conditions where the native and unfolded states are both significantly populated at equilibrium). Specifically, when unfolding is promoted by adding GuHCl or urea, slow-unfolding proteins take days to weeks to equilibrate, whereas for fast-unfolding proteins under similar conditions, equilibrium is reestablished in just a few hours [10–12]. Thus, if incubation times in the denaturing agent are not long enough, a slow-unfolding protein would display noncoincident unfolding and refolding profiles as the concentration of denaturing agent is varied (hysteresis). Likewise, hysteresis has been nicely demonstrated in the temperature-induced transitions of at least four proteins: an immunoglobulin light chain (monomer) [13], the Lpp-56 three-stranded α -helical coiled coil [14], and two dimeric triosephosphate isomerases [15, 16]. In these cases, thermal transitions detected by circular dichroism (CD) appear to be consistent with a two-state model with no intermediates.

Regarding trisosephosphate isomerase (TIM), many mesophilic members belonging to this enzyme family have been found to unfold slowly in chemical-denaturation studies, with one or more equilibrium or kinetic intermediates [11, 17, 18]. In contrast, thermal unfolding transitions of TIMs (in the absence of chemical denaturants) usually manifest themselves as monophasic profiles (i.e., simple sigmoidal curves with no evidence of intermediates), as recorded by CD [15, 19–21]. Unfortunately, irreversibility appears as a common feature in thermal unfolding, which has precluded the study of TIM refolding in cooling scans. Nevertheless, Benítez-Cardoza et al. [15] demonstrated that yeast TIM (γ TIM) thermal unfolding is highly reversible at low protein concentration ($\approx 0.20 \mu\text{M}$), although the unfolding-refolding cycle displays marked hysteresis when a heating-cooling rate of $2.0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ is used. Attempts to achieve near-equilibrium transition profiles by decreasing the scan rate led to pronounced irreversibility [15].

At a fixed temperature, kinetic data for γ TIM unfolding registered by far-UV circular dichroism (CD) in a restricted time span, are well-fitted by single exponential curves, whereas near-UV CD and fluorescence indicate biphasic kinetics. Refolding data are consistent with a second-order reaction [15]. Unlike yeast TIM, the enzyme from *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) shows completely irreversible, temperature-induced denaturation, even at low protein concentration. Kinetic studies of this protein found that denaturation is a complex process in which two or three phases are clearly seen [19]. A common finding for both γ TIM and TcTIM is that their

denatured states appear to conserve some kind of residual structure based on calorimetric data [15, 19].

This work mainly focuses on determining the kinetic characteristics of temperature-induced γ TIM unfolding in aqueous solution over long durations and in a wide pH range. Regardless of pH, three kinetic phases were observed, although the small-amplitude faster phase was detected at only low temperatures. The relative amplitudes of the second and third phases vary with temperature in a way that seems difficult to explain by a sequential mechanism. The results thus evidence that the kinetics of γ TIM thermal unfolding is more complex than previously thought. Furthermore, residual secondary structure was found in denatured γ TIM below pH 8.0. Because this residual structure appears to be associated with the loss of refolding ability, its presence may indicate that misfolded, aggregation-prone structures are formed at high temperature. Molecular dynamics simulations showed that γ TIM has a tendency to suffer α -to- β transitions when unfolded at high temperature, but this method does not properly reproduce the marked effect of pH on the structure of the thermally unfolded protein.

Materials

Overexpression and purification of wild-type *Saccharomyces cerevisiae* TIM (γ TIM) was carried out as described elsewhere [22]. Mass spectrometry (Additional file 1) and SDS-PAGE showed that the obtained enzyme was homogeneous. Enzymatic activity was determined by the coupled assay with α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GDH), using D-glyceraldehyde 3-phosphate (DGAP) as the TIM substrate [23]. Assays were performed at $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ in 1.0 mL of 0.1 M triethanolamine buffer (pH 7.4) containing 10 mM EDTA, 0.20 mM NADH, 0.02 of α -GDH, and 2.0 mM DGAP; the reaction was started by the addition of 3.0 ng of γ TIM, and NADH oxidation was followed by the change in absorbance at 340 nm. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) of this enzyme was $5.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, a value similar to that reported previously [24, 25].

Circular dichroism spectra

Circular dichroism (CD) spectra were obtained with a JASCO J-715 instrument (Jasco Inc., Easton, MD) equipped with a Peltier-type cell holder for temperature control and stirring with a magnetic bar. Cells of 1.00-cm path length were used to keep the protein concentration near $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.19 \mu\text{M}$). Although this somewhat restricted the lower wavelength limit of data registering, a low concentration is mandatory to observe reversible thermal unfolding scans [15]. CD spectral data are reported as mean residue ellipticity, $[\theta]$, which was calculated as $[\theta] = 100 \theta / (C l)$; in this expression θ is the measured ellipticity

in degrees, C is the mean residue molar concentration (mean residue $M_r = 107.5$), and l is the cell path length in centimeters.

Thermal transitions

Conformational changes induced by heating or cooling of γ TIM were continuously monitored by following the ellipticity at 220 nm while temperature was varied at $2.0\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Samples ($\approx 0.19\text{ }\mu\text{M}$) were placed in a 1.00-cm cell with a magnetic stirrer, and the temperature within the cell was registered by the external probe of the Peltier-type accessory. Refolding profiles were registered immediately after the unfolding transitions had been completed.

Kinetics studies

Unfolding kinetics tracings were registered by following ellipticity changes at 220 nm, as described previously [15, 25]. Unfolding was initiated by adding a small aliquot of concentrated TIM solution to a 1.00-cm cell containing buffer equilibrated at the temperature selected for each experiment. Within the cell, the temperature reached $\pm 0.15\text{ }^\circ\text{C}$ of the final equilibrium value in about 15 s. The final protein concentration was $0.19\text{ }\mu\text{M}$ in most cases. Essentially, the same procedure was used for monitoring changes in intrinsic fluorescence over time. In this case, experiments were carried out in a K2 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL), which had a Peltier accessory. Protein samples were excited at 292 nm, and the light emitted at 318 nm was collected. Kinetic data were analyzed using a triple exponential decay equation:

$$y = y_0 + A_1[\exp(-\lambda_1 t) - 1] + A_2[\exp(-\lambda_2 t) - 1] + A_3[\exp(-\lambda_3 t) - 1] \quad (1)$$

where y is the physical observable monitored as a function of time t , and y_0 is the initial value of the observable. A_i and λ_i represent the observed amplitude and rate constant, respectively, for the i th exponential phase. In some cases, only two exponential terms were required for satisfactory curve fitting.

