



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CONTROL CINÉTICO Y TERMODINÁMICO EN EL
DESPLIEGAMIENTO TÉRMICO DE LA TRIOSA FOSFATO
ISOMERASA PROVENIENTE DE ESPECIES BACTERIANAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

LBM. SERGIO ROMERO ROMERO

Tutor Principal:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina – UNAM

Comité Tutor:

Dr. Armando Gómez Puyou
Instituto de Fisiología Celular – UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química – UNAM

MÉXICO, D. F., MAYO DE 201



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| ÍNDICE GENERAL | 2 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 5 |
| RESUMEN..... | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| Plegamiento de las proteínas | 11 |
| El problema del plegamiento de proteínas y los embudos de energía | 11 |
| Agentes perturbantes para el estudio del plegamiento de proteínas | 14 |
| La temperatura como agente desnaturizante | 15 |
| El plegamiento en proteínas homólogas | 18 |
| ANTECEDENTES GENERALES..... | 22 |
| Triosafofato Isomerasa: estructura y función..... | 22 |
| Plegamiento de la TIM..... | 33 |
| Ingeniería de proteínas en la TIM..... | 36 |
| ANTECEDENTES ESPECÍFICOS | 40 |
| Estudios de la TIM realizados en el dominio Bacteria | 40 |
| Origen y evolución bacteriana | 42 |
| Filogenia del dominio Bacteria | 44 |
| Taxonomía bacteriana..... | 47 |
| JUSTIFICACIÓN | 49 |
| HIPÓTESIS | 50 |

| | |
|---|-----|
| OBJETIVOS | 50 |
| Objetivo general | 50 |
| Objetivos particulares | 50 |
| ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO | 51 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 53 |
| Reactivos y soluciones utilizadas | 53 |
| Análisis filogenético del dominio Bacteria y elección de las TIMs a estudiar..... | 53 |
| Síntesis del gen y subclonación del gen en un vector de expresión..... | 53 |
| Sobreexpresión de las enzimas..... | 55 |
| Determinación de la actividad enzimática y parámetros catalíticos..... | 58 |
| Determinación del estado de oligomerización | 59 |
| Mediciones espectroscópicas..... | 59 |
| Dicroísmo Circular..... | 59 |
| Fluorescencia Intrínseca | 61 |
| Desnaturalización por temperatura..... | 62 |
| Dicroísmo Circular..... | 62 |
| Calorimetría Diferencial de Barrido | 63 |
| Resolución de la estructura tridimensional | 64 |
| Análisis de los datos..... | 66 |
| RESULTADOS | 76 |
| Análisis filogenético del dominio Bacteria y elección de las TIMs a estudiar..... | 76 |
| Análisis de las secuencias de la TIM y obtención de los genes | 84 |
| Subclonación de los genes en un vector de expresión..... | 86 |
| Sobreexpresión de las enzimas..... | 87 |
| Purificación de las enzimas | 94 |
| Parámetros Catalíticos | 100 |

| | |
|---|-----|
| Determinación del grado de asociación (oligomerización) | 101 |
| Mediciones espectroscópicas..... | 103 |
| Fluorescencia intrínseca | 103 |
| Dicroísmo circular..... | 105 |
| Estabilidad a la dilución | 105 |
| Desplegamiento térmico..... | 107 |
| TIMs bacterianas con desplegamiento térmico irreversible..... | 108 |
| TIMs bacterianas con desplegamiento térmico reversible..... | 120 |
| Curva de estabilidad de las TIMs bacterianas | 134 |
| Determinación de la estructura tridimensional..... | 137 |
| DISCUSIÓN..... | 145 |
| CONCLUSIONES..... | 161 |
| PERSPECTIVAS | 162 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 163 |
| APÉNDICE A..... | 178 |
| APÉNDICE B..... | 184 |
| APÉNDICE C..... | 188 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| °C | Grados Celsius. |
| Å | Angstroms. |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico. |
| α-GDH | α-Glicerolfosfato deshidrogenasa. |
| ARN | Ácido ribonucleico. |
| ASA | Área accesible al solvente. |
| AvTIM | TIM de <i>Azotobacter vinelandii</i> . |
| BCA | Ácido Bicinconínico. |
| BsTIM | TIM de <i>Bacillus stearothermophilus</i> . |
| CME | Centro de masa espectral. |
| C_p^{exc} | Capacidad calorífica en exceso. |
| CpTIM | TIM de <i>Clostridium perfringens</i> . |
| DC | Dicroísmo Circular. |
| DHAP | Dihidroxiacetona fosfato. |
| DrTIM | TIM de <i>Deinococcus radiodurans</i> . |
| DSC | Calorimetría Diferencial de Barrido. |
| ΔC_p | Cambio en la capacidad calorífica a presión constante. |
| ΔG | Cambio en la energía libre de Gibbs. |
| ΔG_{dis} | Cambio en la energía libre de Gibbs de disociación. |
| ΔH | Cambio en la entalpía. |
| ΔH_{cal} | Cambio en la entalpía calorimétrica. |
| ΔH_{VH} | Cambio en la entalpía de Van't Hoff. |
| ΔS | Cambio en la entropía a presión constante. |
| E_A | Energía de activación. |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> . |
| EcTIM | TIM de <i>Escherichia coli</i> . |
| EhTIM | TIM de <i>Entamoeba histolytica</i> . |
| E_T | Estado de transición. |
| G3P | Gliceraldehído-3-fosfato. |
| GdnHCl | Hidrocloreuro de guanidina. |
| GgTIM | TIM de <i>Gallus gallus</i> . |
| G/TIM | TIM de <i>Giardia lamblia</i> . |
| GoTIM | TIM de <i>Gemmata obscuriglobus</i> . |
| HpTIM | TIM de <i>Helicobacter pylori</i> . |
| HsTIM | TIM de <i>Homo sapiens</i> . |
| IF | Fluorescencia intrínseca. |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido. |
| K | Kelvin. |

| | |
|-------------------------------|--|
| k_{cat} | Constante catalítica. |
| $K_{\text{dis}}^{\text{app}}$ | Constante de disociación aparente. |
| K_{eq} | Constante de equilibrio. |
| K_{M} | Constante de Michaelis-Menten. |
| LB | Luria-Bertani. |
| λ_{max} | Longitud de onda de máxima emisión. |
| <i>Ld</i> TIM | TIM de <i>Leishmania donovani</i> . |
| <i>Lm</i> TIM | TIM de <i>Leishmania mexicana</i> . |
| m^{\ddagger} | m cinética. |
| m_{eq} | m al equilibrio. |
| <i>Mm</i> TIM | TIM de <i>Moritella marina</i> . |
| <i>Mt</i> TIM | TIM de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . |
| <i>Np</i> TIM | TIM de <i>Nostoc punctiforme</i> . |
| <i>Oc</i> TIM | TIM de <i>Oryctolagus cuniculus</i> . |
| PDB | Base de datos de proteínas. |
| <i>Pf</i> TIM | TIM de <i>Plasmodium falciparum</i> . |
| PGA | Ácido 2-fosfoglicólico. |
| PGH | Fosfoglicolohidroxamato. |
| PM | Peso molecular. |
| P_{T} | Concentración total de proteína. |
| <i>Pw</i> TIM | TIM de <i>Pyrococcus woesei</i> . |
| R | Constante universal de los gases. |
| <i>Rm</i> TIM | TIM de <i>Rhipicephalus microplus</i> . |
| R_{s} | Radio de Stokes. |
| <i>Sc</i> TIM | TIM de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . |
| <i>Sco</i> TIM | TIM de <i>Streptomyces coelicolor</i> . |
| <i>Scr</i> TIM | TIM de <i>Sus scrofa</i> . |
| <i>Sj</i> TIM | TIM de <i>Schistosoma japonicum</i> . |
| <i>Tb</i> TIM | TIM de <i>Trypanosoma brucei</i> . |
| <i>Tc</i> TIM | TIM de <i>Trypanosoma cruzi</i> . |
| TIM | Triosafosfato Isomerasa. |
| T_{m} | Temperatura media de desnaturalización. |
| <i>Tm</i> TIM | TIM de <i>Thermotoga maritima</i> . |
| <i>Tmo</i> TIM | TIM de <i>Tenebrio molitor</i> . |
| <i>Ttx</i> TIM | TIM de <i>Thermoproteus tenax</i> . |
| <i>Tv</i> TIM | TIM de <i>Trichomonas vaginalis</i> . |
| UA/AU | Unidades arbitrarias. |
| UVA | Absorción de ultravioleta. |
| V_{max} | Velocidad máxima de catálisis. |

RESUMEN

Control cinético y termodinámico en el desplegamiento térmico de la Triosafosfato Isomerasa proveniente de especies bacterianas

La Triosafosfato Isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica ubicua que cataliza la isomerización del gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Todas las TIMs silvestres estudiadas hasta el momento son homooligómeros, en donde cada monómero adopta un plegamiento tipo barril (β/α)₈. La estructura del barril TIM es conservada entre las especies mientras que el mecanismo de plegamiento es dependiente de la secuencia. El desplegamiento de la TIM, principalmente de organismos eucariontes, ha sido estudiado extensivamente. En todas las TIMs estudiadas a la fecha, el desplegamiento térmico es un proceso irreversible y/o fuera del equilibrio, lo cual ha impedido una caracterización energético-estructural detallada.

En el presente trabajo, estudiamos TIMs pertenecientes a diversos fila bacterianos representados por las siguientes especies: *Deinococcus radiodurans* (*Dr*TIM), *Nostoc punctiforme* (*Np*TIM), *Azotobacter vinelandii* (*Av*TIM), *Gemmata obscuriglobus* (*Go*TIM), *Clostridium perfringens* (*Cp*TIM) y *Streptomyces coelicolor* (*Sco*TIM). Todas estas enzimas fueron expresadas en *Escherichia coli* y purificadas a homogeneidad, a excepción de *Av*TIM que fue descartada del estudio debido a que la enzima se depositó en cuerpos de inclusión por lo que no fue posible purificarla. La actividad enzimática mostró una cinética Michaeliana con una eficiencia catalítica similar a la de otras TIMs reportadas. La cromatografía de exclusión molecular indicó que todas las TIMs analizadas son diméricas. El espectro de Dicroísmo Circular (DC) indicó una composición de estructura secundaria propia de barriles TIM en todas las enzimas. El máximo de emisión de los espectros de fluorescencia intrínseca mostró que los triptófanos de todas las enzimas estudiadas están en un centro hidrofóbico, indicando el correcto plegado de las proteínas.

El desplegamiento térmico se estudió mediante DC y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). El desplegamiento de *Np*TIM y *Go*TIM fue irreversible y la T_m se incrementó ≈ 5 K cuando la velocidad de barrido se incrementó de 30 a 180 K hr⁻¹, indicando control cinético, un comportamiento comúnmente observado en las TIMs eucariontes previamente estudiadas. El valor de la energía de activación se encontró semejante al de otras TIMs analizadas. El estado de transición para ambas TIMs es dimérico y muy parecido al nativo en términos de exposición al solvente.

De manera sorprendente, para *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sco*TIM, el desplegamiento térmico fue reversible con una histéresis < 1 K entre las trazas de desplegamiento y replegamiento, además la ΔT_m entre las velocidades de barrido estudiadas fue < 1.5 K; todas estas evidencias son indicativas de procesos reversibles y al equilibrio, esto es, de control termodinámico, un comportamiento nunca antes encontrado para este tipo de enzimas. El valor de ΔG de estabilidad a 25 °C para estas enzimas (≈ 11 , 13 y 9 kcal mol⁻¹, respectivamente), es de aproximadamente la mitad del reportado para otras TIMs, resultado que puede indicar un “pago” fisicoquímico que otorgan las enzimas por la reversibilidad del desplegamiento térmico. Se propone que los orígenes moleculares de esta reversibilidad puedan ser vislumbrados al analizar las estructuras tridimensionales determinadas (hasta el momento para *Cp*TIM, clave PDB: 4JT1) y a determinar en el futuro.

Los resultados presentados en este trabajo indican que para el miembro fundador de la topología de barriles TIM, la secuencia de aminoácidos seleccionada evolutivamente, determina si el proceso de plegamiento/desplegamiento está bajo control cinético o termodinámico.

ABSTRACT

Kinetic and thermodynamic control in the thermal unfolding of Triosephosphate Isomerases belonging to bacterial species

Triosephosphate isomerase (TIM) is a ubiquitous glycolytic enzyme that catalyzes the isomerization of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. All the wild type TIMs so far studied are homooligomers, where each monomer folds in to a $(\beta/\alpha)_8$ barrel. The structure of the TIM barrel is conserved among species, whereas the folding mechanism seems to be sequence dependent. The unfolding of several TIMs, mainly of eukaryotic organisms, has been extensively studied. In most cases the temperature-induced unfolding is an irreversible process and/or out of chemical equilibrium, this has prevented a detailed energetic-structural characterization.

Here, we study TIMs belonging to diverse bacterial phyla: *Deinococcus radiodurans* (*DrTIM*), *Nostoc punctiforme* (*NpTIM*), *Azotobacter vinelandii* (*AvTIM*), *Gemmata obscuriglobus* (*GoTIM*), *Clostridium perfringens* (*CpTIM*) and *Streptomyces coelicolor* (*ScoTIM*). All these TIMs were expressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity, except *AvTIM* that was discarded from the study because the enzyme was deposited in inclusion bodies whence it was not possible to purify. Enzymatic activity showed Michaelian kinetics, catalytic efficiency was similar to that reported for other TIMs. Size exclusion chromatography indicated that all the TIMs are dimeric. Circular Dichroism spectra (CD) indicated content similar of secondary structure to other TIM barrels. In all enzymes studied, emission maxima of intrinsic fluorescence spectra indicated that tryptophanes are buried in a hydrophobic environment, which indicated that proteins are correctly folded.

The thermal unfolding was then studied by CD and Differential Scanning Calorimetry (DSC). Unfolding of *NpTIM* and *GoTIM* was irreversible and T_m increased ≈ 5 K when the scan rate was increased from 30 to 180 K hr⁻¹, indicating kinetic control; a behavior observed in all eukaryotic TIMs. The value of activation energy was similar to other TIMs analyzed. The transition state for both TIMs is dimeric and very similar to the native structure in terms of solvent exposure.

Interestingly, the thermal unfolding of *DrTIM*, *CpTIM* and *ScoTIM*, was reversible with a hysteresis < 1 K between unfolding and refolding traces. ΔT_m among different scan rates tested was < 1.5 K; all these evidences are indicative of a reversible process and at equilibrium, that is, thermodynamic control; a behavior not observed previously for this type of enzymes. The stability ΔG values at 25 °C for these enzymes (≈ 11 , 13 and 9 kcal mol⁻¹, respectively), is approximately half of that reported for other TIMs, a result that may indicate a physicochemical "fee" that these enzymes pay for their reversible thermal unfolding. We propose that the molecular origin of this reversibility will be discovered when we analyze tridimensional structures already determined (*CpTIM*, PDB ID: 4JT1) and which we will to determine in the future.

The results presented in this work indicate that, for the founding member of the TIM barrel topology, the evolutionarily-selected aminoacid sequence determines if the denaturation/renaturation process is under thermodynamic or kinetic control.

INTRODUCCIÓN

"Il faut faire de la vie un rêve et faire d'un rêve une réalité"
(Hay que hacer de la vida un sueño y de un sueño una realidad)

Pierre Curie, 1890

El proceso por el cual una cadena polipeptídica alcanza su estructura tridimensional, estructura nativa y biológicamente funcional, es posiblemente el ejemplo más fundamental de autoensamblaje molecular en un contexto biológico. Un conocimiento a profundidad de este proceso es esencial para la predicción de la estructura proteica a partir de la secuencia de aminoácidos, el diseño *de novo* de proteínas con propiedades nuevas y útiles, la comprensión de las teorías evolutivas y el conocimiento de los orígenes moleculares de muchas enfermedades debido al plegamiento anómalo de proteínas (Sanchez-Ruiz, 2011).

El proceso de plegamiento/desplegamiento de una proteína, implica la formación y ruptura de numerosas interacciones débiles, no covalentes. Desde una perspectiva teórica, el plegamiento de una proteína se concibe como el movimiento de un punto representando una conformación en una superficie de energía libre interna frente a los grados de libertad conformacional. Dicha energía es un paisaje de alta dimensionalidad (correspondiente a las miles de posibles conformaciones) y, en principio, podría ser considerablemente rugoso, esto es, con un gran número de mínimos y máximos locales (Dill y Chan, 1997). Sin embargo, para las proteínas, se espera que el paisaje conformacional tenga la forma general de un embudo con un pequeño grado de rugosidad, de tal manera que la proteína sea rápidamente dirigida hacia el fondo del embudo (el estado nativo), aunque las moléculas individuales comiencen en diferentes lugares en el paisaje y sigan trayectorias distintas para llegar a la parte inferior. En otras palabras, un paisaje relativamente suave, evita el plegamiento de una forma aleatoria y hace que las proteínas se plieguen en tiempos biológicamente compatibles con la vida (Bryngelson *et al.*, 1995).

Los avances en el estudio de las proteínas, hasta el momento, han permitido establecer una conexión entre el paisaje de energía del plegamiento de las proteínas y los datos experimentales cinéticos y al equilibrio. El análisis de la estabilidad de una proteína permite conocer la energía que diferencia al estado nativo de otras conformaciones "no nativas" o desnaturalizadas; conocer esta propiedad de las proteínas permite, entre muchas otras cosas, conocer el paisaje conformacional del plegamiento de una proteína y saber las barreras energéticas que rigen este proceso (Gruebele, 2002). La estabilidad cinética se refiere al hecho de que las funciones biológicas de una proteína deben ser mantenidas durante una escala de tiempo fisiológica aun si el estado nativo no es termodinámicamente estable con respecto a las formas no funcionales (estados desplegados, agregados o proteína proteolizada). Dicha estabilidad es requerida en varios casos porque las proteínas a veces trabajan bajo condiciones que favorecen las alteraciones irreversibles, por lo que la existencia de grandes barreras energéticas que prevengan estas formas no funcionales es un mecanismo de selección a través del tiempo. Una estrategia para conocer dichas barreras es realizar experimentos de calorimetría diferencial de barrido, que permiten describir la energía que rige el proceso y la escala de tiempo en que sucede éste. Además, la estabilidad cinética determinada *in vitro* puede ser un reflejo de la selección natural para la estabilidad cinética *in vivo*, que asegura el correcto funcionamiento de las proteínas y la homeostasis celular (Sanchez-Ruiz, 2010).

Sabiendo que las proteínas son componentes esenciales de las células y, de hecho, teniendo en cuenta que la vida es un escenario múltiple resultante de la actividad de las mismas, no es de extrañar que la variedad de proteínas encontradas actualmente, puedan poseer la información necesaria para conocer la historia evolutiva que ha permitido el mantenimiento de las muy diversas propiedades fisicoquímicas actuales de las proteínas. ¿Cómo han evolucionado las propiedades termodinámicas de las proteínas? ¿Existe un orden taxonómico en la diversidad de formas que evolucionaron a partir de un ancestro en común? Estas dos cuestiones están en el centro de nuestros esfuerzos científicos, sobre el quehacer de los métodos bioinformáticos, bioquímicos y de biología estructural actuales.

A partir de esta discusión inicial, a lo largo del presente escrito se abordarán más ampliamente algunos de los aspectos antes mencionados. Se iniciará con una descripción general actual del problema del plegamiento de las proteínas y cómo se ha abordado desde un enfoque fisicoquímico y evolutivo. Posteriormente, se describirá a la enzima modelo del presente trabajo, la Triosafosfato Isomerasa, una proteína con características interesantes que ha ayudado a responder algunas de las preguntas que se tienen acerca del plegamiento proteico. Por último, se describirá la relación filogenética y taxonómica de los diversos dominios de la vida, enfocando el análisis a un dominio en específico, el dominio Bacteria, el cual por su gran diversidad y ancestría, genera un elevado interés. En conjunto, se tratará de describir la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, sus mecanismos de plegamiento y su evolución.

Plegamiento de las proteínas

El problema del plegamiento de proteínas y los embudos de energía

Las proteínas son las biomoléculas encargadas de un gran número de funciones en las células, forman parte de la estructura básica de los tejidos como músculos, cabello, piel, mucosas, etc., y desempeñan funciones metabólicas tan diversas dentro y fuera de la célula como la asimilación de nutrientes, transporte de moléculas, protección inmunitaria, acciones hormonales, almacenamiento y reserva de compuestos químicos, reacciones enzimáticas, entre otras. De las proteínas depende en gran parte el buen funcionamiento celular, también son los elementos que definen la identidad de los seres vivos, pues con ellas se expresa el código genético contenido en el genoma; sus funciones junto con el ambiente forman parte del fenotipo de los seres vivos (Voet *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2002; Mathews *et al.*, 2012; Pace, 1996).

El que estructuras proteicas complejas se formen espontáneamente en periodos cortos de tiempo, es una necesidad evolutiva (Wolynes *et al.*, 1996). El plegamiento es el proceso físico mediante el cual las cadenas polipeptídicas adquieren su estructura nativa o conformación de mínima energía. La concepción actual del plegamiento se

deriva de los estudios realizados por Christian Boehmer Anfinsen a mediados del siglo XX, quien a través de experimentos con la ribonucleasa pancreática bovina, estableció que la desnaturalización es por lo general un proceso reversible, además de que la información necesaria para que una proteína adquiera su conformación nativa se encuentra codificada en la secuencia de aminoácidos (Anfinsen, 1973; Anfinsen *et al.*, 1961).

En 1969, Cyrus Levinthal mostró que la búsqueda de la estructura nativa a través de todo el universo conformacional es prácticamente imposible en un tiempo biológicamente relevante. Si suponemos que hay dos conformaciones posibles por aminoácido, una proteína de 100 residuos podría adquirir hasta 2^{100} conformaciones diferentes. Si el ir de una conformación a otra tardara un picosegundo, muestrear todo el universo conformacional tomaría un tiempo de 10^{18} segundos, lo que es igual a 10^{10} años, mayor que la edad del universo mismo. Esta cifra es completamente irreal en un contexto biológico donde el tiempo de plegamiento es del orden de segundos o minutos. A esto se le conoce como la paradoja de Levinthal (Bryngelson, 1995). Como solución a la paradoja, Levinthal propuso la existencia de vías de plegamiento. Esta forma de ver dicho proceso implica que el estado desnaturalizado (formado por un conjunto de conformaciones específicas) llega al estado nativo a través de una serie de pasos secuenciales (Dill y Chan, 1997).

De los resultados de Anfinsen, se postuló la hipótesis termodinámica donde se establece que la estructura tridimensional de una proteína, en su medio fisiológico normal, es aquella en la cual la energía libre de Gibbs (función que describe la energía del sistema proteína-disolvente) del sistema es menor. Es decir, la conformación está determinada por la totalidad de las interacciones interatómicas y, por tanto, por la secuencia de aminoácidos, en un medio determinado (Creighton, 1990).

Cada conformación que la proteína puede adoptar tiene asociada una energía determinada, al conjunto de las energías correspondientes a todas las conformaciones posibles se le conoce como paisaje energético. Actualmente se propone, con base en diversos estudios teóricos y experimentales, que el paisaje energético de las proteínas

tiene forma de embudo, donde el estado desnaturalizado se compone de todo un conjunto de conformaciones de alta energía y entropía. El espacio conformacional se reduce conforme la proteína se acerca al estado de menor energía (nativo) en el pico del embudo (figura 2). En muchos casos este proceso ocurre *in vitro*, sin la ayuda de otro componente en el sistema, lo que reduce al plegamiento a un problema fisicoquímico, gobernado por las diferencias en energía y las barreras cinéticas de los estados conformacionales que adopta la cadena en su camino hacia el estado nativo (modelo del embudo multiestado-energético) (Goodsell y Olson, 2000; Dill y Chan, 1997) (figura 1).

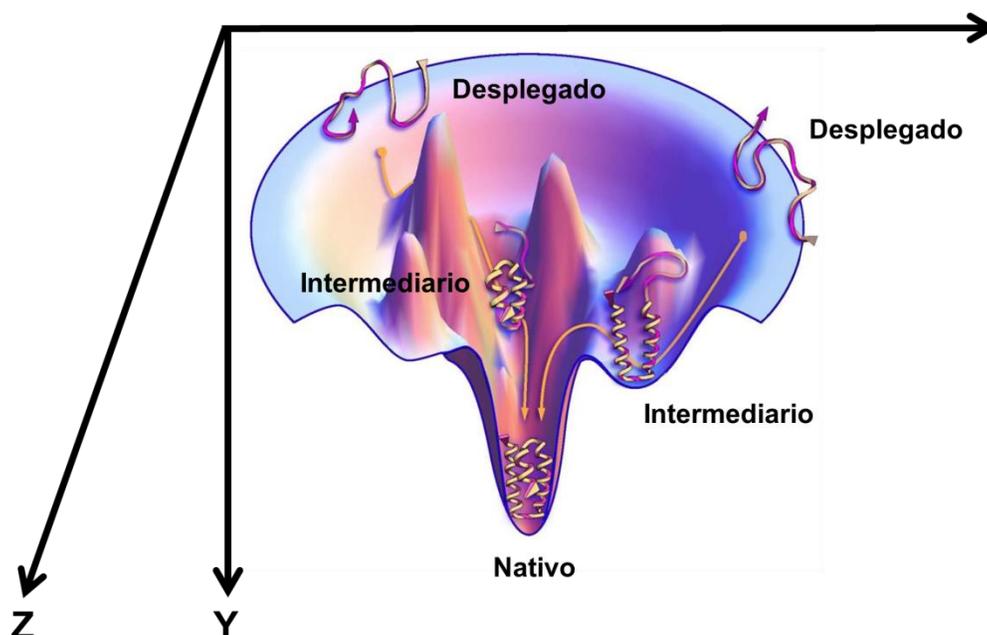


Figura 1. Modelo del embudo para el plegamiento de una proteína. Se muestra el estado nativo con el mínimo de energía que se alcanza mediante un mecanismo de plegamiento multiestado (empezando con distintas moléculas desplegadas y poblando ninguno, uno o más intermediarios en el proceso). El eje vertical del embudo (eje Y) representa la suma de las energías libres que estabilizan una cadena polipeptídica en una conformación particular. El área lateral de un paisaje de energía (eje X) a una profundidad dada (eje Z) representa el número de conformaciones que tiene la cadena polipeptídica con esa energía libre (modificado de Dill y Chan, 1997).

El plegamiento sigue siendo un problema abierto. El modelo más comúnmente usado para analizar este proceso es el que postula únicamente dos estados (nativo y desnaturalizado); sin embargo, la descripción completa del mecanismo de plegamiento involucra no sólo el estudio de los estados inicial y final, sino también el de los estados

intermedios y de los estados de transición que los conectan. En algunas condiciones, es posible observar conformaciones intermedias parcialmente estructuradas. La caracterización de estas especies proporciona valiosa información acerca de las vías y los mecanismos que dirigen a este proceso (Jaenicke, 1991).

Agentes perturbantes para el estudio del plegamiento de proteínas

El plegamiento de proteínas es muy complejo, para elucidar como ocurre se realizan estudios *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. En la observación *in vivo* existen factores auxiliares como las chaperonas, que dirigen el proceso a una vía productiva, sin embargo, en algunos casos, el plegamiento puede llevarse a cabo sin la necesidad de estos factores, hecho demostrado en los estudios realizados *in vitro*, los cuales han arrojado una amplia fuente de datos que han sido utilizados por los modelos computacionales para simular el plegamiento *in silico*. La meta es poder predecir en un futuro la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos (Dobson, 2003).

Para estudiar el plegamiento *in vitro* de las proteínas, éstas se aíslan de la célula que las produce en su estado nativo de modo que el plegamiento de las mismas es un proceso que se debe estudiar por medio de reacciones de desnaturalización y renaturalización (Mathews *et al.*, 2012). La finalidad de estudiar este proceso, se basa en determinar la estabilidad de sus niveles estructurales y la ruta de plegamiento que sigue la proteína hasta el estado nativo, necesitando como primera característica para su estudio, que el proceso sea 100% reversible (Creighton, 1996; Dill, 1991). Se ha observado que, en general, las proteínas pequeñas se desnaturalizan reversiblemente mientras que las proteínas de mayor tamaño u oligoméricas lo hacen irreversiblemente o son parcialmente reversibles, además de que se agregan o se precipitan antes de que la condición desnaturalizante sea modificada a su estado original (Nelson y Cox 2000; Garel, 1992).

Entre los agentes más utilizados en la desnaturalización se encuentra el uso de variaciones físicas como la temperatura o la presión, o bien, agentes químicos como la variación del potencial de hidrógeno (pH) (altera los estados de ionización de las

cadena laterales de aminoácidos produciendo el desplegamiento), desnaturalizantes como el hidrocloreuro de guanidina (GdnHCl) o la urea (permiten que la solubilidad de las cadenas laterales no polares de la proteína se incremente en agua) y detergentes como el SDS (interactúan con los residuos no polares de la proteína e interfieren con su centro hidrofóbico) (Dobson, 2003; Dill, 1991).

La temperatura como agente desnaturalizante

Al utilizar la temperatura como agente desnaturalizante, aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la proteína y se desnaturaliza. Así mismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desordena la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la desnaturalización y en algunos casos la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada (Razvi y Scholtz, 2006; Pain, 2000).

La estabilidad de una proteína es una medida de la energía que diferencia al estado nativo de otros estados "no nativos" o desnaturalizados. La estabilidad termodinámica se obtiene cuando es posible calcular la diferencia de energía entre el estado nativo y el desnaturalizado, para lo cual se requiere la reversibilidad y el equilibrio en el proceso de desnaturalización. En cambio, la estabilidad cinética se refiere a la capacidad de diferenciar energéticamente la proteína nativa del E_T (el estado limitante en el proceso de desnaturalización) que da lugar al estado final; este tipo de estabilidad es la que se puede determinar en proteínas que se desnaturalizan irreversiblemente, aunque también en las proteínas reversibles, puesto que el proceso de desnaturalización también presenta un estado limitante (Rees y Robertson, 2001; Pain, 2000).

Para describir la dependencia de la estabilidad con respecto a la temperatura, se han realizado diversos métodos termodinámicos, la gráfica de Van't Hoff ha sido uno de los métodos más comunes para analizar la dependencia de una reacción en equilibrio con la temperatura (LiCata y Liu, 2011). Una gráfica del $\ln K_{eq}$ vs. $1/T$ genera una línea recta con una pendiente determinada por el cambio de entalpía en la reacción (ΔH ;

cantidad de energía que un sistema puede intercambiar con su entorno) y la ordenada al origen asociada al cambio de entropía del sistema (ΔS ; grado de desorden) (ecuación 1):

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (1)$$

Al calcular la diferencial de la ecuación de Van't Hoff que relaciona la dependencia de la K_{eq} con respecto a la temperatura y al aplicar la relación de $\Delta G = -RT \ln K_{eq}$, se puede obtener la ecuación de Gibbs-Helmholtz, en ambas ecuaciones los gráficos serían lineales si ΔH y ΔS fueran constantes con la temperatura (Fersht, 1999). Sin embargo, hace más de cuatro décadas, un número de biofísicos encontraron que las interacciones entre macromoléculas biológicas están frecuentemente asociadas con los cambios de capacidad calorífica, esto es, ΔS y ΔH no son independientes de la temperatura. Además, con el descubrimiento del efecto hidrofóbico y su singular dependencia de la temperatura (Kauzmann, 1959; Frank y Evans, 1945), quedó claro que el acercamiento inicial de que $\Delta C_p = 0$, era una representación muy pobre de lo que en realidad sucedía en el desplegamiento de las proteínas. Con diversos estudios pioneros en el campo de las proteínas, se encontró que el ΔC_p de desplegamiento de una proteína es grande y positivo, y que dentro del error experimental, éste puede tomarse como una constante para una proteína determinada (Privalov y Khechinashvili, 1971; Shiao *et al.*, 1971; Brandts, 1964).

Con todo esto, se consideró que el parámetro de ΔC_p debía incluirse para calcular la curva de estabilidad de una proteína. Además, al expresar la ecuación en términos de la temperatura media de desnaturalización (T_m), haciendo referencia a una temperatura (T) y considerando que como $\Delta G = 0$ en la T_m , se puede reorganizar la ecuación 1 excluyendo el ΔS , dando como resultado la ecuación de Gibbs-Helmholtz (ecuación 2) que describe la estabilidad de una proteína con respecto a la temperatura (Rees y Robertson, 2001):

$$\Delta G = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left(T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right) \quad (2)$$

Con esta ecuación es posible construir una curva de estabilidad para una proteína dada (figura 2). Algunas propiedades de dicha curva, son: la dependencia de la temperatura sobre las variables ΔH y $T\Delta S$, otorgada por el parámetro ΔC_p , que al ser positivo refleja la exposición al agua de los grupos hidrofóbicos ocultos en el estado nativo de la proteína (Fersht, 1999). Otra consecuencia de que el $\Delta C_p > 0$, es que la gráfica de estabilidad presente la curvatura indicada en la figura 2, mostrando la curva una temperatura máxima de estabilidad y dos temperaturas de desnaturalización media, una a temperatura baja y otra a temperatura alta (Razvi y Scholtz, 2006; Rees y Robertson, 2001). Además, se observa que al considerar el máximo de estabilidad, se puede construir una relación que considere los valores donde ΔH y $\Delta S = 0$, teniendo así que a bajas temperaturas, el término dominante es ΔH y que al incrementar la temperatura, el término que se vuelve dominante en la estabilidad proteica es el $T\Delta S$ (Becktel y Schellman, 1987). Debido a la falta de reversibilidad en el proceso de desplegamiento térmico, curvas de este tipo se han realizado principalmente en proteínas pequeñas y/o monoméricas.

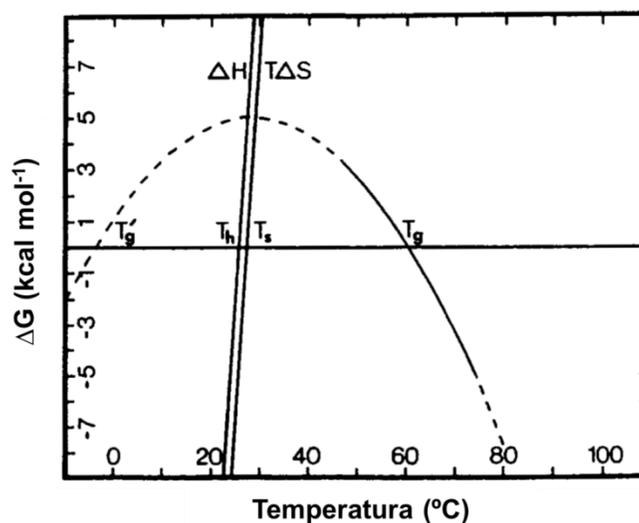


Figura 2. Curva de estabilidad proteica. La curva es derivada de la variación de la entalpía y entropía de desplegamiento de acuerdo a la temperatura. La línea sólida representa la porción de la curva usada en el análisis de Van't Hoff de la transición. La línea discontinua indica la extrapolación de los datos. Las dos líneas rectas indican la relación entre los valores de $\Delta H=0$ (T_h), $\Delta S=0$ (T_s) y el máximo de estabilidad de la proteína, lo que provoca el dominio entálpico o entrópico del sistema de acuerdo a la temperatura que se explore. T_g y T_g' indican la temperatura media de desnaturalización por calor y frío, respectivamente (fuente: Becktel y Schellman, 1987).

El plegamiento en proteínas homólogas

Existen diversos estudios cinéticos y al equilibrio para analizar las vías de plegamiento de proteínas homólogas (proteínas derivadas de un mismo ancestro en común). En todos ellos, aunque el nivel de profundidad y caracterización de los estudios es muy diferente (es decir, no todos se han realizado con las mismas técnicas ni estudiado los mismos aspectos fisicoquímicos), se han encontrado dos grandes grupos: a) las vías de plegamiento se encuentran conservadas evolutivamente, en proteínas pertenecientes a una misma familia (Gunasekaran *et al.*, 2001) y b) a pesar de conservar una topología (o dominio estructural), la vía de plegamiento se encuentra diversificada y no se conserva evolutivamente (Zarrine-Afsar *et al.*, 2005). Algunos ejemplos en donde las rutas de plegamiento siguen caminos similares para proteínas homólogas, son:

1. **Ribonucleasa**. La vía de plegamiento se mantiene constante; al comparar proteínas de distintas especies, todas se pliegan mediante un mecanismo de dos estados, sin la presencia de intermediarios estables (Krebs *et al.*, 1983).
2. **Proteína de unión a acetil-coA**. Al estudiar cuatro proteínas de unión a acetil-coA, se encontró que sus mecanismos de plegamiento están fuertemente relacionados entre ellas y que todas siguen un proceso de dos estados con solamente un paso en la conversión del estado nativo al desnaturalizado (Kragelund *et al.*, 1996).
3. **Proteína de choque por frío**. Al comparar miembros cercanos evolutivamente, se observa que todas se pliegan por un mecanismo de dos estados sin la presencia de intermediarios estables. Incluso, al comparar proteínas derivadas de organismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos, se encontró que las velocidades de plegamiento son similares y los estados de transición son estructuralmente parecidos en todas ellas. Por lo tanto, al parecer la vía de plegamiento en esta familia de proteínas ha sido conservada a través del tiempo (Reid *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 1999; Perl *et al.*, 1998).

4. **Proteínas con topología α/β** . Algunos miembros de bajo peso molecular pertenecientes a esta topología (acilfosfatasa y ADA2h), mantienen una similitud en topología y en las estructuras del estado de transición de estas proteínas, que siguen un plegamiento de dos estados (Chiti *et al.*, 1999).
5. **Dihidrofolato reductasa**. Al analizar diferentes miembros de esta proteína se observa que la vía de plegamiento es conservada, presentando un mecanismo complejo en el que mediante vías paralelas de plegamiento. Dicha vía involucra al menos dos tipos de intermediarios cinéticos dentro de ella; estos tienen las mismas características fisicoquímicas y responden a velocidades de formación semejantes. Al comparar el mecanismo de plegamiento con el del análogo p21 H-ras y encontrar que se pliega de la misma forma, sugiere que probablemente una misma vía de plegamiento ha sido conservada evolutivamente en diferentes miembros de proteínas con topología α/β (Wallace y Matthews, 2002).
6. **Espectrina**. En homólogos de la familia de la espectrina, diferentes dominios se pliegan de acuerdo al modelo de dos estados al equilibrio con un probable intermediario cinético de alta energía, el cual es semejante entre ellos (Wensley *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2004).

Algunos ejemplos para el caso de proteínas homólogas que a pesar de conservar una misma topología en sus diferentes miembros, estos se pliegan por vías y mecanismos diferentes, son:

1. **Proteína inmunitaria Im7/Im9**. Para dos proteínas inmunitarias homólogas (Im7 y Im9), se observó que estructuralmente el estado nativo no presenta diferencias significativas, pero que el plegamiento de ambas sigue diferentes mecanismos cinéticos. Por un lado, Im9 no presenta intermediarios estables mientras que en Im7 un intermediario altamente compacto es poblado en la fase explosiva del plegamiento. Este fue el primer ejemplo de distintos mecanismos de plegamiento en familias de proteínas relacionadas evolutivamente (Ferguson *et al.*, 1999).
2. **Proteína de unión a lípidos**. Al estudiar miembros diferentes de la familia de proteínas de unión a lípidos, con una similitud del 93% en secuencia de aminoácidos, se encontró que sus vías de plegamiento son distintas. En una de ellas se observa la presencia de al menos dos intermediarios cinéticos que no

presenta otra proteína de la familia, la cual tiene un intermediario al equilibrio; los autores le atribuyen esta diferencia a la presencia de distintos centros hidrofóbicos (Ropson *et al.*, 2008; Dalessio y Ropson, 2000; Banaszak *et al.*, 1994).

3. **Proteína G/L.** A pesar de que la proteína L en su estado nativo es altamente simétrica, durante el proceso de plegamiento la simetría se pierde: en el estado de transición (E_T) una misma parte de la proteína se pliega y la otra permanece desestructurada hasta después del paso limitante del plegamiento (Kim *et al.*, 2000). Si se compara con otra proteína similar en estructura, como es la proteína G, se puede notar que a pesar de conservar una misma estructura tridimensional, el E_T de ambas proteínas es totalmente distinto, ya que en la proteína L, una sección es formada en las etapas primarias del plegamiento (primera horquilla β), mientras que en la proteína G ésta se forma hasta al final de la vía (McCallister *et al.*, 2000).
4. **Globinas.** En la familia de globinas, las vías de plegamiento no están conservadas a pesar de tener una misma estructura terciaria (Lecomte *et al.*, 2005). Aunque presentan algunas similitudes, como la presencia de una fase explosiva al inicio del proceso, los intermediarios al equilibrio son diferentes. Para la apomioglobina, el intermediario estable se estructura de forma diferente en comparación con la apoleghemoglobina, donde esa misma parte de la proteína permanece desestructurada en el intermediario (secuencia de hélices distintas). Por lo anterior, las características fisicoquímicas de los intermediarios son diferentes en cada proteína (Nishimura *et al.*, 2000).
5. **Proteínas con puentes disulfuro.** En el caso de proteínas pequeñas ricas en puentes disulfuro se puede observar que existe una heterogeneidad grande en las vías de plegamiento, con la presencia o no de intermediarios y que depende importantemente de la formación temprana de los puentes y la creación del andamiaje que guían el plegamiento global de la proteína (Arolas *et al.*, 2006).

6. **Lactoalbúmina/Lisozima.** Al comparar el plegamiento de dos proteínas homólogas, la lactoalbúmina y lisozima, se puede observar que sus mecanismos de plegamiento son distintos. A pesar de seguir una vía de plegamiento de tres estados, y tener un comportamiento cinético semejante, la estructuración de las proteínas es diferente tanto en el E_T como en el intermediario estable (Nakamura *et al.*, 2010).
7. **Triosafofato Isomerasa.** En el caso de la TIM, se han observado diferencias considerables en las vías y mecanismos de plegamiento de acuerdo a la especie de donde provenga la enzima, por lo que se ha concluido que la vía de plegamiento no está conservada en esta familia de enzimas (Guzman-Luna y Garza-Ramos, 2012; Peimbert *et al.*, 2008a; Vazquez-Contreras *et al.*, 2004).

Debido a que la estructura terciaria y cuaternaria de la TIM en diferentes especies es esencialmente idéntica, la TIM es un excelente modelo de estudio sobre la evolución de los mecanismos de plegamiento en proteínas homólogas (Peimbert *et al.*, 2008b; Chanez-Cardenas *et al.*, 2002).

ANTECEDENTES GENERALES

Triosafosfato Isomerasa: estructura y función

La superfamilia de la TIM o proteínas de barril (β/α)₈ es una de las más abundantes en la naturaleza, ya que aproximadamente el 10% de todas las proteínas conocidas contienen esta estructura (Reardon y Farber, 1995). De acuerdo a SCOP, CATH y FSSP (base de datos que clasifican proteínas de acuerdo a su arquitectura, topología y secuencia), la superfamilia de barriles TIM puede subclasificarse en 33, 29 y 24 subfamilias, respectivamente, indicando el gran contenido y variabilidad de estructuras pertenecientes a esta topología (Hadley y Jones, 1997). Los barriles TIM participan en una gran variedad de funciones celulares y reacciones metabólicas. La mayoría de los miembros son enzimas y existe representantes en cinco de las seis clases de enzimas definidas por la comisión internacional de enzimas (EC) (Nagano *et al.*, 2002; Wierenga, 2001). El miembro fundador de esta superfamilia es la enzima triosafostato Isomerasa (TIM, del cual deriva el nombre de la superfamilia), la cual es una enzima de aproximadamente 250 aminoácidos localizada en citoplasma, cloroplastos y mitocondrias, que participa en la gluconeogénesis, la síntesis de triglicéridos, el ciclo de Calvin y principalmente en la vía de la glucólisis. Mediante esta última vía metabólica anaerobia, la mayoría de las formas de vida degradan la glucosa en dos moléculas de piruvato, con la producción de dos moléculas de ATP a través de 10 reacciones enzimáticas. En el cuarto paso, la hexosa difosforilada fructuosa-1,6-bifosfato se divide por la enzima aldolasa en dos triosas: la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que a su vez en una cetosa, y el gliceraldehído-3-fostato (G3P), que a su vez es una aldosa. Solamente un producto de la aldolasa continúa la vía de la glucólisis, el G3P. (Voet *et al.*, 2006; Nelson y Cox, 2000). La TIM cataliza la interconversión entre DHAP y G3P por una reacción de isomerización, con un intermediario enediol o enediolato (figura 3 y 7) y sin la utilización de cofactores para la catálisis (Knowles, 1991; Knowles y Albery, 1977; Rose y O'Connell, 1961). Algunos organismos anaeróbicos son estrictamente dependientes de la actividad enzimática de la TIM, razón por la cual, esta enzima se ha utilizado como blanco en el diseño de drogas (Enríquez-Flores *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2011; Lopez-Velazquez *et al.*, 2004; Zimosa-Signoret *et al.*, 2003; Reyes-Vivas *et*

al., 2001; Perez-Montfort *et al.*, 1999) y vacunas (Zhu *et al.*, 2006) dirigidas en contra de endoparásitos.

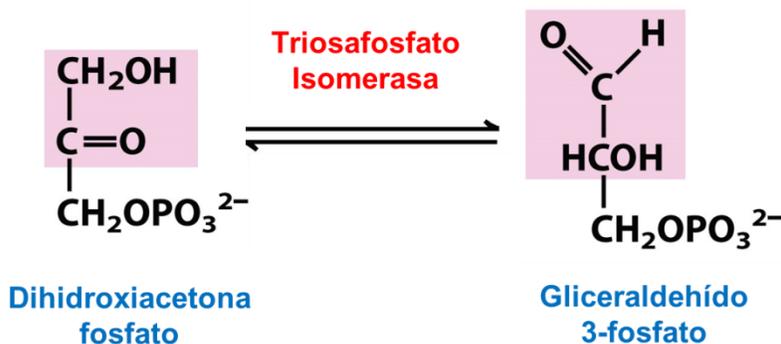


Figura 3. Reacción catalizada por la Triosafosfato Isomerasa (fuente: Nelson y Cox, 2000).

El Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, por sus siglas en inglés), clasifica a la TIM con el número 5.3.1.1 (5: Isomerasas; 3: Oxidorreductasas intramoleculares; 1: Interconvertidores de aldolasas y cetosas; 1: Triosafosfato Isomerasa) de acuerdo a la reacción que cataliza (NC-IUBMB, 1992).

La enzima posee ciertas propiedades catalíticas interesantes: la transformación de DHAP en G3P realizada por la TIM es una reacción muy rápida, entre 10^8 y 10^9 veces más rápida que en ausencia de la enzima (Mathews *et al.*, 2012; Nelson y Cox, 2000; Knowles y Alberly, 1977). Además, la TIM es un catalizador perfecto, lo cual significa que la velocidad de la reacción entre la enzima y el sustrato está controlada sólo por difusión, la formación del producto ocurre tan rápido como la enzima y el sustrato se encuentren en la solución, llegando la eficiencia catalítica ($k_{\text{cat}} K_M^{-1}$) un orden cercano de la constante de difusión, es decir, entre 10^8 y $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Knowles y Alberly, 1977). Los parámetros catalíticos para las TIMs estudiadas al momento, se presentan en la tabla 4. Se pueden notar las semejanzas en la afinidad por el sustrato y en la eficiencia catalítica de todas las enzimas, mientras que la constante de inhibición de sus inhibidores competitivos (análogos de los intermediarios de la reacción), fosfoglicolohidroxamato (PGH) y ácido 2-fosfoglicólico (PGA), se ha visto que es muy diferente entre especies (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros catalíticos para las TIMs silvestres reportadas hasta el momento.

| TIM | K_i PGA (mM) | K_M G3P (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | Eficiencia Catalítica (M ⁻¹ s ⁻¹) [†] | Referencia |
|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|---|---|
| <i>Ec</i> TIM | 6 | 1.03 ± 0.10 | (5.4 ± 0.1) × 10 ⁵ | (2.18 ± 0.24) × 10 ⁸ | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Eh</i> TIM | ND | 0.61 ± 0.46 | 2.4 × 10 ⁵ | 1.64 × 10 ⁸ | Landa <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Gg</i> TIM | 0.02 | 0.47 | 2.6 × 10 ⁵ | 2.27 × 10 ⁸ | Plaut y Knowles, 1972; Putman <i>et al.</i> , 1972 |
| <i>Gl</i> TIM | 0.043 | 0.53 ± 0.03 | (2.9 ± 0.2) × 10 ⁵ | (2.28 ± 0.16) × 10 ⁸ | Reyes-Vivas <i>et al.</i> , 2007; Lopez-Velazquez <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Hp</i> TIM | ND | 3.46 ± 0.23 | 8.8 × 10 ⁴ | 1.10 × 10 ⁷ | Chu <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Hs</i> TIM | 0.0074 | 0.49 | 2.7 × 10 ⁵ | 2.30 × 10 ⁸ | Mainfroid, <i>et al.</i> , 1996; Mande <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Ld</i> TIM | ND | 0.33 | 2.8 × 10 ⁵ | 3.51 × 10 ⁸ | Kumar <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Lm</i> TIM | ND | 0.30 ± 0.05 | 2.5 × 10 ⁵ | 3.47 × 10 ⁸ | Kohl <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Mm</i> TIM | 89 | 1.90 ± 0.20 | (4.2 ± 0.1) × 10 ⁵ | (9.21 ± 0.42) × 10 ⁷ | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Mt</i> TIM | ND | 2.10 | 4.1 × 10 ⁶ | 8.13 × 10 ⁸ | Abendroth <i>et al.</i> , 2009; Mathur <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Oc</i> TIM | 14 | 0.32 ± 0.02 | 5.2 × 10 ⁴ | 6.77 × 10 ⁷ | Knobeloch <i>et al.</i> , 2010; Krietsch <i>et al.</i> , 1970 |
| <i>Pf</i> TIM | ND | 0.58 | 1.1 × 10 ⁵ | 7.54 × 10 ⁷ | Joubert <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Rm</i> TIM | ND | 0.48 | 1.7 × 10 ⁵ | 1.41 × 10 ⁸ | Moraes <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Sc</i> TIM | 0.03 | 1.27 ± 0.06 | 1.0 × 10 ⁶ | 3.28 × 10 ⁸ | Lambeir <i>et al.</i> , 2000; Krietsch <i>et al.</i> , 1970 |
| <i>Scr</i> TIM | ND | 0.51 | 1.2 × 10 ⁵ | 9.33 × 10 ⁷ | Jimenez <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Sj</i> TIM | ND | 0.40 | 2.1 × 10 ⁵ | 2.17 × 10 ⁸ | Sun <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Tb</i> TIM | 0.024 | 0.25 ± 0.05 | 3.7 × 10 ⁵ | 6.17 × 10 ⁸ | Hernandez-Alcantara <i>et al.</i> , 2002; Lambeir <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Tc</i> TIM | ND | 0.48 ± 0.01 | 2.6 × 10 ⁵ | 2.26 × 10 ⁸ | Reyes-Vivas <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Tm</i> TIM | ND | 2.60 ± 0.20 | 1.1 × 10 ³ | 1.76 × 10 ⁵ | Beaucamp <i>et al.</i> , 1997 [‡] |
| <i>Tmo</i> TIM | 27 | 0.84 | 2.6 × 10 ⁵ | 1.28 × 10 ⁸ | Knobeloch <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Ts</i> TIM | ND | 0.37 ± 0.05 | 7.5 × 10 ⁴ | 8.49 × 10 ⁷ | Jimenez <i>et al.</i> , 2003; Jimenez <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Ttx</i> TIM | ND | 0.20 | 2.2 × 10 ⁵ | 4.62 × 10 ⁸ | Walden <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Tv</i> TIM | ND | 0.21 ± 0.02 | 8.2 × 10 ⁴ | 1.63 × 10 ⁸ | Figuroa-Angulo <i>et al.</i> , 2012 |

PGA: ácido 2-fosfoglicólico, **G3P:** gliceraldehído 3-fosfato, **K_M :** constante de Michaelis-Menten, **k_{cat} :** constante catalítica, **ND:** no determinado. †: Realizando la corrección en la K_M al considerar que sólo el 4% del G3P en solución tiene el sustrato aldehído no hidratado, única forma que la TIM es capaz de catalizar (relación 1:25). ‡: K_M determinada para la DHAP, no se tienen datos reportados para el G3P. **Ec:** *Escherichia coli*, **Eh:** *Entamoeba histolytica*, **Gg:** *Gallus gallus*, **Gl:** *Giardia lamblia*, **Hp:** *Helicobacter pylori*, **Hs:** *Homo sapiens*, **Ld:** *Leishmania donovani*, **Lm:** *Leishmania mexicana*, **Mm:** *Moritella marina* (antes *Vibrio marinus*), **Mt:** *Mycobacterium tuberculosis*, **Oc:** *Oryctolagus cuniculus*, **Pf:** *Plasmodium falciparum*, **Rm:** *Rhipicephalus microplus*, **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*, **Scr:** *Sus scrofa*, **Sj:** *Schistosoma japonicum*, **Tb:** *Trypanosoma brucei*, **Tc:** *Trypanosoma cruzi*, **Tm:** *Thermotoga maritima*, **Tmo:** *Tenebrio molitor*, **Ts:** *Taenia solium*, **Ttx:** *Thermoproteus tenax*, **Tv:** *Trichomonas vaginalis*.

La topología de la TIM consiste en un barril (β/α)₈ (figura 4). En la estructura de la TIM, el barril beta está compuesto por ocho hebras beta paralelas, las cuales forman una elipse cuyos semiejes miden 12 Å y 18 Å. El barril está situado en el interior de la proteína, las hebras están conectadas por asas a las hélices alfa que rodean a las hebras beta (Reardon y Faber, 1995). Los aminoácidos que forman el barril beta son predominantemente hidrofóbicos. Muchas de las cadenas laterales de estos aminoácidos llenan el interior del barril y forman parte del centro hidrofóbico de la enzima. El sitio activo se encuentra ubicado en el extremo carboxilo terminal de la hoja beta cilíndrica (figura 4) (Wierenga *et al.*, 1992; Wierenga *et al.*, 1991; Lolis y Petsko, 1990).

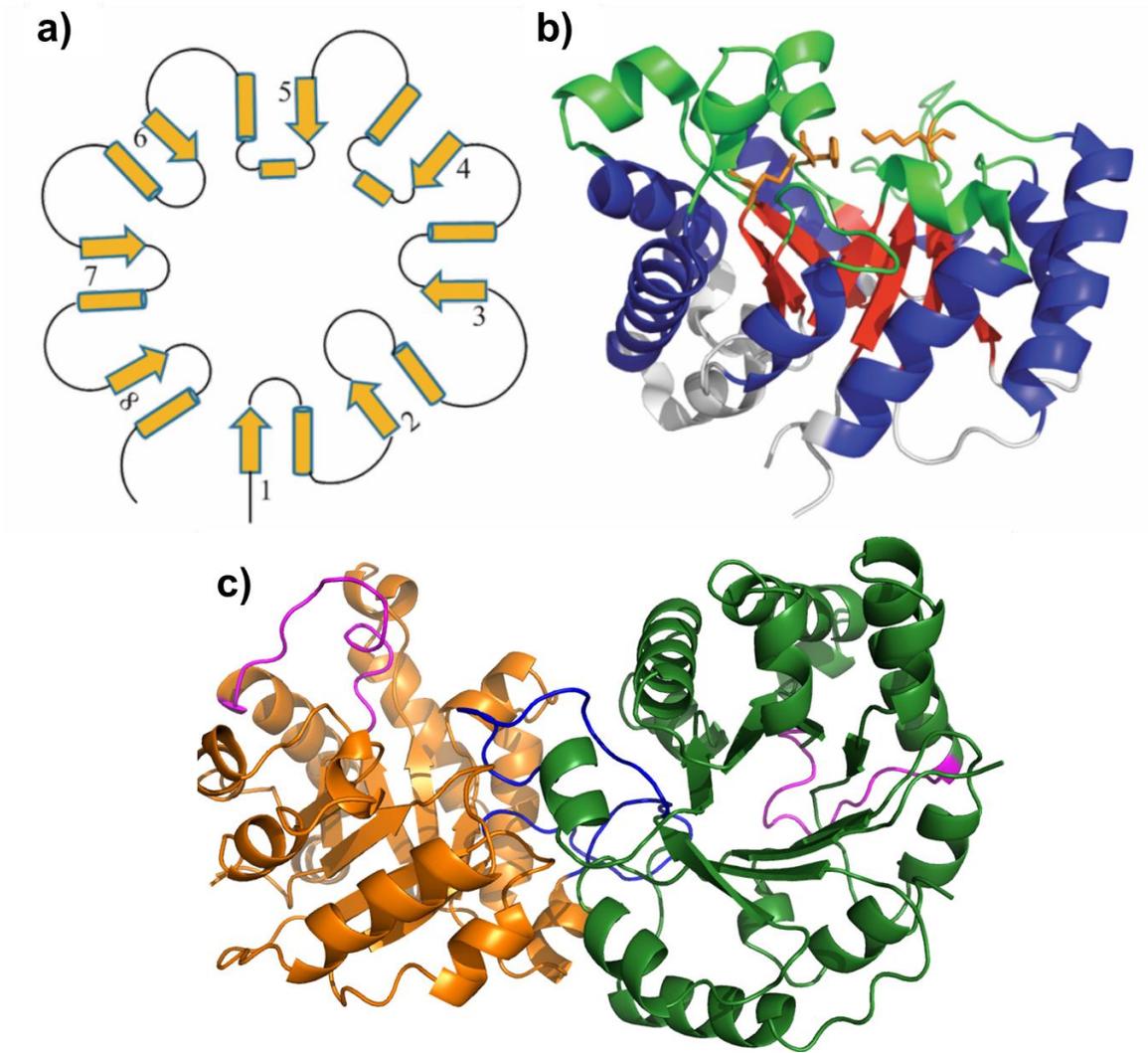


Figura 4. Estructura tridimensional de la TIM. **A)** Esquema de la estructura secundaria de un barril $(\beta/\alpha)_8$, como flechas se señalan las hebras β y como cilindros las hélices α . **B)** Estructura terciaria de una subunidad de la TIM; en rojo se muestran las hebras β , en azul las hélices α , en gris las asas $\alpha\beta$ y en verde las asas $\beta\alpha$. **C)** Dímero activo presente en la TIM; en naranja y verde se indican los monómeros, en magenta se señalan las asas $\beta\alpha$ -6 y en azul se indican las asas $\beta\alpha$ -3 (PDB ID: 1TRE; modificado de: Pardo-Avila, 2011).

Al comparar la secuencia de las TIMs reportadas, se puede notar que la identidad en secuencia aminoacídica, varía en un intervalo del 98.5% (TIM de *Homo sapiens* –HsTIM– vs. TIM de *Oryctolagus coniculus* –OcTIM–) y 12% (TIM de *Pyrococcus woesei* –PwTIM– vs. TIM de *Plasmodium falciparum* –PfTIM– y TIM de *Thermoproteus tenax* –TtTIM– vs. PfTIM). Sin embargo, al comparar las estructuras tridimensionales, se encuentra que la topología se mantiene en todas, es decir, la

arquitectura de barril (β/α)₈ ha sido conservada evolutivamente, independientemente de la variación en la secuencia aminoacídica.

Hasta el momento (1 de mayo de 2013), se han reportado un total de 145 estructuras cristalográficas de la TIM (entre TIMs silvestres y mutantes), procedentes de 28 especies taxonómicas distintas y ubicadas en los 3 dominios de la vida (122 para Eukarya, 20 en Bacteria y 3 en Archaea). Las especies de las cuales se ha determinado al menos una estructura tridimensional de la TIM, se resumen en la tabla 1.

Además del asa 6 que participa en la catálisis, existe el asa 3 que participa de manera indirecta en la estabilización del sitio activo y del dímero mismo (interfase). En el dímero, la mayoría de los contactos de interfase entre monómero, son mediados por el asa 3, también referida como el asa de interfase (residuos 65 a 79) (figura 5), que se extiende desde una subunidad dentro de una cavidad cercana al centro catalítico de la segunda subunidad (entre las asas $\beta\alpha$ -1 y $\beta\alpha$ -4) (Lolis y Petsko, 1990). Algunos residuos del asa 3 interactúan a través de contactos de van der Waals con los residuos del sitio activo de la otra subunidad. La tapa del asa 3 (residuos 74 a 77) forma una región hidrofóbica alrededor del residuo Leu12 de la subunidad adyacente (Maithal *et al.*, 2002). Las TIMs silvestres sólo son activas como dímeros (unas pocas como tetrámeros), los residuos de la interfase son cruciales para mantener la integridad de las interacciones entre ambas subunidades (figura 4 y 5) (Garza-Ramos, *et al.*, 1992; Casal *et al.*, 1987; Zabori *et al.*, 1980;).

Tabla 1. Especies para las cuales se ha determinado la estructura cristalográfica de la TIM.

| Código PDB | Especie | Resolución (Å) | Año | Referencia |
|-------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------------|
| 1TIM | <i>Gallus gallus</i> | 2.50 | 1976 | Banner <i>et al.</i> , 1976 |
| 3TIM | <i>Trypanosoma brucei</i> | 2.80 | 1987 | Wierenga <i>et al.</i> , 1987 |
| 1YPI | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1.90 | 1990 | Lolis y Petsko, 1990 |
| 1TRE | <i>Escherichia coli</i> | 2.60 | 1993 | Noble <i>et al.</i> , 1993 |
| 1HTI | <i>Homo sapiens</i> | 2.80 | 1994 | Mande <i>et al.</i> , 1994 |
| 1BTM | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 2.80 | 1995 | Delboni <i>et al.</i> , 1995 |
| 1AMK | <i>Leishmania mexicana</i> | 1.83 | 1999 | Williams <i>et al.</i> , 1999 |
| 1YDV | <i>Plasmodium falciparum</i> | 2.20 | 1997 | Velanker <i>et al.</i> , 1997 |
| 1TCD | <i>Trypanosoma cruzi</i> | 1.83 | 1998 | Maldonado <i>et al.</i> , 1998 |
| 1AW2 | <i>Moritella marina</i> | 2.65 | 1998 | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |
| 1B9B | <i>Thermotoga maritima</i> | 2.85 | 1999 | Maes <i>et al.</i> , 1999 |
| 1HG3 | <i>Pyrococcus woesei</i> | 2.70 | 2001 | Walden <i>et al.</i> , 2001 |
| 1M6J | <i>Entamoeba histolytica</i> | 1.50 | 2002 | Rodriguez-Romero <i>et al.</i> , 2002 |
| 1MO0 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | 1.70 | 2003 | Symersky <i>et al.</i> , 2003 |
| 1R2T | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 2.25 | 2003 | Aparicio <i>et al.</i> , 2003 |
| 1W0M | <i>Thermoproteus tenax</i> | 2.50 | 2004 | Walden <i>et al.</i> , 2004 |
| 1YYA | <i>Thermus thermophilus</i> | 1.60 | 2005 | Yamamoto y Kunishima, 2005 |
| 2H6R | <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> | 2.30 | 2007 | Gayathri <i>et al.</i> , 2007 |
| 2DP3 | <i>Giardia lamblia</i> | 2.1 | 2007 | Reyes-Vivas <i>et al.</i> , 2007 |
| 2JGQ | <i>Helicobacter pylori</i> | 2.30 | 2008 | Chu <i>et al.</i> , 2008 |
| 3GVG | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 2.55 | 2009 | Abendroth <i>et al.</i> , 2009 |
| 3KXQ | <i>Bartonella henselae</i> | 1.6 | 2009 | Abendroth <i>et al.</i> , 2009 |
| 2I9E | <i>Tenebrio molitor</i> | 2.00 | 2010 | Knobeloch <i>et al.</i> , 2010 |
| 3TH6 | <i>Rhipicephalus microplus</i> | 2.4 | 2011 | Moraes <i>et al.</i> , 2011 |
| 3M9Y | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.9 | 2011 | Mukherjee <i>et al.</i> , 2011 |
| 3KRS | <i>Cryptosporidium parvum</i> | 1.55 | 2011 | Nguyen <i>et al.</i> , 2011 |
| 3QST | <i>Trichomonas vaginalis</i> | 1.75 | 2012 | Salgado-Lugo <i>et al.</i> , 2012 |
| 4G1K | <i>Burkholderia thailandensis</i> | 2.35 | 2012 | Edwards <i>et al.</i> , 2012 |

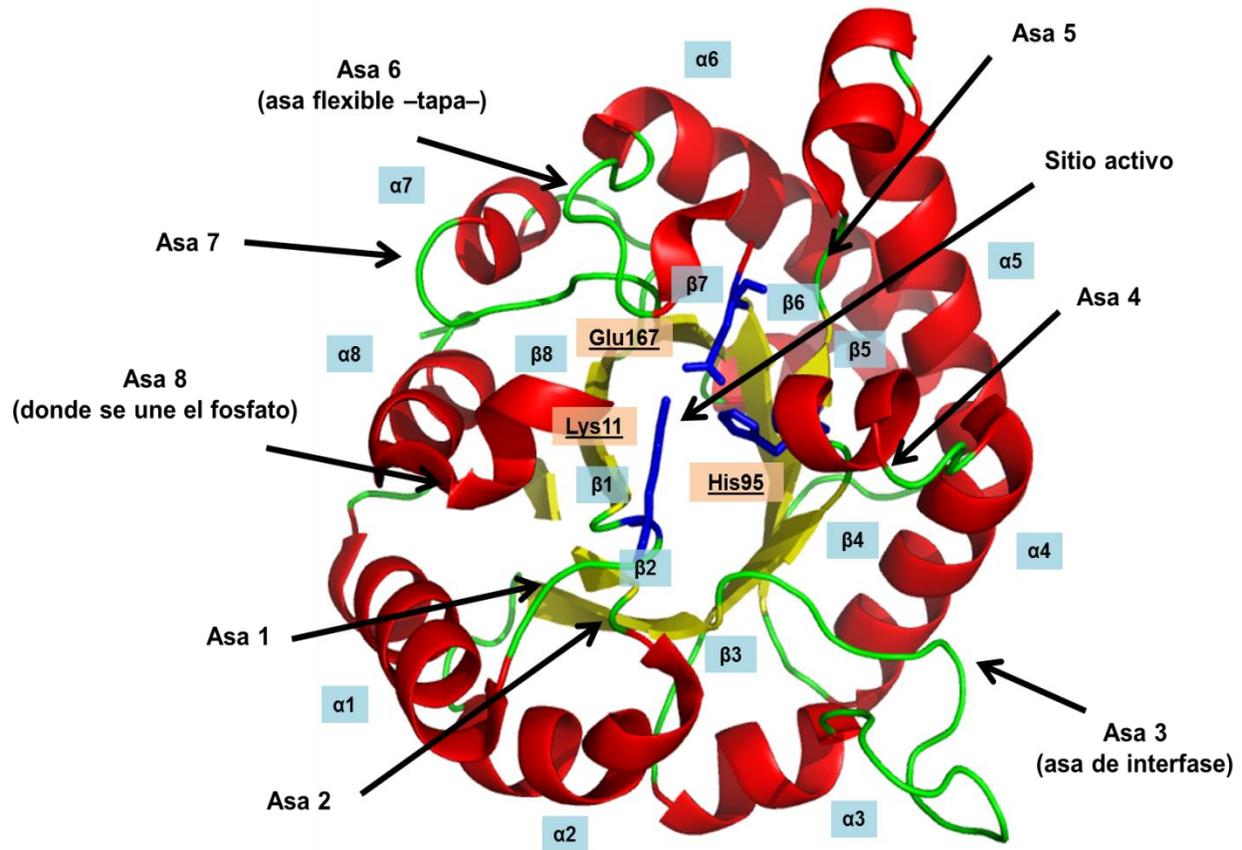


Figura 5. Topología de una subunidad (monómero) de la TIM. Las hebras β (amarillo) y α hélices (rojo) están etiquetadas de $\beta 1$ a $\beta 8$ y de $\alpha 1$ a $\alpha 8$ respectivamente. Las asas (verde) que unen a las hebras y hélices están etiquetadas del asa 1 al asa 8. Se muestran en azul, las posiciones aproximadas de los residuos catalíticos Lys11, His95 y Glu167 (modificado de Maldonado *et al.*, 1998 y de Wierenga *et al.*, 1991).

En la naturaleza, esta enzima sólo es activa en su forma oligomérica, y la estructura del dímero nativo (o del tetrámero en algunas especies), sugiere que el proceso de oligomerización es importante para estabilizar la geometría de algunos residuos del sitio activo (Najera *et al.*, 2003; Wierenga *et al.*, 1992). El sitio activo está localizado en la cara C-terminal del barril y dentro de la catálisis participan 3 aminoácidos principales, los cuales están conservados en todas las secuencias de la TIM reportadas hasta el momento: lisina 11 (asa $\beta\alpha$ -1), histidina 95 (asa $\beta\alpha$ -4) y glutámico 167 (asa $\beta\alpha$ -6) (numeración de la TIM de *Escherichia coli*, EcTIM, figura 6) (Berg *et al.*, 2002).

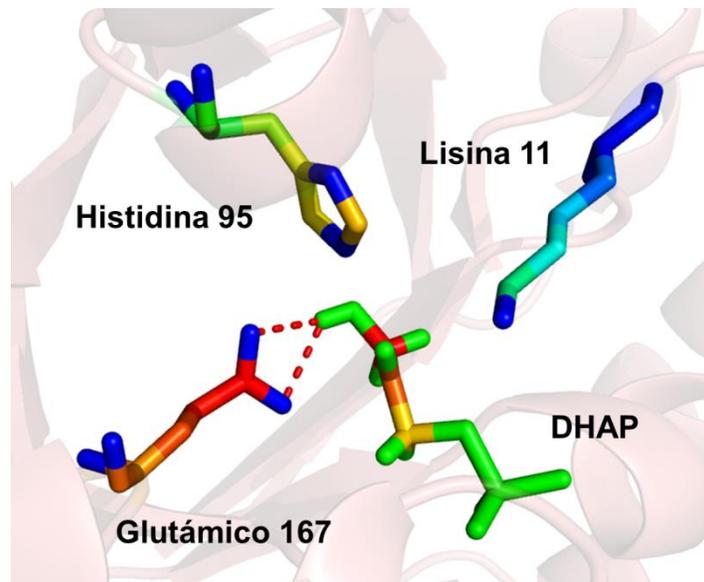


Figura 6. Triada catalítica de la Triosafosfato Isomerasa. Se indican las interacciones que estabilizan al sustrato catalizable (en este caso, DHAP) (Berg *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de la TIM se indica en la figura 7. Consideraciones químicas sugieren que la conversión del DHAP al intermediario enediol es catalizada por una base general, la cual sustrae un protón del C1 de la DHAP y por un ácido general el cual protona su átomo de oxígeno carbonílico (Voet *et al.*, 2006). La cadena lateral del Glu167 se encuentra situada idealmente para sustraer el protón del C1 del DHAP, mientras que la cadena lateral de His95 está posicionada apropiadamente para protonar el oxígeno carbonílico del DHAP (figura 7) (Wierenga *et al.*, 1992; Komives *et al.*, 1991). La cadena lateral de la Lys11, cargada positivamente, estabiliza electrostáticamente el E_T que se encuentra negativamente cargado y además forma un enlace salino con la cadena lateral del carboxilato de Glu97 (Lodi *et al.*, 1994; Joseph-McCarthy *et al.*, 1994). Además, en los pasos iniciales del mecanismo de reacción, sucede una estabilización del fosfato del sustrato por puentes de hidrógeno con la cadena principal de la proteína y la exclusión del solvente. Este último proceso es de vital importancia, ya que en solución, el intermediario enediol se rompe rápidamente con la subsecuente eliminación del fosfato del C3 formando un compuesto altamente tóxico para la célula, el metilglioxal. Para realizar la exclusión del solvente, la TIM posee un asa flexible que es el asa 6. Esta asa, a través de un movimiento de aproximadamente 7 Å, funciona como una tapa que oculta el sitio activo, permitiendo el

posicionamiento del Glu167 a una distancia adecuada del sustrato para permitir su catálisis (figura 8). Esta asa protege el sitio activo del contacto con el medio acuoso y previene la formación de metilgloxal, ya que tiene al grupo fosfato del intermediario en una posición que desfavorece la reacción de eliminación de éste (Lolis y Petsko, 1990; Wierenga *et al.*, 1991); se ha observado que la ausencia de dicha asa genera la liberación temprana del intermediario y la transformación del sustrato a metilgloxal (Pompliano *et al.*, 1990).

El perfil energético calculado de todo el proceso catalítico en dirección DHAP → G3P, considerando la formación del complejo TIM:DHAP, TIM-enediol, TIM:G3P y la liberación del producto final, se muestra en la figura 9 (Albery y Knowles, 1976).

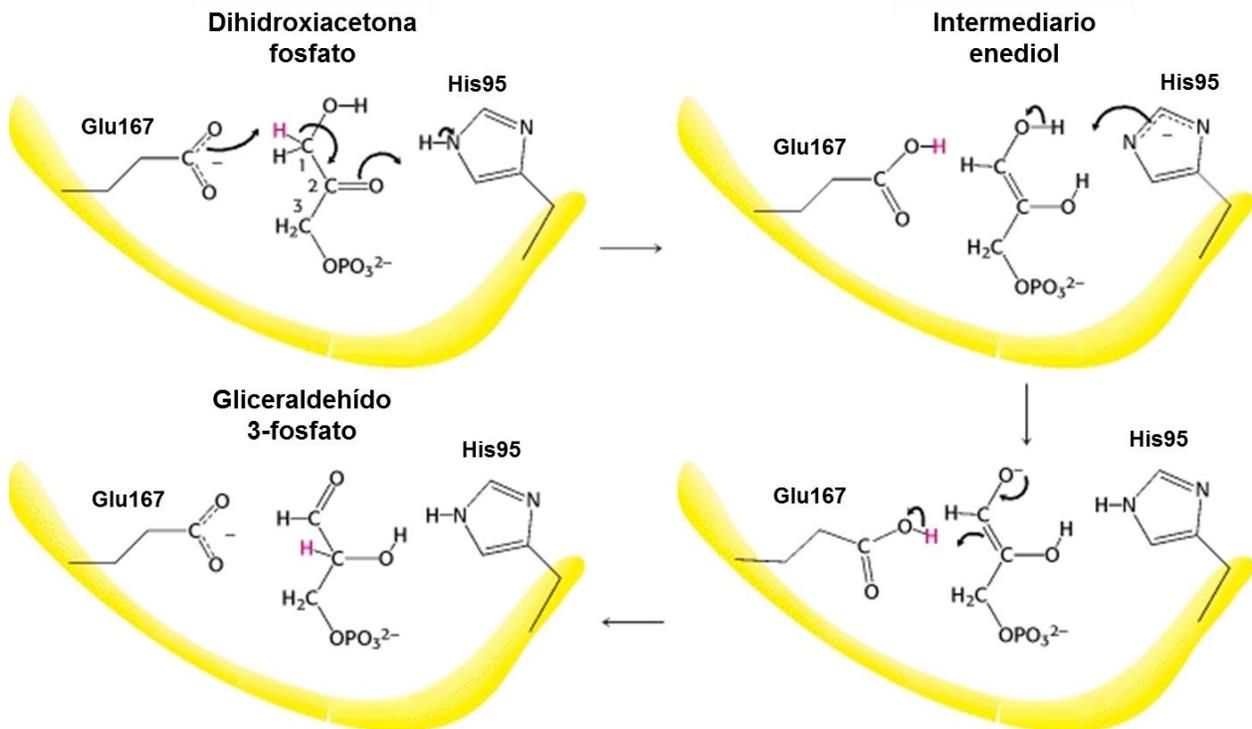


Figura 7. Mecanismo catalítico de la Triosafosfato Isomerasa (modificado de: Berg *et al.*, 2002).

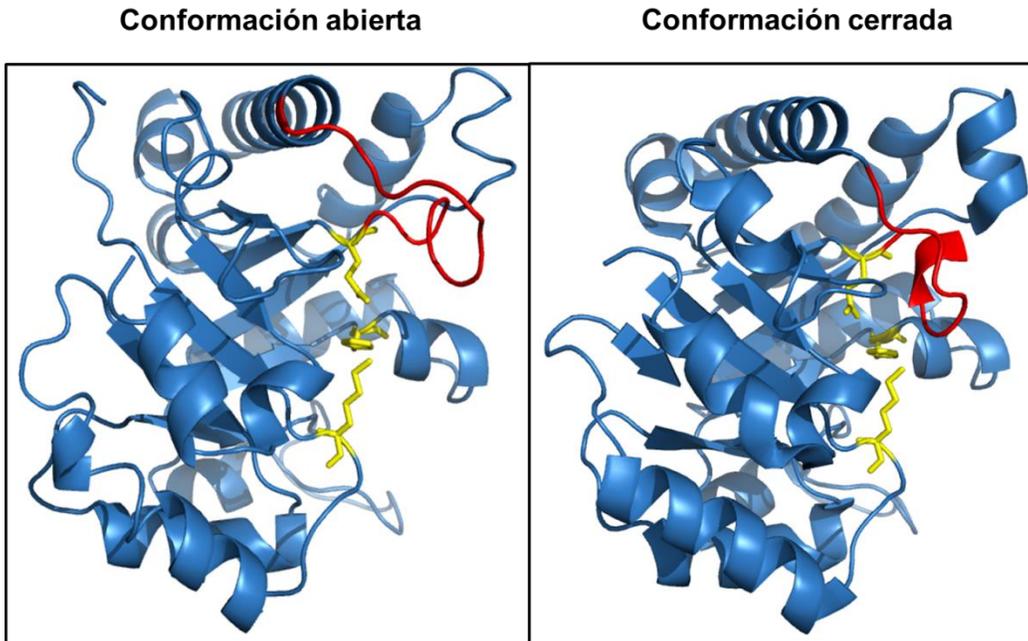


Figura 8. Conformaciones abierta y cerrada de la TIM. El asa 6 se encuentra en rojo y los aminoácidos catalíticos se señalan en amarillo (PDB ID conformación abierta: 4JT1, PDB ID conformación cerrada: 2NEY; modificado de: Derreumaux y Schlick, 1998).

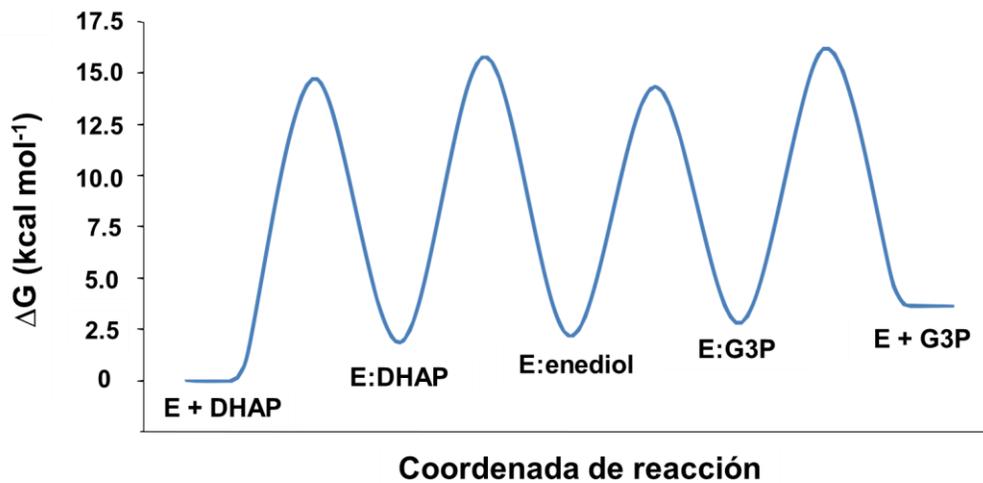


Figura 9. Cambios energéticos en cada paso de la reacción catalizada por la Triosafosfato Isomerasa. Se muestra la reacción en el sentido DHAP a G3P y se incluyen los valores de energía libre reportados para el intermediario enediol y los estados de transición (modificado de: Albery y Knowles, 1976).

Plegamiento de la TIM

Se ha propuesto que a estructuras semejantes corresponden vías de plegamiento semejantes (Clarke *et al.*, 1999). Las TIMs presentan un alto grado de conservación estructural, sin embargo, existen numerosos estudios en los que se han reportado distintas vías de desnaturalización para la TIM de diferentes especies, la mayoría de ellos utilizando agentes caotrópicos desnaturalizantes como la urea o GdnHCl. Por ejemplo: 1) dos estados para la TIM de *Bacillus stearothermophilus* (BsTIM) y *O. coniculus* (OcTIM), 2) tres estados con un intermediario monomérico para la de *S. cerevisiae* (ScTIM) y la de *E. histolytica* (EhTIM) y 3) cuatro estados para la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) y *P. falciparum* (PftIM) (tabla 3).

La relación entre la estructura y la estabilidad no ha sido completamente explicada. El análisis de la estructura cristalográfica muestra que los contactos intercatenarios representan tan sólo el 5% del cambio total del área accesible al solvente (ASA); sin embargo, los intermediarios monoméricos son poco estables y sus propiedades estructurales y parámetros termodinámicos son poco conocidas. Además, se ha visto que el ΔG de disociación (ΔG_{Dis}) es responsable de al menos el 80% del ΔG total de estabilidad, por lo cual existe una paradoja importante por resolver para dilucidar esta contradicción entre estabilidad de los monómeros y estabilidad al establecerse el estado de oligomerización como dímero.

La primera etapa del plegamiento de la TIM involucra la formación de intermediarios monoméricos. Se han reportado este tipo de intermediarios para la desnaturalización con GdnHCl de TcTIM (Chanez-Cardenas *et al.*, 2005), TbTIM (Guzman-Luna y Garza-Ramos, 2012; Chanez-Cardenas *et al.*, 2002), ScTIM (Najera *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 2000) y EhTIM (Vazquez-Perez y Fernandez-Velasco, 2007). Algunas de las características comunes a todos ellos son que conservan estructura residual, son inactivos y expandidos. Posterior a la formación de los monómeros ocurre la asociación y los rearrreglos estructurales necesarios para la consolidación del estado nativo. La presencia de intermediarios diméricos ha sido reportada para la desnaturalización de PftIM (Gokhale *et al.*, 1999), TbTIM (Guzman-Luna y Garza-Ramos, 2012; Chanez-Cardenas *et al.*, 2002) y TcTIM (Chanez-Cardenas *et al.*, 2005).

Tabla 3. Vías de plegamiento reportadas para la TIM de diferentes especies.

| TIM | Vía de desnaturalización/plegamiento | Agente desnaturalizante (Técnica) | Referencia |
|-------|---|-----------------------------------|---|
| BsTIM | $N_2 \rightarrow 2D$ | GdnHCl (IF) | Mainfroid <i>et al.</i> , 1996a |
| ScTIM | $N_2 \rightleftharpoons 2D$ | Temperatura (IF, DC, DSC) | Benitez-Cardoza <i>et al.</i> , 2001 |
| OcTIM | $N_2 \rightleftharpoons 2D$ | GdnHCl (IF) | Rietveld y Ferreira, 1996 |
| GgTIM | $N_2 \rightarrow 2D$ | Temperatura (IF, DC, DSC) | Shi <i>et al.</i> , 2008 |
| LmTIM | $N_2 \rightleftharpoons 2D$ | GdnHCl (IF, DC) | Lambeir <i>et al.</i> , 2000 |
| HsTIM | $N_2 \rightleftharpoons 2D$ | Urea (IF, DC) | Mainfroid <i>et al.</i> , 1996a |
| ScTIM | $N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$ | GdnHCl (IF, DC) | Najera <i>et al.</i> , 2003; Morgan <i>et al.</i> , 2000 |
| EhTIM | $N_2 \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$ | GdnHCl (IF) | Vazquez-Perez y Fernandez-Velasco, 2007 |
| TmTIM | $N_2 \rightarrow A \rightarrow 2D$ | GdnHCl (IF) | Beaucamp <i>et al.</i> , 1997 |
| PfTIM | $N_2 \rightarrow N_2^* \rightarrow A \rightarrow 2D$ | GdnHCl (IF, CD) | Gokhale <i>et al.</i> , 1999 |
| TbTIM | $\begin{array}{c} A \quad A \\ \uparrow \quad \uparrow \\ N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D \end{array}$ | GdnHCl (IF, CD) | Guzman-Luna y Garza-Ramos, 2012; Chanez-Cardenas <i>et al.</i> , 2002 |
| TcTIM | $N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2D$ | GdnHCl (IF, CD) | Chanez-Cardenas <i>et al.</i> , 2005 |

N₂: dímero nativo, **N₂***: intermediario dimérico, **M**: intermediario monomérico, **D**: estado desnaturalizado, **A**: estados agregados. **GdnHCl**: hidrocloreuro de guanidina, **IF**: Fluorescencia Intrínseca, **DSC**: Calorimetría Diferencial de Barrido, **DC**: Dicroísmo Circular. **Bs**: *Bacillus stearothermophilus*, **Eh**: *Entamoeba histolytica*, **Gg**: *Gallus gallus*, **Hs**: *Homo sapiens*, **Lm**: *Leishmania mexicana*, **Oc**: *Oryctolagus cuniculus*, **Pf**: *Plasmodium falciparum*, **Sc**: *Saccharomyces cerevisiae*, **Tb**: *Trypanosoma brucei*, **Tc**: *Trypanosoma cruzi*, **Tm**: *Thermotoga maritima*.

Así mismo, estudios realizados a partir de monómeros de TIM obtenidos por derivatización química, el análisis de intermediarios en la vía de plegamiento y el estudio de mutaciones que impiden la dimerización, han mostrado que los monómeros son marginalmente estables y que aproximadamente el 70% del ΔG de plegamiento está dado por la asociación de los monómeros, como se puede observar en la figura 10, donde se compara la contribución de la asociación en el plegamiento de TIMs de diferentes especies. Las razones por las cuales la TIM es un oligómero obligado, no están totalmente entendidas (Peimbert *et al.*, 2008b).

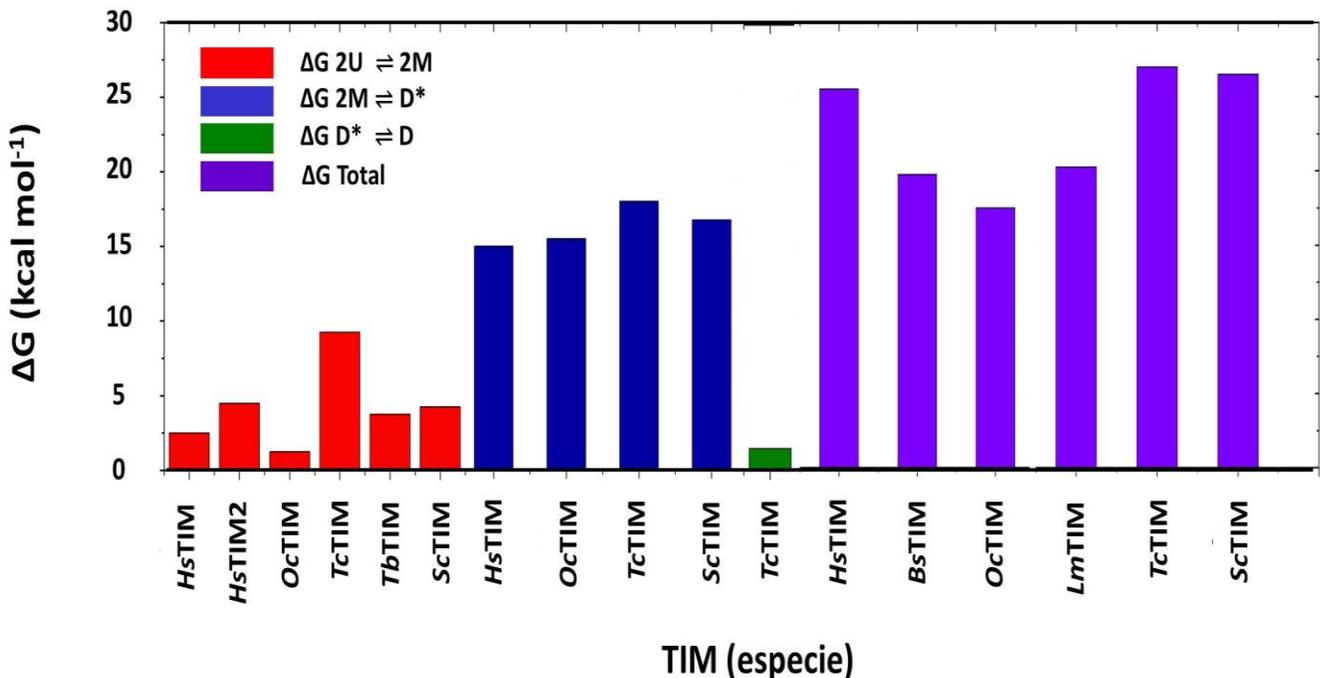


Figura 10. Comparación de energías libres determinadas experimentalmente para diferentes pasos de la vía de plegamiento de la TIM. ΔG : energía libre de Gibbs, $2U \rightleftharpoons 2M$: estado desnaturalizado a intermediario monomérico, $2M \rightleftharpoons D^*$: intermediario monomérico a dimérico (asociación), $D^* \rightleftharpoons D$: intermediario dimérico a estado nativo. **Bs**: *Bacillus stearothermophilus*, **Hs**: *Homo sapiens*, **Hs2**: mutante monomérica de la TIM de *Homo sapiens*, **Lm**: mutante puntual de la TIM de *Leishmania mexicana*, **Oc**: *Oryctolagus cuniculus*, **Sc**: *Saccharomyces cerevisiae*, **Tc**: *Trypanosoma cruzi*, **Tb**: *Trypanosoma brucei* (modificado de: Peimbert *et al.*, 2008b).

Aunado a lo anterior, el desplegamiento térmico de la TIM, principalmente de organismos eucariontes, ha sido estudiado extensivamente. En las TIMs reportadas a la fecha, el desplegamiento térmico es un proceso irreversible, fuera del equilibrio o ambos (con presencia de histéresis), es decir, un proceso controlado cinéticamente, lo

cual ha impedido una caracterización energético-estructural detallada. Debido a la histéresis y al alto grado de irreversibilidad del proceso, el uso de la temperatura como agente desnaturalizante se ha limitado más bien a la estimación de la estabilidad aparente (temperatura media de desnaturalización, T_m) de algunas TIMs y sus mutantes (Costas *et al.*, 2009; Peimbert *et al.*, 2008a; Tellez *et al.*, 2008; Mathur *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2003; Benitez-Cardoza *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 1999; Gopal *et al.*, 1999; Sun y Sampson, 1999; Williams *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 1998; Beaucamp *et al.*, 1997; Schliebs *et al.*, 1997; Mainfroid *et al.*, 1996b; Schliebs *et al.*, 1996) y la determinación de algunos parámetros termodinámicos (como el ΔS , ΔH , ΔC_p , E_A , ΔG , m^\ddagger y constantes cinéticas de la reacción, etc.), dependiendo de la TIM reportada (Costas *et al.*, 2009; Tellez *et al.*, 2008; Benitez-Cardoza *et al.*, 2001; Mainfroid *et al.*, 1996b).

Ingeniería de proteínas en la TIM

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

La estabilización de la proteína ha sido una tarea central en los estudios de ingeniería. El primer logro exitoso fue llegado a cabo por Klibanov y colaboradores. Ellos reemplazaron los residuos de asparagina de la interfase en ScTIM (N14T y N78I). La eliminación de los dos sitios de desamidación, aumenta la estabilidad de la enzima al doble cuando es calentada a 100 °C (Aher *et al.*, 1987). Otra estrategia seguida para aumentar la estabilidad de la TIM ha sido estabilizar las α -hélices. Para esto, se han creado mutantes que introducen nuevas interacciones electrostáticas, incrementan el contenido de alaninas en las α -hélices y que elevan el contenido de prolinas, en todos los casos se encontró que la estabilidad de la enzima se veía incrementada varias unidades energéticas (Mainfroid *et al.*, 1996). Diversos resultados soportan la idea de

que enzimas mesofílicas pueden ser convertidas en enzimas superestables sin afectar las propiedades catalíticas a temperaturas mesófilas (Lambeir *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 1998)

A pesar de que el sitio activo de cada monómero tiene una arquitectura independiente, la disociación de la enzima resulta concomitantemente en la inactivación de la misma aun cuando el monómero está correctamente plegado (Schliebs *et al.*, 1996). Debido a esto, se han realizado numerosos esfuerzos para tratar de comprender el mecanismo que subyace a la naturaleza oligomérica de la TIM. Una de las estrategias más utilizadas ha sido la desestabilización de la interfase de la enzima silvestre (ya sea acortándola o mutándola por aminoácidos desestabilizantes), a partir de la cual se han obtenido proteínas monoméricas mutantes (Borchert *et al.*, 1995; Borchert *et al.*, 1994). Otros ejemplos de monomerización de la TIM abarcan los realizados en *TbTIM* (mono*TbTIM*), la cual resultó ser estable pero con una k_{cat} 1000 veces mayor y una K_M 20 veces mayor respecto a la enzima silvestre, dando como resultado una disminución en la eficiencia catalítica en 4 órdenes de magnitud ($3.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Schliebs *et al.*, 1996; Borchert *et al.*, 1993). Otra monoTIM se logró obtener al acortar el asa 8 de unión a fosfato, con el fin de unir sustratos distintos a DHAP y G3P (Norledge *et al.*, 2001).

Así, se sabe que la catálisis presentada en todas estas mutantes es mucha más baja que la observada para la enzima silvestre. Estos monómeros de TIM se han sometido a diversos estudios para tratar de mejorar su actividad catalítica, en todos ellos, la eficiencia catalítica del monómero es aproximadamente 1000 veces menor que la de una enzima dimérica. Datos cristalográficos indican una mayor accesibilidad al solvente e incrementado movimiento de los aminoácidos catalíticos, lo que sugiere la alteración del sitio activo (*Ibídem*). También se ha mencionado que una de las razones clave de su baja actividad es la pérdida de rigidez en la interfase dimérica, lo que implica a su vez, conformaciones más flexibles para algunos de los residuos del sitio activo (Thanki *et al.*, 1997; Wierenga *et al.*, 1992), además de que la dimerización optimiza la geometría del sitio activo, ya que los contactos entre las subunidades disminuyen la flexibilidad de las asas catalíticas (Schliebs *et al.*, 1996). Esto implica que

en las formas monoméricas de TIM con estructura conservada, la población de sitios activos competentes es muy baja. Al generar una mutante monomérica, una gran cantidad de área hidrofóbica de la interfase dimérica queda expuesta al solvente polar, lo que genera una desestabilización a la enzima (Zarate-Perez *et al.*, 2009; Borchert *et al.*, 1994). En resumen, la monomerización invariablemente produce una drástica disminución en la actividad catalítica y una reducción en la estabilidad proteica, independientemente de la enzima estudiada.

Los acercamientos con mutagénesis agresiva han sido utilizados para explicar la robustez de la TIM. Al mezclar el orden de las unidades β/α (el mejor arreglo tiene el orden de 2-4-6-8-1-3-5-7) se observa que la enzima sigue siendo dimérica, cooperativa en la desnaturalización y que mantiene un contenido de estructura secundaria similar al estado original, todo esto indica un cierto grado de autonomía en la formación de las subunidades β/α (Shukla y Guptasarma, 2004). Con la misma filosofía, también se han explorado un total de 182 mutaciones que preservan el patrón polar-hidrofóbico de la proteína, encontrando que 97 posiciones no tienen un efecto medible en la enzima. Con lo anterior mencionado, se concluye que la catálisis es preservada evolutivamente dentro de una plasticidad grande en la secuencia de la proteína (Silverman *et al.*, 2001).

La estrategia de evolución dirigida también ha sido explorada (Saab-Rincon *et al.*, 2001), en la cual se ha encontrado la persistencia de las mutaciones A43P y T44A o S, y se postula que estas mutaciones estabilizan el asa 2 y serían la causa probable del mejoramiento de la actividad catalítica que presenta esta variante de mono *Tb*TIM. En el caso de la TIM de humano, se han creado formas monoméricas en solución que son inactivas y con una baja estabilidad, cuyo estado de asociación depende de la concentración de proteína (Mainfroid *et al.*, 1996a).

Los experimentos de modificación química han mostrado que el sitio catalítico de un monómero puede ser completamente activo incluso si está acoplado a otro monómero cuyo sitio catalítico no es funcional (Sun *et al.*, 1992a; Sun *et al.*, 1992b). La formación de heterodímeros con *Tc*TIM y *Tb*TIM, muestran que cerca de la mitad de la actividad de un monómero depende de la integridad de la interacción de la Cys15 de

*Tc*TIM (del monómero 1) con el asa 3 (del monómero 2) (Zomosa-Signoret *et al.*, 2007). El cambio de la Cys14 de *Tb*TIM ha mostrado su importancia en la oligomerización de la enzima, ya que al sustituirse por Phe, genera un monómero (Hernandez-Alcantara *et al.*, 2002). Además, mediante proteólisis limitada, en *Tb*TIM puede observarse que los monómeros que conforman al dímero, tienen diferencias estructurales entre sí o que la alteración de una subunidad es capaz de generar cambios en la otra subunidad del dímero (Reyes-Vivas *et al.*, 2002). Asimismo, la derivatización de esta Cys en *Pf*TIM y *Eh*TIM, también promueve la monomerización (Maithal *et al.*, 2002; Rodríguez-Romero *et al.*, 2002).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Estudios de la TIM realizados en el dominio Bacteria

Hasta el momento, la mayoría de los estudios sobre vías de plegamiento de la TIM se han realizado en enzimas procedentes de organismos eucariontes. Con respecto a la TIM en especies del dominio bacteria, hasta el momento se han reportado 20 estructuras cristalográficas, procedentes de 10 especies bacterianas distintas, en varias especies se tiene únicamente la estructura 3D sin tener algún dato de propiedades catalíticas, estado de oligomerización o de la ruta de plegamiento (tabla 4).

Debido a esto, el estudio de las TIMs bacterianas representa un área interesante y nueva para explorar diversos aspectos de interés sobre la enzima, ya que al tener las bacterias una gran diversidad de hábitats, se pueden encontrar condiciones distintas de adaptación que podrían reflejarse en el comportamiento diferencial de sus proteínas. Por ejemplo, en ciertas TIMs de especies bacterianas extremófilas como *Thermotoga marítima*, *Bacillus stearothermophilus* y *Moritella marina*, se ha encontrado un incremento en el número de puentes salinos involucrados en mantener una conformación adecuada de la enzima. Además, se ha observado también un número mayor de interacciones hidrofóbicas en la parte interna del barril en el caso de *T. marítima* y *B. stearothermophilus*, cuando se comparan con las demás TIMs, lo que pudiera indicar que en conjunto, todos estos cambios le otorgan mayor estabilidad a la enzima bajo condiciones extremas de temperatura, osmolaridad o ambas (Maes *et al.*, 1999).

Tabla 4. Estudios reportados de la TIM en el dominio Bacteria.

| Microorganismo | Código PDB y resolución (Å) | Tipo de asociación | K_M (mM) | k_{cat} (min^{-1}) | Eficiencia catalítica ($\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$) [†] | T_m (°C) (técnica empleada) | Otros análisis realizados acerca de la enzima | Referencia |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|------------|---------------------------------|--|-------------------------------|---|---|
| <i>Bartonella henselae</i> | 3KXQ (1.6) | ND | ND | ND | ND | ND | ND | Abendroth <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 1BTM (2.8) | Dímero | ND | ND | ND | 76 (DSC) | Estabilidad enzimática a diferentes temperaturas | Alvarez <i>et al.</i> , 1999; Delboni <i>et al.</i> , 1995 |
| | 2BTM (2.4) | Dímero | ND | ND | ND | 73 (DSC) | Tiempo de vida media. Estabilidad enzimática a diferentes temperaturas. Mutantes H12N y K13G | Alvarez <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Escherichia coli</i> | 1TRE (2.6) | Dímero | 1.03 | 5.4×10^5 | 2.18×10^8 | 54 (DSC) | ND | Alvarez <i>et al.</i> , 1998; Noble <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 25GQ (2.3) | Dímero | 3.46 | 8.8×10^4 | 1.10×10^7 | ND | Mutantes K183S, K183A, D213Q, y D213A | Chu <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Moritella marina</i> | 1AW2 (2.7) | Dímero | 1.9 | 4.2×10^5 | 9.21×10^7 | 41 (DSC) | Tiempo de vida media. Estabilidad enzimática a diferentes temperaturas. Mutante A238S | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |
| | 1AW1 (2.7) | Dímero | ND | ND | ND | ND | ND | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 3GVG (1.6) | Dímero | 2.1 | 4.1×10^6 | 8.13×10^8 | 55 (CD) | Actividad a diferentes pH. Utilización de metales para su actividad. Estabilidad enzimática a diferentes temperaturas | Abendroth <i>et al.</i> , 2009; Mathur <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Thermotoga maritima</i> | 1B9B (2.9) | Tetrámero | 2.6 | 1.1×10^3 | 1.76×10^5 | 82 (CD, IF, UVA) | Desnaturalización con GdnHCl. Actividad a diferentes pHs y temperaturas. Estudio de la enzima separada de la enzima fosfoglicerato cinasa | Beaucamp <i>et al.</i> , 1997; Maes <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Thermus thermophilus</i> | 1YYA (1.6) | Dímero | ND | ND | ND | ND | ND | Yamamoto y Kunishima, 1995 [‡] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 39MY (1.9) | ND | ND | ND | ND | ND | ND | Mukherje <i>et al.</i> , 2011 [‡] |
| <i>Burkholderia thailandensis</i> | 4G1K (2.4) | ND | ND | ND | ND | ND | ND | Edwards <i>et al.</i> , 2012 [‡] |

†: Realizando la corrección en la K_M al considerar que sólo el 4% del G3P en solución tiene el sustrato aldehído no hidratado, única forma que la TIM es capaz de catalizar (relación 1:25). ‡: Estudio únicamente estructural publicado en la base de datos de proteínas (Bernstein *et al.*, 1977). **CD**: Dicroísmo Circular, **DSC**: Calorimetría Diferencial de Barrido, **GdnHCl**: hidrocloreto de guanidina, **IF**: Fluorescencia Intrínseca, **ND**: no determinado, **UVA**: Absorción de UV.

Origen y evolución bacteriana

Al ser las proteínas los motores de las células, son el reflejo de la evolución génica que es responsable de la evolución de los seres vivos. Actualmente, estos se dividen en tres grandes dominios: bacterias (Bacteria), arqueas (Archaea) y eucariontes (Eukarya). Los organismos procariontes, esto es, aquellos cuyas células no tienen un núcleo celular diferenciado, se incluyen en los dominios Archaea y Bacteria, mientras que en el dominio Eukarya se incluyen las formas de vida con núcleo definido y con organización más compleja (protistas, animales, hongos y plantas) (Cicarelli *et al.*, 2006) (figura 11).

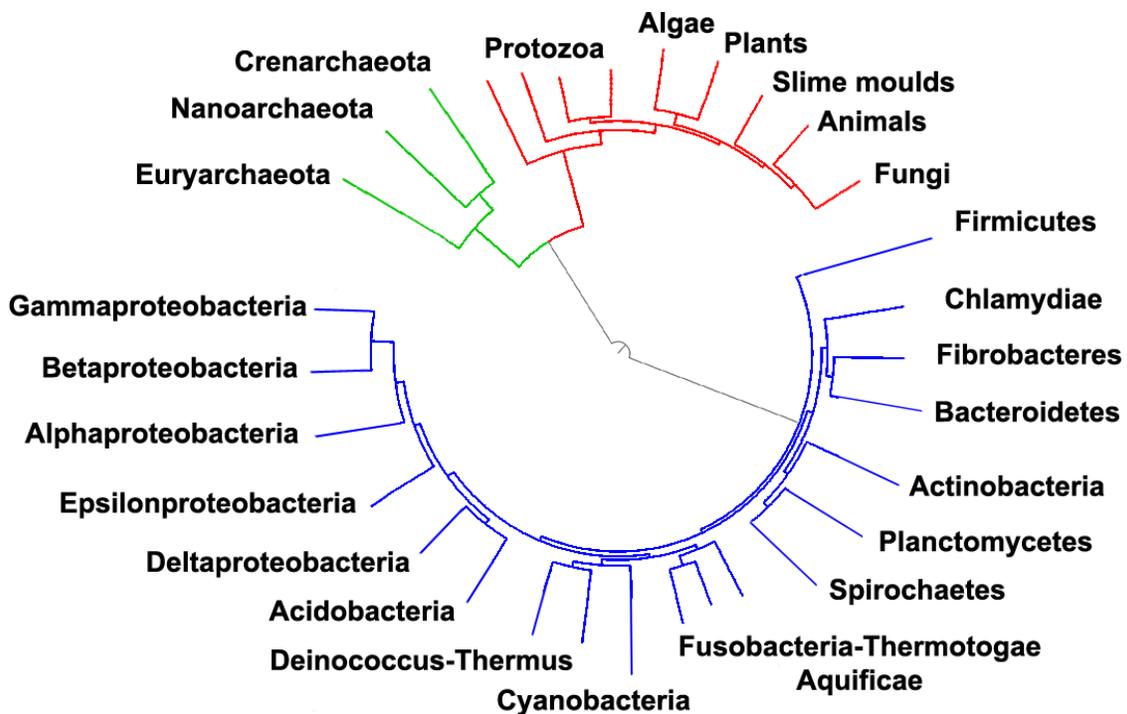


Figura 11. Árbol filogenético de los seres vivos obtenido a partir de genomas completamente secuenciados. El dominio Bacteria, coloreado en azul, presenta una gran diversidad en comparación con los otros dominios, Archaea y Eukarya. Los árboles filogenéticos colocan a Archaea y Eukarya más próximos entre sí que a Bacteria (fuente: Cicarelli *et al.*, 2006).