In refolding experiments, γ TIM samples were first subjected to unfolding for 10 min at $63.0\text{ }^\circ\text{C}$. Then, the temperature control of the CD spectrometer Peltier accessory was set to a value $4.0\text{ }^\circ\text{C}$ below the temperature intended for the study of the refolding reaction ($42.0\text{ }^\circ\text{C}$) to allow for fast cooling of the sample ($\approx 15\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). The final temperature value ($42.0\text{ }^\circ\text{C}$) was entered into the cell-holder control when the solution in the cell was $0.5\text{ }^\circ\text{C}$ above that value, and the CD signal was registered thereafter. Inside the cell, temperature came to equilibrium ($\pm 0.15\text{ }^\circ\text{C}$) in approximately 40 s.

Molecular dynamics simulations

Molecular dynamics (MD) simulations were performed using GROMACS 4.5.4 software [26] with the GROMOS96 53A6 force-field [27]. The side-chain ionization states in the protein at the pH values simulated (6.7, 7.4, and 8.0) were established using pK_a values estimated with PROPKA [28]. Dimeric γ TIM (PDB ID: 1YPI) was placed in the center of a periodic dodecahedral box with 10 \AA between the protein and the edge of the box. To simulate the solvent conditions at pH 6.7 (7.4; 8.0), a total of 21,763(21,757; 21,751) SPC water molecules, 12 (16; 20) sodium ions, and 7 (10; 12) chloride ions were needed to fill the box, neutralize the net protein charge, and reach the experimental ionic strength of 0.015 M (0.022 M ; 0.027 M).

Prior to MD simulations, the system was relaxed by energy minimization, followed by 100 ps of thermal equilibration under the position restraints of protein heavy atoms through a harmonic force constant of $1000\text{ kJ mol}^{-1}\text{ nm}^{-1}$. MD simulation was performed using an NPT ensemble at 423 K and 1.0 bar for 100 ns. A LINCS algorithm was applied to constrain the length of all covalent bonds [29], and a 2-fs time step was used. A cutoff of 1.0 nm was applied for short-range electrostatic and van der Waals interactions, while the long-range electrostatic forces were treated using the particle mesh Ewald method [30]. Two replicas were simulated at each solvent condition.

Results and discussion

Unfolding-refolding thermal transitions

Denaturation (unfolding) and renaturation (refolding) of γ TIM were followed by continuous monitoring of the ellipticity (220 nm) under a constant heating or cooling rate of $2.0\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Temperature scanning profiles recorded at three different pH values are shown in Fig. 1. These profiles display the hysteresis phenomenon previously observed for γ TIM [15, 16, 25], which indicates that unfolding and refolding events occur under kinetic control at the imposed scanning rate [14, 15]. It is clear that pH has an influence on the kinetic stability of the protein, because the apparent *melting temperature* is displaced to lower values at pH 8.5. Despite this pH effect, all the unfolding traces appear as sigmoid curves, with no evidence of stable intermediates. However, the total ellipticity change at pH 6.7 that takes place upon denaturation seems slightly larger (Fig. 1). It must be noted that the up-temperature scans in Fig. 1 were not allowed to proceed to higher temperatures to avoid reactions that make the process irreversible and thus decrease the extent of refolding on down-temperature scans [15].

In a different set of experiments, denatured samples of the enzyme were left to stand at $70\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min to ensure that unfolding had been completed before their CD

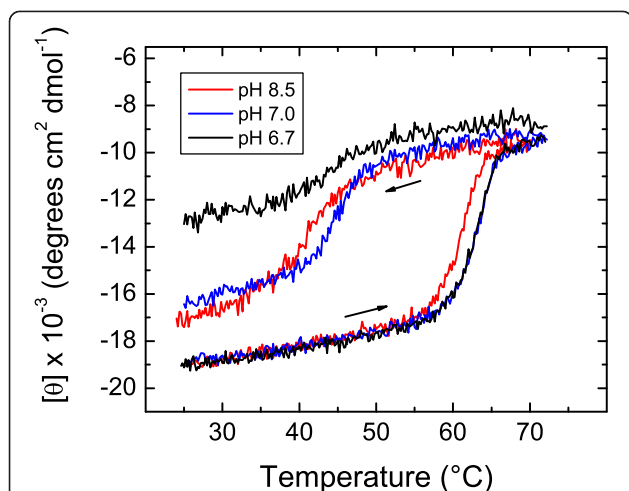


Fig. 1 Thermal unfolding-refolding transitions of γ TIM at selected pH values. The ellipticity at 220 nm was monitored while samples were heated or cooled at $2.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Arrows indicate whether the temperature increased or decreased in scans

spectra were recorded. Spectra shown in Fig. 2 indicate that the native α/β secondary structure of γ TIM is rather insensitive to pH and is largely lost upon heating at all pH values, as judged by the decrease in magnitude in the 208–222 nm region at high temperature (Fig. 2). However, the spectrum of heat-denatured γ TIM shows striking changes as pH is varied. Above pH 8.0, the spectral shape and signal magnitude of the denatured enzyme are typical of small and medium-size proteins (e.g., hen-egg lysozyme, ribonuclease A, cytochrome C, staphylococcal nuclease, cysteine proteinases) when unfolded at high

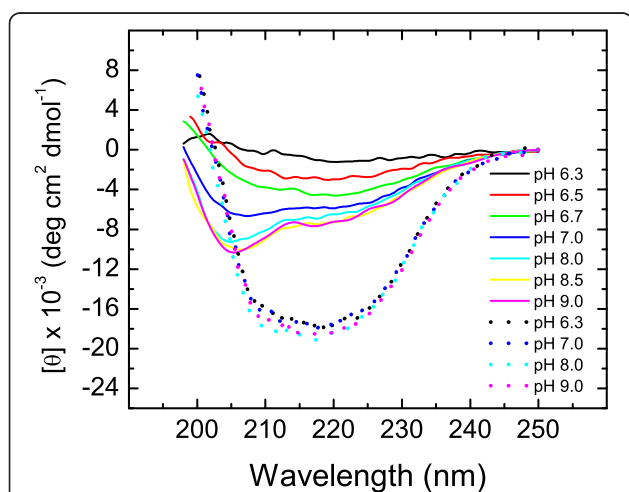


Fig. 2 Far-UV CD spectra of thermally unfolded γ TIM at different pH values. Protein samples were allowed to unfold by continuous heating ($2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) until the end of the transition (cf. Fig. 1) and then left to stand at $70.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min before recording their spectra. For comparison, spectra of native γ TIM at various pH values are also shown (dotted lines)