El término "bacteria" se aplicó tradicionalmente a todos los microorganismos procariontes. Sin embargo, la filogenia molecular ha podido demostrar que los microorganismos procariontes se dividen en dos dominios, originalmente denominados Eubacteria y Archaeobacteria, y ahora renombrados como Bacteria y Archaea (Woese *et al.*, 1990), que evolucionaron independientemente desde un ancestro común. Estos dos

dominios, junto con el dominio Eukarya, constituyen la base del sistema de tres dominios, que actualmente es el sistema de clasificación más ampliamente utilizado en bacteriología (Gupta, 2000).

Los antepasados de los organismos procariontes modernos, fueron los primeros organismos (las primeras células) que se desarrollaron sobre la Tierra, hace unos 3,800-4,000 millones de años. Durante cerca de 3.000 millones de años más, todos los organismos siguieron siendo microscópicos, siendo probablemente bacterias y arqueas las formas de vida dominantes (DeLong y Pace, 2001; Schopf, 1994). Aunque existen fósiles bacterianos, por ejemplo los estromatolitos, al no conservar su morfología distintiva no se pueden emplear para estudiar la historia de la evolución bacteriana, o el origen de una especie bacteriana. En contraste, las secuencias genéticas se pueden utilizar para reconstruir la filogenia de los seres vivos; estos estudios sugieren que arqueas y eucariontes están más relacionados entre sí que con las bacterias (Brown y Doolittle, 1997).

En la actualidad se discute si los primeros procariontes fueron bacterias o arqueas. Algunos investigadores piensan que Bacteria es el dominio más antiguo con Archaea y Eukarya derivando a partir de él (Gupta, 2000), mientras que otros consideran que el dominio más antiguo es Archaea (Wang *et al.*, 2007). Se ha propuesto que el ancestro común más reciente de bacterias y arqueas podría ser un hipertermófilo que vivió entre 2,500 y 3,200 millones de años atrás (Battistuzzi *et al.*, 2004; Di Giulio, 2003). En cambio, otros grupos sostienen que tanto Archaea como Eukarya son relativamente recientes (de hace unos 900 millones de años) (Cavalier-Smith, 2006a; Cavalier-Smith, 2006b) y que evolucionaron a partir de una bacteria grampositiva (probablemente una Actinobacteria), que mediante la sustitución del peptidoglicano por otra pared de glicoproteína y el desarrollo de histonas, daría lugar a un organismo Neomura (Poole y Penny, 2007; Cavalier-Smith, 2002).

Las bacterias también han estado implicadas en la segunda gran divergencia evolutiva, la que separó Archaea de Eukarya. Se considera que las mitocondrias de los eucariontes proceden de la endosimbiosis de una proteobacteria alfa (Dyall *et al.*, 2004;

Lang *et al.*, 1999). En este caso, el antepasado de los eucariontes, que posiblemente estaba relacionado con las arqueas (el organismo Neomura), ingirió una proteobacteria que, al escapar a la digestión, se desarrolló en el citoplasma y dio lugar a las mitocondrias. Éstas se pueden encontrar en todos los eucariontes, aunque a veces en formas muy reducidas, como en los protistas amitocondriales. Después, e independientemente, una segunda endosimbiosis por parte de algún eucarionte mitocondrial con una cianobacteria condujo a la formación de los cloroplastos de algas y plantas. Se conocen incluso algunos grupos de algas que se han originado claramente de acontecimientos posteriores de endosimbiosis por parte de eucariotas heterótrofos que, tras ingerir algas eucariotas, se convirtieron en plastos de segunda generación (Lang *et al.*, 1999; McFadden, 1999).

Filogenia del dominio Bacteria

Las relaciones filogenéticas de los seres vivos son motivo de controversia y no hay un acuerdo general entre los diferentes autores. En la figura 9 se muestra un esquema de la historia evolutiva de los seres vivos basado en las ideas de Cavalier-Smith (Cavalier-Smith, 2006a-b). Según este autor, la raíz del árbol se situaría entre las bacterias gramnegativas, que serían los organismos más antiguos (existiendo desde hace 3.500 millones de años), mientras que Archaea y Eukarya serían relativamente recientes (de hace sólo 900 millones años). Un árbol alternativo podría construirse considerando que Archaea es el dominio más antiguo y poniendo la raíz del árbol en el punto indicado por el asterisco en la figura 12 (Cavalier-Smith, 2002).

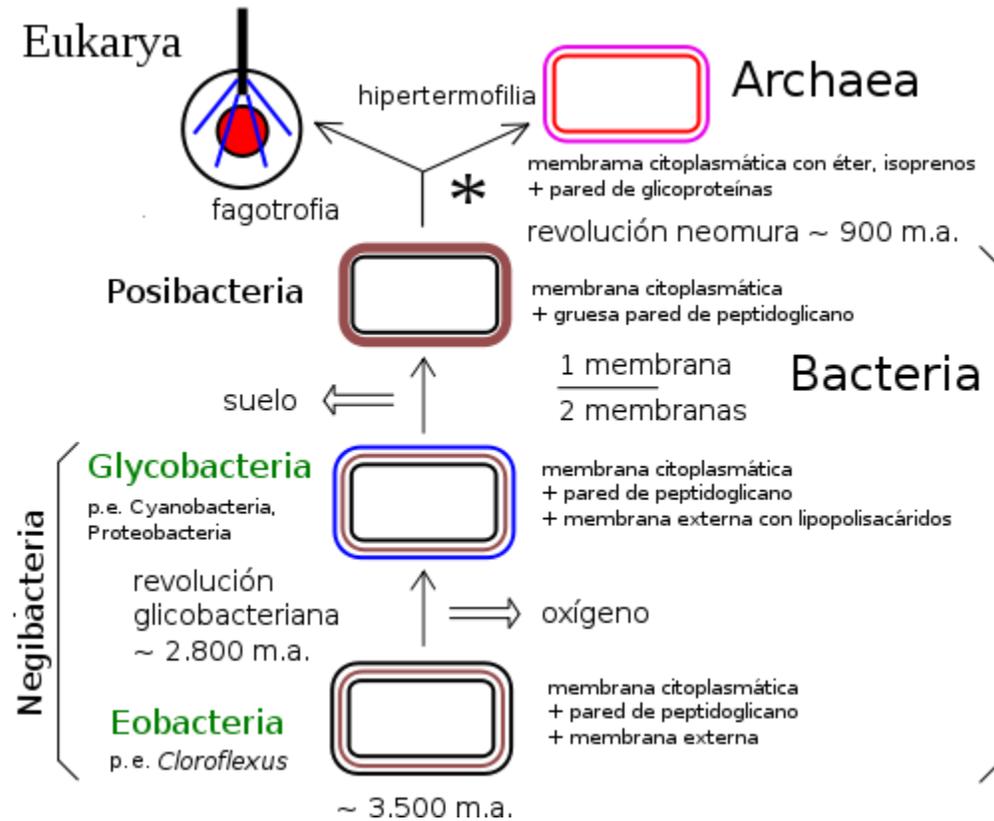


Figura 12. Esquema de la historia evolutiva de los 3 dominios de los seres vivos. Se enfatizan los cambios en la estructura celular y considerando que Bacteria es el dominio más antiguo, de acuerdo con las ideas de Cavalier-Smith (fuente: Cavalier-Smith, 2006a).

Este esquema se basa en la estructura celular de los distintos seres vivos enfatizando en la envoltura celular (membrana citoplasmática, pared celular y membrana externa). Según este criterio, el dominio Bacteria contiene organismos con dos tipos distintos de organización básica, gramnegativa y grampositiva, y además podemos subdividir a las gramnegativas en dos subgrupos en función de la composición de la membrana externa (Pearson *et al.*, 2009).

Bajo esta clasificación, se agrupan las bacterias en tres grandes supertaxones: Eobacteria, Glycobacteria y Posibacteria. Las Eobacterias y Glycobacterias a su vez se clasifican en un supergrupo, llamado Negibacteria (bacterias gramnegativas) quienes presentan dos membranas lipídicas distintas, entre las que se localiza la pared celular, mientras que el resto de los organismos presentan una única membrana lipídica. La hipótesis del citoplasma fuera describe un posible modelo para la aparición de las dos

membranas en estas primeras bacterias. Dentro de este grupo podemos distinguir dos subgrupos. Los subgrupos Eobacteria y Glycobacteria se distinguen por la composición de la membrana externa: los primeros presentan sólo simples fosfolípidos mientras que los segundos presentan inserción de moléculas complejas de lipopolisacáridos (Puigbo *et al.*, 2010).

El tercer supertaxón, las Posibacterias (bacterias grampositivas) presentan una única membrana y la pared de peptidoglicano (mureína) se hace mucho más gruesa. Se considera que las posibacterias proceden de las Negibacterias, y no al revés, porque las primeras presentan características moleculares y ultraestructurales más avanzadas. La pérdida de la membrana externa podría deberse a la hipertrofia de la pared celular, que aumenta la resistencia de estos organismos, pero impide la transferencia de lípidos para formar la membrana externa. Estos organismos fueron probablemente los primeros que colonizaron el suelo (Dagan *et al.*, 2010).

Archaea y Eukarya probablemente tuvieron como origen una Posibacteria a través de un organismo Neomura que sustituyó la pared celular de peptidoglucano por otra de glicoproteína. A continuación y casi inmediatamente, las arqueas se adaptaron a ambientes calientes y ácidos, reemplazando los lípidos acilo éster de las bacterias por lípidos prenil éter, y usando las glicoproteínas como una nueva pared rígida. Los eucariontes, en cambio, usaron la nueva superficie de proteínas como una capa flexible para desarrollar la fagocitosis, lo que los llevó, en última instancia, a profundos cambios en la estructura de la célula (Lake *et al.*, 2009; Cavalier-Smith, 2006).

El siguiente cladograma muestra más en detalle los supertaxones a los que pertenecen las bacterias y señala además las relaciones entre los distintos grupos bacterianos, de acuerdo con las ideas de Cavalier-Smith (figura 13). Para conocer a detalle las características de los diferentes supertaxones, se puede consultar el apéndice A.

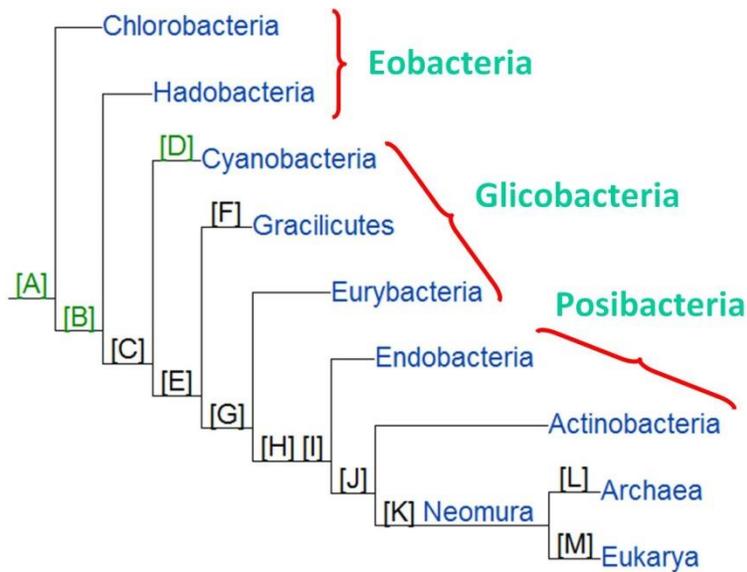


Figura 13. Cladograma que muestra la relación genética entre los distintos grupos bacterianos y su relación con los dominios Archaea y Eukarya. Se detallan los 3 supertaxones y los taxones incluidos en cada uno de ellos (fuente: Cavalier-Smith, 2006a-b).

Taxonomía bacteriana

Los fila bacterianos que se incluyen en el esquema evolutivo actualmente aceptado del dominio Bacteria y que están representados en la imagen 9, son los siguientes (Cavalier-Smith, 2006a-b; Cicarelli *et al.*, 2006):

- Supertaxón Eobacteria.
 - **Taxón Chlorobacteria.**
 - *Filo Chloroflexi.*
 - *Filo Thermomicrobia.*
 - **Taxón Hadobacteria.**
 - *Filo Deinococcus-Thermus.*
- Supertaxón Glycobacteria.
 - **Taxón-Filo Cyanobacteria.**

- **Taxón Gracilicutes**
 - *Filo Spirochaetes.*
 - *Filo Chlorobi.*
 - *Filo Bacteroidetes.*
 - *Filo Fibrobacteres.*
 - *Filo Proteobacteria.*
 - *Filo Aquificae.*
 - *Filo Deferribacteres.*
 - *Filo Chrysiogenetes.*
 - *Filo Acidobacteria.*
 - *Filo Planctomycetes.*
 - *Filo Chlamydiae.*
 - *Filo Lentisphaerae.*
 - *Filo Verrucomicrobia.*

- **Taxón Eurybacteria**
 - *Filo Fusobacteria.*
 - *Filo Thermotogae.*

- *Supertaxón Posibacteria*
 - **Taxón Endobacteria**
 - *Filo Dictyoglomi.*
 - *Filo Firmicutes.*

 - **Taxón-filo Actinobacteria.**

Para conocer más sobre las características de cada filo bacteriano, ver el apéndice A al final del texto.

JUSTIFICACIÓN

La TIM es una enzima modelo para estudios de plegamiento, tanto por su carácter oligomérico como por la arquitectura que adopta en su estado nativo. A lo largo de la escala filogenética la estructura tridimensional de la TIM está conservada, en contraste, el plegamiento de la TIM es diverso. A la fecha se han estudiado los mecanismos de plegamiento de la TIM de varias fuentes, en los cuales se ha encontrado gran variedad, desde procesos de dos estados hasta procesos que incluyen intermediarios monoméricos y diméricos. Aunque esta diversidad puede reflejar las diferencias metodológicas y las condiciones de desnaturalización empleadas por diferentes grupos de trabajo; es claro que la variación en la secuencia modifica profundamente el paisaje conformacional de la TIM. Se desconocen aún cuáles son las propiedades de los patrones de plegamiento en enzimas pertenecientes a especies del dominio Bacteria, el cual ha sido escasamente estudiado.

Así, el caracterizar las propiedades cinéticas, estructurales y de plegamiento de la enzima desde una perspectiva evolutiva, y al enfocarse el análisis a ciertas especies bacterianas importantes y representativas (desde el punto de vista evolutivo, biomédico y/o biotecnológico), nos permitirá tener mayor información de las propiedades de la enzima en el dominio bacteria, que en su conjunto, permitirá adicionalmente la reconstrucción filogenética de TIMs ancestrales para así probablemente lograr una descripción de la historia evolutiva del paisaje conformacional de esta enzima.

HIPÓTESIS

El estudio de la TIM en nuevas especies bacterianas, nos proporcionará una visión evolutiva más amplia de la estructura, propiedades catalíticas, termoestabilidad y mecanismo de plegamiento de esta enzima.

OBJETIVOS

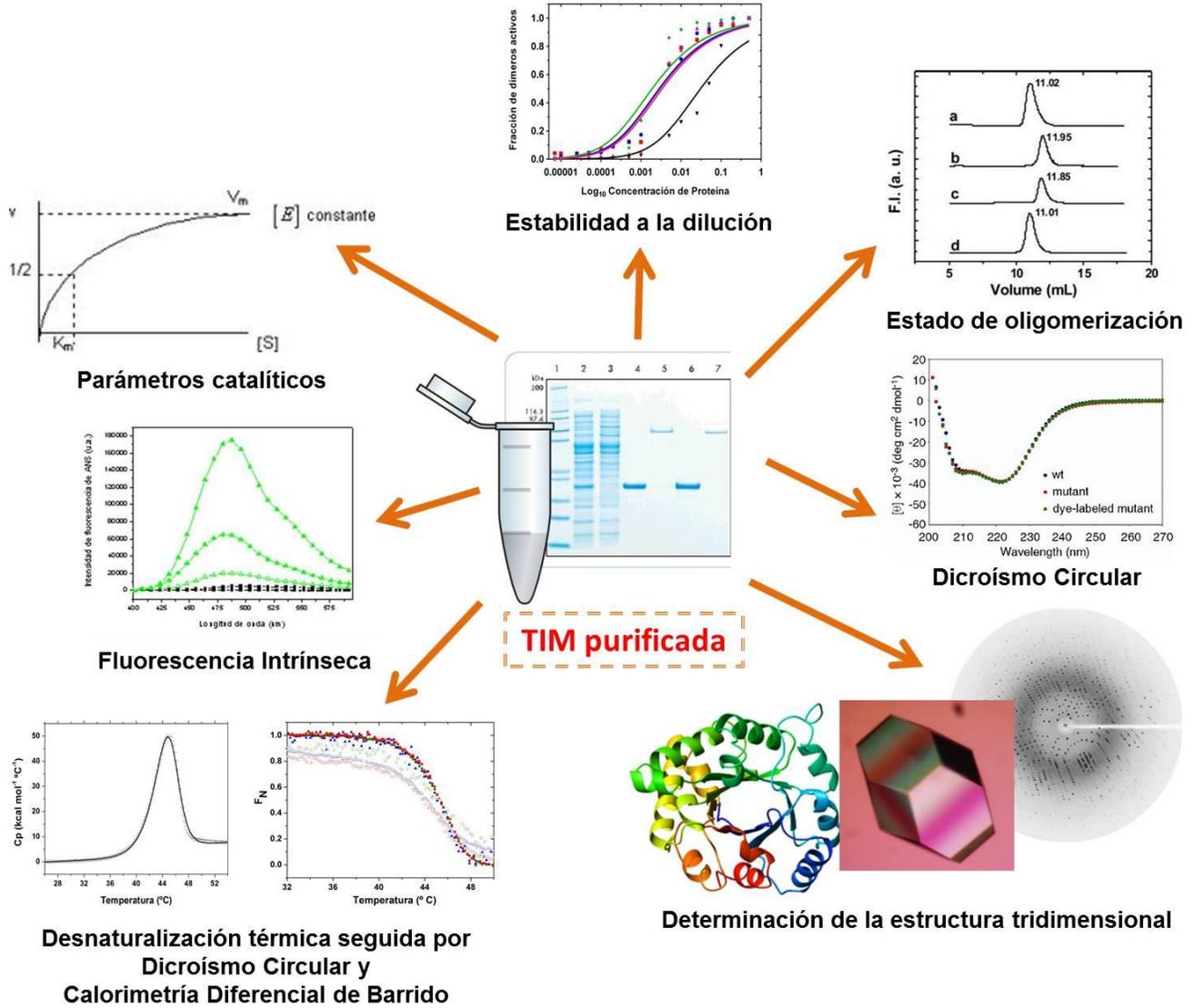
Objetivo general

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y la desnaturalización térmica de la Triosafosfato Isomerasa perteneciente a especies del dominio Bacteria de relevancia evolutiva.

Objetivos particulares

- Seleccionar algunas especies bacterianas de interés evolutivo para el análisis de la TIM que poseen.
- Sobreexpresar las enzimas y realizar la purificación de éstas.
- Definir los parámetros catalíticos y propiedades espectroscópicas de las TIMs purificadas.
- Establecer el estado de oligomerización de las enzimas.
- Determinar la estabilidad a la dilución.
- Estudiar la desnaturalización térmica de las distintas TIMs bacterianas utilizando técnicas espectroscópicas y calorimetría diferencial de barrido.
- Determinar la estructura tridimensional de las enzimas.

Parte 2



MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y soluciones utilizadas

Todos los reactivos fueron adquiridos de la marca Sigma-Aldrich (©) a excepción de aquellos donde se haga la aclaración pertinente.

Análisis filogenético del dominio Bacteria y elección de las TIMs a estudiar

Para la selección de las proteínas que se estudiaron en el presente trabajo, se realizó un análisis filogenético del dominio Bacteria para elegir especies bacterianas de interés evolutivo que nos puedan proporcionar información de otros fila bacterianos donde no ha sido estudiada la enzima TIM. Para esto, se consideró el árbol filogenético publicado por Cicarelli y colaboradores (Cicarelli *et al.*, 2006) y por otra parte, se analizó la clasificación filogenética de las bacterias, arqueas y eucariontes propuesta por Cavalier-Smith y ubicando los 3 supertaxones parafiléticos de las bacterias con sus respectivos taxones y fila, donde se incluyeron los estudios previos de la TIM realizados en bacterias. Posteriormente, se detectaron todos los fila bacterianos descritos al momento y se analizaron los eventos evolutivos clave ubicados en la evolución del dominio Bacteria. Teniendo considerados estos eventos, se eligieron los fila representativos que cubrieran sucesos importantes en la evolución y que permitieran tener una descripción global de todo el árbol filogenético de las bacterias, descartando los fila donde ya se tienen estudios previos de las TIMs. Una vez teniendo los fila elegidos, se analizaron las especies representativas de estos y con base en la importancia evolutiva (complementándola con una importancia biomédica o biotecnológica), se seleccionaron algunas especies para estudiar las características estructurales, cinéticas y de plegamiento de la TIM.

Síntesis del gen y subclonación del gen en un vector de expresión

Al tener elegidas las especies candidatas de estudio, se extrajeron las secuencias del gen de la TIM de las bases de datos de genes (Benson *et al.*, 2013) y se prepararon las secuencias para su síntesis. Los genes fueron flanqueados con los sitios de restricción

NdeI en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3' para facilitar su subclonación en un vector de expresión. Se realizó la optimización de las secuencias para el uso de codones preferencial en la bacteria *Escherichia coli*, utilizando el programa Optimizer (Puigbo *et al.*, 2007) y también usando las bases de datos de la empresa en la cual se compraron los genes. También se alinearon las secuencias obtenidas mediante el programa MAFFT 7.0 (Kato y Standley, 2013) y se compararon con *EcTIM*, todo esto para ver si existía conservación de los aminoácidos importantes en la catálisis. Tras todos los análisis, se solicitó la síntesis de los genes a la empresa *Epoch Life Science*.

Una vez que se recibieron los genes por parte de la compañía, los cuales se encontraban en un vector de clonación pBluescript-II-SK(-) (Agilent Technologies ©), se transformaron los plásmidos en células quimiocompetentes DH5- α (Agilent Technologies ©) mediante choque térmico y se extrajo plásmido por el método de Fenol-Cloroformo. Con el plásmido obtenido, se liberó el gen del vector pBluescript-II-SK(-), mediante el corte de las enzimas *NdeI* y *XhoI* por 2 horas; la digestión se analizó en un gel de agarosa al 1% y la banda que poseía el gen liberado se purificó utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen ©). Una vez purificado el fragmento, se subclonó en el vector de expresión pET-28b(+) (Novagen ®) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción utilizadas para liberar el gen de interés. Las características del vector de expresión utilizado son: 1) respuesta del vector a la regulación por *lacI* y puede ser inducido por un inductor gratuito como el Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), provocando la transcripción por la ARN polimerasa del fago T7; 2) selección de las células transformantes mediante la resistencia al antibiótico kanamicina; 3) inserción de una etiqueta de histidinas en la región N-terminal de la proteína de interés; 4) presencia de una secuencia de reconocimiento para trombina (proteasa) en el extremo N-terminal de la región de expresión, lo que permite retirar posteriormente la etiqueta de histidinas. La inserción de la secuencia de histidinas facilita la detección y posterior purificación de la proteína sobreexpresada (ver más adelante).

La subclonación se llevó a cabo mediante una reacción de ligación, incubando juntos tanto el vector de expresión como el gen *tim* durante 2 días a 16 °C en una

relación de inserto:vector de 5:1 en un volumen de 10 μL utilizando la T4 ADN ligasa (Novagen ®). Una vez terminada la reacción de ligación, se transformó a la cepa quimiocompetente *E. coli* DH5- α (Agilent Technologies ©) con el producto de ligación mediante choque térmico, seleccionando las transformantes mediante un medio LB suplementado con kanamicina (30 mg/mL). Posteriormente, se realizó la extracción de plásmido mediante el método de lisis alcalina fenol/cloroformo de una colonia seleccionada, se realizaron digestiones simples y dobles con las enzimas de restricción necesarias para liberar el fragmento y se corrieron éstos en geles de agarosa al 1% para observar si la colonia seleccionada tenía el plásmido deseado. Posteriormente se mandó a secuenciar para determinar que el gen se encontrara en el sentido adecuado y en fase correcta de lectura. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos del promotor/terminador de la T7 polimerasa. Tras el resultado positivo de la secuencia y sabiendo que el gen de interés se encontraba en la posición correcta, se transformó a la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen ©) mediante la técnica de choque térmico.

Sobreexpresión de las enzimas

Para analizar la sobreexpresión de las proteínas, inicialmente se realizaron pruebas ajustadas a un volumen pequeño con el fin de detectar si la proteína estaba siendo sobreexpresada. Las cepas se ensayaron con protocolos de sobreexpresión estándares que consistieron en crecer 10 mL de medio LB + kanamicina (30 mg mL⁻¹) con el inóculo de una colonia de la cepa a analizar, incubar toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. A partir de este cultivo, se inocularon 100 μL a otro tubo de 10 mL de medio LB + kanamicina (30 mg mL⁻¹) y se creció a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ~0.6. Luego, el cultivo se indujo con 0.8 mM de IPTG y se incubó durante 4 horas a 37 °C y 250 rpm. Se cosechó 1 mL del cultivo mediante centrifugación a 13000 rpm por 15 minutos, y las células fueron resuspendidas en líquido para sonicación (Tris base 100 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7.7) y posteriormente se lisaron por sonicación en frío (3 ciclos de 10 segundos con descansos de 10 segundos cada uno) y se centrifugaron a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C para recuperar la proteína ubicada en el sobrenadante. Las pruebas se analizaron en geles de

poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y fueron teñidos con azul de coomassie, cargando tanto el sobrenadante como el pellet después del centrifugado, para observar si la proteína se encontraba en la parte soluble o insoluble.

Purificación de la enzima

La purificación de las enzimas, en que se observó sobreexpresión, se realizó con un protocolo para volúmenes grandes, siendo el siguiente: se realizó a partir de una colonia transformada que posee el gen codificante para la TIM insertado en el vector de expresión (previamente secuenciado), realizando la inoculación en 10 ml de medio LB + kanamicina (30 mg mL⁻¹), incubando toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. A partir de este cultivo, se inoculó 1 mL a dos matraces que contenían 250 ml de medio LB + kanamicina (30 mg mL⁻¹) respectivamente y se creció a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ~0.6-0.8. Posteriormente, los cultivos se indujeron con 0.8 mM de IPTG y se incubó durante 16 horas a 37 °C y 250 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm por 20 minutos, y fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos (NaH₂PO₄ 35 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) con 5 mM de imidazol y posteriormente se lisaron por sonicación en frío (16 ciclos de 45 segundos con descansos de 45 segundos cada uno) y se centrifugaron a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C para recuperar la proteína ubicada en el sobrenadante.

El sobrenadante recuperado (previamente filtrado), se pasó a una columna de afinidad Protino Ni-TED (Macherey-Nagel ©) (volumen de la columna cromatográfica: 28.5 mL) acoplada a un sistema FPLC (GE ©) y equilibrada previamente con amortiguador de fosfatos con 5 mM de imidazol. La columna se lavó con 80 mL de amortiguador de fosfatos con 5 mM de imidazol y la proteína se eluyó con un gradiente de 180 mL de amortiguador NaH₂PO₄ 35 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 500 mM (gradiente de 0.25 mM de imidazol por cada mililitro de elución), las fracciones que presentaron una señal de UV a 280 nm mayor a 200 mUA fueron colectadas y concentradas para el paso posterior. La proteína concentrada se dializó contra amortiguador Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM para realizar el corte de la etiqueta de histidinas con la enzima trombina mediante el kit Thrombin CleanCleave (Sigma-Aldrich ©). Tras

un tiempo de corte de 4 horas, se recuperó a la proteína cortada y se inyectó a una columna Protino Ni-TED para retirar aquella enzima que no fue cortada. El gradiente ejecutado fue el mismo que en el paso inicial, pero ahora se recuperaron las fracciones iniciales que no se unieron a la columna, ya que en estas fracciones se encuentra la TIM sin etiqueta de histidinas. Los aminoácidos extras que quedan en la región N-terminal después del corte son: Gli, Ser e His.

Las fracciones recolectadas se concentraron y diálizaron contra amortiguador Trietanolamina 10 mM, EDTA 1mM, DTT 1 mM, pH 8.0 (TED 10:1:1); posteriormente, se introdujo la proteína en una columna de intercambio iónico Mono Q (Pharmacia Biotech ®) acoplada a un sistema FPLC (GE ©) como último paso de purificación, la cual fue previamente equilibrada con 75 mL de amortiguador TED 10:1:1. La columna se lavó con 20 mL de amortiguador de TED 10:1:1 y la proteína se eluyó con un gradiente de 40 mL de amortiguador TED 10:1:1 con 1 M de NaCl (gradiente de 0.5 mM de aumento de NaCl por cada mL de elución), las fracciones que presentaron una señal de UV a 280 nm fueron colectadas, cuantificadas y se les realizó la medición de actividad catalítica. Las fracciones que presentaron una actividad máxima semejante, una pureza y concentración de proteína alta, fueron mezcladas y almacenadas a 4 °C para la utilización en experimentos posteriores. En cada paso de la purificación se obtuvieron alícuotas del proceso para cuantificar la cantidad de proteína y medir su actividad catalítica, con lo que se construyeron las tablas de purificación correspondientes e identificar el rendimiento al final del procedimiento.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por su absorbancia a 280 nm. El coeficiente de absortividad molar (ϵ_{280}) utilizado para la medición fue un valor teórico obtenido mediante el servidor ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) considerando la secuencia de proteína y las cisteínas en su forma reducida (Pace *et al.*, 1995). Alternativamente, también se utilizó el método de cuantificación por ácido bicinonínico (BCA) (Bradley *et al.*, 2007) y la concentración de proteína fue reportada en mg mL^{-1} .

Determinación de la actividad enzimática y parámetros catalíticos

La medición de la actividad catalítica para seguir los pasos de purificación, se determinó mediante un ensayo acoplado en la dirección G3P hacia DHAP (Gómez-Puyou *et al.*, 1995). En la transformación de G3P a DHAP por parte de la TIM, se acopla la reducción del DHAP hacia glicerol-3-fosfato catalizada por la α -glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH). La segunda reacción implica la oxidación de una molécula de NADH hacia NAD^+ , este último no absorbe a 340 nm por lo que se observa una disminución en la absorbancia. Así, por cada G3P transformado, se oxida un NADH. El $\Delta D. O. \text{ min}^{-1}$ que se obtiene es posteriormente transformado a $\mu\text{mol de DHAP formado } \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ TIM}$, utilizando un coeficiente de absorptividad molar a 340 nm (ϵ_{340}) de $6\,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el NADH. En la figura 14 se muestra los pasos de la reacción acoplada:

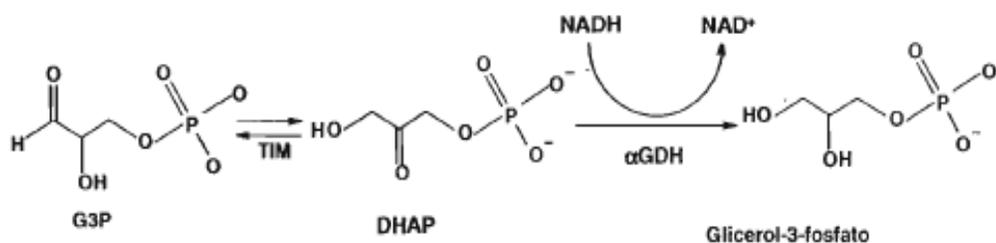


Figura 14. Reacción acoplada en dirección G3P a DHAP. La reacción es monitoreada por el decaimiento en la absorbancia del NADH (fuente: Pardo-Avila, 2011).

La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción con: 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, 1 mM DTT pH 8.0, 1 mM de G3P, 0.2 mM de NADH y 0.9 U de α -glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH). La actividad se monitoreó espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm, a una temperatura de 25 °C. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU7500 termoregulado (Beckman Coulter ©). La concentración de proteína que se utilizó para los ensayos fue de 5 ng/mL. Los resultados se expresaron como actividad específica con unidades de $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Para la medición de los parámetros catalíticos, se utilizaron las mismas condiciones anteriores pero variando la concentración de sustrato (G3P) en el intervalo de 0.1 a 3 mM.

Determinación del estado de oligomerización

La determinación del estado de asociación (oligomerización) de las enzimas estudiadas, se realizó mediante experimentos de cromatografía de exclusión molecular con una columna analítica Superdex 75 HR 10/30 (GE ©) acoplada a un sistema FPLC (GE ©). La elución de las enzimas se siguió con un detector de absorción de UV (UVA) (λ_{280}). Previamente al corrimiento de las TIMs, se realizó una curva de calibración con las siguientes proteínas: albúmina (Peso molecular (PM): 66.3 kDa, Radio de Stokes (R_s): 33.9 Å), ovoalbúmina (PM: 43.5 kDa, R_s : 30.2 Å), anhidrasa carbónica (PM: 28.8 kDa, R_s : 23.6 Å), lisozima (PM: 14.3 kDa, R_s : 20.0 Å), ribonucleasa (PM: 13.7 kDa, R_s : 19.3 Å) y citocromo C (PM: 11.7 kDa, R_s : 17.0 Å). Se graficaron: 1) el volumen de elución vs. el R_s y 2) el volumen de elución vs. el logaritmo del PM; ambas series de datos se ajustaron a una regresión lineal y a partir de éstas se obtuvieron los valores necesarios para la determinación del estado oligomérico.

Para el caso de las TIMs bacterianas, se utilizó el amortiguador trietanolamina 10 mM + EDTA 1 mM + DTT 1mM, pH: 8.0. La concentración de proteína en los experimentos fue de 0.01, 0.1 y 0.5 mg mL⁻¹ con 3 repeticiones para cada una de ellas, las cuales se promediaron. El R_s y PM se determinaron por la interpolación de los volúmenes de elución a la curva de calibración realizada previamente con las 6 proteínas con R_s y PMs conocidos. La determinación del estado oligomérico se realizó dividiendo el PM experimental sobre el PM teórico y el número resultante redondeado fue la cantidad de monómeros asociados de la enzima.

Mediciones espectroscópicas

Dicroísmo Circular

El Dicroísmo Circular (DC) es una técnica espectroscópica de absorción que provee información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas. Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes reunidos

circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina, así como los puentes disulfuro. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar (gracias al uso de algoritmos) en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales) (Neumann y Snatzke, 1990).

Los ensayos de Dicroísmo Circular (DC) se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para el control de temperatura. El espectro fue seguido de 180-250 nm de longitud de onda. La concentración de proteína utilizada para los espectros fue de 0.5 mg mL⁻¹ y se realizó en un amortiguador de NaH₂PO₄ 10 mM pH 8.0 a 25 °C. Previamente se compararon los amortiguadores NaH₂PO₄ 10 mM pH 8.0 y TEA 10 mM pH 8.0 para ver si la utilización de uno y otro amortiguador provocaba algún cambio en la proteína, pero

como no se observaron diferencias entre éstos, se decidió utilizar en todos los experimentos, el amortiguador NaH_2PO_4 10 mM, ya que es un amortiguador que permite llegar a longitudes de onda más bajas que el TEA, amortiguador que genera más ruido en los espectros.

Fluorescencia Intrínseca

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una vez excitada, la molécula pasara al modo vibracional de menor energía del estado excitado. El fotón emitido por fluorescencia tiene menos energía que el absorbido. Por tanto, posee una frecuencia menor y emite a mayor longitud de onda (Skoog *et al.*, 2006). En las proteínas plegadas, la fluorescencia intrínseca es una mezcla de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos: triptófano, tirosina y fenilalanina. Normalmente lo que se mide es la intensidad de la longitud de onda de emisión, entre 300 y 350 nm. Una longitud de onda de 280 nm excita tirosinas y triptófanos, mientras que una de 295 nm excita principalmente a los triptófanos; el análisis comparativo de ambas emisiones puede sugerir cambios terciarios específicos en la proteína. La emisión de fluorescencia de los triptófanos depende mucho del ambiente en el que éstos se encuentren. Por ejemplo, en el estado nativo, los triptófanos se encuentran generalmente formando parte del núcleo hidrofóbico de las proteínas y por lo tanto está en regiones donde las moléculas de agua tienen poco acceso, lo que genera que el espectro de emisión del mismo se corra hacia el ultravioleta (corrimiento hacia el azul) con el máximo de emisión generalmente en 330 nm; en cambio, cuando se desnaturaliza la proteína, el espectro se corre hacia el rojo (más cercano a 350 nm) ya que los triptófanos pasan a un ambiente acuoso (Vivian y Callis, 2001).

Las mediciones de fluorescencia intrínseca (IF) se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para controlar la temperatura. La concentración de proteína en estos experimentos fue de 0.2 mg mL^{-1} . La temperatura de medición fue de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Se utilizó una longitud de onda

de excitación de 295 nm y se midió la emisión en el intervalo de 310 a 410 nm, monitoreando la intensidad de fluorescencia cada 1 nm. El centro de masa espectral (CME) se calculó mediante: $CME = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$, donde I_λ es la intensidad de fluorescencia para cada longitud de onda (λ).

Determinación de la estabilidad a la dilución

Para determinar la constante de disociación aparente (K_{dis}^{app}) de las enzimas, se realizaron experimentos de estabilidad a la dilución a 25 °C. Las enzimas se incubaron a 15 diferentes concentraciones de proteína en el intervalo de 500 a 0.007 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($2 \times 10^{-04} - 2.8 \times 10^{-10}$ M, aproximadamente). Tras 24 horas de incubación a 25 °C, se midió la actividad catalítica de cada dilución a una concentración final de TIM de 5 ng mL^{-1} en la celda de reacción. Las condiciones para la medición fueron: amortiguador 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, 1 mM DTT pH 8.0, 0.2 mM de NADH, 2 mM de G3P y 0.9 U de α -GDH. Con la pendiente asociada al proceso, se calculó la actividad catalítica y se normalizó al valor máximo de actividad de acuerdo a cada enzima ensayada, graficando ésta contra la concentración de proteína utilizada en la incubación. La curva se ajustó a la ecuación 4 presentada más adelante. El valor de la constante de disociación es aparente ya que no se sabe si el proceso de dilución es reversible.

Desnaturalización por temperatura

Dicroísmo Circular

La desnaturalización por temperatura de las TIMs bacterianas seguida por DC se realizó en un espectropolarímetro ChirascanTM (Applied Photophysics ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para el control de temperatura y se determinó siguiendo el cambio en la señal de elipticidad a 195, 208 y 222 nm como función de la temperatura. El proceso se monitoreó tanto al calentar la proteína como al enfriar la misma desde 20 °C hasta 90 °C con la misma tasa de calentamiento (30, 90, 180 K hr^{-1} , respectivamente). La concentración de proteína fue de 0.4 mg mL^{-1} y se probaron velocidades de barrido de 30, 90 y 180 K hr^{-1} en un amortiguador de NaH_2PO_4 10 mM

pH 8.0. Antes y después de cada desnaturalización se obtuvo un espectro de DC para observar el cambio en la señal provocado por el proceso de desnaturalización (180-250 nm y en las mismas condiciones explicadas previamente).

Calorimetría Diferencial de Barrido

La desnaturalización seguida por técnicas espectroscópicas arroja información indirecta sobre los cambios energéticos en el proceso de plegamiento y desplegamiento de las proteínas, ya que los parámetros termodinámicos calculados se basan en un modelo.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperatura. DSC es una técnica poderosa que permite caracterizar los cambios conformacionales en las proteínas inducidos por la temperatura, siendo la única técnica que es capaz de medir directamente la energética del proceso de plegamiento/desplegamiento de una proteína (Freire, 1995).

Un calorímetro diferencial de barrido consiste básicamente en dos celdas: la celda de referencia (donde se coloca el amortiguador) y la celda de muestra (en la cual se deposita la proteína) (Privalov, 1980). Ambas celdas son simultáneamente calentadas a una tasa de calentamiento constante, de manera que la diferencia de temperatura entre ambas sea igual a cero; dado que la energía requerida para calentar a la proteína no es equivalente a la requerida para calentar el amortiguador, las celdas requieren diferente cantidad de energía para elevar su temperatura, por ello, el calorímetro aplica una potencia determinada a cada celda y la salida del instrumento es proporcional a la diferencia en la capacidad calorífica (C_p) entre las dos celdas, que resulta de la división de la potencia aplicada por el equipo entre la velocidad de barrido utilizada. Usualmente, el resultado muestra un pico (transición), la cual es atribuida a la absorción de calor asociada con la desnaturalización de la proteína (para proteínas complejas, pueden notarse varias transiciones). Los valores pre y postransición reflejan

las capacidades caloríficas parciales del estado nativo y desnaturalizado de la proteína, respectivamente (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 2006).

El proceso de desnaturalización térmica en las TIMs bacterianas, también se siguió por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), utilizando el calorímetro capilar VP-Capillary DSC (Microcal ©) del Laboratorio de Termofísica de la Facultad de Química-UNAM en colaboración con el Dr. Miguel Costas Basín. Primero se probó si el proceso de desplegamiento térmico era reversible, para lo cual se calentó la proteína hasta el final de la transición a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} (previamente se hizo una corrida hasta $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para determinar la temperatura de transición de cada proteína). Después de la primera traza, se recolectaron una segunda y tercera trazas para determinar la reversibilidad del proceso. La concentración de proteína fue de 0.4 mg mL^{-1} en amortiguador NaH_2PO_4 10 mM .

Para los experimentos de variación de la velocidad de barrido, se siguió el proceso de desnaturalización térmica de $20\text{-}90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ con 6 velocidades de barrido ($30, 60, 90, 120, 150$ y 180 K hr^{-1}), la concentración de proteína empleada en todos los experimentos fue de 0.4 mg mL^{-1} en amortiguador NaH_2PO_4 10 mM . En algunas proteínas (las que presentaron un desplegamiento térmico irreversible) se realizaron trazas calorimétricas en presencia de concentraciones variables de urea ($0\text{-}2.0 \text{ M}$). Las corridas se realizaron a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} y la concentración de proteína fue de 0.4 mg mL^{-1} en amortiguador NaH_2PO_4 10 mM .

Para las proteínas que presentaron un desplegamiento térmico reversible, se realizaron experimentos en el intervalo de $20\text{-}90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a una misma velocidad de barrido (90 K hr^{-1}) y variando la concentración de proteína de $0.2\text{-}2.0 \text{ mg mL}^{-1}$. El amortiguador utilizado fue NaH_2PO_4 10 mM en todos los experimentos.

Resolución de la estructura tridimensional

La determinación de la estructura tridimensional se realizó mediante la técnica de cristalografía de proteínas y difracción con rayos X en el laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas del Instituto de Química-UNAM en colaboración con la

Dra. Adela Rodríguez Romero. Como primer paso, se analizaron las condiciones de cristalización de otras TIMs depositadas en el PDB. Como primeras pruebas de cristalización, se eligieron 42 condiciones distintas de los kits Crystal Screen I y II (Hampton Research ®) para ensayar cada proteína, todas a una concentración de 5.5 mg mL⁻¹, en amortiguador de Trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y 150 mM de NaCl. Todas las pruebas se realizaron mediante el método de cristalización en fase de vapor con gota colgante. Cada condición de cristalización se preparó con 500 µL de la solución cristalizante en el pozo y 3 µL de la proteína y 3 µL de solución cristalizante en un portaobjetos siliconizado; los pozos se sellaron con grasa de vacío e incubaron en un cuarto de temperatura controlada a 18 °C.

Tras 3 semanas de incubación, se observaron las placas que contenían las pruebas de cristalización y se eligieron un total de 12 condiciones donde se observó alguna formación cristalina (esférulos, agujas, microcristales, maclas, etc.), las cuales se utilizaron para hacer una matriz con 7 concentraciones de proteína distintas: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5 mg mL⁻¹; además, en el pozo de cristalización, se colocaron 200 µL de aceite mineral para disminuir la velocidad de formación de cristales y favorecer su calidad. El método de cristalización y resto de las condiciones fueron las mismas utilizadas en las primeras pruebas colocadas.

En algunas proteínas donde se observó de nuevo formación cristalina pero sin tener la calidad necesaria para difractar, se probaron otras matrices de cristalización, variando la concentración de sales, agente precipitante y pH. Además se colocaron pruebas nuevas con soluciones ya ensayadas pero ahora con proteína recién purificada. Se probaron los cristales con buena calidad para difractar y en aquellos que produjeron un buen patrón de difracción y a buena resolución, se colectó el set completo de datos (realizado únicamente para *Dr*TIM y *Cp*TIM).

La colecta se realizó en un ánodo rotatorio Rigaku Micromax-007 HF (Rigaku ©) con una longitud de onda de 1.54 Å y con un detector Rigaku Raxis IV++ (Rigaku ©). Después de la colecta de datos, se realizó la integración, reducción y escalamiento de los datos utilizando los programas XDS (Kabsch, 2010) y Scala, ubicado en la suite de

CCP4 (Winn *et al.*, 2011). Para el set de datos de CpTIM, se continuó con todo el proceso de resolución de la estructura. Así, la obtención de las fases se hizo por reemplazo molecular y usando el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007). Los ciclos de afinamiento se efectuaron con el programa Phenix (Adams *et al.*, 2010). El modelo de la proteína se construyó con COOT (Emsley y Cowtan, 2004), utilizando los mapas F_o-F_c y $2F_o-F_c$. Al finalizar de construir el modelo de la proteína, se validó en el servidor del PDB (Bernstein *et al.*, 1977) y MolProbity (Davis *et al.*, 2007). Tras obtener una validación correcta, se depositó la estructura en la base de datos de proteínas (Bernstein *et al.*, 1977), obteniendo un código PDB para ésta.

Análisis de los datos

Parámetros catalíticos. Los datos experimentales procedentes de las mediciones de actividad catalítica a diferentes concentraciones de sustrato, se ajustaron a una regresión no lineal como un modelo cinético de Michaelis-Menten para obtener los parámetros catalíticos K_M y V_{max} (ecuación 3):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Para el cálculo de la eficiencia catalítica, se modificó el valor de la K_M obtenida, considerando que sólo el 4% del G3P en solución tiene el sustrato aldehído no hidratado, única forma que la TIM es capaz de catalizar (relación 1:29) (Trentham *et al.*, 1969).

Estabilidad a la dilución. La actividad catalítica normalizada se graficó en contra de la concentración de proteína utilizada en la incubación. La fracción de enzima dimérica (X_N) se expresó en función de la concentración de proteína (P_T) (mg mL^{-1}) a una temperatura (25 °C) por medio de la ecuación 4 (Cisneros-Armas, 2003):

$$X_N(T) = \frac{1}{4} \frac{K_{Diss}(T) + 4P_T - \sqrt{K_{Diss}(T)^2 + 8K_{Diss}(T)P_T}}{P_T} \quad (4)$$

Como se observó la disociación por dilución a temperatura constante (25 °C), la P_T fue la variable independiente y se dejó la K_{dis}^{app} (constante de disociación aparente) como parámetro de ajuste. Esto permitió calcular la energía libre de disociación (ΔG_{Diss}) a esa temperatura por medio de la ecuación 5 (Najera *et al.*, 2003):

$$\Delta G_{Diss}(T) = -RT \ln K_{Diss}(T) \quad (5)$$

Desnaturalización térmica seguida por DC. La señal de dicroísmo circular se ajustó a un modelo de dos estados con disociación $N_2 \leftrightarrow 2D$, donde N_2 representa al estado dimérico nativo y D indica el monómero desnaturalizado. Los datos se normalizaron por medio de la ecuación 6:

$$f_D = \frac{Y_{obsT} - (Y_N + m_N T)}{(Y_{DT} + m_D T) - (Y_N + m_N T)} \quad (6)$$

donde f_D es la fracción de proteína desnaturalizada, Y_{obsT} es la señal observada a esa temperatura, $(Y_N + m_N T)$ y $(Y_D + m_D T)$ son las ecuaciones del ajuste de las zonas pre y post transición a una recta ($Y =$ ordenada al origen, $m =$ pendiente y $T =$ temperatura en K). La constante de equilibrio (K_{eq}) en dirección nativo \rightarrow desplegado se calculó como (ecuación 7):

$$K_{eq_{N \rightarrow D}} = \frac{2 f_D^2 P_T}{1 - f_D} \quad (7)$$

donde f_D es la fracción de proteína desnaturalizada y P_T es la concentración de proteína total expresada en moles de dímero. El valor de ΔG en cada punto se calculó por la ecuación 8:

$$\Delta G_{(T)} = -RT \ln K_{eq}(T) \quad (8)$$

donde K_{eq} es la constante de equilibrio en el sentido nativo \rightarrow desnaturalizado a cierta temperatura. Para calcular la entalpía de Van't Hoff y la T_m , se construyó el gráfico del $\ln(K_{eq})$ vs. $1/T$ (K^{-1}) y al ajustar los puntos experimentales a una línea recta, se multiplicó el valor de la pendiente por la constante universal de los gases (R) y el valor obtenido fue el ΔH_{VH} expresado en $kcal\ mol^{-1}$, el valor de la T_m se expresó en K.

Desnaturalización térmica seguida por DSC. En los experimentos de reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica, las trazas se corrigieron por el tiempo de respuesta del equipo, se les restó la línea física y se normalizaron con respecto a la concentración de proteína. Posteriormente, se restó la línea base química para obtener la capacidad calorífica en exceso ($\langle C_p^{exc} \rangle$) (ecuación 9). De las curvas normalizadas se obtuvieron los valores de ΔH_{cal} y T_m las cuales se compararon entre las 3 distintas trazas realizadas con el fin de obtener el porcentaje de reversibilidad.

$$\Delta H_{cal} = \int \langle C_p^{exc} \rangle dT \quad (9)$$

El análisis de las endotermas se realizó en función de la reversibilidad observada:

a) *Proteínas cuyo desplegamiento térmico fue irreversible.*

Las trazas se corrigieron por el tiempo de respuesta del equipo, se substrajo la línea física y se normalizaron por concentración de proteína. Posteriormente las trazas se ajustaron a un modelo de dos estados irreversible (Lumry-Eyring): $N \xrightarrow{k} F$, donde N es el estado nativo y el cual mediante un solo paso, llega al estado final (F), incapaz de volverse a plegar al estado nativo; dicha conversión cinética de N a F está descrita por una constante de primer orden (k) que cambia con la temperatura. La capacidad calorífica en este modelo puede expresarse como (ecuación 10 y 11; Costas *et al.*, 2009; Lyubarev *et al.*, 1998; Sanchez-Ruiz, 1992):

$$C_p^{exc} = \frac{\Delta H E_A}{RT_m^2} \exp(x) * \exp[-\exp(x)] \quad (10)$$

con:

$$x = \frac{E_A}{RT_m^2} (T - T_m) \quad (11)$$

donde T_m es la temperatura correspondiente al máximo valor de la endoterma, T es la temperatura en un punto de la curva, ΔH es la entalpía de desnaturalización que se asume como constante y E_A es la energía de activación del estado nativo al desnaturalizado. La señal del calorímetro se ajustó mediante la ecuación 12:

$$C_p^{exc} = B1 + B2 + B3 \quad (12)$$

donde B1 es la ecuación 10, B2 es igual a: $\{ 1 - \exp[\exp(-x)] \} * (mT+b)$ (siendo $mT+b$ la línea base pre-transición) y B3 es igual a: $\{ \exp[\exp(-x)] \} * (mT+c)$ (siendo $mT+c$ la línea base post-transición).

Cálculo de la energía de activación

De las trazas obtenidas a diferentes velocidades de barrido, se obtuvo el valor de la E_A del estado nativo al desnaturalizado por cuatro métodos:

- 1) Promedio de las trazas a distintas velocidades de barrido. Del valor obtenido al ajustar las trazas a un modelo de dos estados irreversible (Lumry–Eyring), obtenidas a diferentes velocidades de barrido, se promediaron las distintas magnitudes y éste correspondió al primer valor.
- 2) Variación de la T_m con respecto a la velocidad de barrido. Este análisis es consistente con el efecto que tiene la velocidad de barrido (v) sobre la T_m , el cual, de acuerdo al modelo $N \rightarrow F$, está dado por la ecuación 13 (Costas *et al.*, 2009):

$$\ln\left(\frac{v}{T_m^2}\right) = \text{constante} - \frac{E_A}{RT_m} \quad (13)$$

Con esta relación, se realizó el gráfico del $\ln(v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$, donde la pendiente multiplicada por la constante R, nos otorga el valor de la E_A para cada proteína.

- 3) Ancho de la traza en la parte de la transición. En el modelo de dos estados irreversible (Lumry–Eyring), hay una relación inversa entre el valor de la E_A y el ancho de la transición calorimétrica (ecuación 14; Costas *et al.*, 2009):

$$W = 2.45 \frac{RT_m^2}{E_A} \quad (14)$$

donde W es el ancho de la transición calorimétrica a la mitad de la T_m ; tras aplicar esta relación a cada velocidad de barrido y promediar los datos, se obtiene un valor de E_A .

- 4) Gráfico de Arrhenius. En el proceso de dos estados irreversible (Lumry–Eyring) se asume que la conversión cinética de N a F está descrita por una constante de primer orden (k) que cambia con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius (15):

$$k = \exp \left[-\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right) \right] \quad (15)$$

donde T^* es la temperatura en la cual $k = 1 \text{ min}^{-1}$ y T es la temperatura a la que se evalúa dicha magnitud. Al hacer el gráfico de $\ln k$ vs. $1/T$ para todas las velocidades de barrido y multiplicar el valor de la pendiente por R, obtenemos el valor de la E_A para cada proteína.

Cálculo de la m cinética

El cálculo de la m cinética (m^\ddagger) se realizó a partir de experimentos en presencia de urea. Las trazas realizadas con urea fueron corregidas por el tiempo de respuesta del equipo, se normalizaron por concentración de proteína y se substrajo la línea física.

Posteriormente se ajustaron a un modelo de dos estados irreversible (Lumry–Eyring): N → F. De los resultados obtenidos del ajuste, se calculó el valor m cinético (m^\ddagger) (el efecto de la concentración de desnaturalizante sobre el cambio en la energía de activación y su relación con los correspondientes cambios en el ASA), mediante la expresión 16 (Costas *et al.*, 2009):

$$m^\ddagger = -\frac{E_A}{T_m} \left(\frac{dT_m}{d[Urea]} \right) - RT_m * \left(\frac{d \ln \left(\frac{E_A}{RT_m^2} \right)}{d[Urea]} \right) \quad (16)$$

El valor de la m de urea al equilibrio (m_{eq}) fue obtenido a través de una correlación para 45 proteínas en donde se graficó el cambio del área accesible (ΔASA) al solvente en el desplegamiento con la m_{eq} calculada ($\text{cal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$); la relación lineal estuvo dada por la ecuación 17:

$$m_{eq} = 368 + (0.11 * \Delta ASA) \quad (17)$$

donde el valor de ΔASA utilizado fue un promedio del cálculo para otras TIMs reportadas previamente ($62, 393 \pm 555 \text{ \AA}^2$). El grado fraccional de exposición al solvente en el E_T se calculó del cociente entre m^\ddagger/m_{eq} . El número de residuos desplegados en el E_T se obtuvo con la relación: $N_{res} * (m^\ddagger/m_{eq})$, N_{res} es el número de residuos de la proteína.

b) Proteínas cuyo desplegamiento térmico fue reversible.

Cálculo de la T_m y ΔH calorimétrico

El análisis de estas curvas (y la obtención del ΔH_{cal}) se realizó siguiendo distintas estrategias:

- 1) Modelo al equilibrio de dos estados con disociación. Las endotermas se corrigieron por el tiempo de respuesta del equipo, se substrajo la línea física y se normalizaron por concentración de proteína. Posteriormente las trazas se

ajustaron a un modelo de dos estados con disociación $N_2 \rightleftharpoons 2D$, donde N_2 representa al estado dimérico nativo y D indica el monómero desnaturalizado. La capacidad calorífica para este modelo puede expresarse como (ecuación 18; Tellez *et al.*, 2008):

$$C_p^{exc} = B_0 + B_1 T + \frac{\Delta H}{RT_m^2} * \left(\frac{1 - f}{-1 + \frac{2}{f}} \right) \quad (18)$$

donde B_0 es la intercepción de la pre-transición en el eje y, B_1 es la pendiente de la pre-transición, ΔH es el cambio en la entalpía del proceso y f es el cambio en la fracción molar de dímeros como función de la temperatura (calculada como $f = [\text{Proteína dimérica}] / (2 * [\text{Proteína total en la celda}])$). Esta ecuación es parte del programa de análisis y ajuste MicroCal Origin 7.0.

- 2) Relación de Takahashi-Sturtevant. A partir de los experimentos realizados a diferentes concentraciones de proteína, se utilizó la ecuación 19 para calcular el ΔH de desplegamiento en cada proteína (Takahashi y Sturtevant, 1981):

$$\ln P_T = b \frac{\Delta H}{RT_m} \quad (19)$$

donde P_T es la concentración de proteína total, b es una constante relacionada con el número de subunidades ($n-1$) y T_m es la temperatura donde el C_p^{exc} es máximo. Se construyó el gráfico $\ln(P_T)$ vs. $1/T_m$ y los datos se ajustaron a una recta con pendiente igual a $-\Delta H/R$.

Con estas dos aproximaciones, tuvimos un valor de T_m promedio para todas las trazas calorimétricas ensayadas y dos valores de ΔH calculados por métodos distintos.

Cálculo del ΔC_p

Se utilizaron cinco metodologías distintas:

- 1) Programa MicroCal Origin 7.0. Las trazas a diferentes concentraciones de proteína fueron corregidas por el tiempo de respuesta del equipo y se substrajo la línea física. Utilizando el programa MicroCal Origin 7.0, se calculó el C_p absoluto (C_p^{abs}) en cada una de ellas mediante la ecuación 20:

$$C_p^{abs}(T) = \frac{\Delta C_p}{g_o \rho(T) V_o * [1 + 0.00002(T)]} + v[1 + \alpha(T)] C_p^W(T) \quad (20)$$

donde ΔC_p (cal °C⁻¹) es la línea base muestra-amortiguador menos la línea base amortiguador-amortiguador, g_o es la concentración de la proteína en la solución (g mL⁻¹), ρ es la densidad relativa del agua, V_o es el volumen nominal de la celda (mL), T es la temperatura en °C, v es el volumen parcial específico de la proteína a esa temperatura (mL gm⁻¹), α es el coeficiente de expansión térmica de la proteína (1/°C⁻¹) y C_p^W es la capacidad calorífica del agua por unidad de volumen (cal °C⁻¹ mL⁻¹). Para cada proteína, se seleccionaron las líneas pre y post-transición las cuales corresponden al C_p nativo y desnaturalizado, respectivamente; así, el ΔC_p se calculó al restar la recta del C_p nativo de la recta del C_p desnaturalizado. Se graficó la dependencia del ΔC_p con respecto a la temperatura. El valor reportado de ΔC_p fue la magnitud obtenida en la T_m correspondiente a cada proteína.

- 2) Método de Guzman-Casado et al., 2003. Las trazas a diferentes concentraciones de proteína se corrigieron por el tiempo de respuesta del equipo y se substrajo la línea física. Se obtuvo la capacidad calorífica aparente (C_p^{app}) para la parte nativa y desnaturalizada de cada proteína a partir de la ecuación 21:

$$C_p^{app} = \frac{C}{M} V_o 10^{-3} \left(C_{pP} - \frac{V_P}{V_W} C_{pW} \right) \quad (21)$$

donde C es la concentración de proteína (en mg mL^{-1}), M es la masa molecular de la proteína (en g mol^{-1}), V_0 es el volumen de la celda calorimétrica (en mL), C_{pP} y C_{pW} son las capacidades caloríficas de la proteína y agua, respectivamente, y V_P y V_W son los volúmenes molares de la proteína y agua a una temperatura dada (la misma en que se expresa el (C_p^{app})). Los volúmenes molares de la proteína se calcularon mediante la correlación aminoacídica reportada por Makhatadze *et al.*, 1990. Se construyeron los gráficos de (C_p^{app}) vs. concentración de proteína (a varias temperaturas tanto en la parte nativa como desnaturalizada) y se ajustaron a la ecuación de la recta donde la ordenada al origen es 0 y la pendiente es igual a $(V_0/M) * 10^{-3} (C_{pP} - (V_P/V_W) * C_{pW})$, de la cual el valor de la capacidad calorífica puede calcularse. Posteriormente, se realizó la resta del C_p desnaturalizado menos el C_p nativo y se graficó dicho ΔC_p con respecto a la temperatura. El valor utilizado de ΔC_p fue la magnitud en la T_m correspondiente a cada proteína (Guzman-Casado *et al.*, 2003).

- 3) Ajuste al modelo de 2 estados con disociación. El valor de ΔC_p utilizado fue el reportado al ajustar las trazas al modelo de dos estados con disociación explicado previamente (ecuación 17).
- 4) Parametrización de Robertson-Murphy, 1997. Se consideró la correlación de estos autores en la que utilizan los parámetros determinados para 60 proteínas y que tras el análisis de regresión lineal, establecen que el ΔC_p por residuo de proteína es igual a $13.9 \pm 0.5 \text{ kcal (mol res)}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Robertson y Murphy, 1997).
- 5) Correlación teórica de Milardi et al, 1997. Esta relación se basa en datos de 4 proteínas distintas en la cual consideran la composición aminoacídica de cada una de ellas y con la que logran hacer una división de los componentes polares y no-polares que contribuyen al valor del ΔC_p final (ecuación 22; Milardi *et al.*, 1997):

$$\Delta C_{p \text{ tot}}(T) = a + bT + \alpha + \beta T + \gamma T^2 \quad (22)$$

donde:

- $a = -2.43877 + (0.023205 * N_{\text{CH}})$,
- $b = 0.00155241 - (0.0000489819 * N_{\text{CH}})$,
- $\alpha = 1.94454 - (0.0702 * N_{\text{res}})$,
- $\beta = -0.0599115 + (0.000867265 * N_{\text{res}})$
- $\gamma = 0.000429975 - (0.00000524359 * N_{\text{res}})$.

N_{CH} = número de hidrógenos apolares y N_{res} = número de residuos en la proteína. Los resultados se calcularon con la fórmula previa, utilizando la información de cada proteína.

Construcción de la curva de estabilidad. Con los valores promedio obtenidos de calorimetría (ΔH , ΔC_p y T_m), se construyeron las curvas de estabilidad para las TIMs bacterianas cuyo proceso de desnaturalización térmica fue reversible, mediante el uso de la ecuación de Gibbs-Helmholtz (23):

$$\Delta G = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left(T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right) \quad (23)$$

RESULTADOS

Análisis filogenético del dominio Bacteria y elección de las TIMs a estudiar

A partir del árbol filogenético publicado por Cicarelli y colaboradores (Cicarelli et al., 2006), se ubicaron las especies bacterianas extantes donde ya se tienen algunos estudios previos de la TIM. Así, se observó que de los 20 fila de bacterias existentes, únicamente 5 fila han sido explorados. Con esta premisa, se trató de abarcar los fila restantes (y complementar algunos de los ya estudiados), realizando la elección con base a los eventos evolutivos clave que se propone, permitieron la diversificación de las bacterias y posteriormente su evolución y origen del ancestro Neomura, ancestro de los dominios Archaea y Eukarya (Cavalier-Smith, 2006a-b). Así, se eligieron 6 especies bacterianas como candidatas para estudiar las propiedades fisicoquímicas de la TIM que poseen. Con el total de especies elegidas, se abarcaron 6 de los 22 fila presentes en el dominio Bacteria (todos ellos presentes en 6 de los 7 supertaxones bacterianos), lo que corresponde a un 30% del total de los fila. La ubicación de las especies elegidas en el árbol filogenético de los 3 dominios de la vida, se muestra en la figura 15.

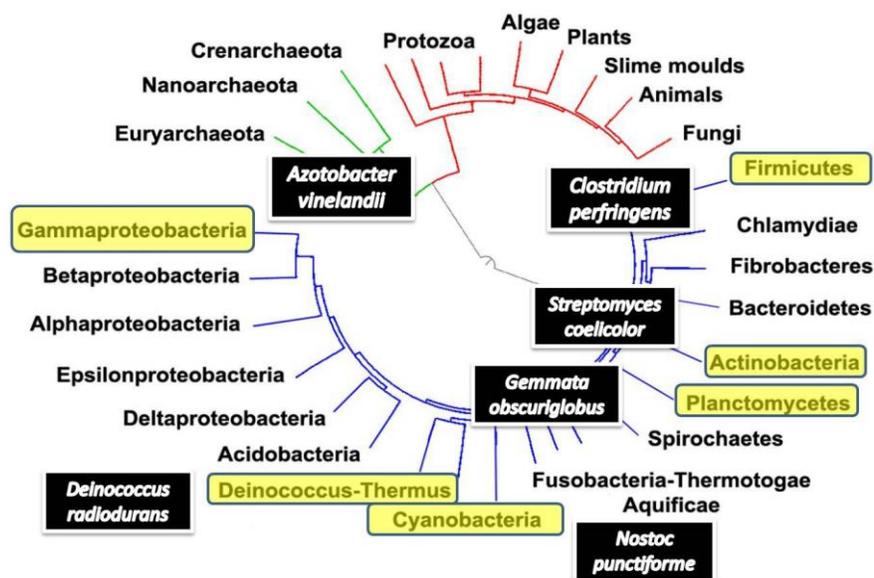


Figura 15. Árbol filogenético de los 3 dominios de los seres vivos señalando las especies seleccionadas para el estudio de su TIM. En cuadros amarillos se indican los fila donde se seleccionaron las especies trabajadas en el presente proyecto y cuyos nombres están indicados en cuadros oscuros.

Las especies seleccionadas y algunas de sus características se describen a continuación:

1. *Deinococcus radiodurans*

Deinococcus radiodurans (antes *Micrococcus radiodurans*) es un microorganismo quimiorganotrofo extremófilo altamente resistente a la radiación, sólo es superado en resistencia a la radiación por la arquea *Thermococcus gammatolerans*.

Esta bacteria pertenece al supertaxón Eobacteria, filo: Deinococcus-Thermus, orden: Deinococcales, familia: Deinococcaceae y género: *Deinococcus* (Brenner *et al.*, 2005). *D. radiodurans* está relacionada directamente con miembros de Chloroflexi, que en conjunto a este filo, se consideran las bacterias más primitivas (Cavalier-Smith, 2006a).

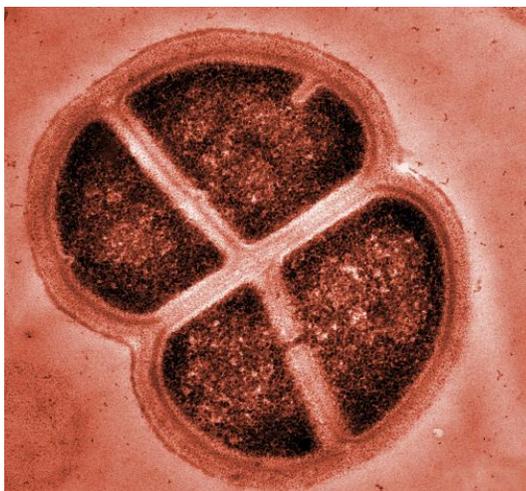


Figura 16. Micrografía de la bacteria *Deinococcus radiodurans* (técnica: microscopía electrónica de transmisión con modificación de color por computadora; fuente: <http://www.emsl.pnl.gov>).

D. radiodurans tiñe como grampositiva, pero la composición de la pared (y el número de membranas) es del tipo de gramnegativas; la razón de esta tinción “anormal” se debe a que la composición química de su pared es distinta, lo que provoca la captación del primer colorante, y aunque la capa de peptidoglicano es delgada, su composición permite la fijación de dicho colorante y su observación como grampositiva, a pesar de que morfológicamente parezca más una bacteria gramnegativa (figura 16).

Algunas características estructurales y fisiológicas de este microorganismo son: su membrana externa carece de lipopolisacáridos, posee la proteína Omp85 (un componente clave en la evolución bacteriana, ya que indica que esta bacteria posee el mecanismo de inserción de proteínas en la membrana externa. La bacteria carece de flagelos y endosporas y su movilidad es realizada por deslizamiento (movilidad tipo gliding).

D. radiodurans presenta citocromo c, clorosomas y realiza fotosíntesis anoxigénica. Otra característica relevante del microorganismo es su alta resistencia a la radiación: mientras que una dosis de 10 Gy es suficiente para matar a un ser humano, y una dosis de 60 Gy es capaz de matar todas células en una colonia de *E. coli*, *D. radiodurans* puede resistir una dosis instantánea de hasta 5000 Gy sin pérdida de viabilidad, y dosis de hasta 15000 Gy con un 37% de pérdida de viabilidad. Además, puede sobrevivir en condiciones de calor, frío, deshidratación, vacío y ácido (Mattimore y Battista, 1996).

D. radiodurans se ha utilizado en biorremediación para consumir y digerir disolventes y metales pesados, incluso en espacios altamente radiactivos (Brim *et al.*, 2000).

2. *Nostoc punctiforme*

Es una bacteria gramnegativa cocoide de color verdoso; forma colonias esféricas compuestas de filamentos (tricomas). Pertenece al supertaxón Glicobacteria, filo: Cianobacteria, orden: Nostocales, familia: Nostocacea y género: Nostoc (Brenner *et al.*, 2005). Sus colonias son esféricas de superficie lisa sobre el agar, de aspecto mucilaginoso y de color desde verde oliva a verde oscuro casi negro. Al microscopio se observan masas densas de filamentos envueltos en una vaina. Células casi esféricas con un diámetro medio 4.3 μm , con heterocistos sobresaliendo de esas masas, semiesféricos y con un diámetro de 4.2 μm y una longitud de 3 μm (figura 17) (Abbot *et al.*, 1989).

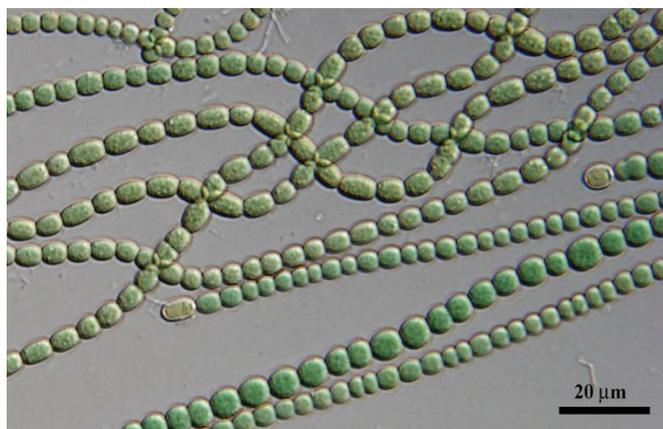


Figura 17. Micrografía de un filamento de la bacteria *Nostoc punctiforme* (técnica: microscopía de contraste de fases; fuente: <http://www.ccala.butbn.cas.cz>).

Algunas características de esta bacteria son: contiene clorofilas tipo a y b, así como ficobilisomas, es capaz de realizar fotosíntesis oxigénica, lo cual permitió la formación de una atmósfera oxidante. Presenta además los heterocistes, que contienen la maquinaria de fijación del nitrógeno. Evolutivamente, son los primeros organismos después de la revolución glicobacteriana que dio surgimiento a las bacterias gramnegativas con pared de peptidoglicano, además se cree que dio origen por endosimbiosis a los plastos. Su membrana externa presenta inserciones de moléculas complejas de lipopolisacáridos además de hopanoides (agentes reforzantes de las membranas) (Cavalier-Smith, 2006a-b).

3. *Gemmata obscuriglobus*

Es una bacteria perteneciente al supertaxón Glicobacteria, filo: Planctomycetes, orden: Planctomycetacia, familia: Planctomycetaceae y género: *Gemmata*. Tienen forma de ovoide que se une a una especie de tallo y se reproduce por gemación. El ciclo biológico implica la alternancia entre células sésiles y flageladas (Brenner *et al.*, 2005).



Figura 18. Micrografía de la bacteria *Gemmata obscuriglobus* (técnica: microscopía electrónica de transmisión con modificación de color por computadora –en verde se muestran algunos compartimentos asociados a membranas internas y en morado se indica el ADN bacteriano-; fuente: <http://www.emsl.pnl.gov>).

Entre sus características metabólicas y estructurales relevantes se encuentran: estructuralmente contiene una región del ADN que está separado del resto de la célula por dos membranas nucleares (figura 18), además hay otros dos compartimentos separados por membranas: riboplasma (o pirelulosoma) que contiene ribosomas con las proteínas asociadas y parifoplasma que no contiene ribosomas. Carece de mureína en su pared celular, en su lugar, las paredes se componen de una glicoproteína rica en glutamato y lípidos llamados “ladderanos”. Algunos genes esenciales de la bacteria no se organizan en operones, posee genes que son similares a los que poseen los organismos eucariontes como la integrina alfa-V. Todas estas características la hacen interesante en cuanto a su relevancia evolutiva (Fuerst y Weeb, 1991).

4. *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria gramnegativa quimiorganotrófica. Pertenece al supertaxón Glicobacteria, filo: Proteobacteria, clase: Gammaproteobacteria, orden: Pseudomonadales, familia: Pseudomonadaceae, género: *Azotobacter* (Brenner *et al.*, 2005).

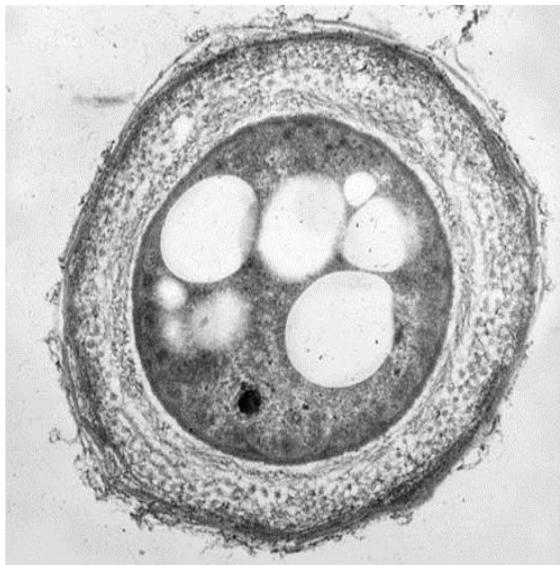


Figura 19. Micrografía de la bacteria *Azotobacter vinelandii* en estado quiste (técnica: microscopía electrónica de transmisión; fuente: <http://www.emsl.pnl.gov>).

Se reproduce por fisión binaria, vive en suelos y en sistemas de agua dulce y salada, presenta células ovoides y grandes de 1,5 a 2 μm de diámetro, pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta cocos. *A. vinelandii* es poliploide (posee varias copias de su cromosoma) (Wong y Yao, 1994).

Las capacidades metabólicas y genéticas por las que *A. vinelandii* ha sido y es objeto de estudio son: fija nitrógeno atmosférico en presencia de oxígeno por tres sistemas diferentes de nitrogenasas. Posee mecanismos de protección de la nitrogenasa. Posee una alta capacidad respiratoria que en condiciones diazotróficas o de fijación de nitrógeno es hasta 10 veces más alta que la de *E. coli*. Produce dos polímeros de uso industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato. Sufre un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación (figura 19). Evolutivamente es de las primeras bacterias con flagelos y proteínas transportadoras en membrana (<http://www.azotobacter.org/>).

5. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es una bacteria anaérobica grampositiva, inmóvil y formadora de esporas (figura 20) que se encuentra en los intestinos de los seres humanos y de varios animales homeotermos, en el suelo, en el agua, en los alimentos (sobre todo en las carnes que no están bien cocinadas), entre otros. Pertenece al supertaxón Posibacteria, filo: Firmicutes, clase: Clostridia, orden: Costridiales, familia: Clostridiaceae y género: Clostridium (Brenner *et al.*, 2005).

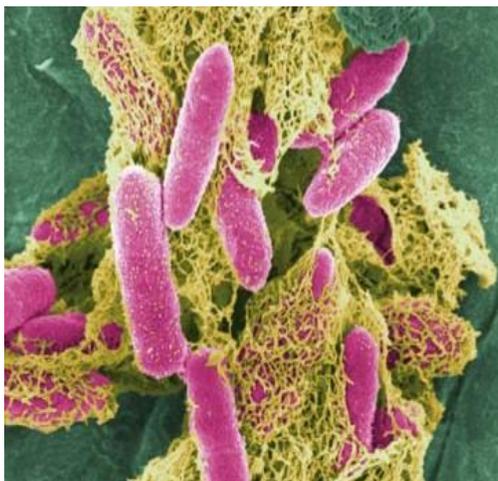


Figura 20. Micrografía de la bacteria *Clostridium perfringens* (técnica: microscopía electrónica de barrido con modificación de color por computadora –en rosa se indican los bacilos bacterianos y en amarillo se indica el biofilm producido por las bacterias-; fuente: www.emsl.pnl.gov).

Esta bacteria produce toxinas que pueden causar enfermedades como la enteritis necrótica o la gangrena gaseosa. En la gangrena gaseosa, *Clostridium perfringens* provoca destrucción en los tejidos infectados si persiste. Esto es provocado por la liberación de exoenzimas específicos que atacan a las moléculas constituyentes de los tejidos de animales: fosfolipasas, hemolisinas, colagenasas, proteasas, que provocan la putrefacción del tejido acompañada de una producción de gas, y de ahí su nombre ("gaseosa") (Brook, 2007). Evolutivamente es de las primeras bacterias donde existe hipertrofia de la pared de peptiglicano y pérdida de la membrana externa, generando al grupo de las grampositivas, además forma endosporas (Wells y Wilkins, 1996).

6. *Streptomyces coelicor*

Streptomyces coelicor es una bacteria perteneciente al género más extenso de actinobacterias, un grupo de bacterias grampositivas de contenido GC generalmente alto. Se encuentra predominantemente en suelos y en la vegetación descompuesta. Se distinguen por el olor a “tierra húmeda” que desprenden, resultado de la producción de un metabolito volátil, la geosmina. Pertenece al supertaxón Posibacteria, filo: Actinobacteria, orden: Actinomycetales, suborden: Streptomycineae, familia: Streptomycetaceae y género: *Streptomyces* (Brenner *et al.*, 2005). El genoma completo de *S. coelicolor* A3, fue publicado en 2002. En esa fecha era el genoma bacteriano más grande conocido (Bentley *et al.*, 2002).

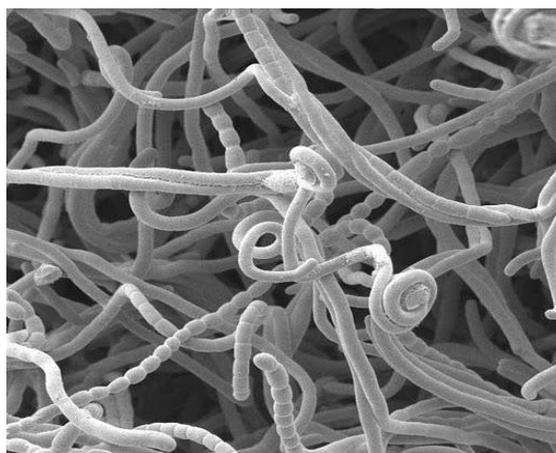


Figura 21. Micrografía de la bacteria *Streptomyces coelicolor* (técnica: microscopía electrónica de barrido –se puede identificar la morfología cocácea característica de la bacteria y los filamentos producidos por las mismas-; fuente: <http://www.jjc.ac.uk>).

Esta bacteria presenta características de coco grampositivo, aerobio, no móvil, no productor de esporas. Su crecimiento es en colonias filamentosas y ciclo celular lento (figura 21) (Brenner *et al.*, 2005). Estructuralmente su ADN tiene contenido de G-C alto y un único cromosoma lineal (Bentley *et al.*, 2002). Evolutivamente, son las primeras bacterias que presentan proteosomas y síntesis de fosfatidilinositol. Pertenece al grupo de las Actinobacterias, que se consideran las bacterias más “evolucionadas”, ancestros del organismo Neomura, origen de los eucariontes y arqueas (Cavalier-Smith, 2006a-b).

Biotechnológicamente se utiliza para la producción de metabolitos secundarios como antibióticos e inmunosupresores, además se ha utilizado como un organismo para la expresión de proteínas en sistemas heterólogos (Watve *et al.*, 2001).

Análisis de las secuencias de la TIM y obtención de los genes

Después de elegir las seis especies bacterianas para el estudio de la TIM que poseen, se prosiguió a obtener las secuencias de los genes de la base de datos del NCBI y se alinearon con una secuencia tipo (*E. coli*) para analizar si tenían alguna particularidad (por ejemplo, gaps grandes, aminoácidos no conservados en el sitio catalítico, etc.). El alineamiento se muestra en la figura 22:

```

EcTIM      1  - -MRHPLVMGNWKLNGSRHMVHELVSNLRKELAGV - -AGCAVA IAPPEMY IDMAKREAEGS - -H 58
DrTIM      1  - -MQTLLALNWKMNKTPTEARSWAEELTTYKAPA - -EGVDLAVLAPALDLSALAAANLPA - -G 56
NpTIM      1  - -VRK I V I AGNWKMFKTQAETQEF LQGFLPHLEETP - QGREV ILCPPFTDL SVLSKTLHGS - -L 59
AvTIM      1  - -MKRKQV I GNWKMNGDLAANRRLLDELLPSLAAL - -DGVELAVCPPFPYLAQVAALLEGs - -G 58
GoTIM      1  MPTRKKFVAGNWKMNNTTLAEAKALGA AVAKGVTD - -DRVTVAVFPPYPWL TAVGEVLKGS - -P 59
CpTIM      1  - -MRTP I I AGNWKMHYTIDEAVKLV EELKPLVKD - -AKCEVVVCTPFVCLDAVKKAVEGT - -N 57
ScoTIM     1  MTRRTPLMAGNWKMNLNHLEA IAHVQKLAFALADKDYDAVEVAVLAPFTDLRSVQTLVDGDKLK 64

EcTIM      59  IMLGAQNVDLNLSGAF TGETSAAMLKDIGAQY I I IGH SERRTYHKEDEL IAKKFAVLKEQGLT 122
DrTIM      57  IAFGGQDVSAHESGAYTGE I SAAMLK DAGASCVVVGH SERREYHDES DATVA AKARQAQANGLL 120
NpTIM      60  IQLGAQNIHWE EFGAYTGE I SGPMLTESGVR FVI VGH SERRQYFGETDATVNLRLRTAQRFGLT 123
AvTIM      59  VALGAQNLNVA AKGAF TGEV SAGMLGELGCR YLVGH SERRSLYGCEDETVAEKFAVALRAGLV 122
GoTIM      60  VALGAQDVSSEKKGAF TGEV SPAMLLETGCKYAL IGH SERRHI IGESETF INHKVHTALEEGLS 123
CpTIM      58  IKVGAQNMHFEEKGAF TGE I APRMLEAMN IDYV I IGH SERREYFNETDETCNKKVKA AF AHNLT 121
ScoTIM     65  IKYGAQDI SAHDGGAYTGE I SGPMLAKLKCTYVAVGH SERRQYHAETDE I VNAKVKAAYKHGLT 128

EcTIM      123  PVL CIGETEAE NEAGKTEEVCARQ I DAVLKTQGA AAFEGAV I AYE P VWA IGTGKSATPAQAQAV 186
DrTIM      121  P IVCVGENLDVR ERGEHV PQT LAQLRGSLEGV GAD - - - VVVAYE P VWA IGTGKTATADDAEEL 180
NpTIM      124  P ILCVGETKQR DAGE TESL I ALQLDKGLVD IDQ - - - NNLV I AYE P IWA IGTGETCEAVEANR I 184
AvTIM      123  PVL C VGETLAQR RQGR TEALVSAQLQAVLRRSG I EGLAAGV I AYE P VWA IGNGETASPEQAQAV 186
GoTIM      124  VVLCMGETLA ERERGLQERVFQRQVYAACAGL TDEQFGR I V I AYE P VWA IGTGKVATPEQAQEA 187
CpTIM      122  P ILC CGETLEQRENGT TNDV IKAQ I TADLEGLTKEQA EKVV I AYE P IWA IGTGKTATSDQANET 185
ScoTIM     129  P ILCVGEELDVREAGNHVEHTLAQVEGGLKDLAAEQAESV V I AYE P VWA IGTGKVCGADDAQEV 192

EcTIM      187  HKFIRDHI AKV - DAN IAEQV I IQYGGSVNASNA AELFAQPD IDGALVGGASL KADAF AV I VKAA 249
DrTIM      181  AAAIRGALREQYGAR - AEGIRVLYGGSVKPEN I AECGKPNVNGALVGGASLKVDPDLGMLDA - 242
NpTIM      185  IGLIRSQLSN - - - - - PNVSIQYGGSVKPNN IDE IMAQPE IDGVLVGGASLEPESFAR I VNFH 241
AvTIM      187  HRHIRDLLAQ - HDPARGVATP ILYGGSVKADNAAALFAQPD IDGGLIGGASLEAAFAA I CQAA 249
GoTIM      188  HAFVRSKLRLLYGDK IADSTP I VYGGSVTPDNTVGLMSQPDVDGALVGGASLKA DSFLA I VKAA 251
CpTIM      186  IAAIRAMVAEMFGQEVADKVR IQYGGSVKPN TIAEQMAKSD IDGALVGGASLVAADF AQ I VNY - 248
ScoTIM     193  CAAIRGKLAELYSQELADKVR IQYGGSVKSGNVAE IMAKPD IDGALVGGASLDSDEFVK I VRFR 256

EcTIM      250  EAAKQA 255
DrTIM      243  - - - -LR 244
NpTIM      242  - - - -LV 243
AvTIM      250  - - - -AR 251
GoTIM      - - - -G 252
CpTIM      - - - - - 251
ScoTIM     257  - - - -DQ 258

```

Figura 22. Alineamiento múltiple de las secuencias en aminoácidos de la TIM de las 6 especies bacterianas elegidas, en comparación con la secuencia de *E. coli*. Se muestran resaltados los aminoácidos catalíticos conservados, en rojo la Lisina-11, en amarillo la Histidina-95 y en verde el Ácido Glutámico-167 (numeración de *EcTIM*) (alineamiento generado con el programa MAFFT 7.0: Katoh y Standley, 2013).

Posteriormente, se analizaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas (tabla 4) y el número de residuos de cisteína, prolina y triptófano de las TIMs elegidas (tabla 5). La cisteína interviene en la posible formación de puentes disulfuro; la prolina puede generar algunas complicaciones en la cinética del plegamiento, mientras que el triptófano es importante para estudios de fluorescencia.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de las TIMs bacterianas elegidas.

| TIM (especie) | Número de residuos | Peso molecular del monómero (Da) | Punto isoelectrico | Coficiente de absortividad molar ϵ_{280nm} ($M^{-1} cm^{-1}$) | Volumen (Å^3) |
|---|--------------------|----------------------------------|--------------------|--|--------------------------|
| <i>Deinococcus radiodurans</i> (DrTIM) | 247 | 25592.86 | 4.93 | 25565 | 30966 |
| <i>Nostoc punctiforme</i> (NpTIM) | 246 | 27052.72 | 5.01 | 22585 | 32731 |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> (AvTIM) | 251 | 26029.84 | 5.84 | 18700 | 31495 |
| <i>Gemmata obscuriglobus</i> (GoTIM) | 252 | 27024.92 | 6.35 | 25565 | 32699 |
| <i>Clostridium perfringens</i> (CpTIM) | 251 | 27339.26 | 5.08 | 20315 | 33079 |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> (ScoTIM) | 261 | 28017.76 | 5.28 | 24660 | 33901 |

Tabla 5. Número de ciertos aminoácidos en las secuencias de las TIMs seleccionadas.

| TIM | Número de Cisteínas | Número de Prolinas | Número de Triptófanos |
|--------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| DrTIM | 3 | 10 | 3 |
| NpTIM | 3 | 11 | 3 |
| AvTIM | 5 | 10 | 2 |
| GoTIM | 3 | 11 | 3 |
| CpTIM | 6 | 7 | 2 |
| ScoTIM | 4 | 6 | 2 |

El porcentaje de identidad entre estas 6 secuencias elegidas se muestra en la figura 25:

Tabla 4. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las TIMs bacterianas elegidas.

| TIM/TIM | DrTIM | NpTIM | AvTIM | GoTIM | CpTIM | ScoTIM |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| DrTIM | 100 | | | | | |
| NpTIM | 36 | 100 | | | | |
| AvTIM | 39 | 72 | 100 | | | |
| GoTIM | 36 | 37 | 46 | 100 | | |
| CpTIM | 40 | 45 | 40 | 43 | 100 | |
| ScoTIM | 47 | 43 | 38 | 43 | 51 | 100 |

Subclonación de los genes en un vector de expresión

Una vez que se recibieron los genes adquiridos de la compañía *Epoch Life Sciene*, los cuales se encontraban en un vector de clonación pBluescript-II-SK(-), se liberó el gen de este vector mediante el corte de las enzimas *NdeI* y *XhoI* y se subclonó en el vector de expresión pET-28b(+) previamente digeridos. Tras la ligación se analizó la construcción con digestiones sencillas y dobles (figura 23) (por simplicidad, sólo se muestra el caso para *DrTIM*, ya que en las demás TIMs se observó el mismo patrón).

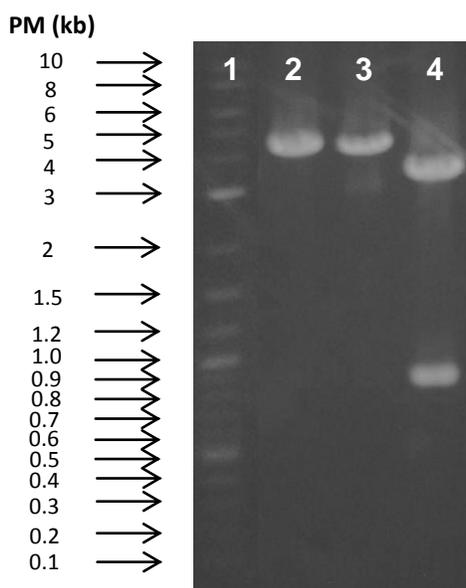


Figura 23. Digestiones de la construcción del gen *tim* + el vector de expresión pET-28b(+). Marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder, New England BioLabs®) (1), digestión de la construcción *tim* + pET-28b(+) con la enzima *NdeI* (2), digestión de la construcción *tim* + pET-28b(+) con la enzima *XhoI* (3), digestión de la construcción *tim* + pET-28b(+) con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (4).

Después de mandar a secuenciar las construcciones de las 6 TIMs subclonadas, y de analizar que las secuencias estaban en fase y sin ninguna mutación, se procedió a sobreexpresar las enzimas.

Sobreexpresión de las enzimas

Para observar la sobreexpresión de las proteínas, inicialmente se realizaron pruebas en volumen pequeño. Tras la realización de éstas, se encontró que 5 de las 6 proteínas a trabajar se sobreexpresan de manera correcta y su peso corresponde al esperado de acuerdo a la secuencia aminoacídica (a pesar de que las células que sobreexpresan 2 de ellas –*NpTIM* y *GoTIM*- presenten resistencia a la sonicación, cuestión que se discutirá más adelante) (figura 24).

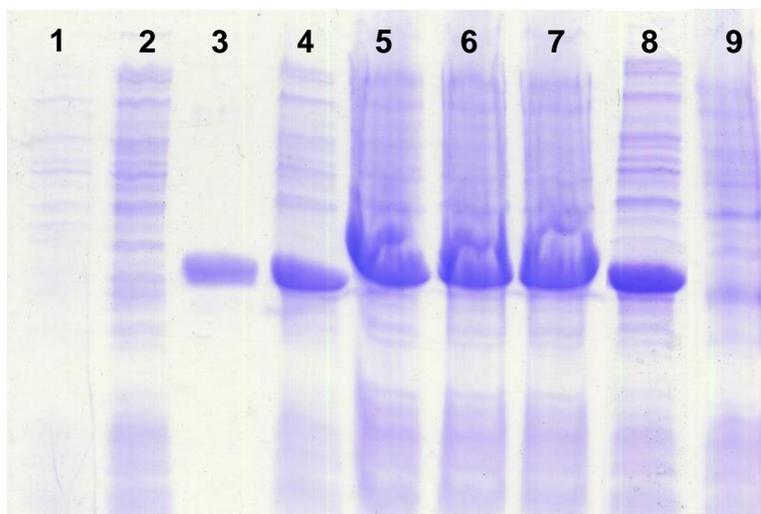


Figura 24. Pruebas de sobreexpresión de las TIMs bacterianas. Control sin transformar (1), control sin inducir (2), TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM) (3), sobreexpresión de *DrTIM* (4), sobreexpresión de *NpTIM* (5), sobreexpresión de *GoTIM* (6), sobreexpresión de *CpTIM* (7), sobreexpresión de *ScoTIM* (8), extracto total después de inducir la cepa que contiene el gen codificante de *AvTIM* donde se observa la falta de sobreexpresión (9).

Como se puede ver, no fue posible sobreexpresar a AvTIM en estas condiciones (figura 24), por lo que se diseñaron diversos protocolos de sobreexpresión. Se realizaron un total de 38 pruebas de expresión con las siguientes variaciones (una única variación por prueba, dejando todas las condiciones restantes igual a las estándares):

- Concentración de IPTG: 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10 mM.
- Temperatura: 15, 20, 25, 30, 37 y 40 °C.
- Densidad óptica del cultivo en el momento de la inducción: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4 y 1.6.
- Inducción con lactosa: concentración de 1, 5, 10 y 20 mg mL⁻¹.
- Tiempo de inducción: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas.

A pesar de todas las variaciones, en ninguna de ellas se logró la sobreexpresión de la enzima, por lo que se decidió cambiar de cepa de expresión y se realizaron pruebas con un total de 9 cepas (Agilent Technologies ©):

- *E. coli* ER 2566: cepa deficiente de proteasas.
- *E. coli* LMG 194: cepa deficiente de proteasas y con crecimiento lento.
- *E. coli* BL21(DE3)pLysS: cepa con un control extra (lisozima) de expresión de la polimerasa T7.
- *E. coli* Rosseta Δnag: cepa que cuenta con tARNs para codones raros.
- *E. coli* BL21 A1: cepa con un sistema de expresión de la ADN polimerasa basado en arabinosa.
- *E. coli* BL21pLysS Gold: cepa con una polimerasa constitutiva y sin el control del sistema *lac*.
- *E. coli* OverExpress(tm) C41(DE3): cepa modificada para tolerar proteínas tóxicas.
- *E. coli* BL21 ★Δnag pRARE: cepa que cuenta con tARNs para codones raros y una ADN polimerasa independiente de la inducción con lactosa e IPTG.
- *E. coli* Δnag pC(+): cepa que cuenta con una mutación en una ARNsa lo que evita la formación del sistema de degradosoma.

Las cepas se ensayaron con protocolos de sobreexpresión estándares y también con variaciones de IPTG: 0.2, 0.6, 1.2 y 2 mM, variaciones de temperatura: 20, 25 y 30 °C y DO₆₀₀ al momento de inducir de: 0.2, 0.8 y 1.2, todas fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes teñidos con azul de coomassie. Al analizar los resultados, se encontró que en ninguna de las cepas y bajo ninguna condición, se logró observar la expresión de AvTIM como se puede observar en un gel tipo que se muestra en la figura 25:

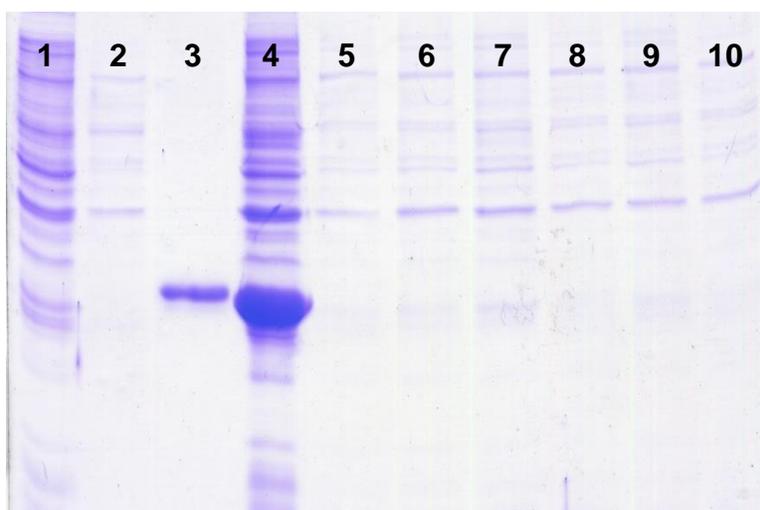


Figura 25. Pruebas de sobreexpresión para AvTIM. Control sin transformar (1), control sin inducir (2), ScTIM (3), sobreexpresión positiva de DrTIM (4), prueba de sobreexpresión con 2 mM de IPTG (5), prueba de sobreexpresión con 5 mM de IPTG (6), prueba de sobreexpresión incubada a 20 °C (7), prueba de sobreexpresión incubada a 30 °C (8), prueba de sobreexpresión inducida a una DO de 0.4 (9), prueba de sobreexpresión inducida a una DO de 1.0 (10).

Así, con todas las cepas y condiciones exploradas, se contabilizan un total de 137 pruebas de expresión realizadas, en ninguna de las cuales se obtuvo sobreexpresión. Debido a la falta de éxito en la sobreexpresión para AvTIM, se decidió cambiar el gen a otro vector de expresión. La elección fue el pET-22a (Novagen®) que tiene los mismos sitios de multiclonación que el vector usado previamente, por lo cual se utilizaron las mismas enzimas de restricción para liberar el fragmento, la única diferencia es que el vector presente, no coloca una etiqueta de histidinas como lo hace el pET-28b(+). La subclonación se realizó como en las otras TIMs y tras realizar la ligación, ésta se analizó por doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (figura 26). El

proceso se repitió para el vector pET28-b(+) como control. Se mandaron a secuenciar ambas construcciones y tras el resultado positivo de la secuencia y sabiendo que el gen de interés se encontraba en la posición correcta (en los dos vectores), se probó la sobreexpresión de la enzima.

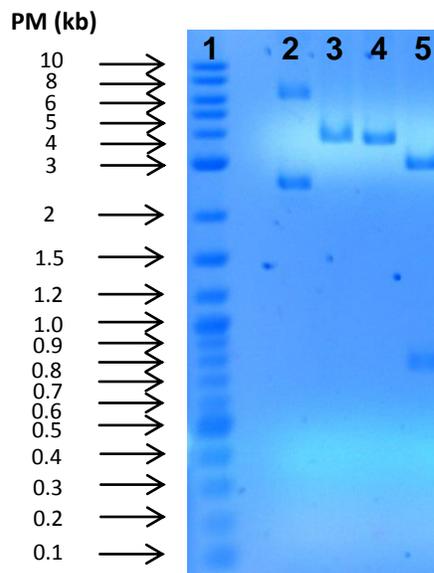


Figura 26. Digestiones de la construcción del gen *avtim* + el vector de expresión pET-22a. Marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder, New England BioLabs ®) (1), plásmido superenrollado (2), digestión de la construcción *tim* + pET-22a con la enzima *NdeI* (3), digestión de la construcción *tim* + pET-22a con la enzima *XhoI* (4), digestión de la construcción *tim* + pET-22a con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (5).

Se realizaron pruebas de sobreexpresión de esta enzima en volúmenes pequeños, y se observó la sobreexpresión únicamente en el vector pET-22a (figura 27), ya que en el vector pET-28b(+) no se pudo cumplir el objetivo; es probable que la etiqueta de histidinas presente una interacción desfavorable en conjunto con el resto de la proteína.

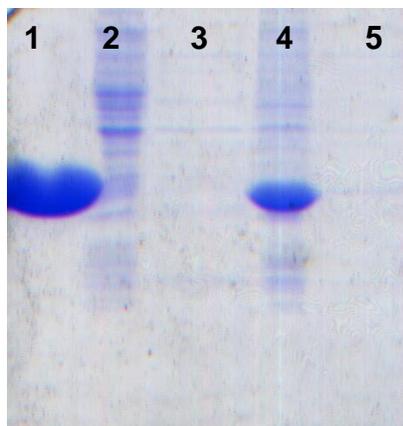


Figura 27. Pruebas de sobreexpresión para AvTIM. Marcador de peso molecular (*DrTIM*) (1), sobrenadante del control sin inducir (2), pellet del control sin inducir (3), pellet de AvTIM en pET-22a (4), sobrenadante de AvTIM en pET-22a (5).

Si bien se logró sobreexpresar la 6° TIM bacteriana, tuvimos el problema de que la proteína no estaba en la parte soluble del sonicado, lo que nos hizo pensar que la enzima se depositaba en cuerpos de inclusión. Al saber esto, se prosiguió a solubilizar la proteína, para esto, se probaron varios métodos de desnaturalización - renaturalización, los cuales se presentan en seguida:

1. Solubilizar la pastilla con 100 mM de NaCl y amortiguador TED 10:1:1.
2. Solubilizar la pastilla en 8 M de Urea y luego dializar contra amortiguador TED 10:1:1 para retirar la urea.
3. Solubilizar la pastilla en 6 M de urea y luego dializar contra amortiguador TED 10:1:1 para retirar la urea.
4. Solubilizar la pastilla en 8 M de urea y dializar progresivamente en intervalos decrecientes de urea hasta llegar a 0 M de urea.
5. Solubilizar la pastilla en 8 M de urea y dializar progresivamente cada 1 M de urea menos que la concentración anterior hasta llegar a 0 M de urea, además en cada amortiguador de diálisis se agregó 100 mM de arginina para ayudar a la solubilización de la enzima.
6. Solubilizar la pastilla en 1 M de urea y dializar progresivamente cada 1 M de urea más que la concentración anterior hasta llegar a 8 M y luego regresar en sentido inverso hasta llegar a 0 M de urea.

7. Solubilizar la pastilla en 6 M de GdnHCl y luego dializar contra amortiguador TED 10:1:1 para retirar el GdnHCl.
8. Solubilizar la pastilla en 6 M de GdnHCl y dializar progresivamente cada 1 M de GdnHCl menos que la concentración anterior hasta llegar a 0 M de GdnHCl.
9. Solubilizar la pastilla en 6 M de GdnHCl y dializar progresivamente cada 1 M de GdnHCl menos que la concentración anterior hasta llegar a 0 M, además en cada amortiguador de diálisis se agregó 100 mM de arginina para ayudar a la solubilización de la enzima.

10. Solubilizar la pastilla en 1 M de GdnHCl y dializar progresivamente aumentando en cada paso en 1 M de GdnHCl más que la concentración anterior hasta llegar a 6 M y luego regresar en sentido inverso hasta llegar a 0 M de GdnHCl.

Tras haber realizado todas estas opciones, encontramos que ningún método logró solubilizar proteína que se encontraba en los cuerpos de inclusión (figura 28), ya que o se dificultaba la solubilización de la pastilla o al dializar la proteína, ésta se agregaba y se perdía en estos agregados, encontrando en la parte soluble alrededor de 0.4 mg de proteína total en el mejor de los casos, por lo que era proteína insuficiente para trabajar en los ensayos posteriores. Además, tampoco funcionó disminuir los tiempos de inducción para obtener una proteína soluble (figura 28). Por estas razones, se decidió dejar a un lado la purificación de esta enzima y dedicar el trabajo a las otras cinco proteínas que se podían purificar en buena cantidad y de forma homogénea.