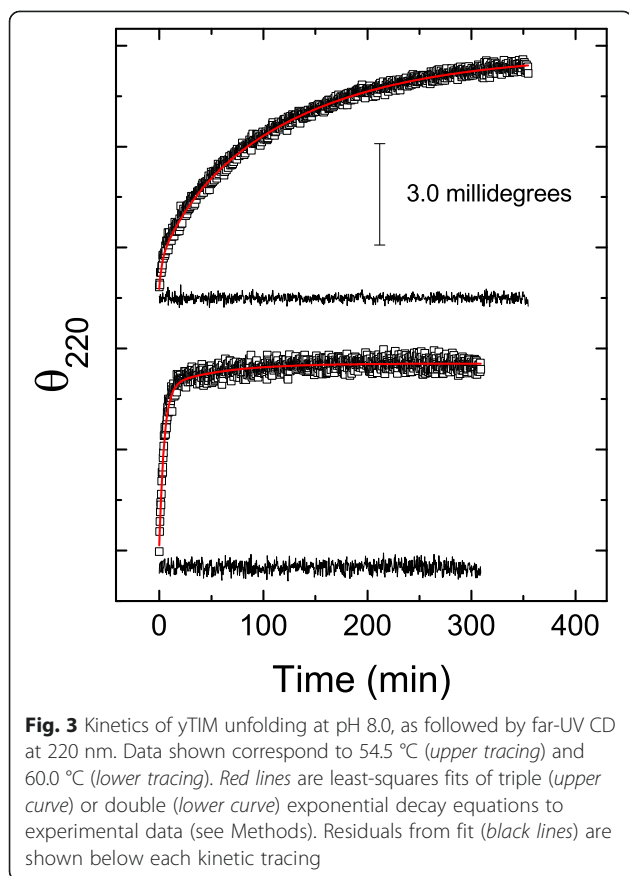
temperatures in the absence of denaturant agents (see, for example, CD spectra of native and thermally unfolded lysozyme in Additional file 2). This spectral type is characterized by a negative band of approximately $10 \times 10^3\text{ deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}$ centered at 202–204 nm, along with a broad negative shoulder with magnitude around $5 \times 10^3\text{ deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}$ at longer wavelength [31, 32]. Below pH 8.0, the spectra of heat-denatured γ TIM progressively decrease in magnitude and acquire a shape typical of all- β proteins [33], thus pointing to the presence of *residual* secondary structure in the denatured enzyme.

Regarding γ TIM refolding in cooling-down scans, it is evident that this process becomes increasingly irreversible as the pH decreases below pH 7.0, as judged from the extent of recovery of native γ TIM ellipticity shown in Fig. 1. To gain detailed information on the influence of pH in the unfolding and refolding events, further kinetic experiments were carried out.

Unfolding kinetics

Kinetic studies were carried out by monitoring the time course of ellipticity at 220 nm. Experiments examining a large temperature interval were done at pH 8.0 and 6.7, where the CD spectra of denatured γ TIM showed distinct features. The results at pH 8.0 indicate that at relatively high temperatures ($60.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and above), the loss of secondary structure shows double exponential behavior (Fig. 3), with phases well separated on the time scale. Indeed, over a restricted time interval, a single exponential-decay equation can fit the experimental data reasonably well. Only when data were recorded over a long time did a second phase become readily apparent, but this phase had small amplitude. Nevertheless, at low temperature, triple exponential behavior was observed (Fig. 3). The fastest phase, which conveys a minor ellipticity change, occurred too fast for accurate assessment of the kinetic constant by the manual-mixing method (i.e., time constant of about 20 to 100 s). This fast phase seems to be completely lost within the dead time in experiments at high temperature. Hereafter, the observed rate constants are referred to as λ_1 , λ_2 , and λ_3 , in descending order of their magnitudes. Unfolding of γ TIM at pH 6.7 showed similar behavior, with two and three kinetic phases at high and low temperature, respectively, as shown in Additional file 3.

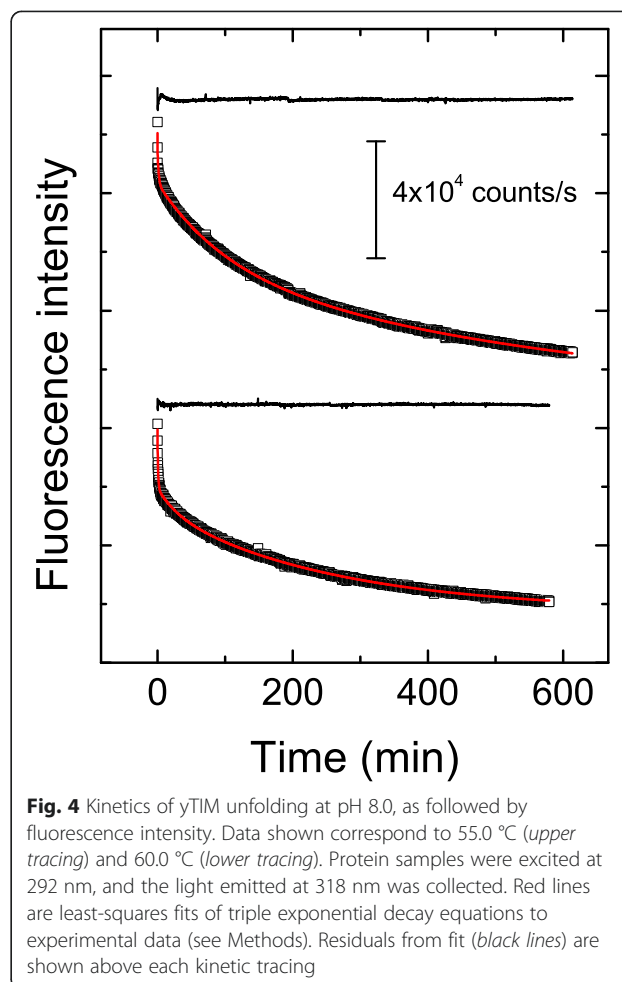
CD spectra were recorded near the end of the unfolding process when the slowest phase was more than 98 % complete (these experiments required recordings of kinetic data for more than nine hours in the case of low temperatures). The *final* spectra appeared nearly identical, notwithstanding the temperature at which the kinetics was studied (see Additional file 4 for results obtained at pH 8.0). Furthermore, at a given pH, the spectral shape and magnitude observed at the end of unfolding were both similar to those illustrated in Fig. 2. In other



words, the final conformation achieved by the protein seems to be independent of the temperature (in the range studied), but is otherwise strongly affected by pH.