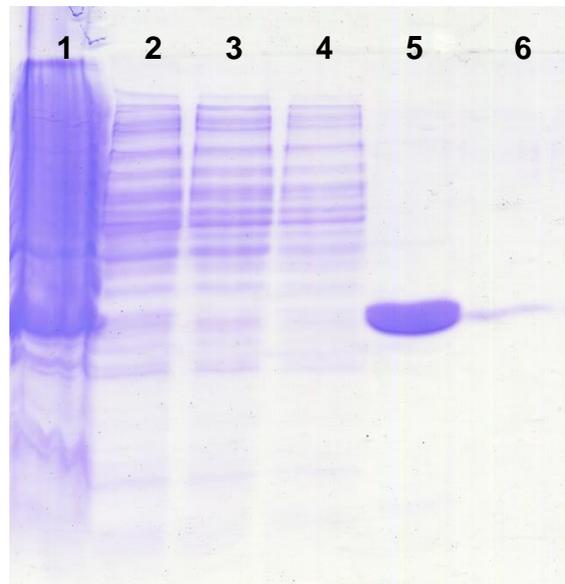


Figura 28. Lisis celular y sobreexpresión de AvTIM. Extracto total de la enzima sin centrifugar tras la lisis con sonicación (1), sobrenadante del lisado a 8 horas de inducción (2), sobrenadante del lisado a 4 horas de inducción (3), sobrenadante del lisado a 2 horas de inducción (4), precipitado tras la solubilización con urea 8 M (5), sobrenadante tras la solubilización con GdnHCl más 100 mM de arginina (6).

Purificación de las enzimas

Los pasos de purificación de las 5 enzimas se siguieron por cromatografía acoplada a FPLC. Un ejemplo de cada paso de purificación a través de columnas de cromatografía (para *DrTIM*), se muestran en las figuras 29-31.

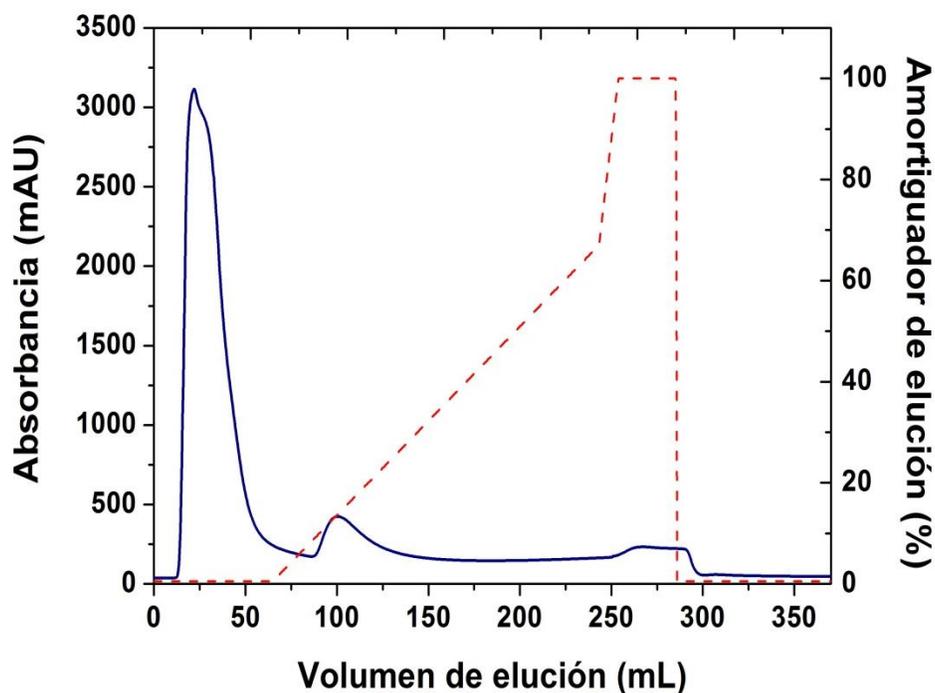


Figura 29. Cromatograma del primer paso de purificación para *DrTIM* utilizando una columna de afinidad Protino Ni-TED. El pico a los 95-125 mL muestra la elución de la proteína deseada con etiqueta de histidinas. Amortiguador de elución: NaH_2PO_4 35 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 500 mM, pH: 8.0.

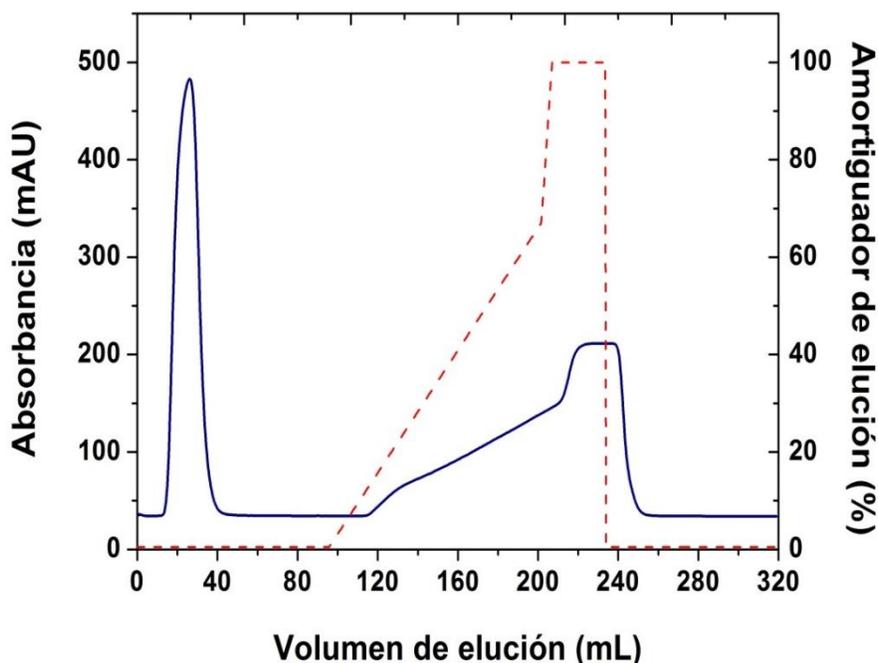


Figura 30. Cromatograma del tercer paso de purificación para *DrTIM* utilizando una columna de afinidad Protino Ni-TED. Se muestra el cromatograma al pasar la proteína después de realizar el corte con el kit de trombina. El pico a los 16-40 mL muestra la elución de la proteína deseada sin etiqueta de histidinas. Amortiguador de elución: NaH_2PO_4 35 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 500 mM, pH: 8.0.

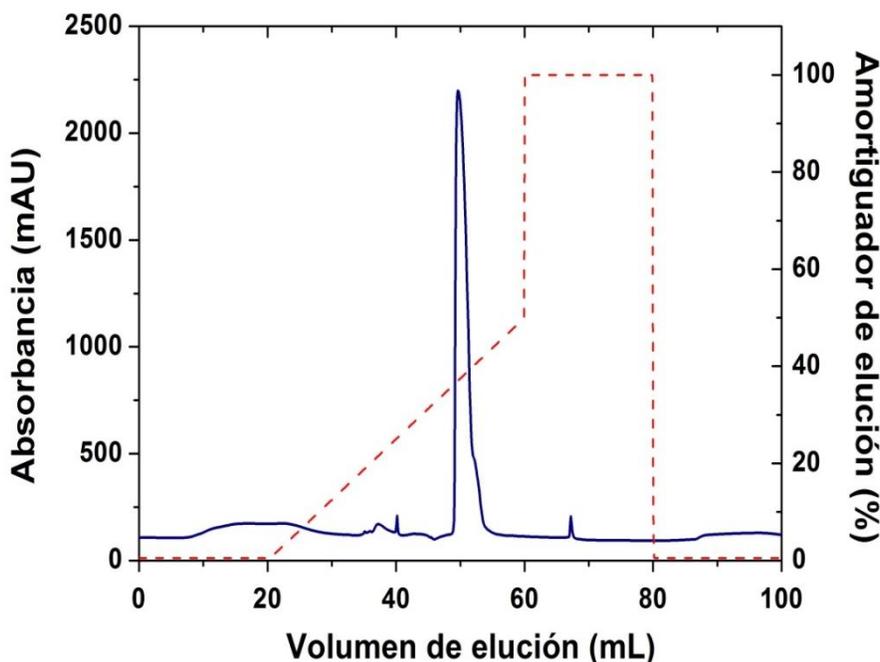


Figura 31. Cromatograma del cuarto paso de purificación para *DrTIM* utilizando una columna de intercambio aniónico Mono Q. El pico a los 48-52 mL muestra la elución de la proteína deseada. Amortiguador de elución: Trietanolamina 10 mM + EDTA 1 mM + DTT 1mM + NaCl 1 M, pH: 8.0.

El proceso completo de purificación se siguió en cada paso mediante geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y por medición de actividad específica. El protocolo estándar de purificación antes descrito fue útil para *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*, un gel representativo del proceso de purificación y las tablas de purificación de cada enzima se muestran en la figura 32 y tablas 6-8, respectivamente.

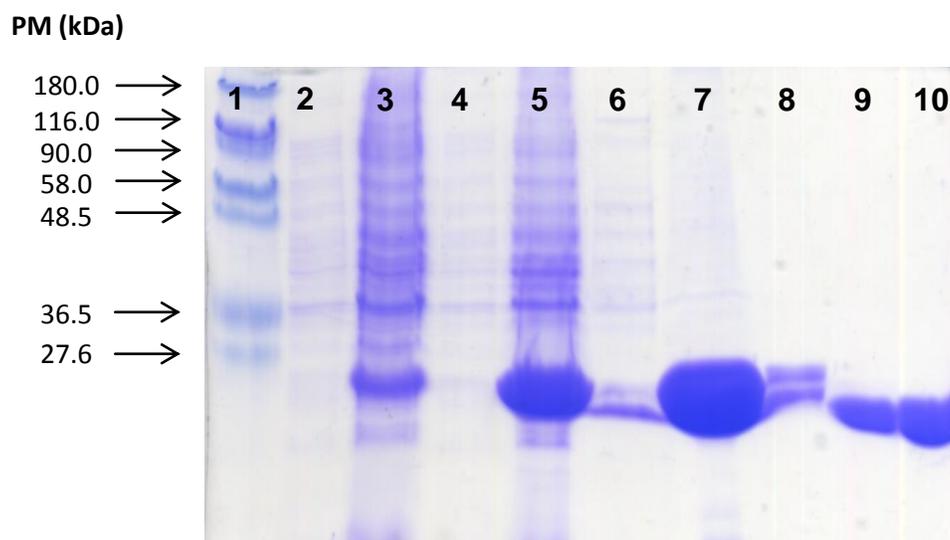


Figura 32. Pasos de purificación para *DrTIM*. Marcador de peso molecular (1), control sin inducir (2), extracto total (3), pastilla después de sonicar (4), sobrenadante después de sonicar (antes de meter a la columna Protino Ni-TED) (5), frente de elución (6), TIM con etiqueta de histidinas (7), TIM después de cortar con trombina (antes de meter a la columna Protino Ni-TED) (8), TIM sin etiqueta de histidinas (antes de meter a la columna Mono Q) (9), TIM pura (10).

Tabla 6. Tabla de purificación para *DrTIM*.

| Paso de purificación | Volumen (mL) | Concentración proteína (mg mL ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad total (μmol min ⁻¹) | Actividad específica (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Número de veces purificada (n) | Rendimiento (%) |
|---|--------------|---|---------------------|---|---|--------------------------------|-----------------|
| Antes de la columna Protino Ni-TED (Sobrenadante) | 17.5 | 8.82 | 154.40 | 76869 | 498 | 1.00 | 100.00 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (con HisTag) | 5.8 | 6.71 | 38.91 | 73763 | 1896 | 3.81 | 95.96 |
| Después del corte con trombina | 12.0 | 2.25 | 27.00 | 67534 | 2501 | 5.02 | 87.86 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (sin HisTag) | 12.0 | 1.89 | 22.68 | 67014 | 2955 | 5.93 | 87.18 |
| Después de la columna Mono Q | 2.0 | 5.71 | 11.41 | 64707 | 5669 | 11.39 | 84.18 |

Tabla 7. Tabla de purificación para CpTIM.

| Paso de purificación | Volumen (mL) | Concentración proteína (mg mL ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad total (μmol min ⁻¹) | Actividad específica (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Número de veces purificada (n) | Rendimiento (%) |
|---|--------------|---|---------------------|---|---|--------------------------------|-----------------|
| Antes de la columna Protino Ni-TED (Sobrenadante) | 9.6 | 16.71 | 160.38 | 112650 | 702 | 1.00 | 100.00 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (con HisTag) | 7.5 | 6.61 | 49.54 | 106513 | 2150 | 3.06 | 94.55 |
| Después del corte con trombina | 12.0 | 2.87 | 34.41 | 97914 | 2845 | 4.05 | 86.92 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (sin HisTag) | 10.5 | 2.35 | 24.68 | 96454 | 3909 | 5.57 | 85.62 |
| Después de la columna Mono Q | 2.0 | 5.35 | 10.70 | 95854 | 8955 | 12.75 | 85.09 |

Tabla 8. Tabla de purificación para ScoTIM.

| Paso de purificación | Volumen (mL) | Concentración proteína (mg mL ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad total (μmol min ⁻¹) | Actividad específica (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Número de veces purificada (n) | Rendimiento (%) |
|---|--------------|---|---------------------|---|---|--------------------------------|-----------------|
| Antes de la columna Protino Ni-TED (Sobrenadante) | 12.5 | 9.11 | 113.89 | 62210 | 546 | 1.00 | 100.00 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (con HisTag) | 9.0 | 3.34 | 30.06 | 57852 | 1925 | 3.52 | 92.99 |
| Después del corte con trombina | 12.0 | 2.22 | 26.64 | 55990 | 2102 | 3.85 | 90.00 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (sin HisTag) | 10.0 | 2.15 | 21.50 | 55153 | 2565 | 4.70 | 88.66 |
| Después de la columna Mono Q | 2.0 | 5.22 | 10.44 | 52469 | 5026 | 9.20 | 84.34 |

Para *Np*TIM y *Go*TIM se siguieron procedimientos de purificación modificados en el paso inicial, debido a que las 2 enzimas presentaron resistencia a la sonicación (observada como la falta de un cambio en la turbidez y la ausencia de proteínas en el sobrenadante tras la centrifugación). Después de pruebas de sonicación por tiempos y ciclos prolongados (siendo el máximo que se probó de 20 ciclos de 2 minutos con descansos de 1 minuto cada uno), se llegó a la conclusión que las células no podían ser lisadas por sonicación y por lo tanto, se debería utilizar otro método para lograrlo. El protocolo elegido para lisar estas células fue resuspender la pastilla en amortiguador de fosfatos con 5 mM de Imidazol para lisarla en la prensa de French, con 3 ciclos a 1000

psi de presión y continuar con los pasos siguientes de purificación de la misma forma que las otras TIMs. A pesar de realizar este procedimiento, la cantidad de proteína recuperada fue menor comparada con las purificaciones estándares, lo que se puede ver en los geles y tablas de purificación siguientes (figura 33, tablas 9-10):

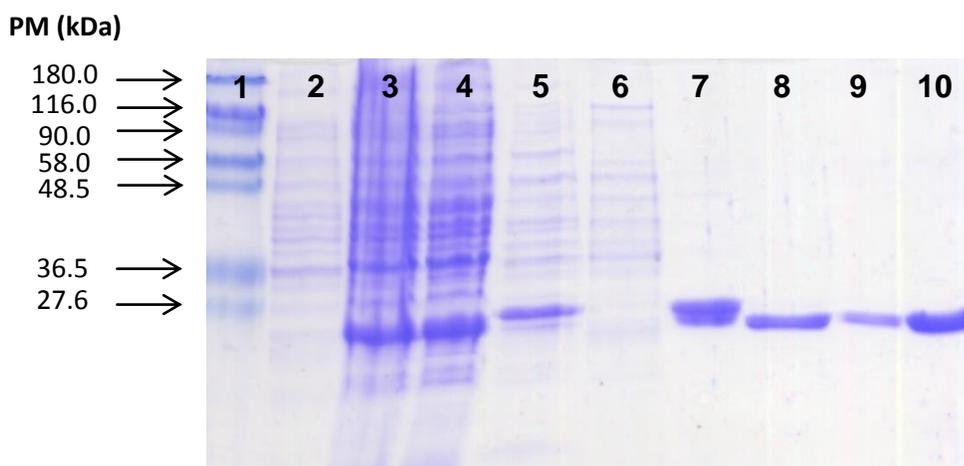


Figura 33. Pasos de purificación para *NpTIM*. Marcador de peso molecular (1), control sin inducir (2), extracto total (3), pastilla después de lisar en la French Press (4), sobrenadante después de lisar (antes de meter a la columna Protino Ni-TED) (5), frente de elución (6), TIM con etiqueta de histidinas (7), TIM después de cortar con trombina (antes de meter a la columna Protino Ni-TED) (8), TIM sin etiqueta de histidinas (antes de meter a la columna Mono Q) (9), TIM pura (10).

Tabla 9. Tabla de purificación para *NpTIM*.

| Paso de purificación | Volumen (mL) | Concentración proteína (mg mL ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad total (μmol min ⁻¹) | Actividad específica (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Número de veces purificada (n) | Rendimiento (%) |
|---|--------------|---|---------------------|---|---|--------------------------------|-----------------|
| Antes de la columna Protino Ni-TED (Sobrenadante) | 12.3 | 47.59 | 585.36 | 5994 | 10 | 1.00 | 100.00 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (con HisTag) | 7.5 | 2.54 | 19.05 | 5339 | 280 | 27.37 | 89.07 |
| Después del corte con trombina | 12.0 | 1.12 | 13.44 | 5237 | 390 | 38.05 | 87.37 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (sin HisTag) | 9.0 | 1.22 | 10.98 | 5184 | 472 | 46.11 | 86.49 |
| Después de la columna Mono Q | 2.0 | 3.12 | 6.24 | 5147 | 825 | 80.54 | 85.86 |

Tabla 10. Tabla de purificación para GoTIM.

| Paso de purificación | Volumen (mL) | Concentración proteína (mg mL ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad total (μmol min ⁻¹) | Actividad específica (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Número de veces purificada (n) | Rendimiento (%) |
|---|--------------|---|---------------------|---|---|--------------------------------|-----------------|
| Antes de la columna Protino Ni-TED (Sobrenadante) | 24.5 | 41.60 | 1019.20 | 11874 | 12 | 1.00 | 100.00 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (con HisTag) | 8.5 | 1.10 | 9.32 | 10895 | 1169 | 100.38 | 91.76 |
| Después del corte con trombina | 12.0 | 0.69 | 8.28 | 9922 | 1198 | 102.85 | 83.56 |
| Después de la columna Protino Ni-TED (sin HisTag) | 18.0 | 0.44 | 7.92 | 9787 | 1236 | 106.08 | 82.43 |
| Después de la columna Mono Q | 6.0 | 1.22 | 7.33 | 9688 | 1322 | 113.51 | 81.59 |

Las cantidades de enzima purificada, a partir de 500 mL de medio de cultivo, fueron (promedio de 3 lotes distintos de purificación):

- *DrTIM*: 11.4 ± 1.3 mg.
- *NpTIM*: 6.2 ± 1.1 mg.
- *GoTIM*: 7.3 ± 1.8 mg.
- *CpTIM*: 10.7 ± 0.7 mg.
- *ScoTIM*: 10.4 ± 0.9 mg.

Como criterio de pureza para todas las proteínas estudiadas, se realizó el corrimiento de un gel de poliacrilamida al 12% sobrecargado de proteína, con el fin de ver algún contaminante en la muestra concentrada. En todas ellas se observó una única banda de proteína, lo que indicó que nuestras muestras estaban puras en un porcentaje mayor al 95%. Además, en el cromatograma del último paso de purificación (columna Mono Q, figura 33) se puede observar que la proteína eluye en una sola fracción, lo que nos indica indirectamente también que la proteína está pura. Para comprobar la pureza de las proteínas, se propone en un futuro realizar otras pruebas como son: densitometría de los geles de poliacrilamida, gel de isoelectroenfoque, dispersión dinámica de luz y espectrometría de masas.

Parámetros Catalíticos

Los datos experimentales de 3 lotes diferentes de proteínas a los cuales se les calcularon los parámetros catalíticos, se muestran en la figura 34 (curvas de cinética enzimática) y tabla 1 (resultados de los parámetros catalíticos).

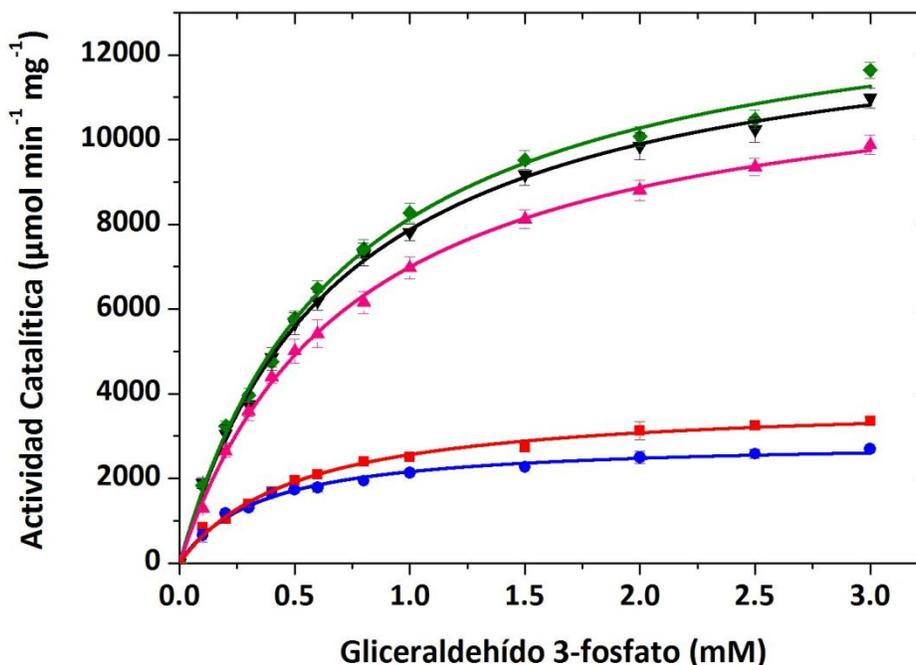


Figura 34. Cinéticas enzimáticas de las TIMs bacterianas. Los valores se determinaron a 25 °C, pH 8.0 y diferentes concentraciones de G3P (0.1-3.0 mM); los datos se ajustaron a una regresión no lineal con una cinética tipo Michaelis-Menten. Las barras de incertidumbre corresponden a los 3 diferentes lotes de proteína en los que se determinaron los parámetros catalíticos. Los valores finales se muestran en la tabla 10; *DrTIM* (--- ▼ ---), *NpTIM* (--- ■ ---), *GoTIM* (--- ● ---), *CpTIM* (--- ◆ ---), *ScoTIM* (--- ▲ ---).

Tabla 11. Parámetros catalíticos de las TIMs bacterianas.

| TIM | K_M (mM) | V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | k_{cat} (min^{-1}) | Eficiencia Catalítica ($M^{-1} \text{s}^{-1}$) |
|----------------|-----------------|--|------------------------------------|---|
| <i>Dr</i> TIM | 0.69 ± 0.03 | 13313 ± 181 | $(3.41 \pm 0.12) \times 10^5$ | $(2.06 \pm 0.18) \times 10^8$ |
| <i>Np</i> TIM | 0.51 ± 0.04 | 3851 ± 89 | $(1.05 \pm 0.04) \times 10^5$ | $(8.63 \pm 0.29) \times 10^7$ |
| <i>Go</i> TIM | 0.34 ± 0.02 | 2901 ± 57 | $(7.84 \pm 0.32) \times 10^4$ | $(9.51 \pm 0.14) \times 10^7$ |
| <i>Cp</i> TIM | 0.72 ± 0.04 | 13930 ± 272 | $(3.81 \pm 0.09) \times 10^5$ | $(2.24 \pm 0.10) \times 10^8$ |
| <i>Sco</i> TIM | 0.74 ± 0.02 | 12137 ± 132 | $(3.41 \pm 0.13) \times 10^5$ | $(1.93 \pm 0.06) \times 10^8$ |

* El valor de \pm corresponde a la desviación estándar de los 3 diferentes lotes de proteína en los que se determinaron los parámetros.

Determinación del grado de asociación (oligomerización)

A partir de la interpolación de las curvas construidas con las proteínas que sirvieron de calibración, se determinó el R_s y los PMs experimentales de las TIMs bacterianas. La determinación del estado oligomérico se realizó dividiendo el PM experimental sobre el PM teórico y el número resultante redondeado fue la cantidad de monómeros asociados de la enzima (tabla 12). Un cromatograma de elución de ejemplo para una TIM a 3 diferentes concentraciones de proteína se muestra en la figura 35 (las demás TIMs bacterianas tuvieron un comportamiento igual al mostrado en el ejemplo).

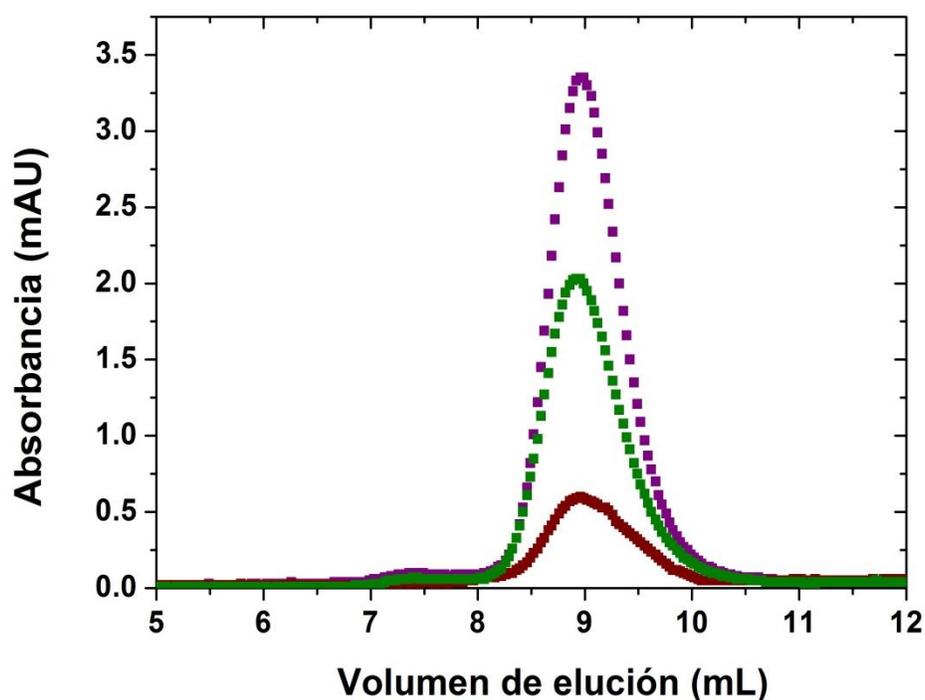


Figura 35. Cromatograma de elución para ScoTIM a 3 concentraciones diferentes de proteína. Se observa que el volumen de elución corresponde a un estado de asociación dimérico. Los resultados detallados de los experimentos se encuentran en la tabla 3; $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—■—), $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—■—) y $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (—■—) (temperatura: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; amortiguador: trietanolamina 10 mM + EDTA 1 mM + DTT 1 mM , pH 8.0).

Tabla 12. Estado oligomérico de las TIMs bacterianas.

| TIM | Peso molecular teórico (monómero) (Da) | Volumen de elución (mL) | Radio de Stokes (Å) | Peso molecular experimental (Da) | Estado oligomérico (monómeros calculados) |
|----------------|--|-------------------------|---------------------|----------------------------------|---|
| <i>Dr</i> TIM | 25593 | 9.13 | 31.56 | 53872 | Dímero (2.1) |
| <i>Np</i> TIM | 27053 | 9.16 | 31.38 | 53041 | Dímero (2.0) |
| <i>Go</i> TIM | 27025 | 9.10 | 31.73 | 54636 | Dímero (2.0) |
| <i>Cp</i> TIM | 27339 | 9.04 | 32.03 | 55993 | Dímero (2.0) |
| <i>Sco</i> TIM | 28018 | 9.07 | 31.88 | 55314 | Dímero (2.0) |

Mediciones espectroscópicas

Fluorescencia intrínseca

Las mediciones de fluorescencia tanto en los datos crudos como en su forma normalizada, se muestran en las figuras 36-37.

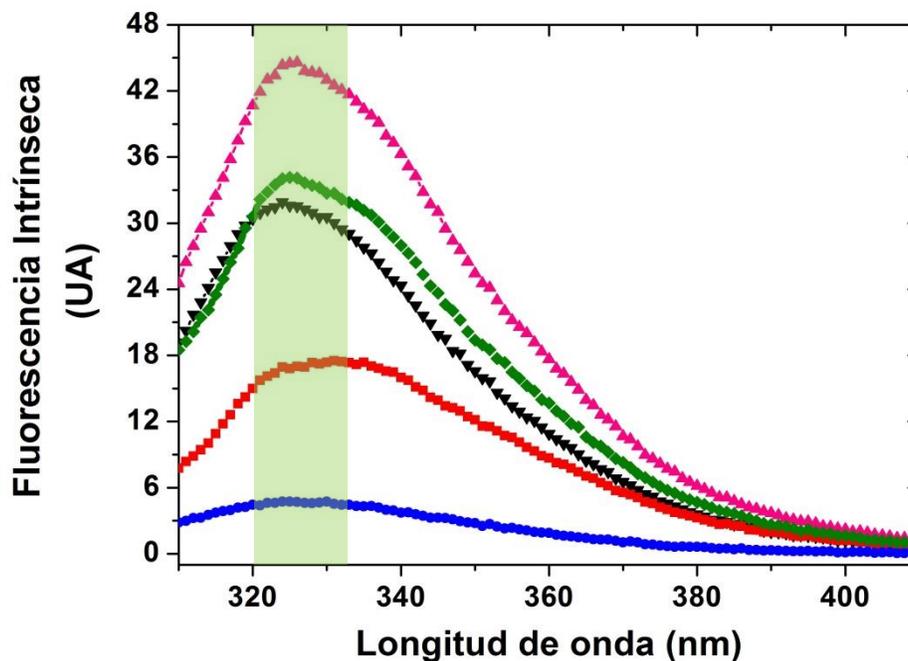


Figura 36. Espectros de fluorescencia intrínseca de las TIMs bacterianas (datos crudos). En la franja verde se indica el máximo de emisión para éstas (λ excitación: 295 nm; temperatura: 25 °C; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; en todos los casos la concentración de proteína es de 0.2 mg mL^{-1}); *DrTIM* (-- ▼ --), *NpTIM* (-- ■ --), *GoTIM* (-- ● --), *CpTIM* (-- ◆ --), *ScoTIM* (-- ▲ --).

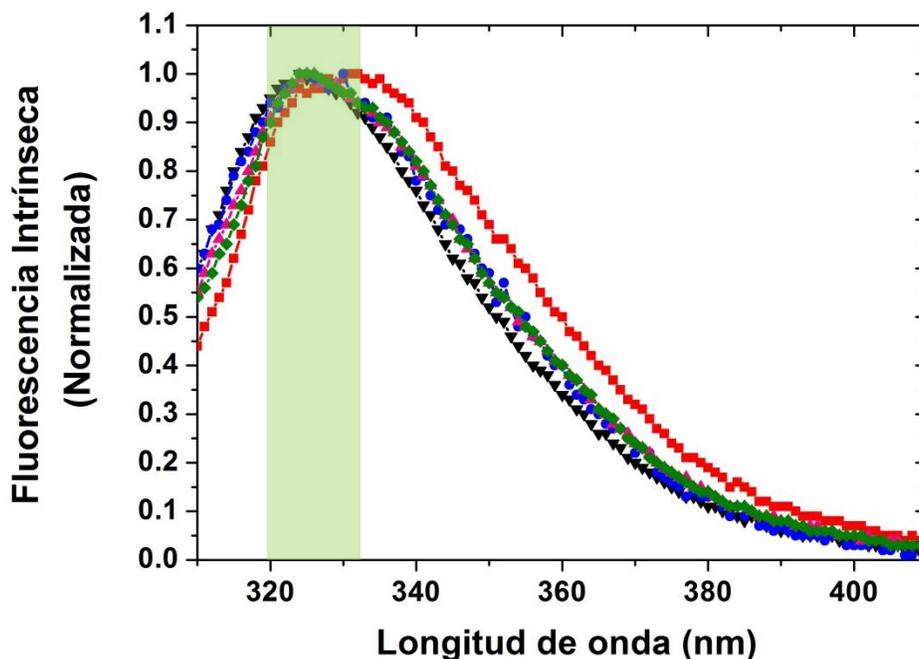


Figura 37. Espectros de fluorescencia intrínseca de las TIMs bacterianas (datos normalizados). En la línea verde se indica el máximo de emisión para éstas (λ excitación: 295 nm; temperatura: 25 °C; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; en todos los casos la concentración de proteína es de 0.2 mg mL^{-1}); *DrTIM* (-- ▼ --), *NpTIM* (-- ■ --), *GoTIM* (-- ● --), *CpTIM* (-- ◆ --), *ScoTIM* (-- ▲ --).

Los resultados del CME, longitud de onda máxima de emisión y número de triptófanos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de los espectros de fluorescencia de las TIMs bacterianas.

| TIM | Número de triptófanos (n) | λ_{max} (nm) | Intensidad _{max} (UA) | Centro de Masa Espectral (nm) |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>DrTIM</i> | 3 | 324 | 31.9 | 337.7 |
| <i>NpTIM</i> | 3 | 331 | 17.5 | 342.1 |
| <i>GoTIM</i> | 3 | 325 | 4.7 | 339.5 |
| <i>CpTIM</i> | 2 | 326 | 44.6 | 339.4 |
| <i>ScoTIM</i> | 2 | 325 | 34.1 | 339.5 |

Dicroísmo circular

En los espectros de DC de las TIMs se distinguen los mínimos característicos de proteínas que poseen hélices α y hebras β , con mínimos en 220 y 210 nm, respectivamente (figura 38); aunque se ve una diferencia clara en la forma del espectro de *DrTIM*, cuestión que se discutirá más adelante.

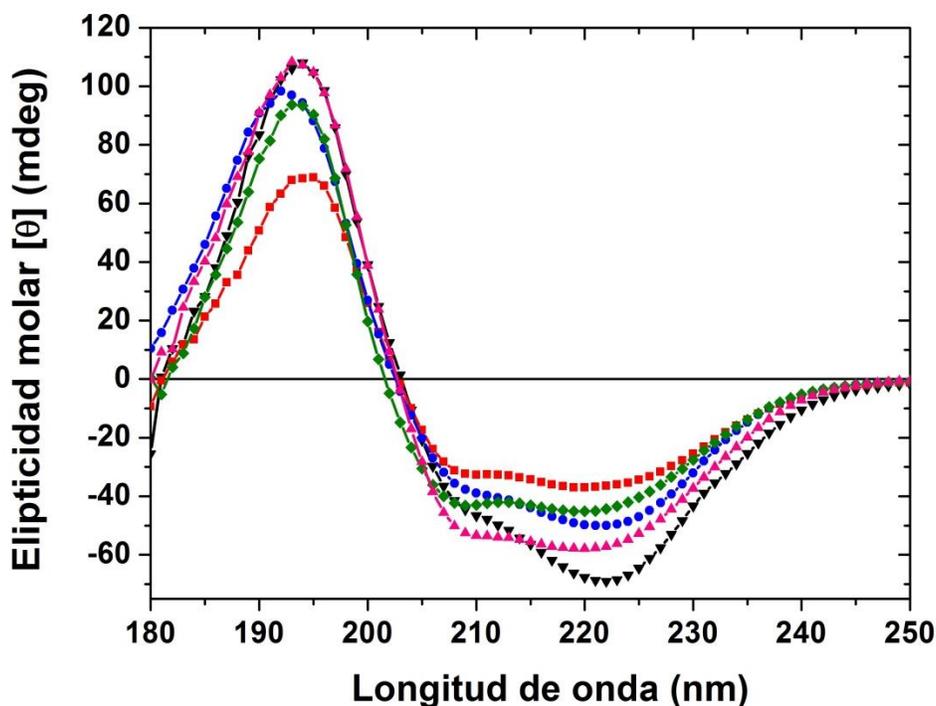


Figura 38. Espectro de Dicroísmo Circular nativo de las TIMs bacterianas (temperatura: 25 °C; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; en todos los casos la concentración de proteína es de 0.5 mg mL^{-1}); *DrTIM* (-- ▼ --), *NpTIM* (-- ■ --), *GoTIM* (-- ● --), *CpTIM* (-- ◆ --), *ScoTIM* (-- ▲ --).

Estabilidad a la dilución

Con los experimentos de estabilidad a la dilución, se construyó la gráfica de fracción de dímeros activos con respecto a la concentración de proteína a la que se incubó cada dilución (figura 39). De esta gráfica se obtuvo el valor de la $K_{\text{dis}}^{\text{app}}$, a partir de este valor se calculó el ΔG_{dis} para cada enzima (tabla 14).

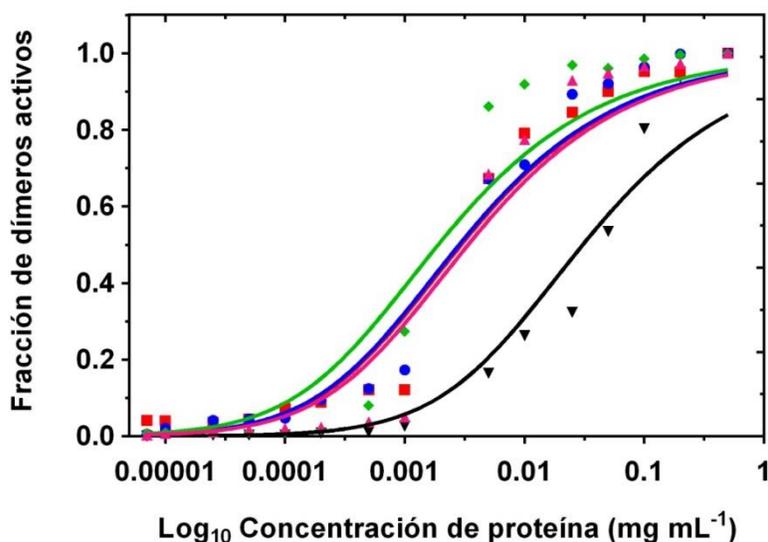


Figura 39. Estabilidad a la dilución para las TIMs bacterianas a 25 °C. Se indica la fracción de dímeros activos en función de la concentración de proteína a la que se hicieron. En símbolos se muestran los datos experimentales y en la línea continua, el ajuste realizado con la ecuación 4 (materiales y métodos); *DrTIM* (-- ▼ --), *NpTIM* (-- ■ --), *GoTIM* (-- ● --), *CpTIM* (-- ◆ --), *ScoTIM* (-- ▲ --).

Tabla 14. Constante (K_{Diss}) y ΔG de disociación aparente (ΔG_{Diss}) de las TIMs bacterianas en comparación con otras TIMs silvestres reportadas.

| TIM | $K_{\text{dis}}^{\text{app}}$ (M) | ΔG_{dis} (kcal mol ⁻¹) | Referencia |
|---------------|-----------------------------------|---|---|
| <i>DrTIM</i> | $(11.9 \pm 2.7) \times 10^{-7}$ | 8.08 ± 0.23 | Este estudio |
| <i>NpTIM</i> | $(10.9 \pm 2.4) \times 10^{-8}$ | 9.50 ± 0.19 | Este estudio |
| <i>GoTIM</i> | $(10.5 \pm 2.2) \times 10^{-8}$ | 9.52 ± 0.11 | Este estudio |
| <i>CpTIM</i> | $(69.4 \pm 12.3) \times 10^{-9}$ | 9.77 ± 0.20 | Este estudio |
| <i>ScoTIM</i> | $(30.9 \pm 8.3) \times 10^{-8}$ | 8.88 ± 0.54 | Este estudio |
| <i>EhTIM</i> | $(9.3 \pm 2.6) \times 10^{-10}$ | 11.71 ± 0.13 | Cisneros-Armas, 2003; Landa <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>G/TIM</i> | $(50.6 \pm 12.0) \times 10^{-9}$ | 9.77 ± 0.25 | Lopez-Velazquez <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>HsTIM</i> | 32.1×10^{-12} | 14.32 | Mainfroid <i>et al.</i> , 1996b |
| <i>TbTIM</i> | $(43.8 \pm 4.0) \times 10^{-9}$ | 10.04 ± 0.21 | Lopez-Velazquez <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>TcTIM</i> | $(44.0 \pm 2.3) \times 10^{-9}$ | 10.04 ± 0.13 | Lopez-Velazquez <i>et al.</i> , 2004 |

Desplegamiento térmico

Con los experimentos de DC y DSC, se obtuvieron las temperaturas medias de desnaturalización de cada proteína. En la tabla 15 se muestran los valores de la T_m para las TIMs bacterianas estudiadas en el presente trabajo y en comparación con el valor para otras TIMs silvestres reportadas hasta la fecha (en la mayoría de los casos, la T_m reportada es utilizando una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1}).

Tabla 15. T_m para las TIMs bacterianas en comparación con otras TIMs silvestres reportadas.

| TIM | T_m (°C) | Referencia |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| TIMs de organismos termófilos | | |
| <i>Tm</i> TIM | 82.0 | Beaucamp <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Bs</i> TIM | 76.0 | Alvarez <i>et al.</i> , 1999 |
| TIMs de organismos mesófilos | | |
| <i>Go</i> TIM | 65.2 | Este estudio |
| <i>Scr</i> TIM | 63.9 | Jimenez <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Ts</i> TIM | 62.3 | Jimenez <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Sc</i> TIM | 59.1 | Benitez-Cardoza <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Cp</i> TIM | 58.9 | Este estudio |
| <i>Tc</i> TIM | 58.5 | Costas <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Gg</i> TIM | 58.4 | Shi <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Np</i> TIM | 58.3 | Este estudio |
| <i>Pf</i> TIM | 58.0 | Gopal <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Lm</i> TIM | 57.5 | Williams <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Tb</i> TIM | 57.0 | Schliebs <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Mt</i> TIM | 55.0 | Mathur <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Hs</i> TIM | 54.8 | Mainfroid <i>et al.</i> , 1996b |
| <i>Ec</i> TIM | 54.0 | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Sco</i> TIM | 45.4 | Este estudio |
| <i>Dr</i> TIM | 44.9 | Este estudio |
| <i>Eh</i> TIM | 41.5 [†] / 57.0 [‡] | Tellez <i>et al.</i> , 2008 |
| TIMs de organismos psicrófilos | | |
| <i>Mm</i> TIM | 41.0 | Alvarez <i>et al.</i> , 1998 |

†: T_m de la primera transición (disociación). ‡: T_m de la segunda transición (desplegamiento).

A partir de ahora, para describir los resultados de la desnaturalización térmica, se agruparán las enzimas en dos grandes bloques: 1) aquellas cuyo desplegamiento térmico fue irreversible y 2) aquellas que mostraron un desplegamiento térmico reversible.

TIMs bacterianas con desplegamiento térmico irreversible

Dentro de este bloque se encuentran: *NpTIM* y *GoTIM*. Los experimentos de desplegamiento térmico seguido por DC en ambas direcciones siguiendo 3 longitudes de onda se muestran en las figuras 40-43 (datos crudos y datos normalizados a fracciones de proteína nativa, respectivamente). Los espectros de dicroísmo circular antes y después de la desnaturalización para ambas enzimas se muestran en la figura 44 y 45. Con efecto de ahorrar espacio y comparar con otros resultados reportados de la TIM, las curvas sólo se muestran a la velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} (el mismo comportamiento para esta velocidad de barrido se observó a 30 y 180 K hr^{-1} , datos no mostrados). Al finalizar el experimento, en todos los casos se observó agregación de la proteína en la celda de DC.

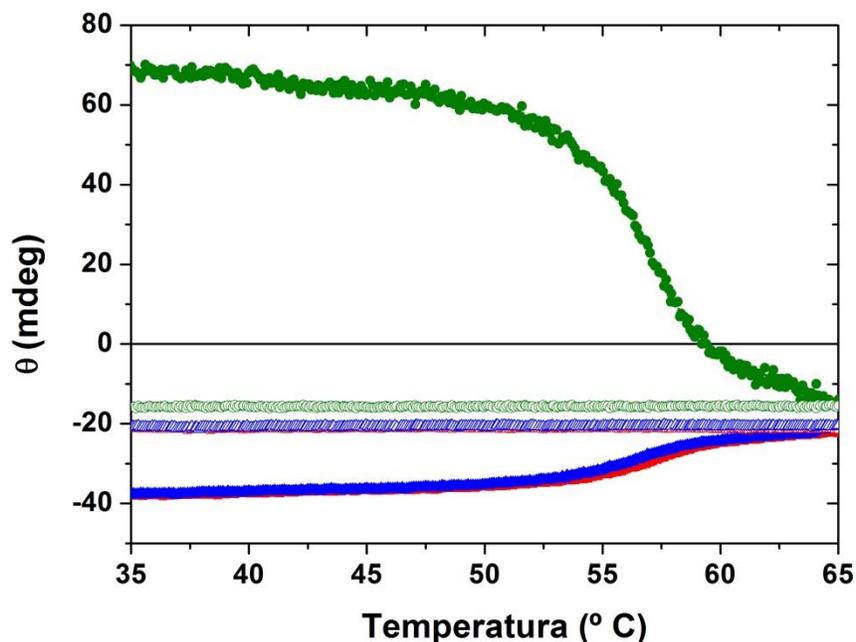


Figura 40. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *NpTIM* seguidas por DC (datos crudos). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (-- ● --), 208 nm (-- ▲ --), 222 nm (-- ■ --). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

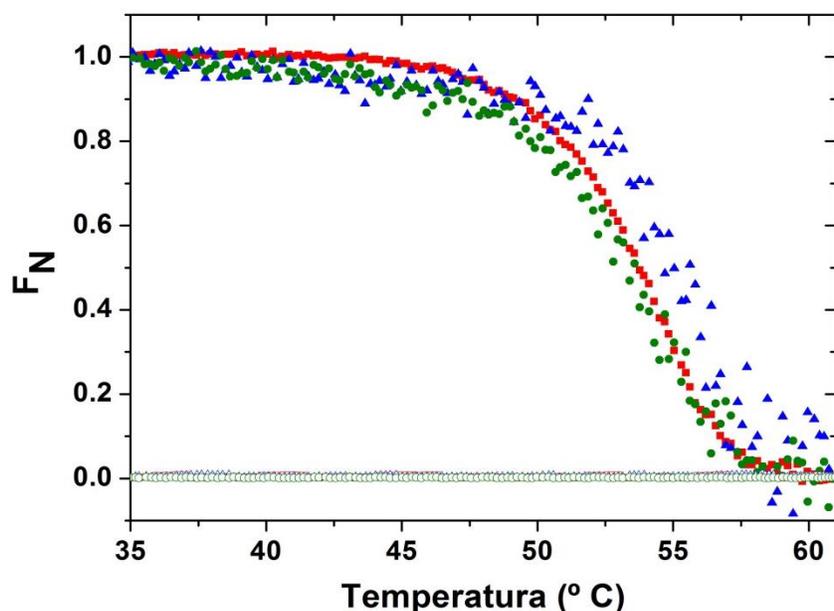


Figura 41. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *NpTIM* seguidas por DC (datos normalizados en fracción de proteína nativa). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

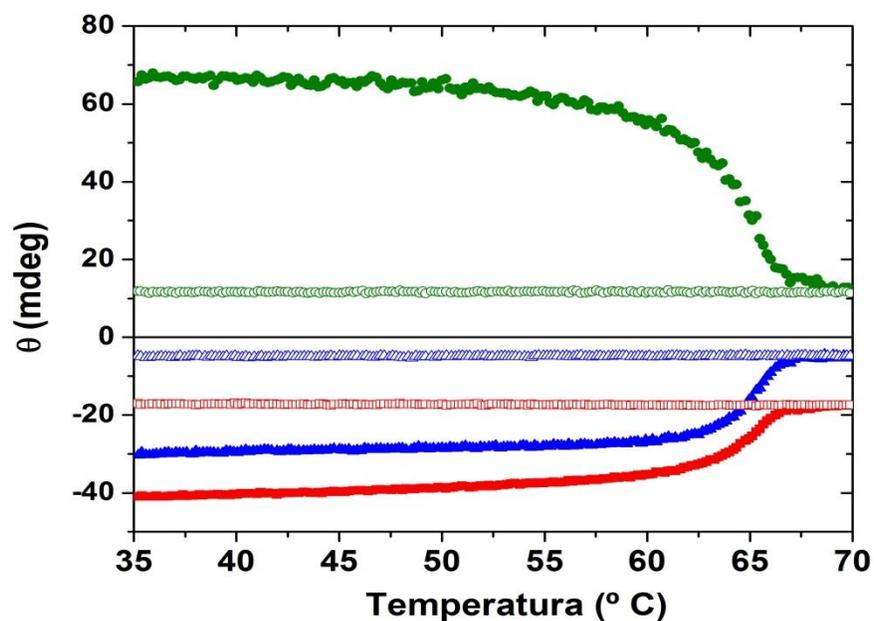


Figura 42. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *GoTIM* seguidas por DC (datos crudos). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

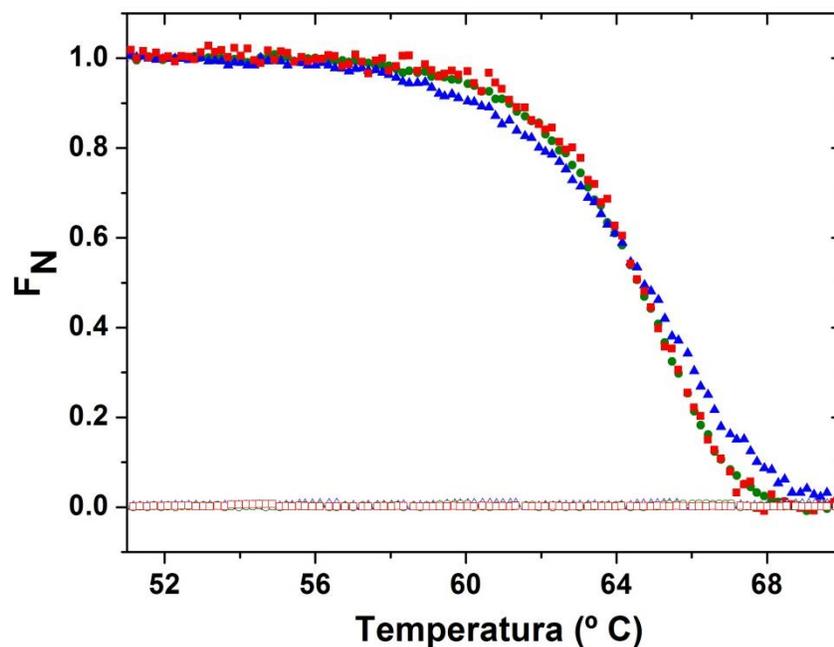


Figura 43. Curvas de desnaturalización/renaturalización para GoTIM seguidas por DC (datos normalizados en fracción de proteína nativa). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

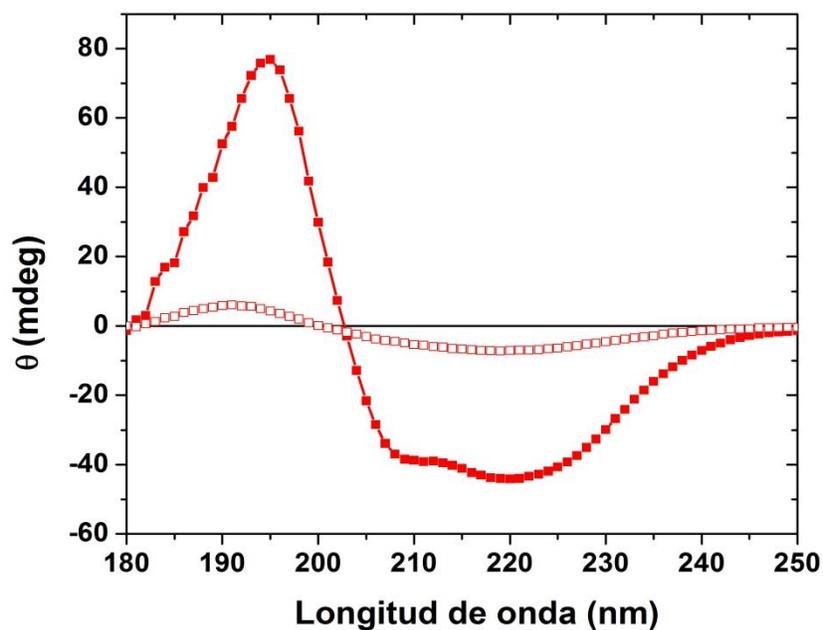


Figura 44 Espectros de DC para $NpTIM$ antes de la desnaturalización térmica (--- ■ ---) y después de permitir la renaturalización (--- □ ---). Nótese la falta de recuperación de la señal tras haber enfriado la proteína, lo que indica que el proceso de desplegamiento térmico es irreversible; (temperatura: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1})

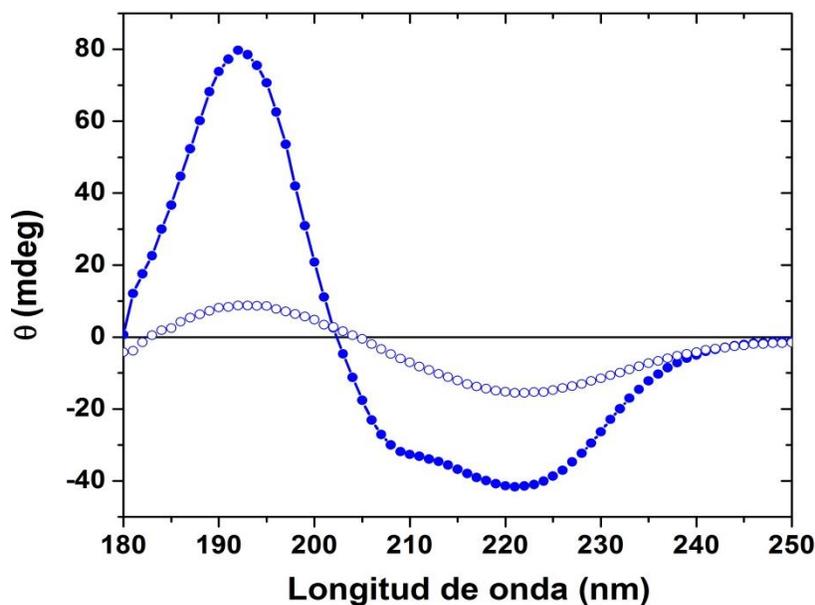


Figura 45. Espectros de DC para GoTIM antes de la desnaturalización térmica (-- ● --) y después de permitir la renaturalización (-- ○ --). Nótese la falta de recuperación de la señal tras haber enfriado la proteína, lo que indica que el proceso de desplegamiento térmico es irreversible; (temperatura: 25 °C; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1})

El proceso de desnaturalización térmica también se siguió por DSC. Como primer punto, se analizó la reversibilidad del proceso. Para ello, la muestra se sometió a dos ciclos de calentamiento; en el primero se observó la endoterma característica (símbolos llenos, figuras 46-47), sin embargo, en un segundo ciclo de calentamiento (después de enfriar a la proteína) no se observó transición alguna (símbolos vacíos, figuras 46-47). Esto indica que después del primer ciclo de calentamiento, las enzimas no se repliegan al regresar a temperatura ambiente, esto es, el proceso de desnaturalización térmica es irreversible. Para ver una posible reversibilidad del proceso, se realizó un experimento extra, calentando únicamente hasta la T_m . Al igual que en los experimentos anteriores, no se observó transición alguna en los segundos ciclos de calentamiento (datos no mostrados).