The voltage applied to the phototube of the CD instrument, which is proportional to the absorbance, was simultaneously recorded. The measurements indicated that changes in ellipticity associated with the first two phases are accompanied by only small changes (5.0 % or less) in the absorbance of the protein solution (see Additional file 5). Such small changes are known to occur due to alterations in the secondary and, to less extent, the tertiary structure of proteins and polypeptides [34]. However, a relatively large absorbance increment (approximately 10.0 % of the protein absorbance) was linked to the slower CD-detected kinetic phase. It is likely that this apparent increment comes from the scattering of light by aggregates of unfolded protein molecules.

Monitoring of the denaturation kinetics by changes in the fluorescence intensity also showed that this is a complex process (Fig. 4) in which there is a progressive decrease of intensity (at the wavelength of maximum emission by native yTIM). Overall, comparison of the plots shown in Figs. 3 and 4 indicates that progressive loss of secondary structure upon denaturation is accompanied by a quenching of the fluorescence signal of



tryptophan residues, which in turn likely reflects either the exposure of these residues to the aqueous solvent or less constraint by the environment [35]. Notwithstanding the temperature, three exponential terms were required to fit fluorescence data. As in CD experiments, the first fluorescence-detected phase was too fast (time constant of about 25 s) for an accurate determination of its rate constant. At low temperature (55.0 °C), the rate constant for the second phase had a value similar to that of λ_2 from CD experiments (the two values differed by 50–80 %). At 62.0 to 64.0 °C, however, it was the first fluorescence-detected rate constant that was consistent with λ_2 . Furthermore, the decrease in the fluorescence intensity extended over a much longer time than the change in ellipticity (i.e., the rate constant for the slowest phase was approximately three- to fourfold smaller when determined from fluorescence than from CD). These markedly different values suggest that the slowest phase comprises several elementary steps that respond differently to the spectroscopic probes employed. For instance, formation of molecular aggregates can conceivably occur with little or no change in secondary

conformation, but with an otherwise significant fluorescence quenching of tryptophan residues.

Kinetic model for γ TIM unfolding

The simplest model accounting for the results obtained from CD would be that of three sequential reactions (Scheme 1), with native and unfolded γ TIM (N and U, respectively) and two intermediate species (I and X):

In this model, each of the three λ values determined from data analysis (eqn. 1) is identical to each one of the microscopic rate constants k_1 , k_2 , and k_3 . As mentioned, neither the rate constant nor the amplitude of the faster phase could be accurately determined from experiments at the lowest temperatures studied. Moreover, this phase was apparently lost within the dead time of experiments performed at high temperature. Fortunately, because k_1 seems to be 15–20 times larger than k_2 , the first kinetic step occurs on a much shorter time scale than the other steps and can be regarded as kinetically separated from the other events, at least in a first approximation. This implies that amplitudes A_2 and A_3 reflect changes involved solely with steps $I \rightarrow X \rightarrow U$. Therefore, the kinetic model can be simplified to a two-step model (Scheme 2).

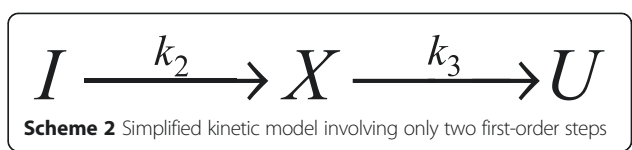
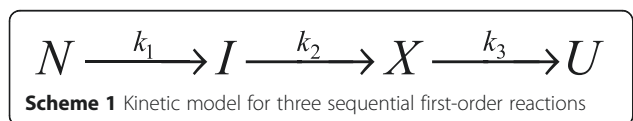
Equations describing the evolution in time of the fraction of each species are well known [36, 37]. By denoting the characteristic ellipticity of each species as θ_I , θ_X , and θ_U , it can be shown that (see Additional file 6):

$$(\theta_X - \theta_I) / (\theta_U - \theta_I) = k_3 / k_2 - [(k_3 - k_2) / k_2] [A_2 / (A_2 + A_3)] \quad (2)$$

and

$$(\theta_U - \theta_X) / (\theta_U - \theta_I) = -[(k_3 - k_2) / k_2] \times [A_3 / (A_2 + A_3)] \quad (3)$$

The two equations above were used to compute $(\theta_X - \theta_I) / (\theta_U - \theta_I)$ and $(\theta_U - \theta_X) / (\theta_U - \theta_I)$, which give the ellipticity change as a fraction of the total change for each step in Scheme 2. The results indicate that the degree of unfolding occurring during the $I \rightarrow X$ step (normalized to a total unitary change) would vary from 0.35 to 0.70 over a temperature range of 11 °C (Fig. 5). For the $X \rightarrow U$ step, a concomitant decrease in the degree of unfolding would take place. Admittedly, it seems unlikely that the conformation of intermediate species would vary so drastically within such a narrow temperature range. Alternatively, these results may point to the presence of an off-pathway intermediate or even different, parallel unfolding pathways with predominance that changes with temperature.



Temperature dependence of unfolding rate constants

Further studies on the denaturation of the enzyme were also performed at other pH values but over a restricted temperature range to determine the *activation* parameters that control the temperature dependence of k_2 and k_3 . Results for selected pH values are shown in Fig. 6 as Eyring plots, which agree with the well-known equation:

$$\ln(k/T) = \ln E + \Delta S^\ddagger / R - (\Delta H^\ddagger / R)(1/T) \quad (4)$$

where k is the rate constant for an elementary reaction, T is the absolute temperature, E stands for a preexponential factor, and ΔS^\ddagger and ΔH^\ddagger represent the activation entropy and enthalpy, respectively. Figure 6a shows that plots corresponding to k_2 follow linear trends when a narrow temperature range is considered. This linearity was observed before for γ TIM and has been found for a large number of other proteins [15]. However, in the cases of pH 6.7 and 8.0, at which larger temperature intervals were examined, Eyring plots appear slightly curved upwards in the low temperature region. This might be due to a shift between parallel unfolding pathways with different *activation* enthalpies [38]; that is, unfolding would switch from one predominant pathway to another as the temperature varies, in agreement with the interpretation mentioned for the change with

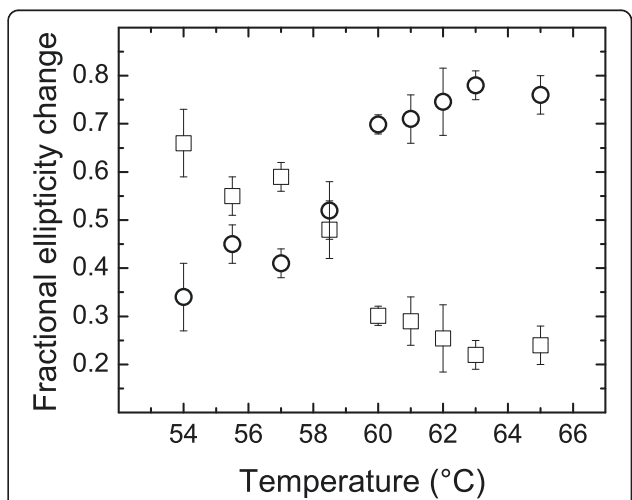
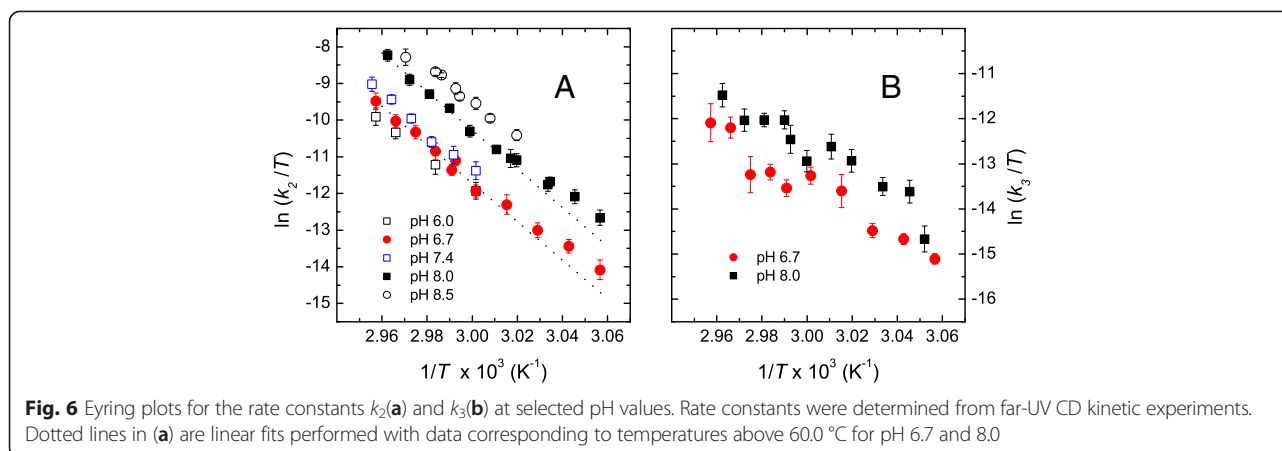


Fig. 5 Fractional structural change for the two kinetic steps in Scheme 2 at different temperatures. Fractional changes in ellipticity were calculated from eqns. 2 and 3 from values of the rate constants and amplitudes determined at pH 6.7. Data for step $I \rightarrow X$, i.e., $(\theta_X - \theta_I) / (\theta_U - \theta_I)$, are shown as circles; data for step $X \rightarrow U$, i.e., $(\theta_U - \theta_X) / (\theta_U - \theta_I)$, are shown as squares



temperature of the computed degree of unfolding for step $I \rightarrow X$. However, a nonzero activation heat capacity cannot be ruled out as the origin of the curvature.

From Eyring plots, such as those in Fig. 6a, ΔH_2^\ddagger was determined between pH 6.0 and 8.5. It must be noted that values of k_2 were determined from data registered in a temperature region in which the unfolding degree accompanying step $I \rightarrow X$ remains relatively constant (i.e., from 60 to 65 °C, cf. Fig. 5). Therefore, k_2 can be assigned to a single predominant pathway. Overall, the value of ΔH_2^\ddagger was about 450 kJ mol⁻¹ at pH 6.0–8.0 and showed a slight decrease ($\approx 15\%$) at pH 8.5 (data not shown). In contrast, Eyring plots for k_3 display a linear but ill-defined trend (Fig. 6b), suggesting that the slowest kinetic phase is indeed composed of several elementary steps. It is also seen that k_3 is much less temperature dependent than k_2 .

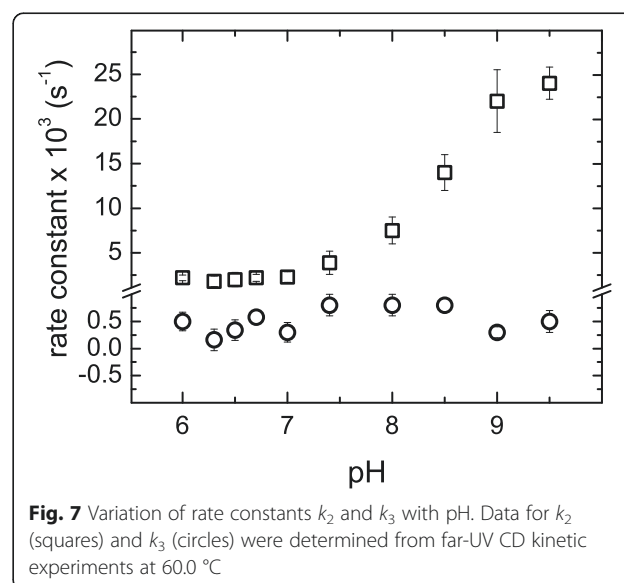
The effect of pH on k_2 and k_3 was examined over a longer interval of pH values at constant temperature; 60.0 °C was chosen, because of the single apparent pathway at this temperature, and the unfolding process was slow enough to allow for determining the value of k_2 over an extended pH range. Results are shown in Fig. 7, which shows that pH-induced changes in k_2 resemble the sigmoid titration curve for an ionizable group with an approximate pK_a of 8.5. Because this value of pK_a is close to that of a thiol group, it may be hypothesized that a cysteine residue is responsible for the behavior observed for k_2 . In this regard, it has been proposed that Cys126, which is a residue that is conserved with the family of TIM enzymes, plays an important role in the stability of this protein [24]. In contrast, k_3 values showed no defined variation with pH, again suggesting that the step $X \rightarrow U$ actually comprises multiple individual reactions.