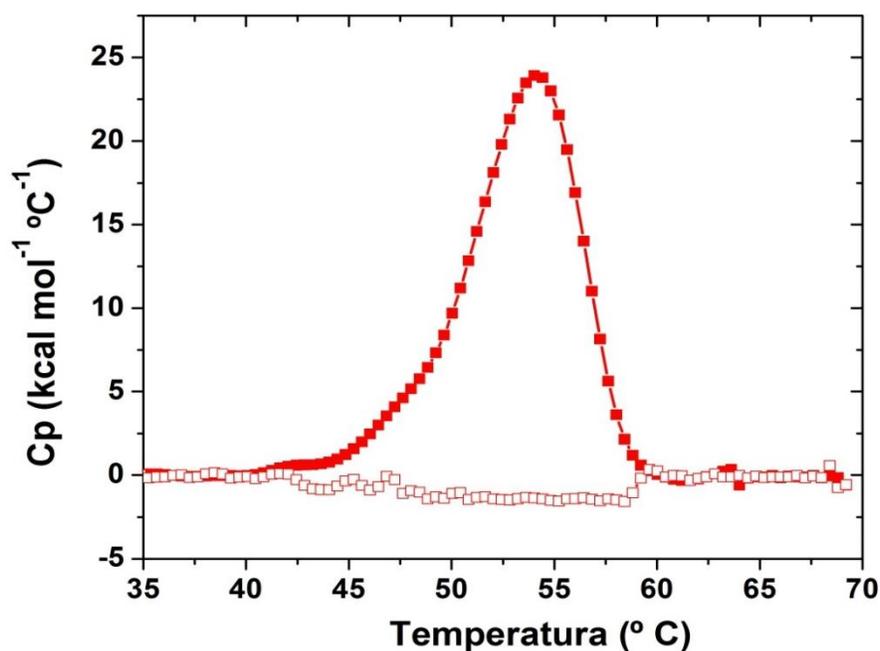


Figura 46. Análisis de la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica para *NpTIM* (--- ■ ---). Los símbolos llenos muestran el primer scan y los símbolos vacíos indican el segundo scan realizado; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

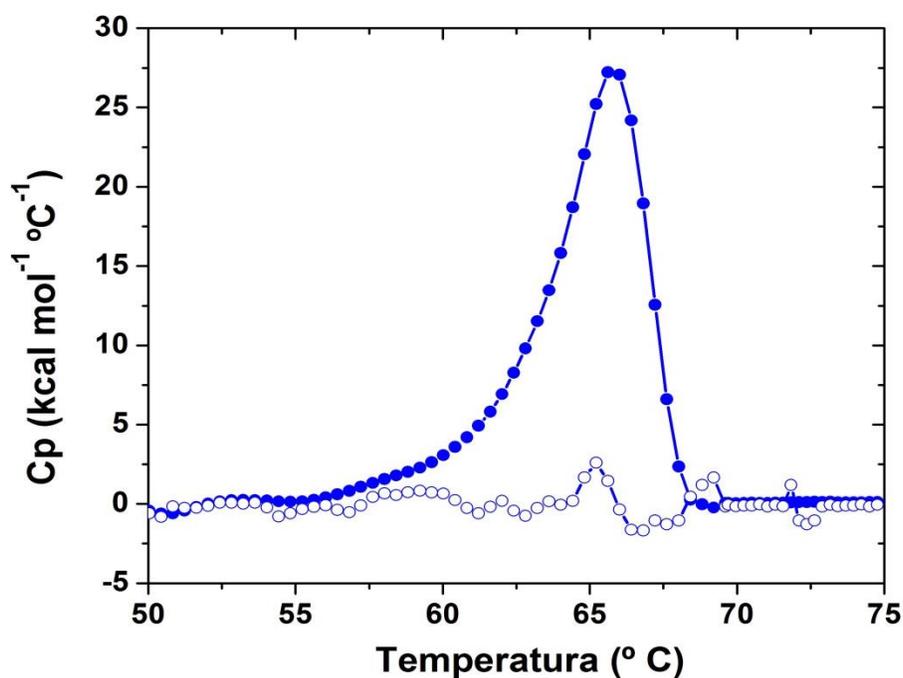


Figura 47. Análisis de la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica para *GoTIM* (--- ● ---). Los símbolos llenos muestran el primer scan y los símbolos vacíos indican el segundo scan realizado; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

Posteriormente, se analizó la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido, con el fin de observar si existía un control cinético en el desplegamiento térmico de estas TIMs. El corrimiento de las trazas de acuerdo a la velocidad de barrido para *Np*TIM y *Go*TIM, se observan en las figuras 48-49. El ΔT_m entre las dos velocidades de barrido más lejanas (de 30 a 180 K hr⁻¹) para las TIMs cuya desnaturalización térmica fue irreversible es:

- *Np*TIM: 4.7 K.
- *Go*TIM: 2.6 K.

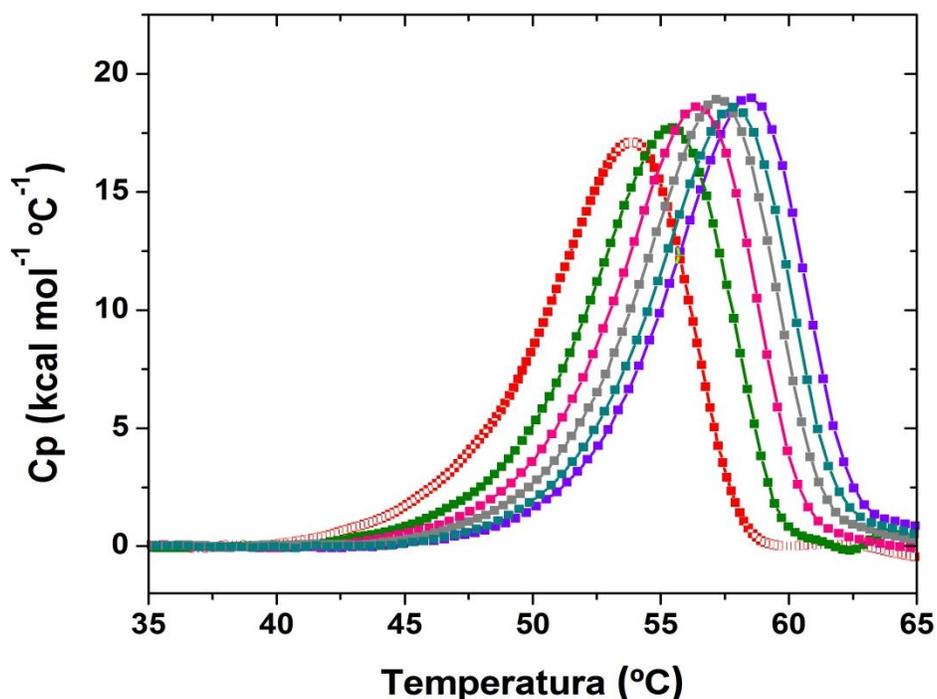


Figura 48. Trazas calorimétricas de *Np*TIM a 6 distintas velocidades de barrido; 30 (--- ■ ---), 60 (--- ■ ---), 90 (--- ■ ---), 120 (--- ■ ---), 150 (--- ■ ---) y 180 K hr⁻¹ (--- ■ ---); (amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

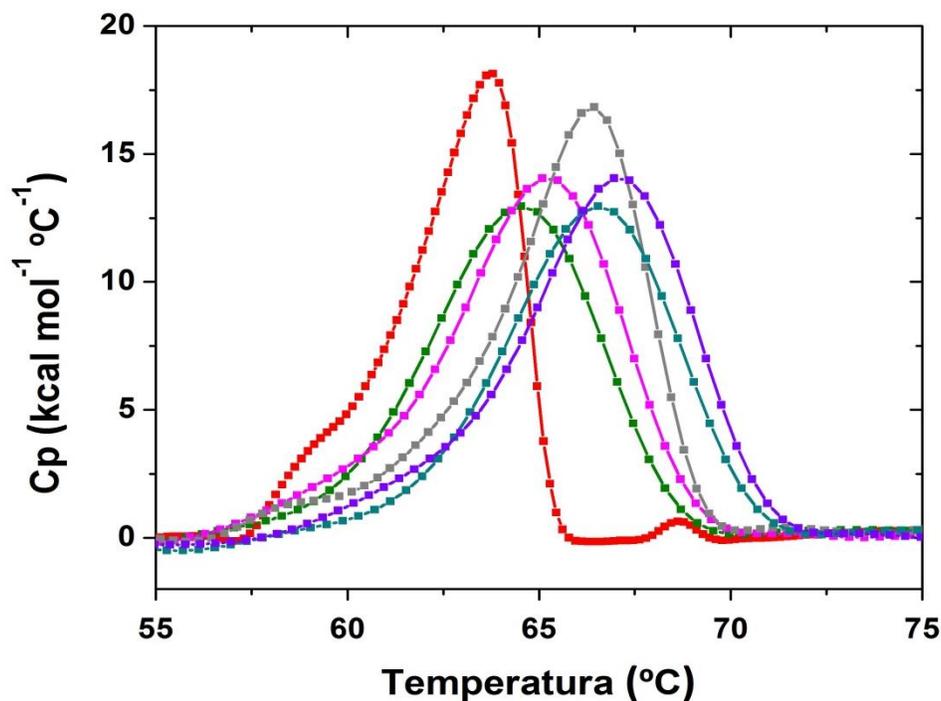


Figura 49. Trazas calorimétricas de GoTIM a 6 distintas velocidades de barrido; 30 (--- ■ ---), 60 (--- ■ ---), 90 (--- ■ ---), 120 (--- ■ ---), 150 (--- ■ ---) y 180 K hr⁻¹ (--- ■ ---); (amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

El ajuste de las trazas a un modelo de dos estados irreversible fue adecuado (un ejemplo para cada proteína a una misma velocidad de barrido y concentración de proteína se muestran en las figuras 50-51) y tras realizarlo para todas las velocidades de barrido ensayadas, se obtuvieron los valores de E_A , ΔH y T_m , los cuales se presentan en la tabla 16 (promedio de los datos).

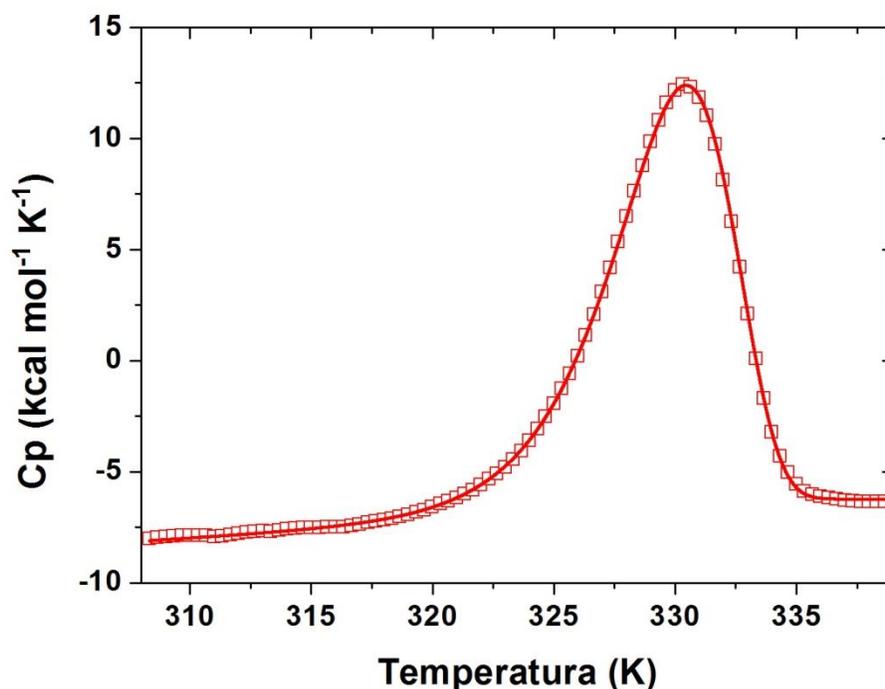


Figura 50. Ajuste de una traza calorimétrica de *NpTIM* al modelo de dos estados irreversible (Lumry–Eyring). Los símbolos abiertos indican los datos experimentales y la línea continua señala el ajuste realizado sobre los datos; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

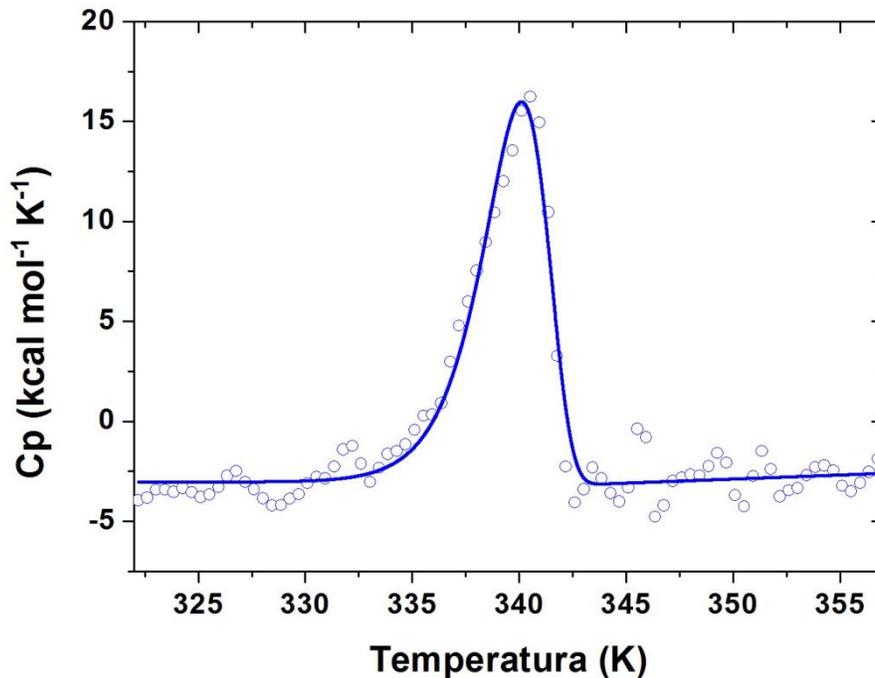


Figura 51. Ajuste de una traza calorimétrica de *GoTIM* al modelo de dos estados irreversible (Lumry–Eyring). Los símbolos abiertos indican los datos experimentales y la línea continua señala el ajuste realizado sobre los datos; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

Tabla 16. Parámetros obtenidos del ajuste de las trazas a un modelo de dos estados irreversible (Lumry–Eyring) para *NpTIM* y *GoTIM*.

| TIM | T _m (° C) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | Energía de activación (kcal mol ⁻¹) |
|--------------|----------------------|------------------------------|---|
| <i>NpTIM</i> | 56.5 ± 1.5 | 116.5 ± 3.4 | 87.9 ± 11 |
| <i>GoTIM</i> | 66.4 ± 0.8 | 65.9 ± 7.3 | 171.3 ± 15.1 |

Después, con el fin de caracterizar lo más posible estas TIMs bacterianas irreversibles, se prosiguió a calcular la E_A del estado nativo al estado desnaturalizado. Como se mencionó previamente, la energía de activación se calculó por cuatro métodos distintos. El gráfico $\ln(v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$ (valores procedentes de los ajustes de las curvas a un modelo de dos estados irreversible) y $\ln k$ vs. $1/T$ (gráfico de Arrhenius) para ambas TIMs se muestran en las figuras 52-53, respectivamente. La comparación de los valores de E_A mediante los 4 métodos para ambas proteínas se muestra en la tabla 17.

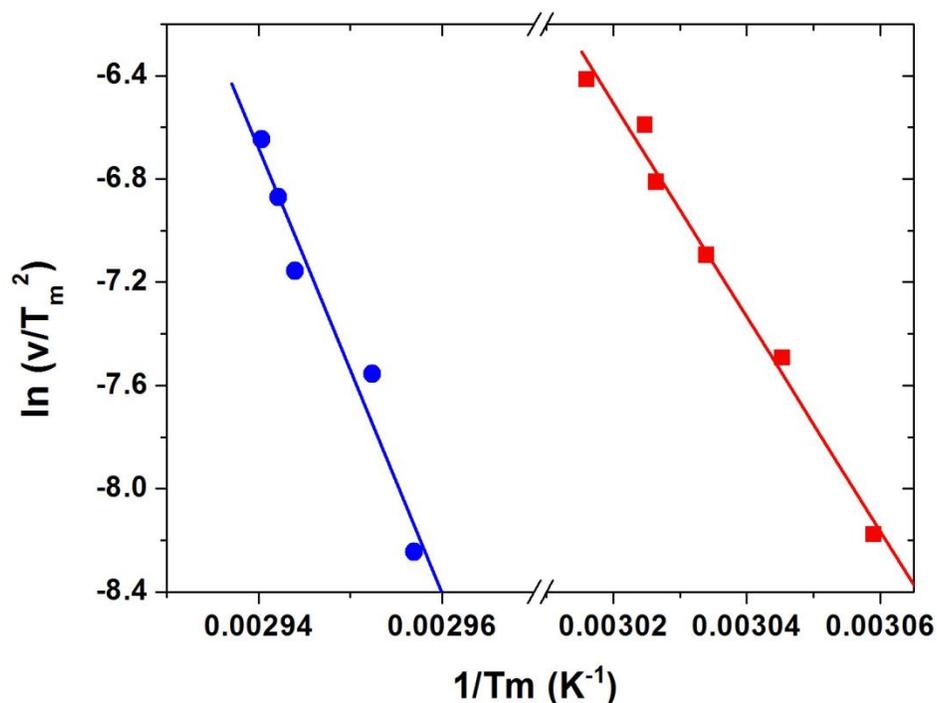


Figura 52. Efecto de la velocidad de barrido sobre la temperatura máxima de transición. Se muestra el gráfico $\ln(v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$ para obtener el valor de la energía de activación; *NpTIM* (■), *GoTIM* (●).

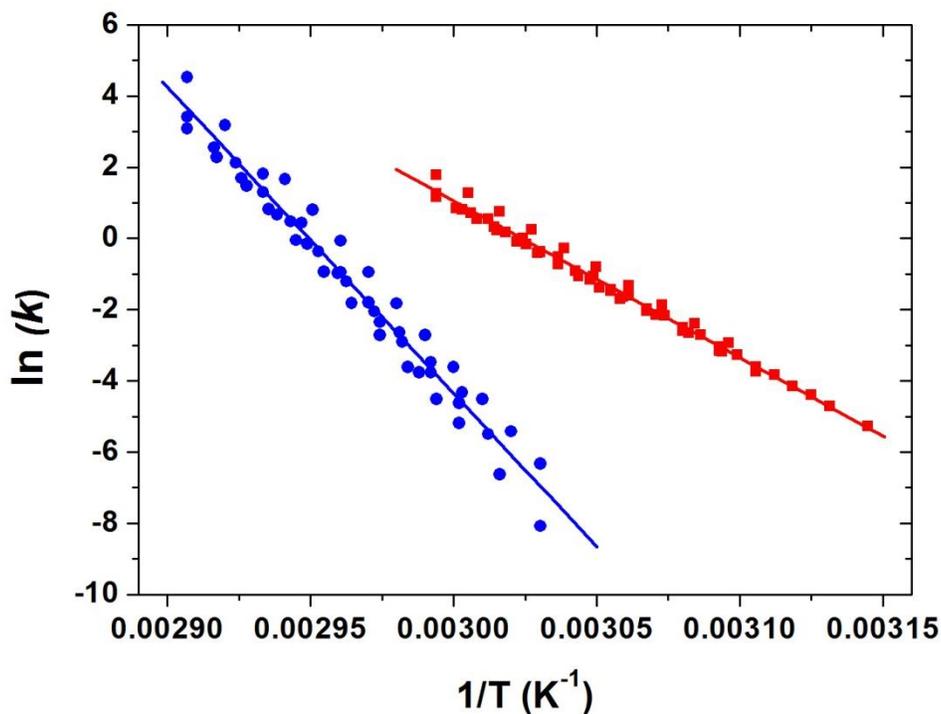


Figura 53. Gráfico de Arrhenius para el desplegamiento térmico irreversible de *NpTIM* (--- ■ ---) y *GoTIM* (- • -).

Tabla 17. Energía de activación (kcal mol^{-1}) para *NpTIM* y *GoTIM* en comparación con otras TIMs reportadas.

| Método | <i>NpTIM</i> | <i>GoTIM</i> | <i>LmTIM</i> [†] | <i>TbTIM</i> [†] | <i>TcTIM</i> [†] |
|--|-----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Promedio del ajuste a un modelo de dos estados irreversible de las trazas a distintas velocidades de barrido | 87.9 ± 11.0 | 171.3 ± 15.1 | 74.7 ± 1.1 | 95.1 ± 1.3 | 193.6 ± 1.5 |
| Variación de la T_m con respecto a la velocidad de barrido (gráfico $\ln v/T_m^2$ vs. $1/T_m$) | 82.2 ± 4.7 | 170.6 ± 21.4 | 82.9 ± 9.3 | 100.4 ± 13.2 | 170.9 ± 32.8 |
| Ancho de la traza en la parte media de la transición | 82.9 ± 1.5 | 167.8 ± 17.9 | NR | NR | NR |
| Gráfico de Arrhenius (gráfico $\ln k$ vs. $1/T$) | 87.5 ± 1.2 | 171.2 ± 4.6 | 75.4 ± 0.8 | 95.2 ± 1.0 | 189.7 ± 4.2 |

†: Datos reportados por Costas *et al.*, 2009. NR: No reportado.

La caracterización de estas dos TIMs cuyo desplegamiento térmico es irreversible, concluyó analizando el grado fraccional de exposición de la proteína al solvente en el E_T (m^\ddagger/m_{eq}). Para esto se realizaron experimentos de DSC con concentraciones variantes de urea. Se construyeron los gráficos de T_m vs. [Urea] y $\ln E_A/T_m^2$ vs. [Urea] (figuras 54-55) y con las relaciones antes descritas, se calculó el valor para la m^\ddagger y m_{eq} mostradas en la tabla 18.

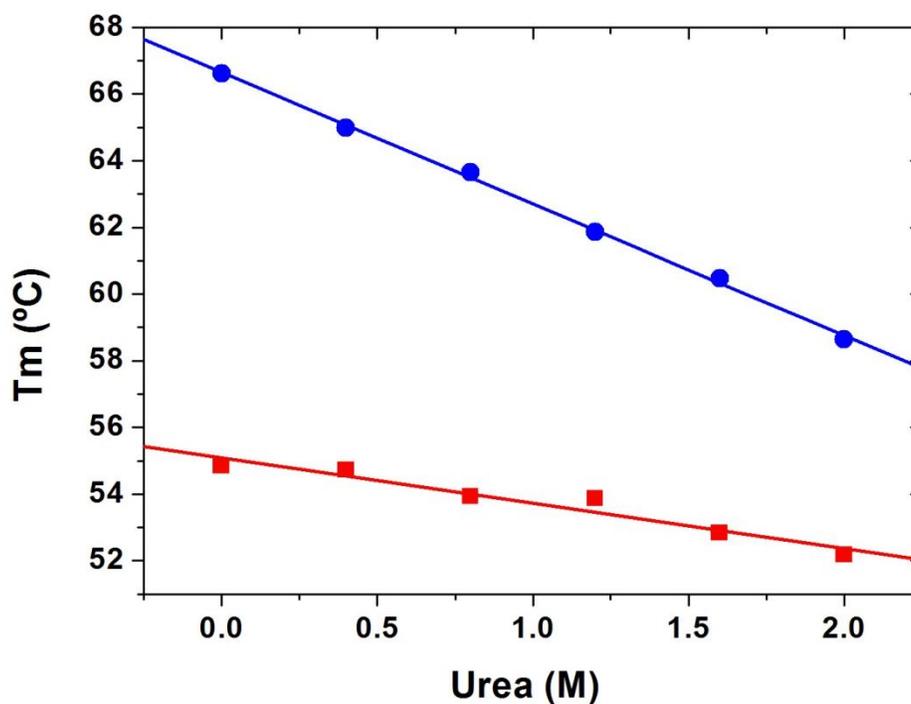


Figura 54. Efecto de la concentración de urea sobre la temperatura máxima de transición (T_m); NpTIM (--- ■ ---), GoTIM (--- ● ---).

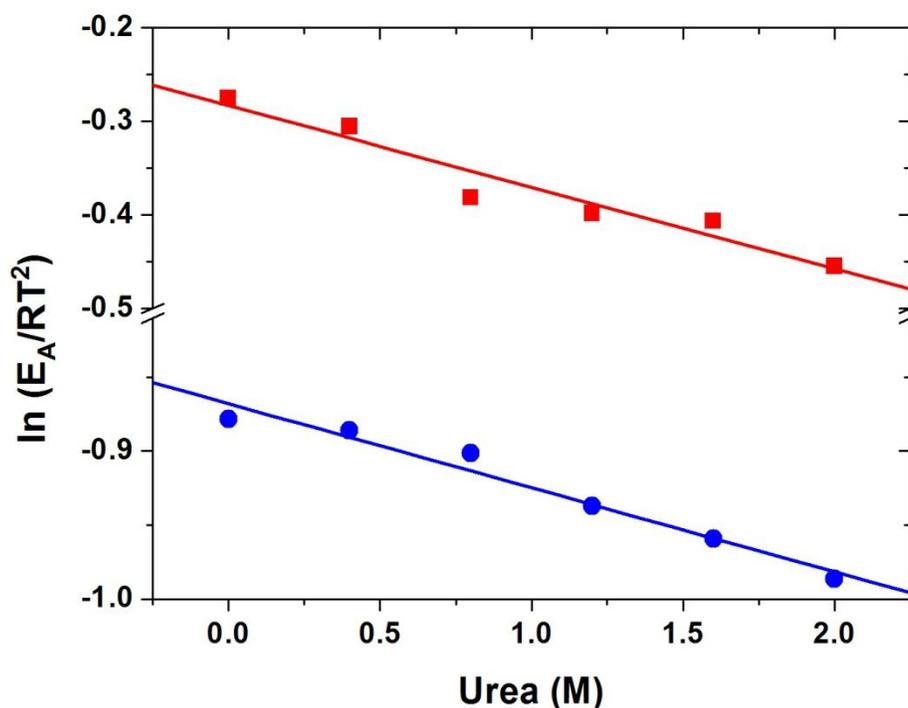


Figura 55. Efecto de la concentración de urea sobre el $\ln E_A/T_m^2$; NpTIM (--- ■ ---), GoTIM (--- ● ---).

Tabla 18. Valores de la m^\ddagger y m_{eq} para NpTIM y GoTIM en comparación con otras TIMs reportadas.

| TIM | NpTIM | GoTIM | LmTIM [†] | TbTIM [†] | TcTIM [†] |
|---|-------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|
| m^\ddagger (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | 0.40 | 1.94 | 0.35 | 0.41 | 1.99 |
| m_{eq} (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹) | 7.25 | 7.25 | 7.37 | 7.26 | 7.34 |
| m^\ddagger / m_{eq} | 0.055 | 0.268 | 0.048 | 0.056 | 0.271 |
| Número de residuos desplegados en el estado de transición | 30 | 138 | 24 | 28 | 136 |

Se muestra el valor de la m cinética (m^\ddagger) y m del desplegamiento al equilibrio (m_{eq}) calculados mediante el proceso descrito previamente. También se indica el grado fraccional de exposición al solvente en el E_T (grado fraccional de desplegamiento) como el cociente m^\ddagger/m_{eq} y el número de residuos desplegados en dicho estado. El valor de la m_{eq} para NpTIM y GoTIM se calculó con el promedio de los valores determinados para otras TIMs. El número de residuos desplegados en el E_T se obtuvo con la relación: $N_{res}^*(m^\ddagger/m_{eq})$, N_{res} es el número de residuos de la proteína. †: Datos reportados por Costas *et al.*, 2009.

TIMs bacterianas con desplegamiento térmico reversible

Dentro de este bloque se encuentran: *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sco*TIM. Los experimentos de desplegamiento térmico seguido por DC en ambas direcciones y siguiendo 3 longitudes de onda se muestran en las figuras 56-61 (datos crudos y datos normalizados a fracciones de proteína nativa, respectivamente). Los espectros de dicroísmo circular antes y después de la desnaturalización se muestran en la figura 62-64. Con efecto de ahorrar espacio y comparar con otros resultados reportados de la TIM, las curvas sólo se muestran a la velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} (el mismo comportamiento se observó a 30 y 180 K hr^{-1} , datos no mostrados).

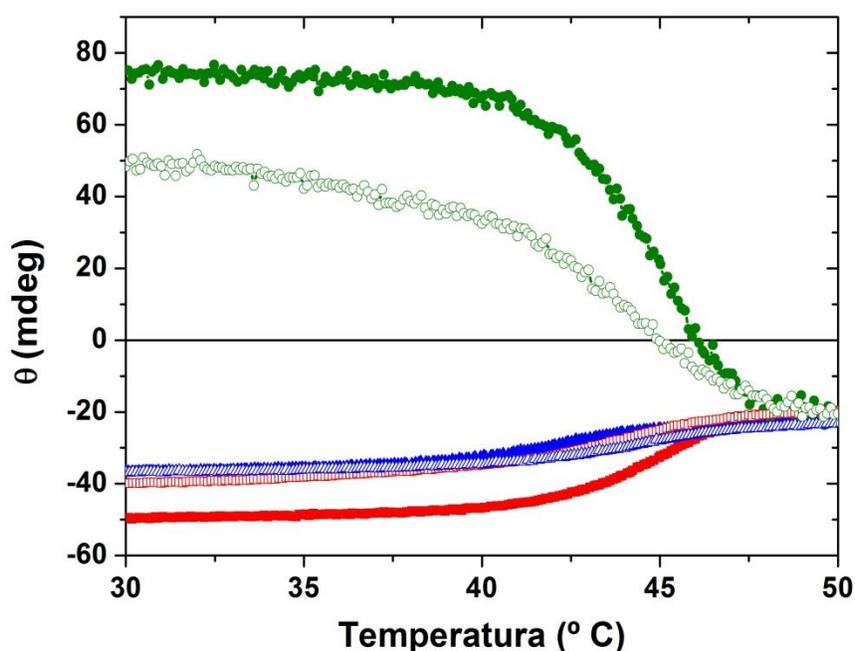


Figura 56. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *Dr*TIM seguidas por DC (datos crudos). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

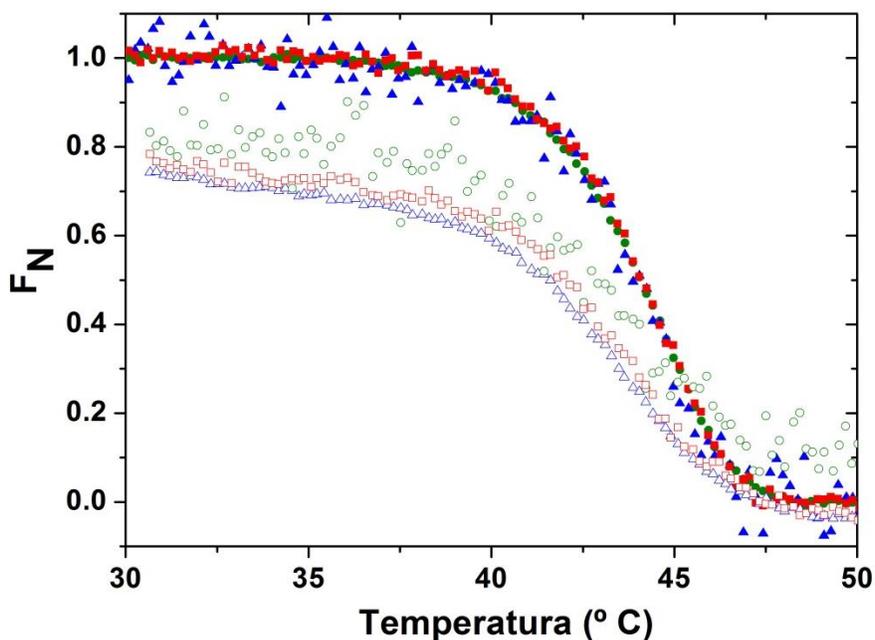


Figura 57. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *DrTIM* seguidas por DC (datos normalizados en fracción de proteína nativa). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

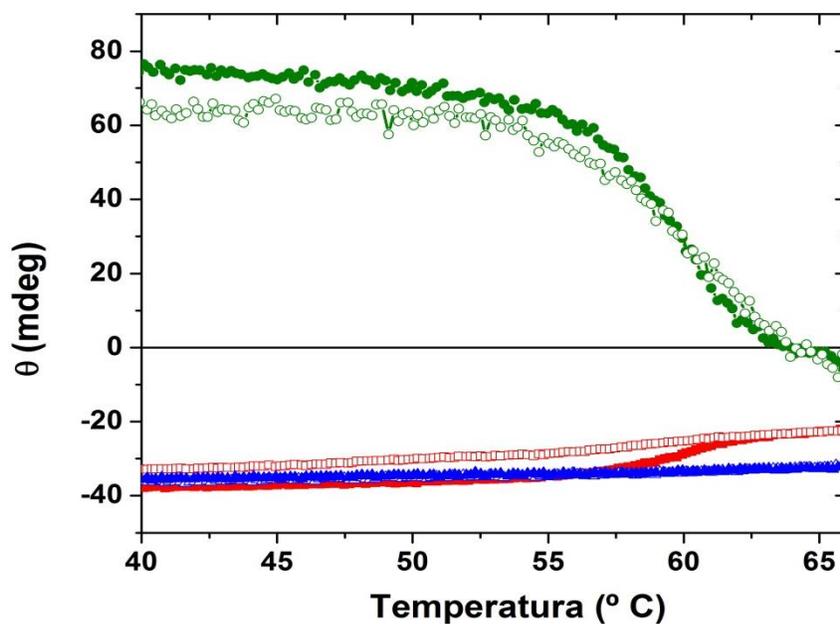


Figura 58. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *CpTIM* seguidas por DC (datos crudos). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

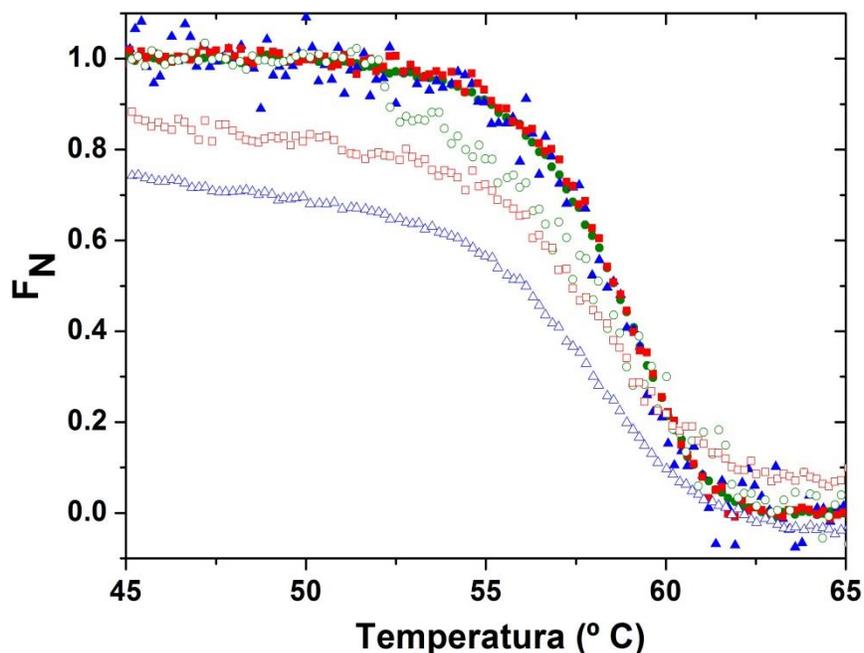


Figura 59. Curvas de desnaturalización/renaturalización para CpTIM seguidas por DC (datos normalizados en fracción de proteína nativa). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

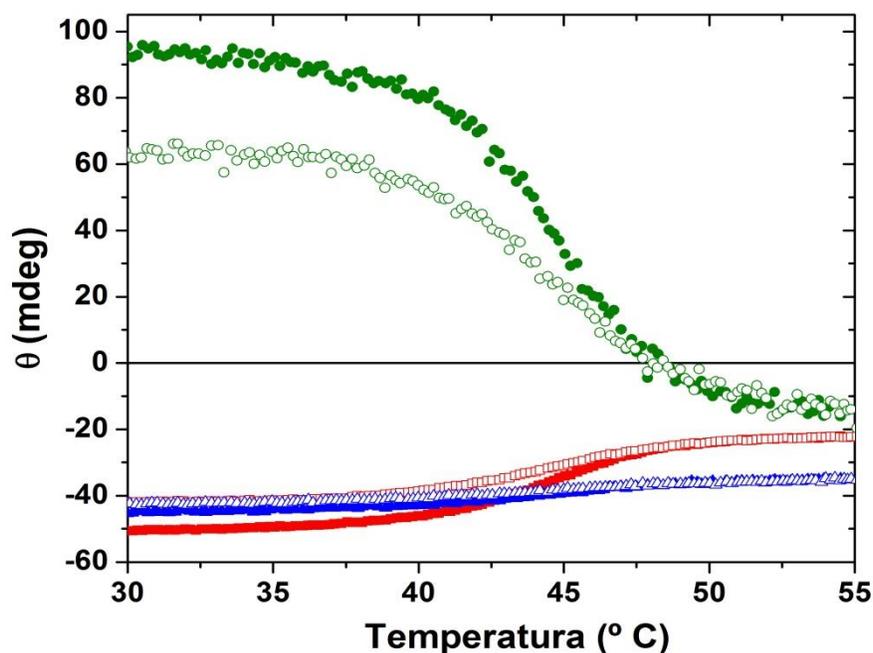


Figura 60. Curvas de desnaturalización/renaturalización para ScoTIM seguidas por DC (datos crudos). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

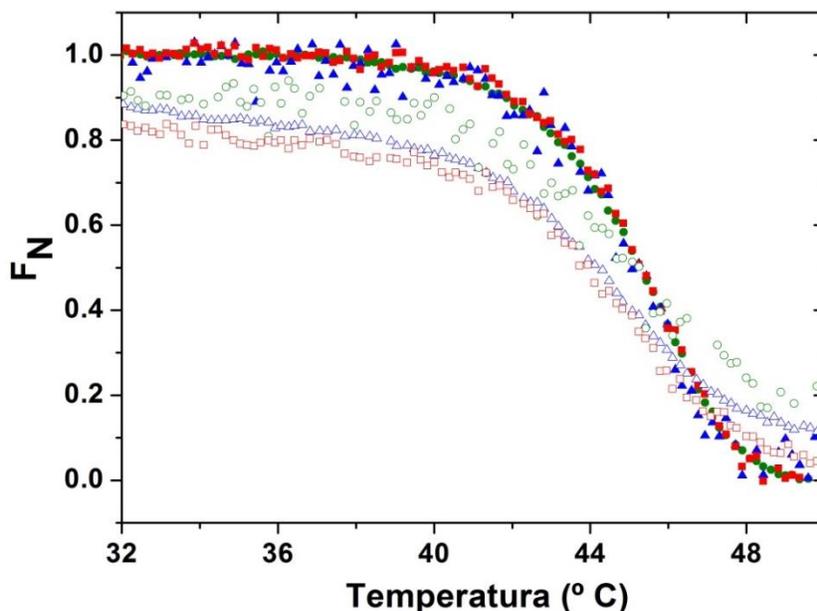


Figura 61. Curvas de desnaturalización/renaturalización para *ScoTIM* seguidas por DC (datos normalizados en fracción de proteína nativa). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K hr^{-1} ; 195 nm (--- ● ---), 208 nm (--- ▲ ---), 222 nm (--- ■ ---). Los símbolos llenos representan el proceso de nativo \rightarrow desnaturalizado y los símbolos vacíos indican el proceso inverso; (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

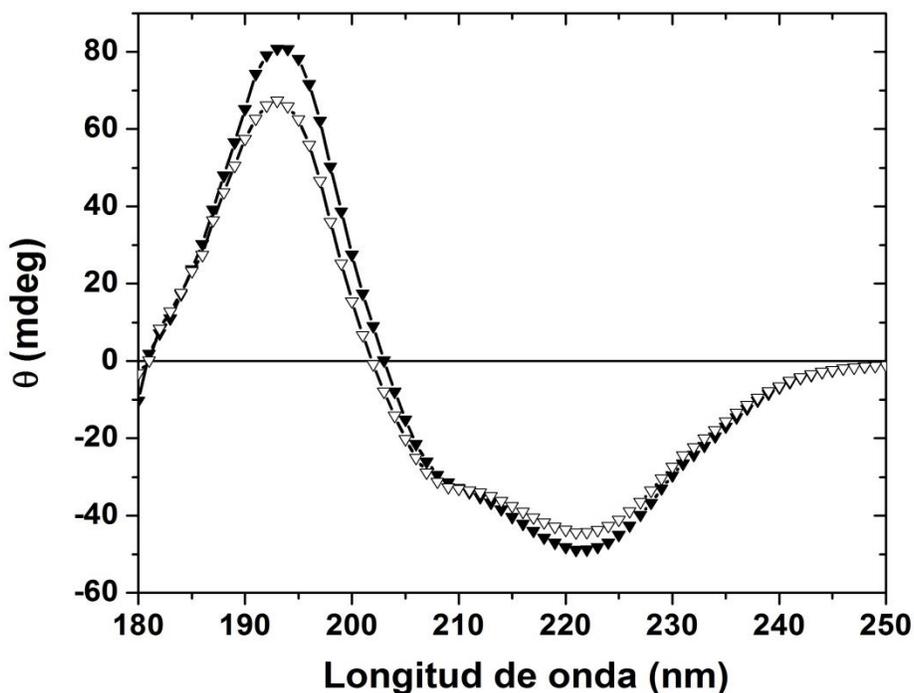


Figura 62. Espectros de DC para *DrTIM* antes de la desnaturalización térmica (--- ▼ ---) y después de permitir la renaturalización (--- ▽ ---). Nótese la recuperación de la señal tras haber enfriado la proteína, lo que indica que el proceso de desplegamiento térmico es reversible; (temperatura: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

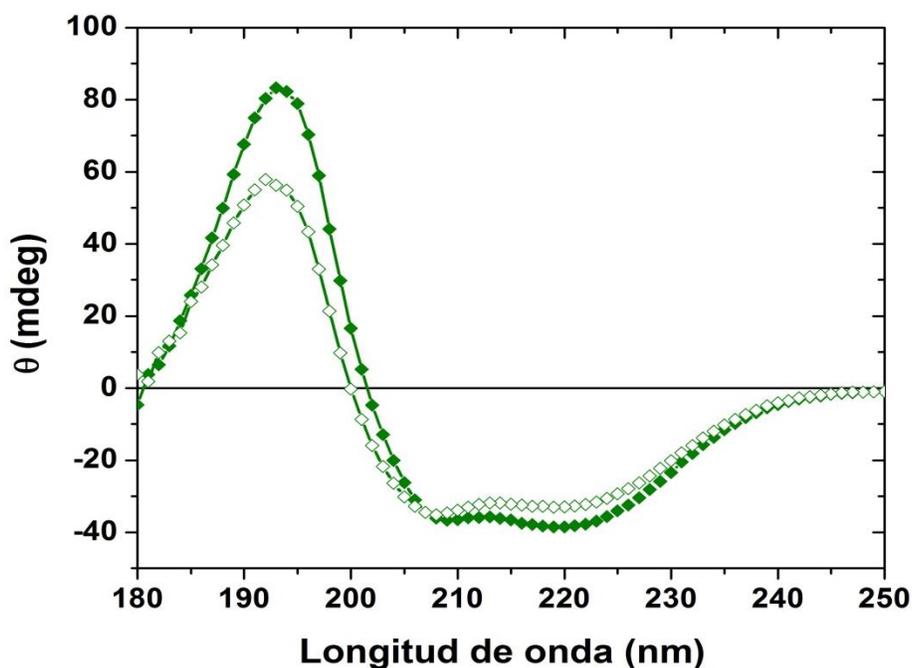


Figura 63. Espectros de DC para CpTIM antes de la desnaturalización térmica (-- ♦ --) y después de permitir la renaturalización (-- ◇ --). Nótese la recuperación de la señal tras haber enfriado la proteína, lo que indica que el proceso de desplegamiento térmico es reversible; (temperatura: 25 °C; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

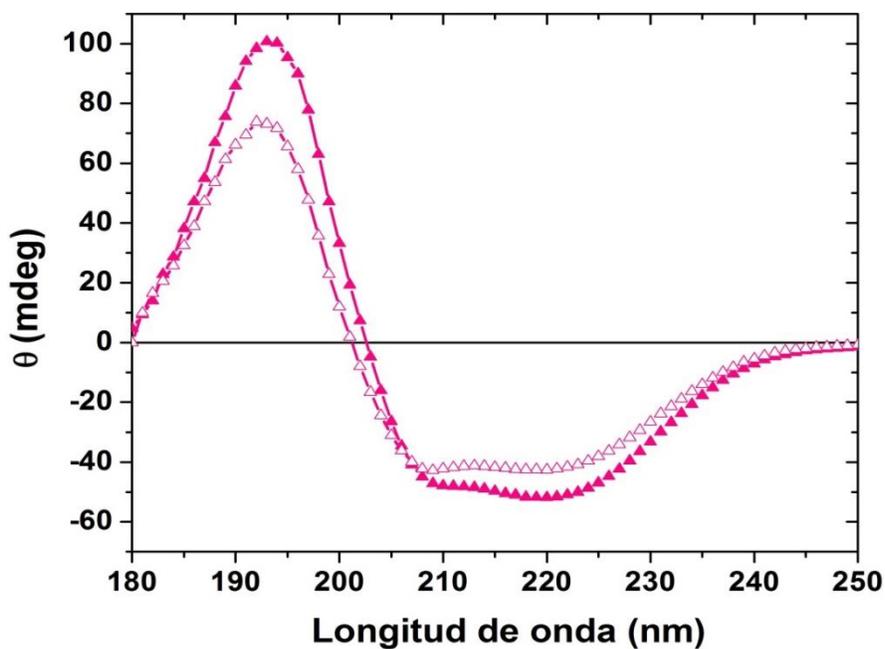


Figura 64. Espectros de DC para ScoTIM antes de la desnaturalización térmica (-- ▲ --) y después de permitir la renaturalización (-- △ --). Nótese la recuperación de la señal tras haber enfriado la proteína, lo que indica que el proceso de desplegamiento térmico es reversible; (temperatura: 25 °C; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

Con los datos de dicroísmo circular para cada proteína, se hicieron los regráficos de $\ln(K_{eq})$ vs. $1/T$ (figura 65) para obtener el valor de la entalpía de Van't Hoff que se muestra en la tabla 19.

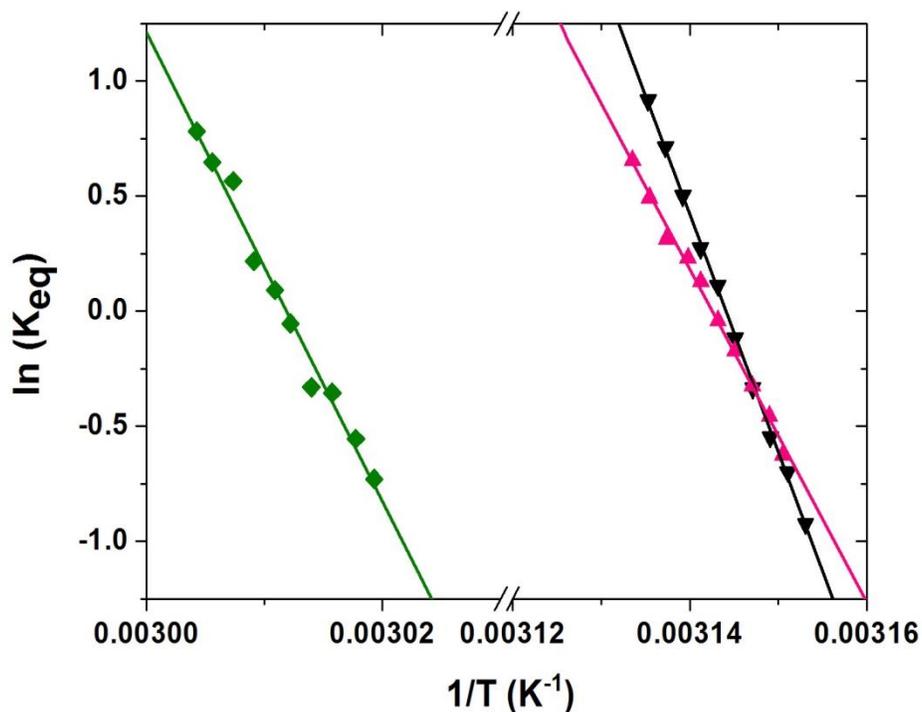


Figura 65. Gráfico de Van't Hoff de los datos experimentales de DC para *Dr*TIM (-- ▼ --), *Cp*TIM (-- ◆ --) y *Sco*TIM (-- ▲ --).

Tabla 19. Entalpía de Van't Hoff a partir de experimentos de DC al equilibrio para las TIMs bacterianas con desplegamiento térmico reversible.

| TIM | ΔH_{VH} (kcal mol ⁻¹) |
|----------------|---|
| <i>Dr</i> TIM | 205 ± 3 |
| <i>Cp</i> TIM | 222 ± 9 |
| <i>Sco</i> TIM | 183 ± 4 |

El proceso de desnaturalización térmica también se siguió por DSC. Como primer punto, se analizó la reversibilidad del proceso. Al igual que en DC, el proceso fue reversible para *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sc*oTIM. Las trazas para las tres proteínas se muestran en las figuras 66-68 donde se puede ver la reversibilidad del proceso.

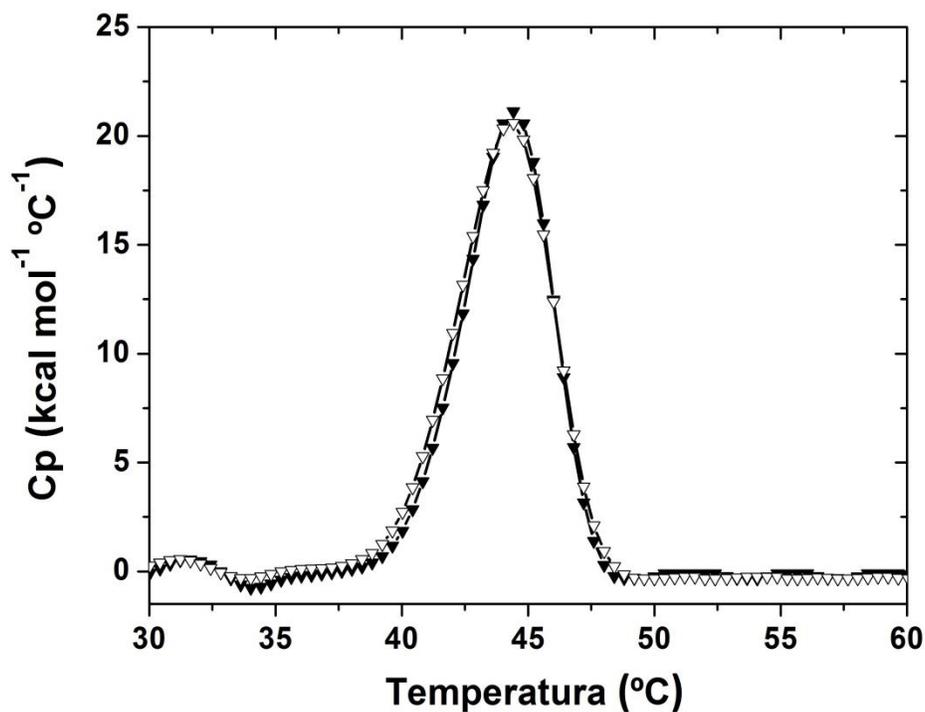


Figura 66. Análisis de la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica para *Dr*TIM (-- ▼ --). Los símbolos llenos muestran el primer scan y los símbolos vacíos indican el segundo scan realizado una vez que se enfrió la proteína; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

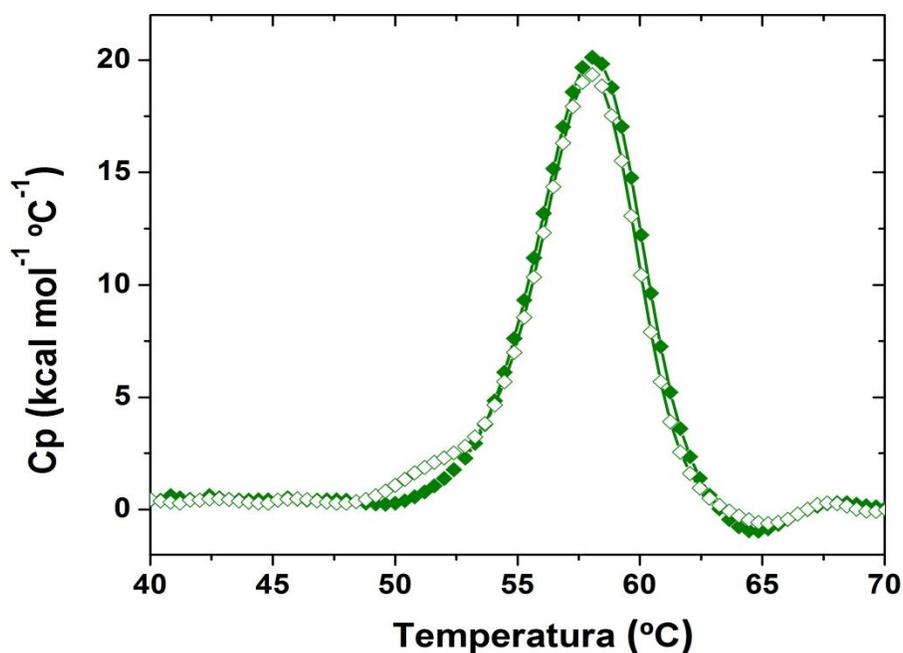


Figura 67. Análisis de la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica para *CpTIM* (—◆—). Los símbolos llenos muestran el primer scan y los símbolos vacíos indican el segundo scan realizado una vez que se enfrió la proteína; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

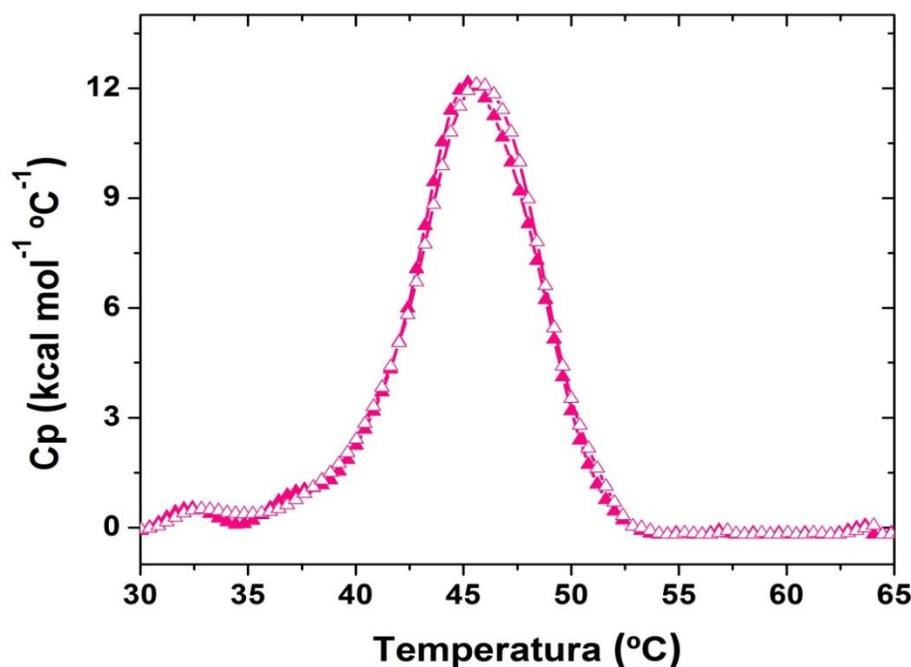


Figura 68. Análisis de la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica para *ScoTIM* (—▲—). Los símbolos llenos muestran el primer scan y los símbolos vacíos indican el segundo scan realizado una vez que se enfrió la proteína; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

Posteriormente, se analizó la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido. El corrimiento de las trazas de acuerdo a la velocidad de barrido para *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sc*oTIM, se observan en la figura 69-71. El ΔT_m entre las dos velocidades de barrido más lejanas (de 30 a 180 K hr⁻¹) para las TIMs cuya desnaturalización térmica fue reversible es:

- *Np*TIM: 1.8 K.
- *Go*TIM: 1.7 K.
- *Sc*oTIM: 1.5 K.

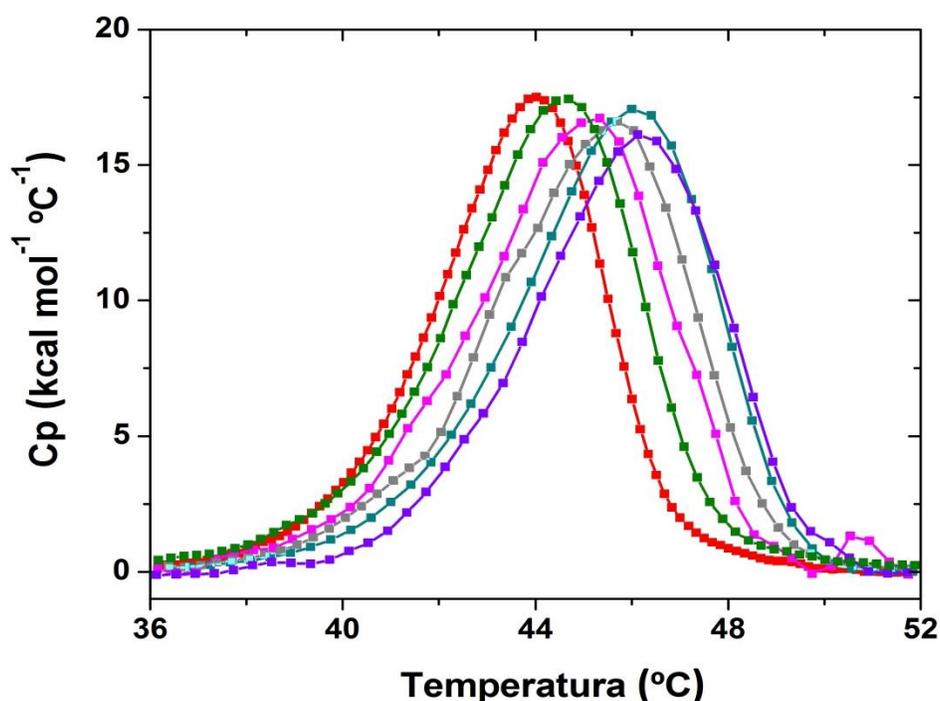


Figura 69. Trazas calorimétricas de *Dr*TIM a 6 distintas velocidades de barrido; 30 (--- ■ ---), 60 (--- ■ ---), 90 (--- ■ ---), 120 (--- ■ ---), 150 (--- ■ ---) y 180 K hr⁻¹ (--- ■ ---); (amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

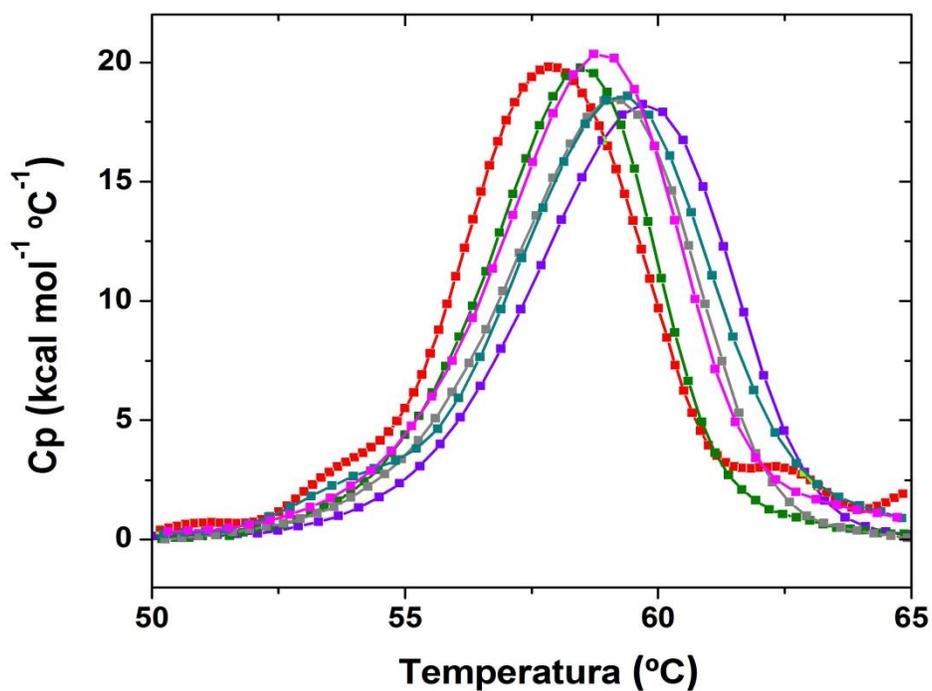


Figura 70. Trazas calorimétricas de *CpTIM* a 6 distintas velocidades de barrido; 30 (--- ■ ---), 60 (--- ■ ---), 90 (--- ■ ---), 120 (--- ■ ---), 150 (--- ■ ---) y 180 K hr^{-1} (--- ■ ---); (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

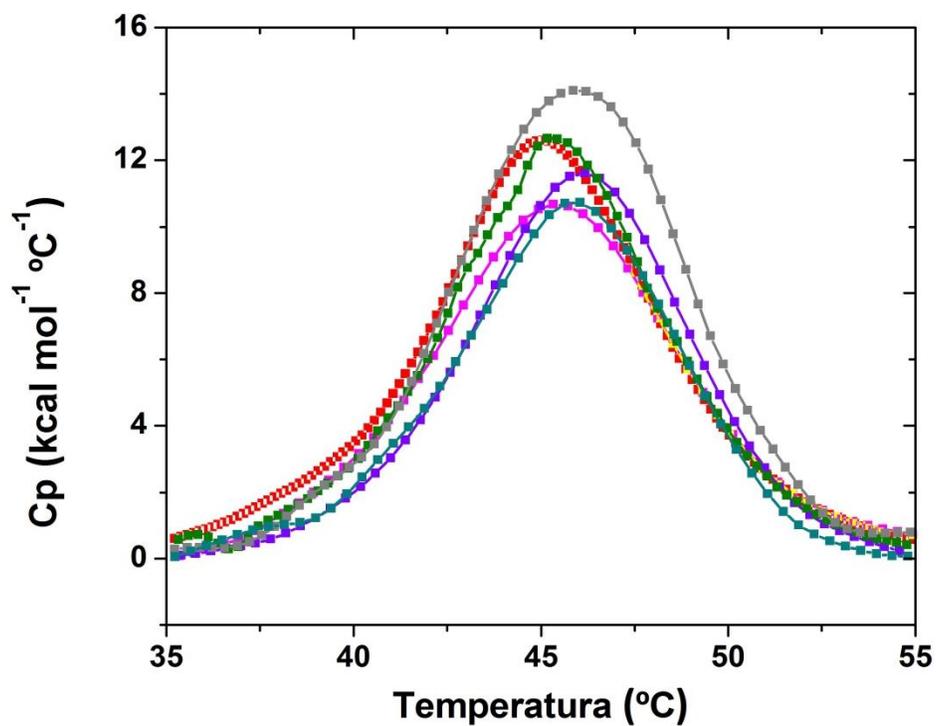


Figura 71. Trazas calorimétricas de *ScoTIM* a 6 distintas velocidades de barrido; 30 (--- ■ ---), 60 (--- ■ ---), 90 (--- ■ ---), 120 (--- ■ ---), 150 (--- ■ ---) y 180 K hr^{-1} (--- ■ ---); (amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

El ajuste de las trazas a un modelo de dos estados con disociación ($N_2 \rightleftharpoons 2D$) fue adecuado (un ejemplo para cada proteína a una misma velocidad de barrido y concentración se muestran en las figuras 72-74). También se realizó el ajuste a un modelo de dos estados simple ($N \rightleftharpoons D$) pero el ajuste no fue bueno y por tanto no se consideró este modelo (datos no mostrados). Con el ajuste a todas las velocidades de barrido y concentraciones de proteína ensayadas, se obtuvieron los valores de ΔC_p , ΔH y T_m , los cuales se presentan en la tabla 20 (promedio de los datos en mol de dímero de enzima).

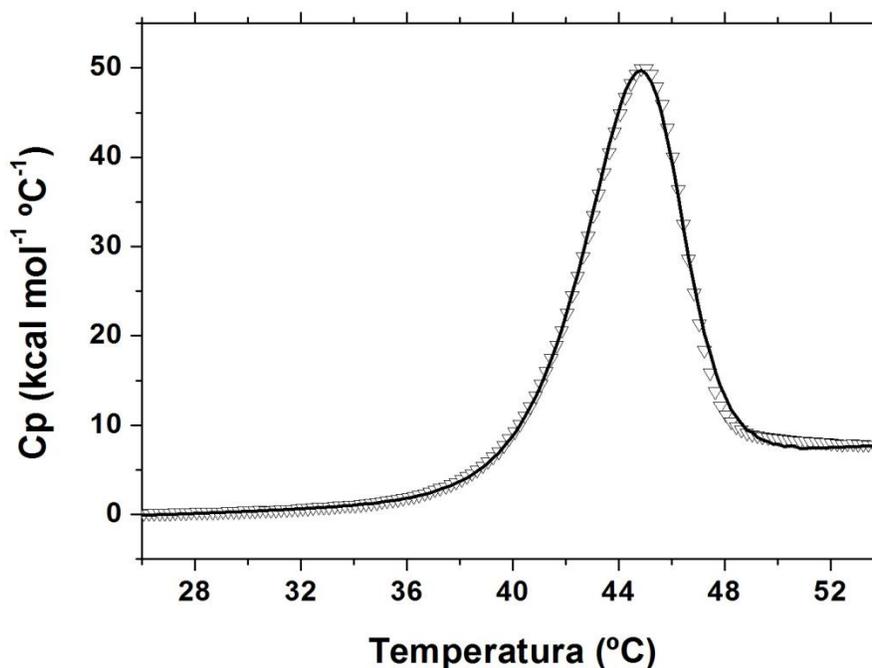


Figura 72. Ajuste de una traza calorimétrica de *DriTIM* al modelo de dos estados con disociación. Los símbolos abiertos indican los datos experimentales y la línea continua señala el ajuste realizado sobre los datos; (velocidad de barrido: 90 K hr⁻¹; amortiguador: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

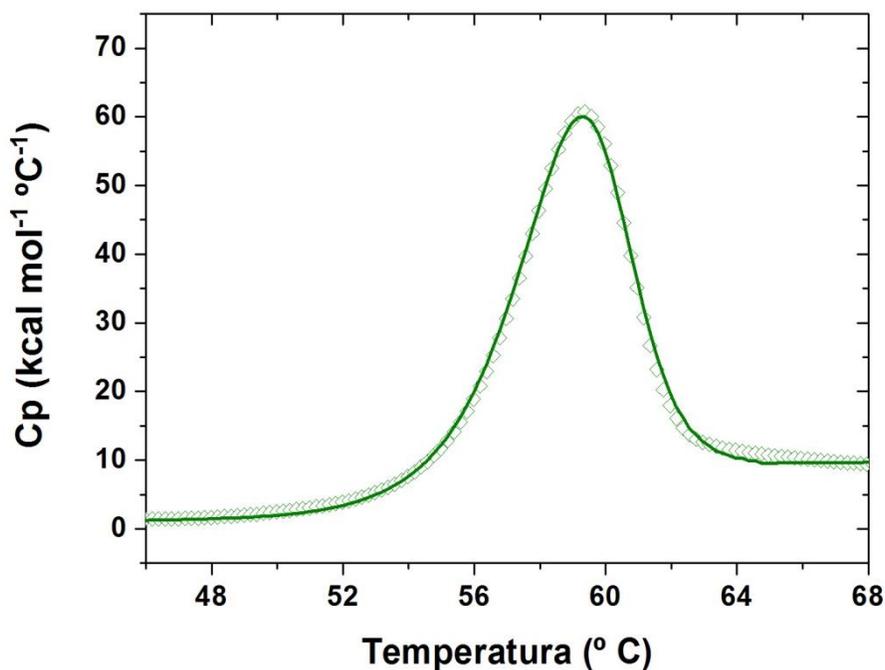


Figura 73. Ajuste de una traza calorimétrica de Cp_{TIM} al modelo de dos estados con disociación. Los símbolos abiertos indican los datos experimentales y la línea continua señala el ajuste realizado sobre los datos; (velocidad de barrido: 90 K hr^{-1} ; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

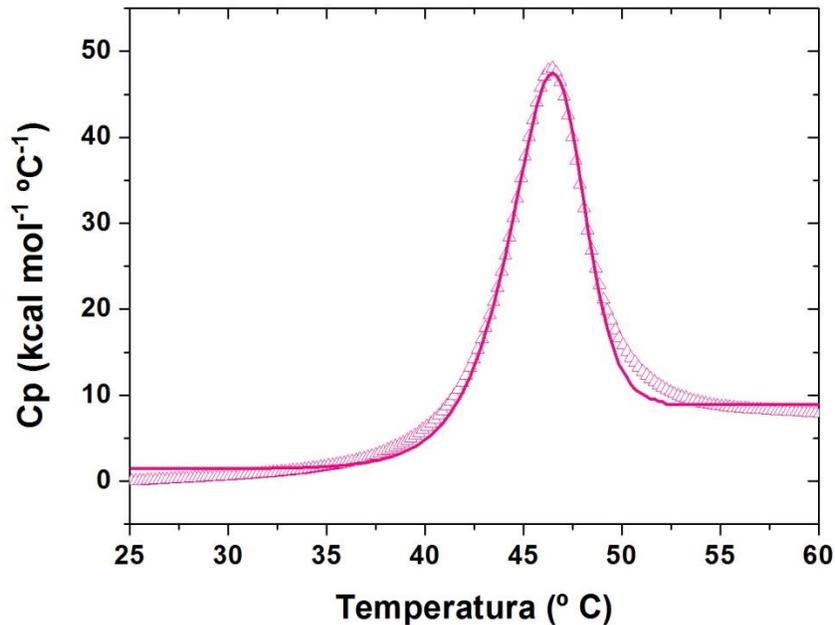


Figura 74. Ajuste de una traza calorimétrica de Sco_{TIM} al modelo de dos estados con disociación. Los símbolos abiertos indican los datos experimentales y la línea continua señala el ajuste realizado sobre los datos; (velocidad de barrido: 90 K hr^{-1} ; amortiguador: NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

Tabla 20. Parámetros obtenidos del ajuste de las trazas a un modelo de dos estados con disociación para *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*. Datos por mol de dímero de enzima.

| TIM | T_m (°C) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|---------------|------------|--------------------------------------|--|
| <i>DrTIM</i> | 45.2 ± 0.9 | 222 ± 7 | 6.2 ± 0.3 |
| <i>CpTIM</i> | 58.9 ± 0.7 | 254 ± 8 | 6.8 ± 0.4 |
| <i>ScoTIM</i> | 45.7 ± 0.6 | 200 ± 11 | 6.6 ± 0.4 |

Con las trazas a diferentes velocidades de barrido, se construyó el gráfico de Takahashi y Sturtevant (1981); (\ln [Proteína] vs. $1/T_m$) para obtener un valor de ΔH calorimétrico al variar la concentración de proteína en las trazas calorimétricas (figura 75). La comparación entre este valor y el obtenido por el ajuste de las trazas a un modelo de 2 estados con disociación y la entalpía de Van't Hoff que proviene de los datos de dicróismo circular, se muestran en la tabla 21 (los valores son indicados a la T_m de cada proteína y por mol de dímero).

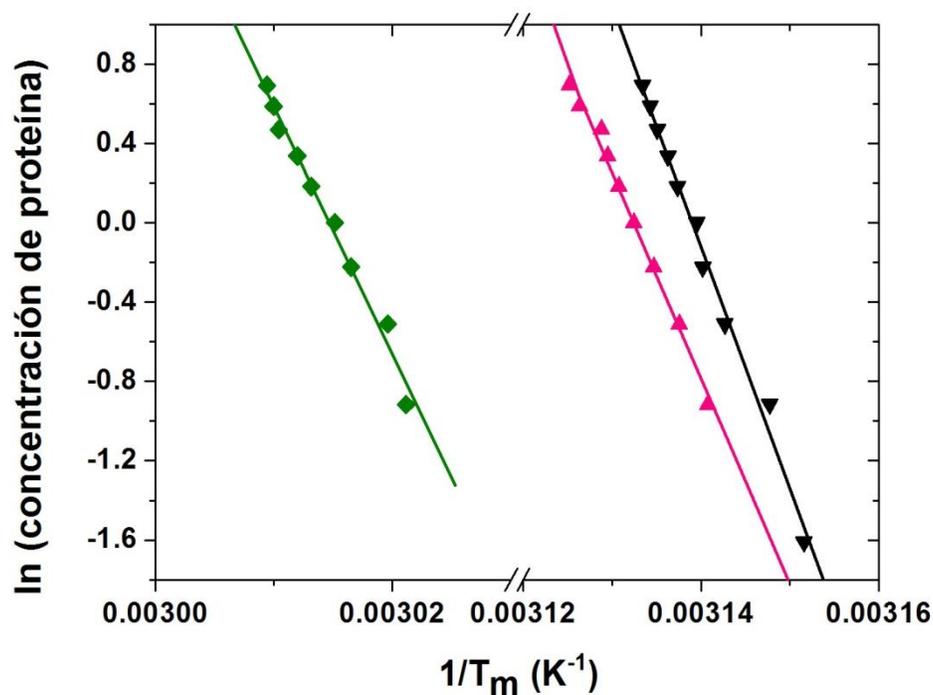


Figura 75. Gráfico de Takahashi- Sturtevant para *DrTIM* (--- ▼ ---), *CpTIM* (--- ◆ ---) y *ScoTIM* (--- ▲ ---).

Para evaluar si el desplegamiento térmico de estas proteínas es de dos estados, se determinó el cociente entre el ΔH calorimétrico (el obtenido por el ajuste de las trazas a un modelo de dos estados con disociación) y el ΔH_{VH} por dicroísmo circular, para obtener el criterio calorimétrico ya que se sabe que para proteínas que siguen un mecanismo de dos estados, $\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH} \approx 1$. La relación para cada proteína se muestra en la tabla 21.

Tabla 21. Comparación del valor para el ΔH (kcal mol^{-1}) calculado mediante diferentes métodos para *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*.

| Método | <i>DrTIM</i> | <i>CpTIM</i> | <i>ScoTIM</i> |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ΔH_{cal} por DSC (ajuste al modelo de dos estados con disociación) | 222 ± 7 | 254 ± 8 | 200 ± 11 |
| ΔH_{cal} por DSC (gráfico de takahashi-Sturtevant) | 242 ± 8 | 248 ± 11 | 206 ± 7 |
| ΔH_{VH} por DC | 205 ± 3 | 222 ± 9 | 183 ± 4 |
| Criterio calorimétrico ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$) | 1.08 ± 0.02 | 1.14 ± 0.18 | 1.09 ± 0.10 |

El valor de los parámetros es a la T_m de cada proteína y por mol de dímero de enzima. Se indica el criterio calorimétrico para estas enzimas al dividir el $\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$ (el ΔH_{cal} considerado fue el del ajuste al modelo de 2 estados con disociación).

Posteriormente se calculó el valor del ΔC_p por las 5 metodologías explicadas en la sección de materiales y métodos. La comparación de los 5 valores obtenidos se muestra en la tabla 22 (el valor indicado es a la T_m de cada proteína estudiada y por mol de dímero de enzima).

Tabla 22. Comparación del valor para el ΔC_p ($\text{kcal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) calculado mediante diferentes métodos para *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*. El valor del parámetro es en la T_m de cada proteína y por mol de dímero de enzima.

| Método | <i>DrTIM</i> | <i>CpTIM</i> | <i>ScoTIM</i> |
|--|---------------|---------------|---------------|
| Programa Microcal-Origin | 6.6 ± 0.2 | 6.7 ± 0.9 | 6.2 ± 0.4 |
| Utilizando el método de Guzman-Casado <i>et al.</i> , 2003 | 6.6 ± 0.2 | 6.8 ± 0.8 | 6.2 ± 0.8 |
| Promedio del ajuste al modelo de 2 estados con disociación | 6.5 ± 0.2 | 6.8 ± 0.4 | 6.6 ± 0.4 |
| Paramétrico (Robertson y Murphy, 1997) | 6.9 ± 0.1 | 7.0 ± 0.2 | 7.2 ± 0.2 |
| Paramétrico (Milardi <i>et al.</i> , 1997) | 7.8 ± 2.1 | 8.5 ± 1.9 | 8.6 ± 2.4 |

Curva de estabilidad de las TIMs bacterianas

Por último, se construyeron las curvas de estabilidad para las tres TIMs cuyo proceso de desnaturalización térmica fue reversible. Los valores de ΔH , ΔC_p y T_m utilizados para construir la curva fueron el promedio de los datos experimentales determinados por DSC (valor indicado a la T_m de cada proteína y por mol de dímero de enzima) (tabla 23). Para observar todas las curvas de estabilidad para cada proteína, construidas con los diferentes valores de ΔC_p obtenidos, se puede acceder al apéndice B, en el cual se observa que los métodos distintos utilizados, resultan en curvas muy semejantes.

Tabla 23. Valores de ΔC_p , ΔH y T_m con los que se construyeron las curvas de estabilidad para *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sco*TIM. El valor de los parámetros es en la T_m de cada proteína y por mol de dímero de enzima.

| TIM | T_m (°C) | T_m (K) | ΔH (kcal mol ⁻¹) | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|----------------|------------|-----------|--------------------------------------|--|
| <i>Dr</i> TIM | 44.9 | 318.2 | 232 | 6.5 |
| <i>Cp</i> TIM | 58.9 | 332.1 | 251 | 6.7 |
| <i>Sco</i> TIM | 45.4 | 318.5 | 203 | 6.3 |

En la curva de estabilidad construidas con los datos de DSC, se anexaron en símbolos vacíos, los valores experimentales de ΔG obtenidos de las transiciones de las curvas seguidas por DC y el valor del ΔG_{dis} calculado por experimentos de estabilidad a la dilución (símbolos llenos) (figura 60); los datos de calorimetría y DC coinciden, lo cual confirma que el proceso es de dos estados.

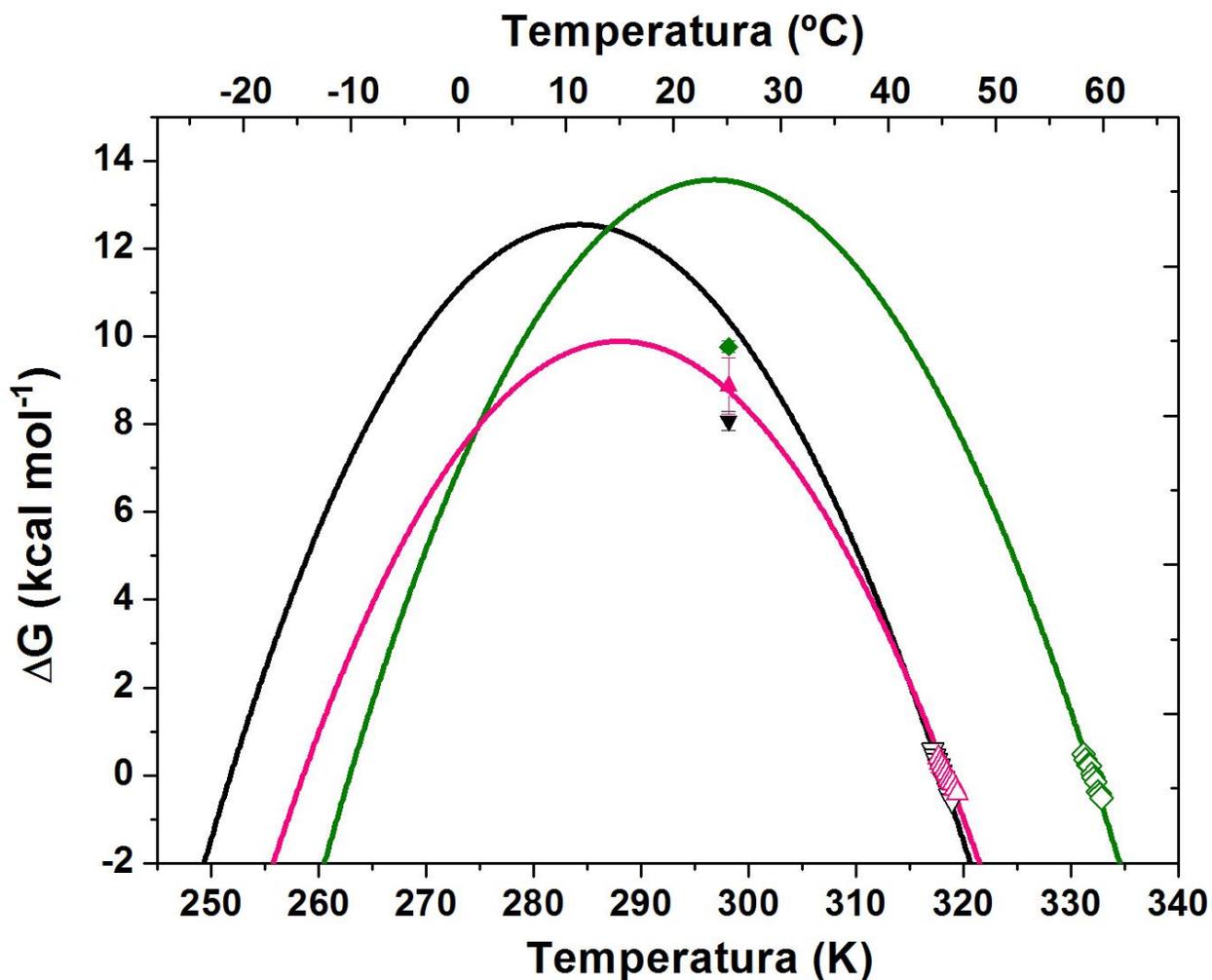


Figura 76. Curvas de estabilidad para las TIMs bacterianas. Las líneas continuas son las curvas de estabilidad construidas con los datos obtenidos por DSC; los símbolos vacíos indican los valores experimentales de ΔG en la transición de las curvas seguidas por DC; los símbolos llenos indican el valor del ΔG de disociación a partir de experimentos de estabilidad a la dilución; *Dr*TIM (-----) (-- ▼ --) (-- Δ --), *Cp*TIM (-----) (-- ◆ --) (-- ◇ --), *Sco*TIM (-----) (-- ▲ --) (-- △ --).

A partir de estas curvas, se obtuvo el valor de la temperatura de estabilidad máxima y el valor de ésta para cada proteína además de su temperatura de desnaturalización en frío, valores que se muestran en la tabla 24:

Tabla 24. Valores de estabilidad a partir de las curvas construidas para *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*.

| Parámetro | <i>DrTIM</i> | <i>CpTIM</i> | <i>ScoTIM</i> |
|--|--------------|--------------|---------------|
| Temperatura de máxima estabilidad (°C) | 11.05 | 23.65 | 14.85 |
| ΔG de máxima estabilidad (kcal mol ⁻¹) | 12.55 | 13.57 | 9.89 |
| ΔG a 25 ° C (kcal mol ⁻¹) | 10.39 | 13.55 | 8.78 |
| Temperatura de desnaturalización en frío (°C) | -21.35 | -10.25 | -14.55 |

Determinación de la estructura tridimensional

Después de probar varios cristales, se encontró un cristal de *CpTIM* que aunque parecía de muy mala calidad a simple vista (figura 77), en las primeras 3 fotografías de prueba (0, 90 y 170 °), se observó que difractaba a una resolución de aproximadamente 1.6 Å. Por lo anterior, se realizó la colecta completa de datos, en un equipo Rigaku RU200 con una estrategia de colecta de 1-169° (338 fotografías en total), una oscilación en Φ de 0.5 ° por frame y un tiempo por fotografía de 9 minutos, dando una duración total de 50.2 horas de colecta. La colecta fue realizada sin el uso de un crioprotector extra, debido a que la solución de cristalización ya contenía una molécula crioprotectora (polietilenglicol 4000). La proteína se cristalizó a una concentración de 3.5 mg mL⁻¹ en una solución de 0.2 M de acetato de amonio, 0.1 M de acetato trihidratado de sodio, pH 4.6 y 30% w/v de polietilenglicol 4000 (figura 77).

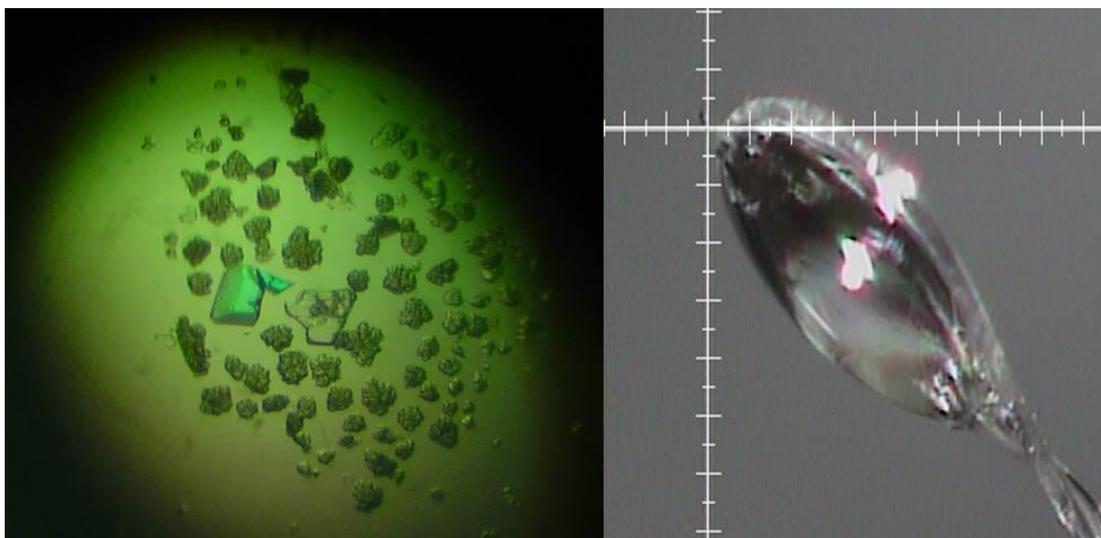


Figura 77. Cristal de *CpTIM* que difractado para la resolución de la estructura tridimensional. Del lado izquierdo se presenta al cristal ubicado en la caja de cristalización antes de ser difractado y del lado derecho se muestra al cristal montado en la asa durante el experimento de difracción.

Después de la colecta de datos, se realizó la integración, reducción y escalamiento de los datos utilizando los programas XDS y Scala, este último ubicado en la suite de CCP4. Los resultados del proceso de integración, reducción y escalamiento se muestran a continuación (tabla 25):

Tabla 25. Parámetros cristalográficos resultantes tras la integración, reducción y escalamiento de los datos colectados para *Cp*TIM. Los valores entre paréntesis, son los resultantes en la capa (zona) de más alta resolución.

| Parámetro | Valor |
|--|--|
| Fuente de rayos X | Rigaku Micromax-007 HF |
| Longitud de onda (Å) | 1.5418 |
| Detector | Rigaku Raxis IV++ |
| Distancia del detector al cristal (mm) | 100.007 |
| Rango de recolección (°) | 1 – 169 |
| Oscilación (°) | 0.5 |
| Grupo espacial | C121 (5; monoclinico) |
| Parámetros de la celda unitaria | a= 75.25; b= 49.56; c= 71.50 $\alpha= 90,0^\circ$; $\beta= 120^\circ$; $\gamma= 90,0^\circ$ |
| Mosaicidad | <0.05 % |
| Límites de resolución (Å) | 37.59 – 1.54 |
| Volumen de Matthews (Å ³) | 2.11 |
| Integridad (%) | 99.2 (94.4) |
| Número de reflexiones únicas totales | 34203 |
| Número de reflexiones únicas observadas | 33930 |
| Redundancia | 4.2 (3.7) |
| Factor B del Wilson Plot (Å ²) | 11.45 (16.54) |
| I/ σ | 14.6 (3.1) |
| R _{merge} (%) | 6.2 (44.8) |

Posteriormente las fases fueron determinadas mediante reemplazo molecular utilizando como modelo de homología estructural a la TIM de *Bacillus stearothermophilus* (1BTM) con la que *Cp*TIM posee 54.8% de identidad. El reemplazo molecular se llevó a

cabo con el programa Phenix bajo los parámetros establecidos en el mismo, arrojando como resultado un factor Z de 21.3 y LLG de 2755.77, por lo que se determinó que el reemplazo molecular estaba realizado de manera correcta. Al terminar éste, se realizó el afinamiento de la estructura, mediante ciclos iterativos utilizando el programa Phenix y realizando afinamientos de cuerpo rígido, cuerpo rígido con factores B, TLS y RIIA. Tras cada afinamiento, se analizó toda la cadena construida, comparándola con el mapa de densidad electrónica experimental (archivo .mtz) y los mapas F_o-F_c y $2F_o-F_c$. Las estadísticas finales del afinamiento se presentan en la tabla 26.

Tabla 26. Parámetros cristalográficos resultantes del afinamiento de la estructura de CpTIM.

| Parámetro | Valor |
|-------------------------------------|-----------------|
| Rango de resolución (Å) | 37.59 – 1.54 |
| $R_{work} - R_{free}$ | 0.1466 – 0.1813 |
| Total de átomos | 2363 |
| Átomos de proteína | 1990 |
| Moléculas de agua | 368 |
| Iones acetato | 2 |
| Iones sodio | 3 |
| Factor B (proteína) | 11.28 |
| Factor B (agua) | 16.24 |
| Factor B (iones acetato) | 22.14 |
| Factor B (iones sodio) | 43.24 |
| Residuos en regiones preferidas (%) | 98.47 |
| Residuos en regiones permitidas (%) | 1.15 |
| Residuos en regiones prohibidas (%) | 0.38 |
| RMS de enlace (Å) | 0.010 |
| RMS de ángulo (°) | 1.239 |

Al tener la estructura lista, se envió al PDB para su validación. Los resultados de la validación indicaron que el proceso de afinamiento y construcción de nuestro modelo había sido el correcto. Dos aminoácidos se encontraron fuera del mapa de Ramachandran; uno de ellos es la lisina catalítica (lys 14), la cual en todas las estructuras se encuentra fuera del mapa de Ramachandran, por lo que no fue un problema mayor. El otro aminoácido fue una tirosina (tyr 17) pero al revisar el modelo construido y la densidad electrónica experimental, no se observó que esté mal asignada, por lo que se acordó dejar este aminoácidos como lo construimos ya que no hay nada que nos indique una mala asignación de la cadena.

Después de esto, se depositó la estructura en el PDB, otorgándonos los códigos de acceso: PDB ID: **4JT1** y RCSB ID: **RCSB078467**, los cuales pueden consultarse directamente en la página: <http://www.rcsb.org/pdb/>.

En las figuras 77-80 se muestran algunas representaciones en listón de la estructura de *CpTIM*, determinada a una resolución final de 1.54 Å, nótese que la estructura presenta el barril (β/α)₈ modelo que caracteriza a esta familia de proteínas.

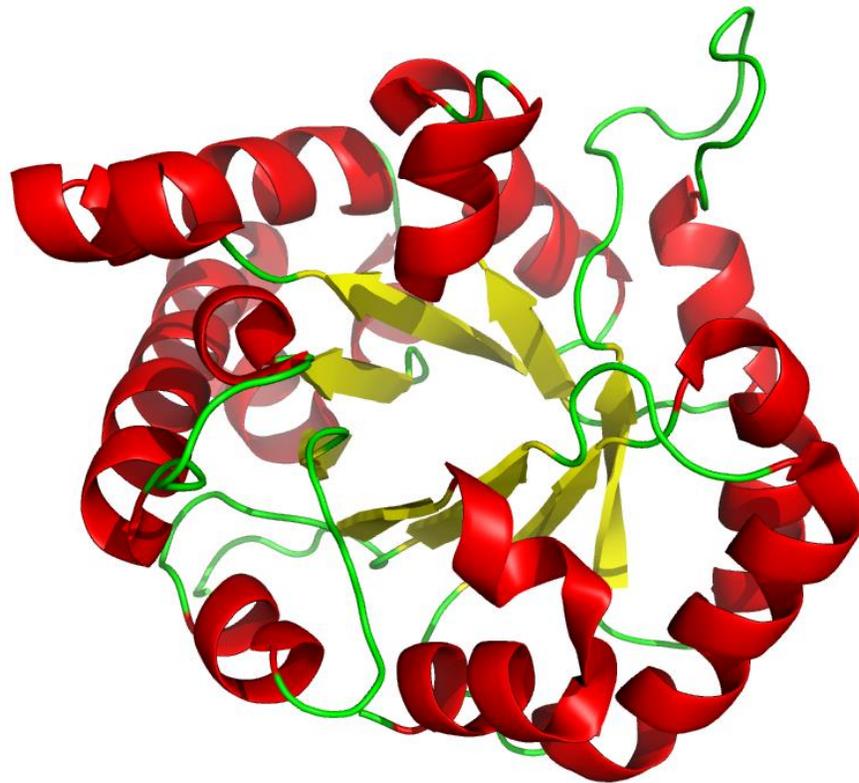


Figura 77. Estructura tridimensional de CpTIM. Se muestra en el centro, la cavidad del barril TIM formado por las hojas β y rodeado por las hélices α .



Figura 78. Vista lateral de un monómero de CpTIM.

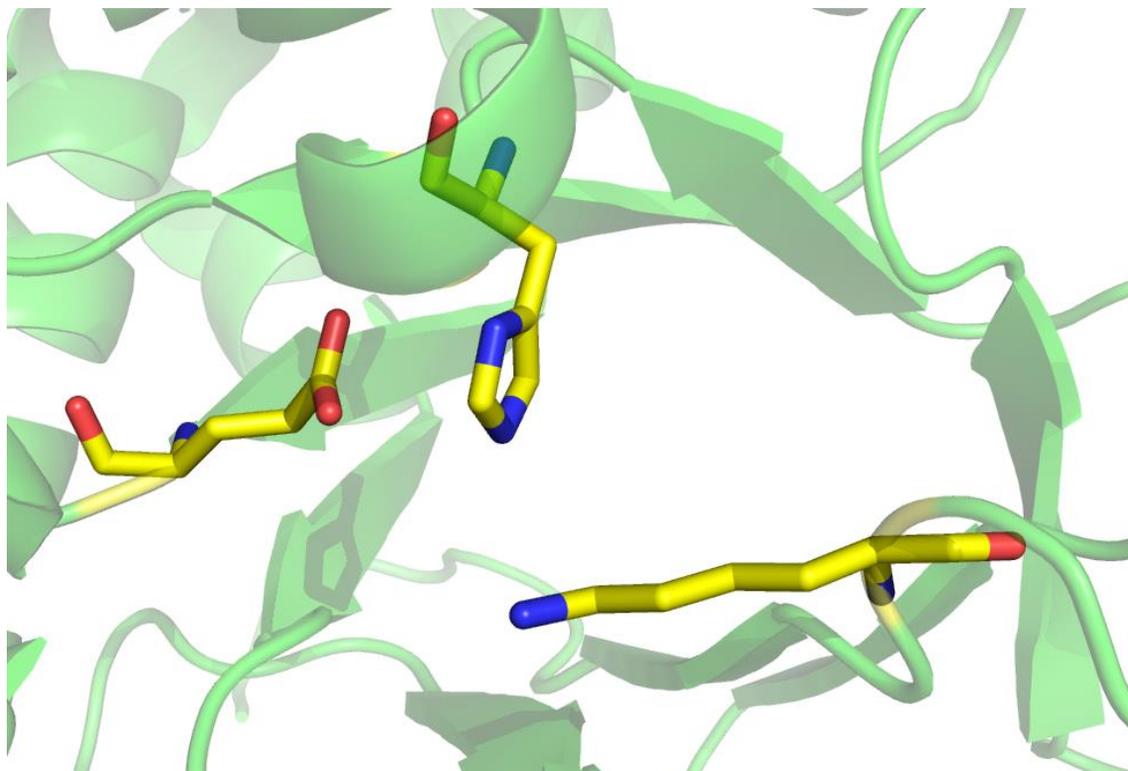


Figura 79. Acercamiento en la estructura tridimensional de CpTIM. Se muestran en amarillo los aminoácidos catalíticos Lys 14, His 96 y Glu 167.

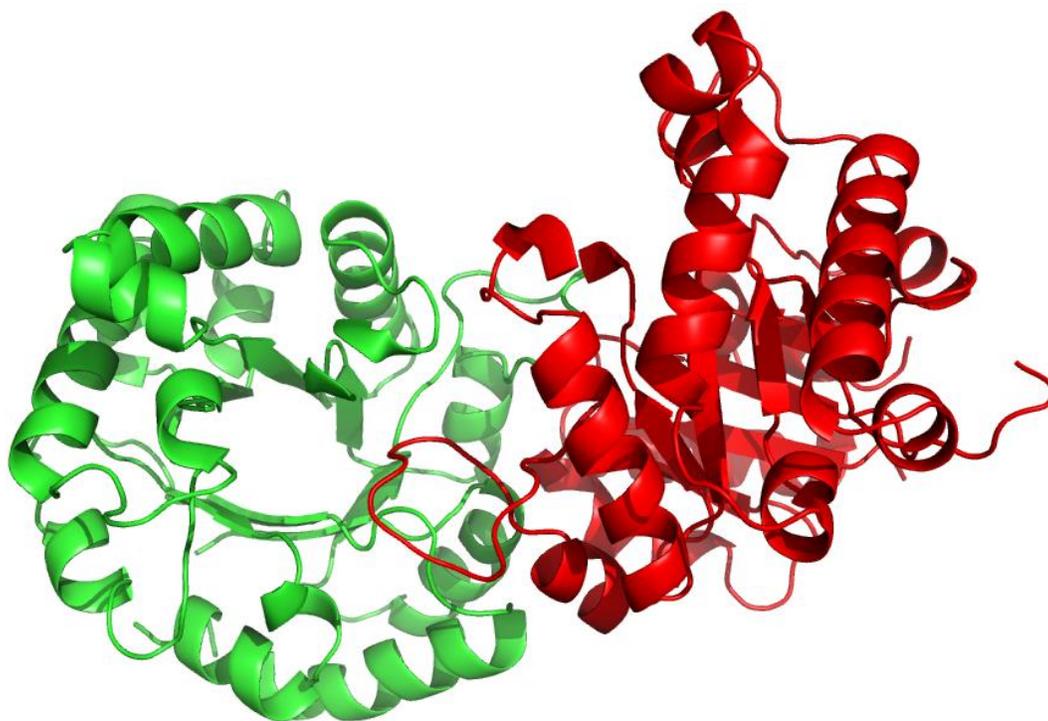


Figura 80. Estructura tridimensional de CpTIM donde se muestra el ensamblado del dímero biológicamente activo. La coloración distinta diferencia a los monómeros respectivamente.

Por otra parte, se obtuvo un set de datos completo de *Dr*TIM con una resolución de 2.9 Å. Se realizó la integración e indexado y se obtuvieron los valores siguientes:

- Valores de la celda unitaria: $a= 167.79$, $b=167.79$, $c=199.93$; $\alpha=90$, $\beta=90$, $\gamma=120$.
- Grupo espacial R3 (romboédrico).
- Condiciones de cristalización: concentración de proteína de 4.5 mg mL^{-1} , 2.0 M sulfato de amonio, 0.1 M citrato de sodio pH: 5.6 y 0.2 M tartrato de sodio/potasio (figura 77).

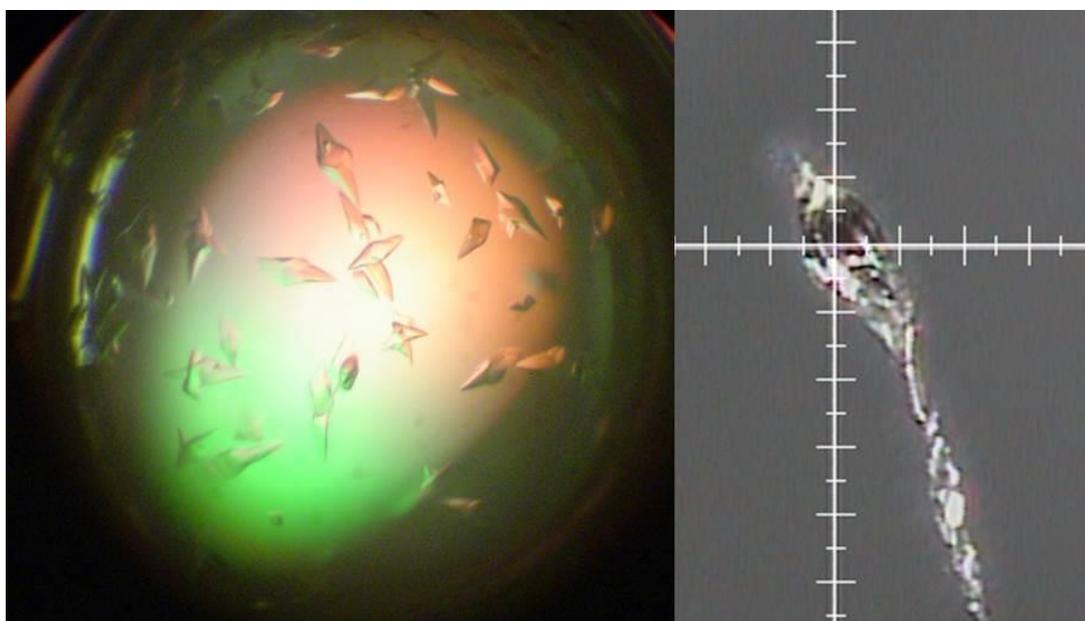


Figura 77. Cristal de *Cp*TIM que difractado para la resolución de la estructura tridimensional. Del lado izquierdo se presenta al cristal ubicado en la caja de cristalización antes de ser difractado y del lado derecho se muestra al cristal montado en la asa durante el experimento de difracción.