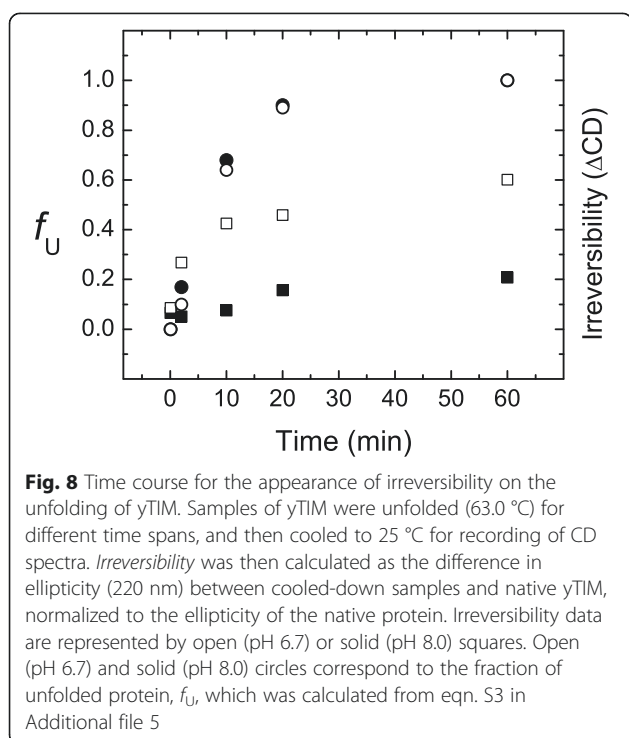
Refolding of γ TIM

As reported previously [15, 24, 25], the kinetics of γ TIM refolding at low protein concentration (0.13–0.75 μ M) and in a certain temperature range is slow enough to be

monitored without resorting to fast temperature-jump techniques. By using the procedure described in the Methods section, we followed the recovery of secondary structure under two pH conditions. These studies were aimed at determining the effect of the *residual* native-like structure of unfolded γ TIM (which is clearly observed at pH 6.7) on the refolding ability of the enzyme. For this purpose, γ TIM samples were allowed to unfold (in the cell of the CD instrument) for 10 min at 63.0 °C. These conditions ensured ca. 85 % (pH 6.7) or 99 % (pH 8.0) unfolding, as judged by the ellipticity signal. After that, the protein solution was cooled to 42.0 °C to record the refolding reaction. Additional file 7 shows that at pH 6.7 the enzyme refolds faster than at pH 8.0. In both cases, however, refolding tracings are adequately described by a second-order kinetics equation, as determined previously [15, 24].

To explore the effect of the residual structure on the reversibility of the unfolding process, samples of γ TIM





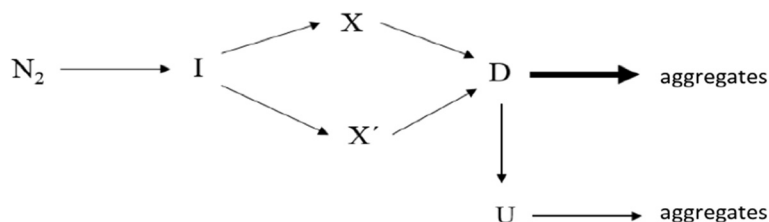
were unfolded for different time spans and then cooled to 25 °C to record CD spectra. As a quantitative indicator of irreversibility, the difference in ellipticity (220 nm) between cooled-down samples and native yTIM, normalized to the ellipticity of the native protein, was used. The results are shown in Fig. 8, together with the fractional values of U (f_U) in Scheme 2. Experimentally determined values of the kinetic constants k_2 and k_3 were used to calculate the time variation of f_U according to eqn.S3 in Additional file 6. An inspection of the plots in the figure makes it evident that irreversibility is more intense at pH 6.7 than pH 8.0, as expected from the thermal scan results (cf. Fig. 1). At the lower pH, however, irreversibility begins with early unfolding times and approximately parallels the formation of f_U . In contrast, the onset of irreversibility at pH 8.0 is delayed and thus appears as a late event in unfolding, which takes place after the final U state becomes largely populated. This suggests again that the slowest CD-detected kinetic phase does not represent an elementary step. Reactions

that lead to irreversibility probably do not involve major changes in secondary conformation and are therefore silent in CD studies.

In summary, results from refolding studies indicate that yTIM refolds faster from the denatured state with residual structure, although such denatured state decreases the folding efficiency (i.e., the amount of native protein recovered upon refolding). Thus, it may be thought that under physiological conditions (pH near neutrality, 37 °C) the advantage of a fast folding process overcomes the difficulties posed by some degree of irreversibility. Furthermore, because irreversibility appears to be related to the time unfolded (denatured) yTIM stays at moderate to high temperatures [15], the problem of a low folding efficiency may be of less significance for mesophilic organisms such as *Saccharomyces cerevisiae*.