Se espera en un futuro poder determinar esta estructura tridimensional, al igual que para las otras TIMs estudiadas, en algunos casos ya se tienen condiciones donde se ha observado la formación de algunas estructuras cristalinas.

DISCUSIÓN

El universo proteico es de gran complejidad. Muchas proteínas poseen una elevada masa molecular, forman complejos con otras biomoléculas, sufren cambios al llevar a cabo su actividad o son inestables. En todas ellas, la adquisición de su estructura nativa es de vital importancia. Uno de los retos más importantes a los que se enfrenta la bioquímica actual consiste en discernir las reglas que determinan de qué modo una cadena polipeptídica recién sintetizada adquiere su estructura tridimensional y funcional. Las cuestiones fundamentales parecen ser las siguientes: ¿cómo codifica la secuencia para el plegamiento dado que el esqueleto de todas las proteínas tiene la misma composición? En otras palabras, ¿cómo dictan las cadenas laterales el plegamiento? ¿Cómo encuentra una determinada secuencia su estructura nativa entre el enorme número de conformaciones posibles que puede adoptar un polipéptido? ¿Cómo se inicia el proceso de plegamiento y cuál es (son) la(s) vía(s) de plegamiento?

La aproximación al estudio de plegamiento mediante experimentos *in vitro* es una estrategia para poder responder algunas de estas preguntas. El tipo de molécula proteica elegida para realizar los estudios, dependerá de las características que uno desee describir del proceso de plegamiento, así como de la relevancia biológica y bioquímica de la misma proteína. Nuestro modelo de estudio es la enzima glicolítica TIM.

En cuanto a las arquitecturas moleculares o plegamientos adoptados por las proteínas en el estado nativo, casi el 10% de las proteínas depositadas en el PDB muestran el patrón $(\beta/\alpha)_8$. La triosfato isomerasa consta de 250 aminoácidos que adopta un plegamiento de barril $(\beta/\alpha)_8$, y en la forma activa, es homodimérica en la mayoría de los organismos, sin embargo, en los hipertermófilos es tetramérica. Así, la TIM es entonces una enzima modelo para estudios de plegamiento, tanto por su carácter oligomérico como por la arquitectura que adopta en su estado nativo. A lo largo de la escala filogenética la estructura tridimensional de la TIM está conservada, en contraste, el mecanismo de plegamiento de la TIM es diverso.

En la actualidad, se han estudiado las características fisicoquímicas y el patrón de plegamiento de la enzima perteneciente a diversos organismos, encontrando una gran variedad, desde procesos de dos estados hasta procesos que incluyen intermediarios monoméricos y diméricos. Aunque esta diversidad puede reflejar las diferencias metodológicas y las condiciones de desnaturalización empleadas por diferentes grupos de trabajo; es claro que la variación en la secuencia modifica profundamente el paisaje conformacional de la TIM. Sin embargo, el dominio Bacteria ha sido escasamente analizado a pesar de ser un grupo numeroso y heterogéneo, por lo que el estudiar TIMs provenientes de bacterias, posiblemente nos permitirá lograr una descripción de la historia evolutiva del paisaje conformacional de esta enzima. Con esta premisa, decidimos trabajar con seis TIMs bacterianas: he aquí donde comienza la variedad de historias y sorpresas.

Con respecto a la sobreexpresión de las enzimas, ésta se logró efectivamente en cinco de las seis; la única TIM que no se logró purificar fue AvTIM, a pesar de lograr su sobreexpresión al cambiarla de vector, la proteína se localiza en cuerpos de inclusión y no se lograron encontrar las condiciones para solubilizar la proteína. Esto nos indica que probablemente la enzima es tóxica para el crecimiento celular, ya que se observó en las diversas pruebas que el crecimiento al parecer se detiene y decae considerablemente comparado con controles sin inducir y con sistemas que producen TIM sobreexpresadas. Como posible explicación para el comportamiento de esta TIM, se realizó el análisis del índice de inestabilidad para las secuencias de todas las TIMs bacterianas estudiadas. El análisis se hizo mediante el método de composición de dipéptidos (Guruprasad *et al.*, 1990), obteniendo una matriz de 400 dimensiones y cuya sumatoria nos da un valor que es indicativo del índice de inestabilidad; valores menores a 40 indican una probabilidad alta para que la proteína sea estable, mientras que una magnitud por arriba de 40 propone la inestabilidad de la secuencia proteica. Se encontró que de las 6 TIMs bacterianas elegidas, sólo AvTIM tuvo un índice superior a 40, lo que indica que la proteína es clasificada como inestable. En el resto de las TIMs bacterianas se obtuvieron índices de inestabilidad bajos (*Dr*TIM: 26.5, *Np*TIM: 33.3, *Go*TIM: 34.1, *Cp*TIM: 21.2 y *Sc*TIM: 15.3). Además, curiosamente si se realiza el análisis de la secuencia clonada en los dos vectores distintos donde se subclonó el gen

(pET-28b(+)) y pET-22a), se encuentra que para la secuencia en pET-28b(+) arroja un índice de inestabilidad de 47.6, mientras que para la secuencia en pET-22a, el índice es de 41.3, tal vez esta diferencia haga que en el primer vector no hayamos podido sobreexpresar la enzima contrario al segundo con el cual sí obtuvimos sobreexpresión aunque la enzima se va a cuerpos de inclusión (el índice en este caso sigue siendo superior a 40, por lo que probablemente genere este comportamiento de inestabilidad proteica). Por último, también se realizó una búsqueda de proteínas parecidas a la secuencia de AvTIM en la base de datos BLAST (Madden *et al.*, 1996) con el fin de encontrar parecidos con otras proteínas de *E. coli* y que probablemente estuviera generando el comportamiento anómalo observado para esta TIM. Como se esperaba, los puntajes más altos de identidad fueron para Triosafosfato Isomerasas, sin embargo, en la lista de resultados existe una segunda proteína con un valor alto de identidad (66%), la Exodesoxiribonucleasa V (RecB), encargada de hidrolizar cadenas dobles de ADN foráneo como mecanismo de defensa para la bacteria. Se sabe que cuando el complejo de exodesoxiribonucleasa eleva su concentración en la célula, llega a un punto crítico donde el crecimiento se detiene y la célula muere debido a que se activan mecanismos de muerte celular que previenen la captación extrema de ADN foráneo (Pavankumar *et al.*, 2010; Seki *et al.*, 2008). Con este panorama, se puede hipotetizar que el parecido de AvTIM a RecB pudiera generar un fenómeno de toxicidad celular, ya que tal vez la sobreexpresión de AvTIM provoque una disminución del crecimiento celular y su posterior muerte mediante mecanismos semejantes a los que activa RecB. En general, se cree que el comportamiento anómalo de AvTIM pudiera estar relacionado al menos con estas dos causas, razón por la cual se imposibilitó la purificación de la enzima.

Es curioso el efecto que se observó por la sobreexpresión de ciertas TIMs (*Np*TIM y *Go*TIM) en la sensibilidad a la lisis celular, ya que al parecer la enzima puede modificar el comportamiento de la célula y evitar su ruptura mediante los métodos y protocolos convencionales. Por lo anterior, fue necesario recurrir a un método mecánico para romper las células y liberar la proteína, método que tampoco fue efectivo en su totalidad, ya que sólo un porcentaje bajo de bacterias se lograron romper, sin embargo, se obtuvo una cantidad considerable. En la actualidad, se conocen algunas causas de

resistencia a la sonicación y lisis enzimática, como lo es, la incorporación extra de D-Alanina y de otros aminoácidos en el péptidoglicano, lo que afecta la polaridad de la pared celular y genera una sección hidrofóbica mayor que se traduce en un empaquetamiento alto entre las células (Chassy y Giuffrida, 1980; Salto, 1953); a su vez, se ha visto que una integración no ordenada de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, altera los enlaces β 1-4 y genera un peptidoglicano “resistente” a condiciones químicas y enzimáticas (Jacobs *et al.*, 1997). A pesar de este par de explicaciones, desconocemos la unión entre la resistencia a la sonicación y la sobreexpresión de la proteína.

Analizando las TIMs que se lograron purificar, encontramos que el sistema de purificación que seguimos tiene un rendimiento alto. A pesar de perder cantidades considerables de proteína en los pasos de purificación, la actividad específica de la enzima se eleva considerablemente lo que se traduce en que la actividad total se mantenga sin cambios grandes en cada paso de la purificación. En las tablas de purificación, se puede observar que el rendimiento y el número de veces que se purifica son altos, al final obtenemos una cantidad considerable de proteína (aproximadamente 20 mg por litro de cultivo).

Pasando al tema de los parámetros cinéticos, los resultados reflejan una firma característica de las TIMs: actividad catalítica limitada por difusión (eficiencia catalítica $\approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), lo que indica que estas enzimas son catalizadores perfectos, tal y como se esperaba que fuese desde un inicio. Los valores de K_M de las TIMs analizadas son muy parecidas a algunas TIMs eucariontes reportadas hasta el momento y, aunque para *NpTIM* y *GoTIM* tienen una V_{max} menor que las otras tres TIMs, presentan una K_M más afín, por lo que la eficiencia catalítica no se ve alterada.

Al igual que la mayoría de las TIMs mesófilas reportadas, se encontró que todas las TIMs bacterianas se asocian en un estado dimérico. Se sabe que la dimerización para la TIM es un evento clave que permite el plegamiento completo de los monómeros hasta el estado nativo y el correcto posicionamiento del sitio activo (Schliebs *et al.*, 1997). Las causas por las cuales la TIM ha evolucionado hacia dímero, apuntan hacia

razones funcionales (Najera *et al.*, 2003) y no de estabilidad como se propuso en un principio (Mainfroid *et al.*, 1996a-b). En un intento por revivir la teoría de la recapitulación de Haeckel, se ha propuesto que la ruta de plegamiento de los oligómeros recapitula su historia de dimerización (D'Alessio, 1999). Esto significa que, para el caso de dímeros que se pliegan en dos pasos, la dimerización sucedió tempranamente en la evolución debido quizá a una baja estabilidad inicial.

Se sabe que la interfase del dímero de la TIM está formada por interacciones no covalentes entre los monómeros; la constante de asociación de las dos subunidades está en el orden de 10^{-9} - 10^{-16} M (Landa *et al.*, 1997; Mainfroid *et al.*, 1996b; Borchert *et al.*, 1993; Lambeir *et al.*, 1987). Debido a que los monómeros son inactivos, la pérdida del estado dimérico puede ser seguida mediante la actividad enzimática después de que la enzima es incubada a diferentes concentraciones de proteína; con estos datos experimentales se puede calcular una K_{dis}^{app} . Tras estos experimentos realizados, el comportamiento de las TIMs bacterianas en estudios de estabilidad a la dilución es muy semejante en términos energéticos. Para todas ellas, los valores de la K_{dis}^{app} son mayores a los reportados para otras TIMs silvestres (Lopez-Velazquez *et al.*, 2004; Cisneros-Armas, 2003; Mainfroid *et al.*, 1996b). Para *Dr*TIM se determinó una K_{dis} mucho mayor que las otras TIMs bacterianas, sin embargo, al hacer el cálculo del ΔG_{dis} , se puede observar que la diferencia energética no es de una magnitud tan diferente con respecto a las otras TIMs. A pesar de que la K_{dis}^{app} para las TIMs bacterianas fue mayor a la de otras TIMs silvestres, no consideramos que esta característica afecte en nuestros experimentos realizados, en específico en la determinación de los parámetros catalíticos (y otros experimentos dependientes de la actividad enzimática de las TIMs), ya que al realizar la medición de actividad enzimática siempre se observaron trazos lineales, sin signos de inactivación, por lo que aunque las TIMs bacterianas tengan una K_{dis}^{app} alta, su cinética de disociación puede ser lenta y nos permite hacer todos los experimentos sin ningún problema de variación entre poblaciones monoméricas y diméricas. Además, cuando se mide la actividad enzimática de las TIMs, se sabe que la estabilidad del dímero aumenta con la ocupación de los sitios activos por el sustrato (Jimenez *et al.*, 2003; Garza-Ramos *et al.*, 1992), una razón más por la cual no se

observa inactivación en las mediciones de actividad enzimática. Sobre los experimentos de desnaturalización térmica (y en general en el resto de los ensayos mostrados), todos ellos llevaron a cabo en concentraciones de proteína muy elevadas a la K_{Diss} , debido a esto, podemos tener la certeza de que en todos los experimentos realizados en el presente estudio se trabajó con dímeros activos. Se propone en un futuro caracterizar la energética de esta disociación para conocer más a fondo como sucede este proceso, así como determinar la reversibilidad del proceso de dilución, con la posibilidad de que en algunos casos el valor de la constante de disociación reportado no sea un valor aparente.

Al calcular el ΔG de asociación a partir de la K_{dis}^{app} determinada, se encontró que este valor es el que tiene la mayor contribución al ΔG total de estabilidad, es decir, la asociación de las subunidades es el mayor contribuyente a la estabilidad de la enzima a comparación del ΔG de plegamiento, una característica encontrada en todas las TIMs analizadas (Peimbert *et al.*, 2008b). La razón de este comportamiento (y en su fondo, de la naturaleza oligomérica de la TIM) se ha estudiado ampliamente. Por una parte, las conclusiones de los primeros estudios señalaban que la estabilidad de las subunidades es la principal razón de la naturaleza oligomérica de la TIM (Mainfroid *et al.*, 1996b; Borchert *et al.*, 1993). Sin embargo, también se ha discutido que la baja estabilidad de los monómeros de la TIM no es la única ni la principal causa de su naturaleza dimerica y que existe una relación entre la estabilidad y su función, implicando la aparición de un elevado ΔG de asociación para realizar la catálisis. Empero, se han logrado tener monómeros activos mediante la estrategia de evolución dirigida, aunque la actividad está lejos de una TIM silvestre (Saab-Rincon *et al.*, 2001), debido a esto se sabe que la realización de estos experimentos pueden ayudar a responder la relación entre el estado de oligomerización y la estabilidad de la enzima misma.

Sobre los espectros de dicroísmo circular, todas las TIMs presentaron los mínimos clásicos de una proteína que tiene estructura α y β , como lo presentan los barriles TIM, a excepción de *Dr*TIM en la que su espectro de dicroísmo circular está fuera del espectro estándar de las demás TIMs. *Dr*TIM presentó una intensa banda negativa en 222 nm, lo cual probablemente indica la presencia de hélices α adicionales;

se tendrá que esperar la resolución de la estructura de la enzima para ver si tiene alguna peculiaridad estructural con respecto al barril TIM clásico.

Los espectros de fluorescencia muestran que las cinco TIMs bacterianas tienen una λ_{max} de emisión entre 325-330 nm, lo cual nos indica que sus triptófanos están en un ambiente hidrofóbicos y ocultos del solvente. Sin embargo, al comparar los valores máximos de emisión, podemos ver que hay diferencias considerables. Por ejemplo, el máximo de intensidad de fluorescencia de *Sco*TIM es 9 veces mayor que el de *Go*TIM, a pesar de que esta última tiene un triptófano de más. Al analizar *in silico* un modelo de estas enzimas, los 2 triptófanos conservados están en las asas 1 y 6. Con esto, podemos especular que las diferencias en la señal, pudiera deberse al apagamiento de alguno de los triptófanos de *Go*TIM en el estado nativo; de hecho para otras TIMs (*G*TIM y *Tb*TIM), se ha observado que el apagamiento de triptófanos es debido a dos mecanismos principales: 1) interacciones con otros aminoácidos aromáticos debido a la proximidad y orientación de los grupos indol y 2) transferencia de energía de residuos cargados que rodean los triptófanos (Hernandez-Alcantara *et al.*, 2008; Chanez-Cardenas *et al.*, 2002). Probablemente en *Go*TIM pudiera estar sucediendo alguno de estos dos mecanismos.

El valor obtenido de T_m para cada proteína nos dejó con una amplia sorpresa, ya que el valor de 46 °C para *Dr*TIM, es de los más bajos reportados hasta ahora para las TIMs, sólo por arriba de la TIM de *Moritella marina* (41 °C). Este comportamiento es destacable, debido a que *D. radiodurans* es un organismo termotolerante y nuestro valor de T_m está por debajo del intervalo de las TIMs provenientes de organismos termófilos (≈ 80 °C). Al respecto, se han reportado algunos mecanismos que utiliza *D. radiodurans* para resistir a la temperatura y radiación, entre los que destacan: presencia de grandes concentraciones de cosolutos como la trehalosa, iones como el manganeso, alteración de la membrana celular con incorporación de mayor número de proteínas, mayor presencia de chaperonas y proteínas para la reparación de DNA (Daly, 2009; Daly *et al.*, 2004; Battista, 1997). *Sco*TIM y *Np*TIM presentan valores dentro del intervalo de los reportados para la TIM de organismos mesófilos (≈ 55 °C). En cambio, para *Go*TIM y *Cp*TIM presentaron los valores más altos de T_m , por arriba de las TIMs

de organismos mesófilos y muy cercanas a las T_m de organismos termófilos. Esto sugiere que tal vez dichos organismos se enfrentan a altas temperaturas en su hábitat natural, por lo que deben de desarrollar una mayor estabilidad térmica en sus estructuras proteicas. Entre las estrategias hasta ahora asociadas a la termoestabilidad de la enzima, se encuentra el estado de oligomerización, ya que se ha visto que, en la mayoría de las TIMs termófilas hasta ahora estudiadas, el estado de asociación es tetramérico y no dimérico como lo observado en TIMs mesófilas (a excepción de *BsTIM* que es un dímero (Álvarez *et al.*, 1999) y de *GTIM* que varía su estado de oligomerización entre dímero/tetramero de acuerdo con su ciclo de vida (Reyes-Vivas *et al.*, 2007; Lopez-Velazquez *et al.*, 2004)). Otra estrategia puede ser la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica que se observa en algunas TIMs bacterianas, aunque se desconoce si este mecanismo se encuentra diversificado en otros fila bacterianos o en especies del mismo filo.

Los resultados de la desnaturalización inducida por temperatura tienen varios aspectos a resaltar. En primer punto, el proceso de desnaturalización térmica resultó ser irreversible para *NpTIM* y *GoTIM* como lo había sido para la mayoría de las TIMs estudiadas, respondiendo a un modelo de dos estados irreversible $N \rightarrow F$ (modelo de Lumry-Eyring). Sin embargo, se puede observar que el proceso de desnaturalización es parcialmente reversible (>85%) por DC y completamente reversible por DSC en tres de las TIMs bacterianas: *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*, presentando transiciones únicas en la desnaturalización y renaturalización. Lo anterior se demuestra tanto en las rampas de temperatura seguidas por dicroísmo circular, como por las trazas calorimétricas realizadas con DSC. También se observa que en los espectros de dicroísmo circular comparados entre la forma nativa y la renaturalizada tras el proceso de desnaturalización térmica, se ve una elevada recuperación de la señal en las 3 TIMs mencionadas. La reversibilidad en el desplegamiento térmico es un resultado interesante, ya que nunca se había tenido una TIM con reversibilidad elevada y al equilibrio. La mayoría de las TIMs estudiadas hasta el momento habían presentado transiciones irreversibles en un proceso de desnaturalización térmica, y en el caso de que hubiera reversibilidad, como lo es en la TIM de *Saccharomyces cerevisiae*, *ScTIM* (bajo condiciones muy especiales), *HsTIM* (y sus mutantes con baja energía de

disociación huTIM/M14Q y huTIM/R98Q) y *EhTIM*, el proceso no estaba al equilibrio, ya que el regreso a la forma nativa muestra una histéresis alta (aproximadamente 10 °C para *ScTIM*, Benitez-Cardoza *et al.*, 2001; 2 °C para *EhTIM* (sólo la primera transición), Tellez *et al.*, 2008). En contraste, en las TIMs bacterianas (*DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM*) la histéresis es menor a 1 °C entre las trazas de desnaturalización y renaturalización (figuras 57, 59 y 61).

En las TIMs con desplegamiento térmico irreversible, se observó que las curvas calorimétricas se ajustan bien a un modelo de dos estados irreversible ($N \rightarrow F$, modelo de Lumry-Eyring), lo cual indica que al ajustarse a esta constante de primer orden, la disociación del dímero en monómeros tiene lugar después del paso limitante, en otras palabras, el E_T cinéticamente relevante es también dimérico como en la forma nativa. Es de resaltar el amplio intervalo de energías de activación encontrado para *NpTIM* y *GoTIM*, lo cual indica grandes diferencias en la energética del E_T . Para ambas proteínas, los valores encontrados se encuentran entre los reportados para otras TIMs: para *GoTIM*, su valor de E_A es casi del doble de *NpTIM* (171 contra 87 kcal mol⁻¹) y muy semejante al reportado para *TcTIM*, mientras que el valor de *NpTIM* se parece mucho al de *TbTIM* y *LmTIM* (Costas *et al.*, 2009). Es importante notar que los diferentes valores de E_A se traducen en diferentes tasas de desnaturalización a condiciones fisiológicas de la bacteria. Si observáramos el proceso a 37 °C (de la extrapolación del gráfico de Arrhenius), la tasa de desnaturalización para *GoTIM* ($k= 4.69 \times 10^{-19} \text{ min}^{-1}$) es varios órdenes de magnitud más lenta que para *NpTIM* ($k= 1.48 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), indicando una mayor estabilidad cinética de esta proteína.

Se ha observado una relación entre los valores m y los cambios en el ASA (Myers *et al.*, 1995). Así, los valores de m^\ddagger obtenido por los experimentos con urea, pueden transformarse a grados fraccionales de exposición al solvente en el E_T mediante el cociente m^\ddagger/m_{eq} . Si se compara este grado de exposición al solvente entre *NpTIM* y *GoTIM*, se puede observar que el grado de exposición (0.06 y 0.27) son bajos, por lo cual el E_T tiene características semejantes al estado nativo en lo que refiere a la exposición al solvente, a pesar de esto, *GoTIM* muestra una mayor exposición al solvente que *NpTIM*.

La E_A puede ser vista como la diferencia de la entalpía entre el estado de transición y el estado nativo ($E_A = \Delta H^\ddagger$). Los valores de m^\ddagger pueden tomarse como un estimado del grado de desplegamiento (o de ASA) en la conversión del estado nativo al estado de transición; el hecho de que se obtengan valores más altos de E_A junto con valores de m^\ddagger bajos, indica que el balance energético en el estado de transición es diferente que en los estados nativos. Si calculamos la entalpía en el E_T multiplicando el grado de exposición al solvente por la entalpía calculada del proceso de desplegamiento (tabla 15) (*Np*TIM: $0.06 \times 117 \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1} = 7.02 \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$; *Go*TIM: $0.27 \times 66 \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1} = 16.82 \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) podemos ver que estos valores comparados con la E_A (*Np*TIM: $88 \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y *Go*TIM: $171 \text{ kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) son mucho más pequeños. Para explicar esta diferencia tan grande, hay que considerar que claramente, el valor de la E_A experimental no puede ser explicado únicamente en términos del grado de desplegamiento en el E_T , ya que existen contribuciones energéticas adicionales (no presentes en el estado nativo) que necesitan involucrarse para la energética del estado de transición. Para otras TIMs reportadas, se ha visto que la contribución de la barrera de solvatación asociada con interacciones parcialmente desfavorecidas del agua en el estado de transición puede ser una causa de esta diferencia (Costas *et al.*, 2009). Se sabe que las barreras energéticas para una proteína en su proceso de plegamiento-desplegamiento son principalmente determinadas por el tamaño y la topología. Sin embargo, las diferencias en la función biológica pueden requerir proteínas con el mismo tamaño y topología pero diferente barrera energética, tal como se observa con estas dos TIMs bacterianas. Al parecer los efectos de solvatación pueden ser mecanismos eficientes para la modulación de estas barreras energéticas ya que evolutivamente pudieran estar controlando las estabilidades cinéticas diferenciales en proteínas pertenecientes a una misma familia. Debido a esto, se hipotetiza que esta variación en los efectos de solvatación, pudiera estar sucediendo en las dos TIMs bacterianas discutidas; se propone hacer un análisis a profundidad en el futuro como el propuesto por Costas y colaboradores en 2009 con el fin de comprobar o descartar esta posibilidad.

Para saber si una proteína está bajo control cinético o termodinámico, un experimento clave es observar la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido. Aquí tenemos dos grandes grupos: mientras que para *NpTIM* y *GoTIM* se observa una clara dependencia de aproximadamente ΔT_m de 2.5-5 K entre las velocidades de barrido extremas, indicando un control cinético, concordante con lo observado con todas las TIMs estudiadas hasta el momento; para *DrTIM*, *CpTIM* y *ScoTIM* la dependencia es menor y parece no existir correlación grande con ésta, ya que es menor a 1.8 K entre velocidades de barrido extremas (figura 81), indicando un control termodinámico del proceso.

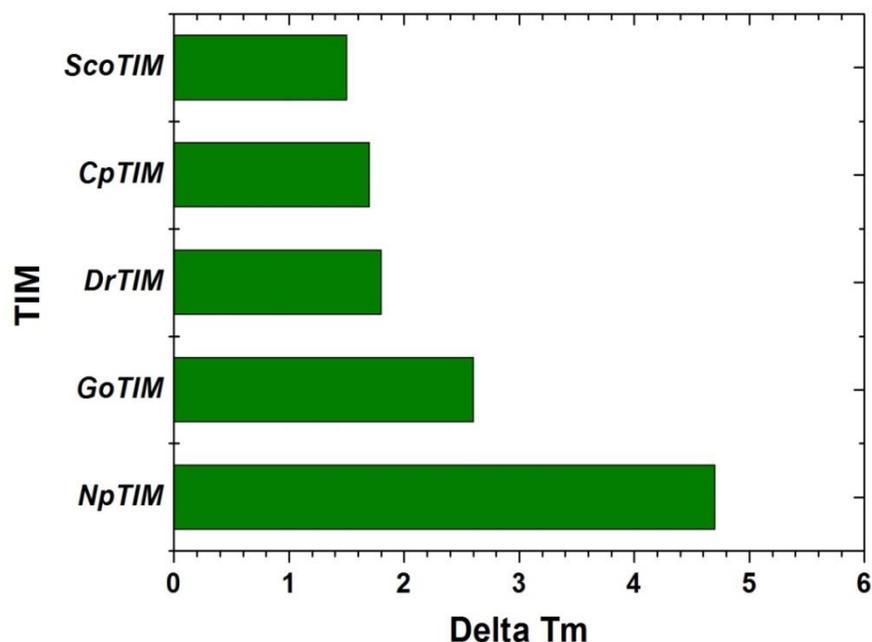


Figura 81. Delta T_m de las TIMs bacterianas entre la velocidad de barrido más baja (30 K hr^{-1}) y más alta (180 K hr^{-1}) ensayada por DSC. La gráfica muestra la comparación entre las 5 TIMs bacterianas estudiadas.

Con respecto a las TIMs en las que se observó reversibilidad en el proceso de desnaturalización térmica, hay que señalar que es la primera vez que se observa este fenómeno y que además el proceso está cercano al equilibrio por DC y totalmente al equilibrio por DSC (así mismo, el proceso es robustamente reversible ya que al calentar hasta por 30 grados después de la transición calorimétrica, se sigue observando reversibilidad del proceso, datos no mostrados).

Las curvas de calorimetría se ajustaron de manera correcta a un modelo de dos estados con disociación ($N_2 \rightleftharpoons 2D$) y para comprobar si el modelo de desplegamiento considerado era el correcto, se compararon los valores de ΔH de Van't Hoff (por experimentos de DC) y ΔH calorimétrico, realizando el cociente de ambos. Como dicho criterio resultó en un valor aproximado a 1 (tabla 21), se puede considerar que el modelo propuesto es correcto. Sobre los cálculos del ΔC_p se pudo observar que los valores calculados por métodos distintos no presentaron diferencias significativas y que si se construyen las curvas de estabilidad con estos valores, no se aprecia gran variación ni en la forma ni en los valores de ΔG (ver apéndice B).

La reversibilidad en el proceso de desplegamiento térmico, permite una caracterización fisicoquímica a profundidad del proceso de plegamiento - desplegamiento. Esto permitió que se calcularan los parámetros necesarios para construir la curva de estabilidad para cada proteína lo cual produjo resultados novedosos. Si comparamos los valores de estabilidad máxima de las TIMs bacterianas reversibles con los datos de otras TIMs reportadas (figura 82), podemos ver que los valores son más bajos (casi de la mitad); en estos momentos desconocemos las causas que subyacen a este comportamiento. Una de las posibilidades, es que la baja estabilidad sea una de las razones de la reversibilidad en el proceso de desnaturalización térmica, es decir, un “pago” fisicoquímico que otorgan estas proteínas para tener reversibilidad en su proceso de desplegamiento térmico. Aun con estas discrepancias en el ΔG máximo de estabilidad, se puede observar que el valor de estabilidad a 25 °C tiene un componente mayoritario que corresponde al ΔG de asociación, como se explicó anteriormente (alrededor del 80-95%), por lo cual el plegamiento de los monómeros contribuye en menor porcentaje en la estabilidad de la proteína (menos del 20% del total). Es indudable que la estabilidad conformacional se incrementa en gran medida durante el proceso de oligomerización, ya que la estabilidad del monómero es mucho menor cuando se compara con la energía del dímero. A partir de los datos disponibles en la literatura, se estima que el ΔG total promedio del proceso es aproximadamente de 20-25 kcal mol⁻¹, que corresponde al 100% de la energía libre total del proceso. Por otro lado, la estabilidad del monómero corresponde únicamente al 15% de la energía total. La baja estabilidad del intermediario monomérico es quizá una

de las principales razones de la ausencia de catálisis en el monómero aislado (Saab-Rincon *et al.*, 2001).

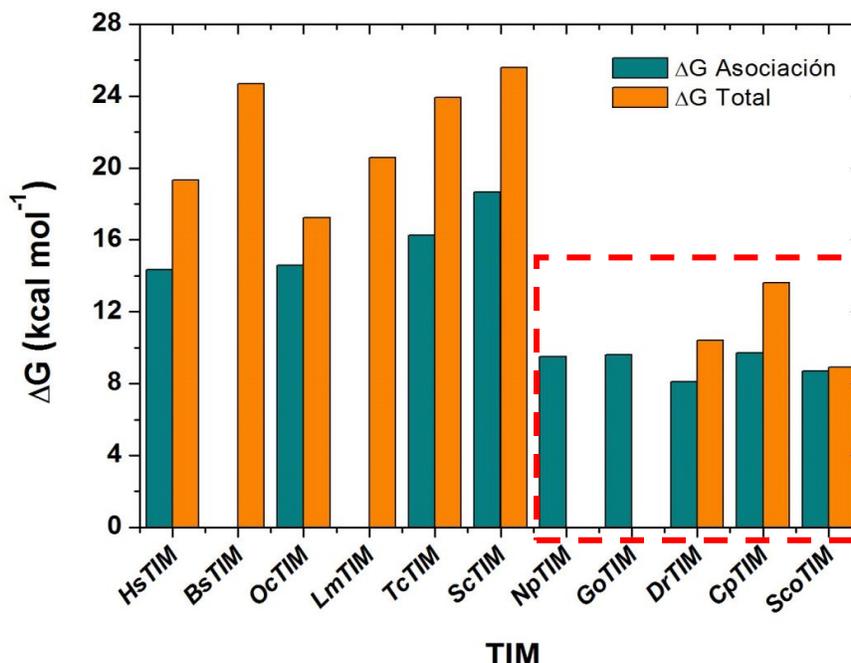


Figura 82. ΔG total y de asociación de las TIMs bacterianas y de otras TIMs eucariontes reportadas hasta el momento. Las proteínas del extremo derecho marcadas en un cuadro rojo, son las estudiadas en el presente trabajo. Para *NpTIM* y *GoTIM*, únicamente se tiene hasta el momento el valor de ΔG_{Diss} debido a que el proceso de desplegamiento térmico fue irreversible, se espera tener en un futuro el ΔG total, determinado con experimentos de desnaturalización con urea, GdnHCl o ambos, al igual que las otras TIMs eucariontes observadas en la gráfica.

¿Por qué el desplegamiento de unas TIMs es reversible y en otras TIMs no lo es? Esta no es una pregunta fácil ni directa de responder. Comparando las características generales de las 5 enzimas, al menos en tamaño y punto isoeléctrico, no se observan diferencias considerables. Al alinear las cinco enzimas, agrupar las tres proteínas con desplegamiento reversible y las dos con proceso irreversible, no encontramos diferencias claras entre los grupos. Los porcentajes de identidad y similitud entre las TIMs estudiadas al momento se pueden observar en el apéndice C. Se sabe que la presencia de algunos aminoácidos puede desfavorecer la resistencia a la temperatura, sin embargo, algunos de ellos como las argininas, asparaginas y algunos aminoácidos polares, no parecen tener una distribución preferencial en estas TIMs, por lo que tampoco se encuentra una relación directa con la composición de aminoácidos ni sus propiedades fisicoquímicas (tabla 27).

Tabla 27. Composición aminoacídica de las TIMs bacterianas.

| Aminoácido / % de cierta característica | TIMs con desplegamiento térmico irreversible | | | | | TIMs con desplegamiento térmico reversible | | | | | | |
|--|---|------------|------------|------------|---------------------------|---|------------|------------|------------|------------|------------|---------------------------|
| | NpTIM | | GoTIM | | Promedio del grupo (%) | DrTIM | | CpTIM | | ScoTIM | | Promedio del grupo (%) |
| | n | % | n | % | | n | % | n | % | n | % | |
| Ala (A) | 15 | 6.1 | 32 | 12.5 | 9.3 | 42 | 17.0 | 31 | 12.4 | 35 | 13.4 | 14.3 |
| Arg (R) | 12 | 4.9 | 11 | 4.3 | 4.6 | 12 | 4.9 | 7 | 2.8 | 9 | 3.4 | 3.7 |
| Asn (N) | 11 | 4.5 | 4 | 1.6 | 3.0 | 8 | 3.2 | 12 | 4.8 | 6 | 2.3 | 3.4 |
| Asp (D) | 8 | 3.3 | 10 | 3.9 | 3.6 | 12 | 4.9 | 12 | 4.8 | 19 | 7.3 | 5.6 |
| Cys (C) | 3 | 1.2 | 3 | 1.2 | 1.2 | 3 | 1.2 | 6 | 2.4 | 4 | 1.5 | 1.7 |
| Gln (Q) | 15 | 6.1 | 8 | 3.1 | 4.6 | 7 | 2.8 | 9 | 3.6 | 10 | 3.8 | 3.4 |
| Glu (E) | 22 | 8.9 | 18 | 7.1 | 8.0 | 20 | 8.1 | 24 | 9.6 | 19 | 7.3 | 8.3 |
| Gly (G) | 24 | 9.8 | 28 | 11.0 | 10.4 | 27 | 10.9 | 18 | 7.2 | 24 | 9.2 | 9.1 |
| His (H) | 6 | 2.4 | 7 | 2.7 | 2.6 | 5 | 2.0 | 5 | 2.0 | 9 | 3.4 | 2.5 |
| Ile (I) | 21 | 8.5 | 10 | 3.9 | 6.2 | 8 | 3.2 | 20 | 8.0 | 13 | 5.0 | 5.4 |
| Leu (L) | 24 | 9.8 | 21 | 8.2 | 9.0 | 25 | 10.1 | 12 | 4.8 | 22 | 8.4 | 7.8 |
| Lys (K) | 7 | 2.8 | 15 | 5.9 | 4.4 | 9 | 3.6 | 19 | 7.6 | 18 | 6.9 | 6.0 |
| Met (M) | 3 | 1.2 | 5 | 2.0 | 1.6 | 4 | 1.6 | 8 | 3.2 | 5 | 1.9 | 2.2 |
| Phe (F) | 10 | 4.1 | 8 | 3.1 | 3.6 | 1 | 0.4 | 7 | 2.8 | 4 | 1.5 | 1.6 |
| Pro (P) | 11 | 4.5 | 11 | 4.3 | 4.4 | 10 | 4.0 | 7 | 2.8 | 6 | 2.3 | 3.0 |
| Ser (S) | 14 | 5.7 | 15 | 5.9 | 5.8 | 12 | 4.9 | 6 | 2.4 | 11 | 4.2 | 3.8 |
| Thr (T) | 15 | 6.1 | 17 | 6.7 | 6.4 | 11 | 4.5 | 18 | 7.2 | 11 | 4.2 | 5.3 |
| Trp (W) | 3 | 1.2 | 3 | 1.2 | 1.2 | 3 | 1.2 | 2 | 0.8 | 2 | 0.8 | 0.9 |
| Tyr (Y) | 4 | 1.6 | 6 | 2.4 | 2.0 | 6 | 2.4 | 6 | 2.4 | 9 | 3.4 | 2.8 |
| Val (V) | 18 | 7.3 | 23 | 9.0 | 8.2 | 22 | 8.9 | 22 | 8.8 | 25 | 9.6 | 9.1 |
| Total | 246 | 100 | 255 | 100 | 100 | 247 | 100 | 251 | 100 | 261 | 100 | 100 |
| % Cargados (DEKHR) | 22.4 | | 23.5 | | 23.0 | 23.5 | | 26.7 | | 28.4 | | 26.2 |
| % Cargados + (KRH) | 10.2 | | 12.6 | | 11.4 | 10.5 | | 12.4 | | 13.8 | | 12.2 |
| % Cargados - (DE) | 12.2 | | 10.9 | | 11.6 | 12.9 | | 14.4 | | 14.6 | | 14.0 |
| % Alifáticos (ILV) | 25.6 | | 22.4 | | 24.0 | 22.3 | | 21.5 | | 22.9 | | 22.2 |
| % Aromáticos (FHWWY) | 9.4 | | 9.1 | | 9.3 | 6.1 | | 7.9 | | 9.2 | | 7.7 |
| % Polares (DERKQN) | 30.5 | | 25.9 | | 28.2 | 27.5 | | 33.1 | | 31.1 | | 30.6 |
| % Neutros (AGHPSTY) | 36.2 | | 44.3 | | 40.3 | 45.8 | | 36.3 | | 40.2 | | 40.8 |
| % Hidrofóbicos (CFILMWW) | 33.4 | | 29.8 | | 31.6 | 26.7 | | 30.7 | | 28.8 | | 28.7 |
| % Pequeños (ACDGST) | 32.1 | | 40.4 | | 36.3 | 43.3 | | 36.3 | | 39.9 | | 39.8 |
| % Medianos (EHILKMNPQV) | 56.1 | | 48.6 | | 52.4 | 47.8 | | 54.9 | | 50.9 | | 51.2 |
| % Grandes (FRWY) | 11.8 | | 10.9 | | 11.4 | 8.9 | | 8.8 | | 9.2 | | 9.0 |

Si normalizamos la composición aminoacídica de acuerdo a las preferencias que se encuentran en las proteínas depositadas en el PDB, se puede obtener la misma tabla normalizada de acuerdo a la abundancia de cada aminoácido en una estructura (tabla 28).

Tabla 28. Preferencia normalizada de la composición aminoacídica de las TIMs bacterianas.

| Aminoácido / % de cierta característica | Preferencia y abundancia del aminoácido en las estructuras del PDB† (%) | TIMs con desplegamiento térmico irreversible | | | TIMs con desplegamiento térmico reversible | | | |
|--|---|---|---------------|-----------------------|---|---------------|------------------------|-----------------------|
| | | <i>Np</i> TIM | <i>Go</i> TIM | Promedio del grupo | <i>Dr</i> TIM | <i>Cp</i> TIM | <i>Sc</i> <i>o</i> TIM | Promedio del grupo |
| Ala (A) | 8.74 | 0.70 | 1.44 | 1.07 | 1.95 | 1.41 | 1.53 | 1.63 |
| Arg (R) | 4.81 | 1.01 | 0.90 | 0.96 | 1.01 | 0.58 | 0.72 | 0.77 |
| Asn (N) | 4.39 | 1.02 | 0.36 | 0.69 | 0.74 | 1.09 | 0.52 | 0.78 |
| Asp (D) | 5.72 | 0.57 | 0.69 | 0.63 | 0.85 | 0.84 | 1.27 | 0.99 |
| Cys (C) | 1.62 | 0.75 | 0.73 | 0.74 | 0.75 | 1.48 | 0.95 | 1.06 |
| Gln (Q) | 3.19 | 1.91 | 0.98 | 1.45 | 0.89 | 1.12 | 1.20 | 1.07 |
| Glu (E) | 6.39 | 1.40 | 1.10 | 1.25 | 1.27 | 1.50 | 1.14 | 1.30 |
| Gly (G) | 7.82 | 1.25 | 1.40 | 1.33 | 1.40 | 0.92 | 1.18 | 1.16 |
| His (H) | 2.15 | 1.13 | 1.28 | 1.21 | 0.94 | 0.93 | 1.60 | 1.16 |
| Ile (I) | 5.15 | 1.66 | 0.76 | 1.21 | 0.63 | 1.55 | 0.97 | 1.05 |
| Leu (L) | 8.20 | 1.19 | 1.00 | 1.10 | 1.23 | 0.58 | 1.03 | 0.95 |
| Lys (K) | 6.78 | 0.42 | 0.87 | 0.64 | 0.54 | 1.12 | 1.02 | 0.89 |
| Met (M) | 2.08 | 0.59 | 0.94 | 0.76 | 0.78 | 1.53 | 0.92 | 1.08 |
| Phe (F) | 3.87 | 1.05 | 0.81 | 0.93 | 0.10 | 0.72 | 0.40 | 0.41 |
| Pro (P) | 4.49 | 1.00 | 0.96 | 0.98 | 0.90 | 0.62 | 0.51 | 0.68 |
| Ser (S) | 6.56 | 0.87 | 0.90 | 0.88 | 0.74 | 0.36 | 0.64 | 0.58 |
| Thr (T) | 5.84 | 1.04 | 1.14 | 1.09 | 0.76 | 1.23 | 0.72 | 0.90 |
| Trp (W) | 1.17 | 1.04 | 1.01 | 1.02 | 1.04 | 0.68 | 0.65 | 0.79 |
| Tyr (Y) | 3.33 | 0.49 | 0.71 | 0.60 | 0.73 | 0.72 | 1.04 | 0.83 |
| Val (V) | 7.01 | 1.04 | 1.29 | 1.17 | 1.27 | 1.25 | 1.37 | 1.30 |
| % Cargados (DEKHR) | 25.85 | 4.54 | 4.83 | 4.7 | 4.61 | 4.95 | 5.75 | 5.1 |
| % Cargados + (KRH) | 13.74 | 2.57 | 3.04 | 2.8 | 2.49 | 2.62 | 3.34 | 2.8 |
| % Cargados - (DE) | 12.11 | 1.97 | 1.79 | 1.9 | 2.12 | 2.33 | 2.41 | 2.3 |
| % Alifáticos (ILV) | 20.36 | 3.89 | 3.05 | 3.5 | 3.13 | 3.38 | 3.36 | 3.3 |
| % Aromáticos (FHWY) | 10.52 | 3.72 | 3.80 | 3.8 | 2.81 | 3.05 | 3.69 | 3.2 |
| % Polares (DERKQN) | 31.28 | 6.33 | 4.90 | 5.6 | 5.29 | 6.24 | 5.87 | 5.8 |
| % Neutros (AGHPSTY) | 38.93 | 6.48 | 7.82 | 7.1 | 7.42 | 6.19 | 7.23 | 6.9 |
| % Hidrofóbicos (CFILMW) | 29.10 | 7.32 | 6.54 | 6.9 | 5.80 | 7.79 | 6.28 | 6.6 |
| % Pequeños (ACDGST) | 36.30 | 5.18 | 6.29 | 5.7 | 6.45 | 6.23 | 6.29 | 6.3 |
| % Medianos (EHILKMNPQV) | 49.83 | 11.36 | 9.55 | 10.5 | 9.19 | 11.29 | 10.28 | 10.3 |
| % Grandes (FRWY) | 13.18 | 3.60 | 10.9 | 7.2 | 2.88 | 2.70 | 2.80 | 2.8 |

†: La normalización de las preferencias en contenido aminoacídico se realizó con las preferencias reportadas por Nakashima *et al.*, 1986.

Esperamos determinar las estructuras tridimensionales de las otras TIMs analizadas en este estudio y que, al hacerlo, se pueda hacer una comparación entre ellas y encontrar el origen molecular de la reversibilidad del desplegamiento térmico. Posiblemente haya diferencias en la interfase o en la ubicación de moléculas de agua,

lo que pudiera permitir la reversibilidad entre unas y otras TIMs. Con la estructura que ya se tiene, a expensas de comparar la estructura con otras reportadas, no se observan diferencias significativas hasta el momento, será interesante analizar la interfase del dímero, número de puentes de hidrógeno, etc., para buscar una correlación entre la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica y la estabilidad estructural de la enzima.

Algunas de las características que se analizarán en el futuro para comparar TIMs con procesos de desplegamiento diferentes, serán: volumen de las cavidades, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos, secuencias antiagregación, la longitud de las asas e interacciones involucradas en la interfase (Somero, 1995), entre otras características que han sido reportadas que contribuyen a la estabilidad térmica de las proteínas.

Los resultados presentados en este trabajo confirman la idea de que a pesar de haber estudiado el plegamiento de las proteínas por más de 50 años, aún existen muchas preguntas por responder. Las pautas que determinan un control cinético o termodinámico en el proceso de plegamiento/desplegamiento no son conocidas en su totalidad, pero trabajos como el realizado pueden acercarnos a tener una visión más amplia sobre el tema. Lo que hasta ahora conocemos, es la punta de un iceberg cuyo fondo día tras día vamos descubriendo. Sin duda alguna, las investigaciones actuales y futuras, permitirán comprender el mecanismo de plegamiento de proteínas y posiblemente, encontrar una solución al problema del plegamiento de éstas.

CONCLUSIONES

1. La eficiencia catalítica de las TIMs estudiadas indica que en todas, la catálisis está limitada por difusión.
2. En todas las enzimas el estado oligomérico es un dímero.
3. Para *Np*TIM y *Go*TIM, el desplegamiento térmico es un proceso irreversible y controlado cinéticamente. Dicha desnaturalización, responde a un modelo de dos estados irreversible (Lumry-Eyring): $N \rightarrow F$.
4. El valor de energía de activación para *Np*TIM y *Go*TIM, se encuentra entre los reportados previamente para otras TIMs.
5. El estado de transición para *Np*TIM y *Go*TIM es dimérico y muy parecido al nativo en términos de exposición al solvente.
6. Por primera vez se encontró que para un grupo de TIMs (*Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sco*TIM), el desplegamiento térmico es reversible y está al equilibrio. El proceso responde a un modelo de dos estados con disociación: $N_2 \rightleftharpoons 2D$. La reversibilidad del proceso puede tener algún significado evolutivo de acuerdo al nicho ecológico en el que habitan estas bacterias y su ubicación en el árbol filogenético.
7. El valor de ΔG de estabilidad a 25 °C para *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sco*TIM es de aproximadamente la mitad del reportado para otras TIMs, lo que puede indicar un “pago” fisicoquímico por la reversibilidad del desplegamiento térmico.
8. Los resultados presentados en este trabajo indican que para el miembro fundador de la topología de barriles TIM, la secuencia de aminoácidos seleccionada evolutivamente, determina si el proceso de plegamiento/desplegamiento, está bajo control cinético o termodinámico.

PERSPECTIVAS

1. Caracterizar energéticamente el mecanismo de disociación de las TIMs bacterianas.
2. Resolver la estructura tridimensional de las TIMs bacterianas que faltaron determinar en el presente estudio.
3. Hacer otros análisis y comparaciones estructurales entre TIMs con desplegamiento térmico reversible e irreversible para encontrar alguna posible causa molecular de la reversibilidad en este proceso.
4. Determinar la vía de plegamiento de las TIMs bacterianas utilizando agentes caotrópicos como la urea, GdnHCl o ambos.
5. Estudiar otras proteínas derivadas de organismos extantes con el fin de completar mejor el árbol filogenético de la TIM en el dominio Bacteria.
6. Realizar una reconstrucción de proteínas ancestrales de la TIM y analizar algunos ancestros evolutivos con el fin de encontrar una relación biológica del surgimiento/mantenimiento de la reversibilidad/irreversibilidad en el proceso de desnaturalización térmica.
7. Analizar la termoestabilidad de la TIM desde una perspectiva evolutiva que permita describir la historia del paisaje conformacional de esta enzima y su adaptación a la temperatura a lo largo del tiempo y en diferentes nichos ecológicos.

BIBLIOGRAFÍA

A

1. **Abendroth, J., and B. Staker.** 2009. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Mycobacterium tuberculosis*. **To be published.**
2. **Abendroth, J., T. E. Edwards, and B. Staker.** 2009. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Bartonella henselae* at 1.6 Å resolution. **To be published.**
3. **Abbott, I. A. C. A. Lembi, and J. Waaland.** 1989. Algae and human affairs. **1st edition.** New York, USA: Cambridge University Press-Phycological Society of America.
4. **Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, and P. H. Zwart.** 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst Sect D.* **66(2):** 213-221. Website: <http://www.phenix-online.org/>
5. **Ahern, T. J., J. I. Casal, G. A. Petsko, and A. M. Klibanov.** 1987. Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA.* **84(3):** 675-679.
6. **Alahuhta, M., M. Salin, M. G. Casteleijn, C. Kemmer, I. El-Sayed, K. Augustyns, P. Neubauer, and R. K. Wierenga.** 2008. Structure-based protein engineering efforts with a monomeric TIM variant: the importance of a single point mutation for generating an active site with suitable binding properties. *Prot Eng Design and Select.* **21(4):** 257-266.
7. **Albery, W. J., and J. R. Knowles.** 1976. Free-Energy Profile for the Reaction Catalyzed by Triosephosphate Isomerase. *Biochemistry.* **15(25):** 5627–5631.
8. **Alvarez, M., J. P. Zeelen, V. Mainfroid, F. Rentier-Delrue, J. A. Martial, L. Wyns, R. K. Wierenga, and D. Maes.** 1998. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J Biol Chem.* **273(4):** 2199–2206.
9. **Alvarez, M., J. Wouters, D. Maesi, V. Mainfroid, F. Rentier-Delrue, L. Wynsi, E. Depiereux, and J. A. Martial.** 1999. Lys¹³ plays a crucial role in the functional adaptation of the thermophilic triose-phosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus* to high temperatures. *J Biol Chem.* **274(27):** 19181–19187.
10. **Anfisen, C. B.** 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* **181(96):**223-230.
11. **Anfinsen, C. B., E. Haber, M. Sela, and F. H. White.** 1961. The kinetics of formation of native ribonucleasa during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Nat Acad Sci.* **47(2):** 1309-1314.
12. **Aparicio, R., S. T. Ferreira, and I. Polikarpov.** 2003. Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity. *J Mol Biol.* **334(5):** 1023-1041.
13. **Arolas, J. L., F. X. Aviles, J-Y. Chang, and S. Ventura.** 2006. Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *TRENDS Biochem Sci.* **31(5):** 292-301.

B

14. **Banaszak, L. N. Winter, Z. Xu, D. A. Bernlohr, S. Cowan, and T. A. Jones.** 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Prot Chem.* **45(4):** 89-151.
15. **Banner, D. W., A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. C. Phillips, C. I. Pogson, I. A. Wilson, P. H. Corran, A. J. Furth, J. D. Milman, R. E. Offord, J. D. Priddle, and S. G. Waley.** 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using aminoacid sequence data. *Nature.* **255(5510):** 609-614.
16. **Battista, J. R.** 1997. Against all odd: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Ann Rev Microbiol.* **51(3):** 203-224.

17. **Battistuzzi, F., A. Feijao, and S. Hedges.** 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol.* **4(44)**: 44-58.
18. **Beaucamp, N., A. Hofmann, B. Kellerer, and R. Jeanicke.** 1997. Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Prot Sci.* **6(10)**: 2159-2165.
19. **Becktel, W. J., and J. A. Schellman.** 1987. Protein stability curves. *Biopolymers.* **26(5)**: 1859-1877.
20. **Benitez-Cardoza, C. G., A. Rojo-Dominguez, and A. Hernandez-Arana.** 2001. Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry.* **40(30)**: 9049-9058.
21. **Benson, D. A., M. Cavanaugh, L. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and E. W. Sayers.** 2013. GenBank. *Nucl Acids Res.* **41(1)**: D36-D42. Website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
22. **Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeño-Tárraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Hopwood.** 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete "*Streptomyces coelicolor*" A3. *Nature.* **417(2)**: 141-147.