Residual structure

As mentioned, thermally denatured yTIM retains a high content of β structure below pH 8.0 (see Fig. 2), which is implicated in reactions leading to irreversibility. This type of secondary structure has been found to be refractory to temperature in thermophilic and mesophilic proteins [39, 40], whereas in other instances, such as in apomyoglobin, β structure appears to be formed at elevated temperature [31] as a result of α -to- β transitions [41]. Furthermore, molecular dynamics simulations have shown that certain all- α peptides, and even full-length proteins, may be transformed to all- β structures [42, 43]. We carried out preliminary MD simulations to investigate whether this method can reproduce the structural differences in denatured yTIM that were experimentally observed when pH is varied. Simulations run at 400 K for 100 ns showed that helices are completely lost after 75 ns, regardless of the pH value. Conversely, β -strands actually seem to be formed during the simulation, but they are slightly more abundant at pH 6.7 than at pH 8.0 (Additional file 8). Although preliminary, these results are encouraging, for they indicate that some regions in the polypeptide sequence of yTIM have a tendency to undergo α -to- β transitions. In contrast, the effect of pH does not appear to have been properly taken into account by the MD method used here, and thus deserves to be studied further.



Scheme 3 Proposed model for yTIM unfolding

Conclusions

Two experimental approaches were used to study the influence of pH on the temperature-induced unfolding of yeast triosephosphate isomerase (γ TIM). Temperature-scan experiments showed that unfolding profiles (monitored by CD) appear as monophasic transitions, with no evidence of intermediate species. pH was found to affect the *kinetic stability* of the protein based on shifts in the *melting temperature* (T_m). Furthermore, below pH 8.0, CD spectra of heat-denatured γ TIM gradually changed in shape to look like those for proteins rich in β -strands, but otherwise, the unfolded protein became prone to aggregate.

Despite the apparent simplicity of thermal profiles, kinetic studies performed at constant temperature clearly showed the presence of up to three kinetic phases, irrespective of pH (i.e., at high temperatures, the fastest phase was completely lost within the experimental dead time). Because the relative values of the kinetic constants suggested that the fastest phase is indeed *decoupled* from the other two, we analyzed the kinetic constants and amplitudes of the two slowest phases according to a two-step sequential mechanism. Results from the analysis, however, pointed to a more complex actual mechanism, such as one that involves parallel pathways. The temperature dependence of the rate constants appears to lend some evidence to this proposal. A simple model for γ TIM unfolding that accounts for the information summarized above is shown in Scheme 3, where N_2 stands for the native dimer, I and X represent partially unfolded intermediates, and D and U are used to symbolize, respectively, the denatured form with β -strand residual structure and the thermally unfolded state of γ TIM.

In summary, it was shown that the temperature-induced denaturation of γ TIM reveals itself as a complex process when followed for a long time and over an ample temperature range. Further investigation over a wide pH range showed that the kinetic stability of γ TIM responds to the titration of an ionizable group with $pK_a \approx 8.5$. Refolding studies, on the other hand, indicated that the refolding ability of the unfolded protein decreases under pH conditions that favor the formation of residual, β -strand-like structures in heat-denatured γ TIM, even though refolding is faster under such conditions. Moreover, most of the reactions leading to irreversibility occur late in the unfolding process and are not detected by CD. Finally, as demonstrated in molecular dynamics simulations, γ TIM unfolding shows α -to- β transition behavior, albeit with no discrimination of the experimentally observed pH effect.

Additional files

Additional file 1: Mass Spectrum of isolated γ TIM. (PDF 72 kb)

Additional file 2: Native and thermally unfolded hen-egg lysozyme CD spectra. (PDF 67 kb)

Additional file 3: Kinetics of γ TIM unfolding at pH 6.7, as followed by CD. (PDF 210 kb)

Additional file 4: Far-UV CD spectra of γ TIM near the end of the unfolding kinetics process. (PDF 89 kb)

Additional file 5: Kinetics of γ TIM unfolding detected by light absorption. (PDF 142 kb)

Additional file 6: Derivation of eqns. 2 and 3 in text. (PDF 113 kb)

Additional file 7: Refolding kinetics of γ TIM as followed by CD. (PDF 133 kb)

Additional file 8: Molecular dynamics simulations of γ TIM unfolding. (PDF 113 kb)

Abbreviations

γ TIM: Triosephosphate isomerase from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*); CD: Circular dichroism; MD: Molecular dynamics.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ALP and MCC carried out most of the spectroscopic experiments, performed part of the data analysis, and participated in the experimental design and interpretation of results. GGR helped with the experiments, data analysis, and interpretation of results. RAZ performed the molecular dynamics simulations, participated in the interpretation of results, and helped in drafting the manuscript. AHA conceived of the study, participated in its design, carried out a major part of data analysis, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded in part by CONACYT, México (SEP-CONACYT2007-80457, and SEP-CONACYT 2012-181049). ALP received a doctoral fellowship from CONACYT, México (208217). The authors thank Dr. Ponciano García-Gutiérrez (Laboratorio Interdivisional de Espectrometría de Masas, UAM-Iztapalapa) for obtaining the mass spectrum of γ TIM.

Author details

¹Área de Biofisiocoquímica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa D.F. 09340, Mexico. ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán D.F. 04510, Mexico.

Received: 24 March 2015 Accepted: 19 August 2015

Published online: 03 September 2015

References

- Sánchez IE, Kiefhaber T. Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J Mol Biol.* 2003;325:367–76.
- Ferguson N, Fersht A. Early events in protein folding. *Curr Op Struct Biol.* 2003;13:75–81.
- Kamagata K, Arai M, Kuwajima K. Unification of the folding mechanisms of non-two-state and two-state proteins. *J Mol Biol.* 2004;339:951–65.
- Tsong TY. Detection of three kinetic phases in the thermal unfolding of ferricytochrome c. *Biochemistry.* 1973;12:2209–14.
- Baldwin RL. On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding & Design.* 1996;1:R1–8.
- Aghera N, Udgaonkar JB. The utilization of competing unfolding pathways of monellin is dictated by enthalpic barriers. *Biochemistry.* 2013;52:5770–9.
- Travaglini-Allocatelli C, Ivarsson Y, Jemth P, Gianni S. Folding and stability of globular proteins and implications for function. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19:3–7.
- Wong KB, Clarke J, Bond CJ, JoseÀ Luis Neira J, Freund SMV, Fersht AR, et al. Towards a complete description of the structural and dynamic properties of the denatured state of barnase and the role of residual structure in folding. *J Mol Biol.* 2000;296:1257–82.

9. Pearce MC, Cabrita LD, Rubin H, Gore MG, Bottomley SP. Identification of residual structure within denatured antichymotrypsin: implications for serpin folding and misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324:729–35.
10. Sawano M, Yamamoto H, Ogasahara K, Kidokoro S, Katoh S, Ohnuma T, et al. Thermodynamic basis for the stabilities of three CutA1s from *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus*, and *Oryza sativa*, with unusually high denaturation temperatures. *Biochemistry*. 2008;47:721–30.
11. Vázquez-Pérez AR, Fernández-Velasco DA. Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: the monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry*. 2007;46:8624–33.
12. Shirley BA. Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In: Shirley BA, editor. *Protein Stability and Folding. Theory and Practice*. Totowa, NJ: Humana Press; 1995. p. 177–90.
13. Blancas-Mejía LM, Tischer A, Thompson JR, Tai J, Wang L, Auton M, et al. Kinetic control in protein folding for light chain amyloidosis and the differential effects of somatic mutations. *J Mol Biol*. 2014;426:347–61.
14. Dragan AI, Potekhin SA, Sivolob A, Lu M, Privalov PL. Kinetics and thermodynamics of the unfolding and refolding of the three-stranded R-helical coiled coil, Lpp-56. *Biochemistry*. 2004;43:14891–900.
15. Benítez-Cardoza CG, 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;40:9049–58.
16. Samanta M, Banerjee M, Murthy MRN, Balaram H, Balaram P. Probing the role of the fully conserved Cys 126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis – distal effects on dimer stability. *FEBS Journal*. 2011;278:1932–43.
17. Pan H, Raza AS, Smith DL. Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *J Mol Biol*. 2004;336:1251–63.
18. Guzman-Luna V, Garza-Ramos G. The folding pathway of glycosomal triosephosphate isomerase: Structural insights into equilibrium intermediates. *Proteins*. 2012;80:1669–82.
19. Mixcoha-Hernández E, Moreno-Vargas LM, Rojo-Domínguez A, Benítez-Cardoza CG. Thermal-unfolding reaction of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein J*. 2007;26:491–8.
20. Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Mendoza-Hernández G, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*. 2008;47:3499–506.
21. Dhaunta N, Arora K, Chandrayan SK, Guptasarma P. Introduction of a thermophile-sourced ion pair network in the fourth beta/alpha unit of a psychrophile-derived triosephosphate isomerase from *Methanococcus burtonii* significantly increases its kinetic thermal stability. *Biochim Biophys Acta*. 1834;2013:1023–33.
22. Vázquez-Contreras E, Zubillaga RA, Mendoza-Hernández G, Costas M, Fernández-Velasco DA. Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein Pept Lett*. 2000;7:57–64.
23. Rozacky EE, Sawyer TH, Barton RA, Gracy RW. Studies of human triosephosphate isomerase: isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1971;146:312–20.
24. González-Mondragón E, Zubillaga RA, Saavedra E, Cháñez-Cárdenas ME, Pérez-Montfort R, Hernández-Arana A. Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*. 2004;43:3255–63.
25. Reyes-López CA, González-Mondragón E, Benítez-Cardoza CG, Cháñez-Cárdenas ME, Cabrera N, Pérez-Montfort R, et al. The conserved salt bridge linking two C-terminal b/a units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins*. 2008;72:972–9.
26. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput*. 2008;4:435–47.
27. Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*. 2004;25:1656–76.
28. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very fast empirical prediction and interpretation of protein pKa values. *Proteins*. 2005;61:704–21.
29. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*. 1997;18:1463–72.
30. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N*log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys*. 1993;98:10089–92.
31. Privalov PL, Tiktopulo EI, Venyaminov SY, Griko YV, Makhataadze GI, Khechinashvili NN. Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state. *J Mol Biol*. 1989;205:737–50.
32. Arroyo-Reyna A, Hernández-Arana A. The thermal unfolding of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1248:123–8.
33. Manavalan P, Johnson WC. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature*. 1983;305:831–2.
34. Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. *Principles of Physical Biochemistry*. New Jersey: Prentice Hall International; 1998.
35. Campbell ID, Dwek RAR. *Biological Spectroscopy*. Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company; 1984.
36. Gutfreund H. *Kinetics for the Life Sciences. Receptors, Transmitters and Catalysts*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995.
37. Szabo ZG. Kinetic characterization of complex reaction systems. In: Banford CH, Tipper CFH, editors. *Comprehensive Chemical Kinetics. Volume 2*. Amsterdam: Elsevier; 1969. p. 1–80.
38. Zaman MH, Sosnick TR, Berry RS. Temperature dependence of reactions with multiple pathways. *Phys Chem Chem Phys*. 2003;5:2589–94.
39. Toledo-Núñez C, López-Cruz JI, Hernández-Arana A. Thermal denaturation of a blue-copper laccase: Formation of a compact denatured state with residual structure linked to pH changes in the region of histidine protonation. *Biophys Chem*. 2012;167:26–32.
40. Ausili A, Scire A, Damiani E, Zolese G, Bertoli E, Tanfani F. Temperature-induced molten globule-like state in human R1-acid glycoprotein: An infrared spectroscopic study. *Biochemistry*. 2005;44:15997–6006.
41. Fabiani E, Stadler AM, Madern D, Koza MM, Tehei M, Hirai M, et al. Dynamics of apomyoglobin in the α -to- β transition and of partially unfolded aggregated protein. *Eur Biophys J*. 2009;38:237–44.
42. GC JB, Bhandari YR, Gerstman BS, Chapagain PP. Molecular dynamics investigations of the α -helix to β -barrel conformational transformation in the RfaH transcription factor. *J Phys Chem B*. 2014;118:5101–8.
43. Kaur H, Sasidhar YU. Molecular dynamics study of an insertion/duplication mutant of bacteriophage T4 lysozyme reveals the nature of α - β transition in full protein context. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15:7819–30.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00150

Metrópoli 207180200

Estructura residual en el plegamiento de una proteína dimérica tipo β/α . Influencia en la eficiencia de replegamiento.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 2 del mes de agosto del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA
DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ
DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA
DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO
DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, 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: ARIANA LABASTIDA POLITO

y de acuerdo con el artículo 76 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

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.



ARIANA LABASTIDA POLITO
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVSIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

VOCAL

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ

VOCAL

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ
CARDOZA

VOCAL

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ
VELASCO

SECRETARIA

DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA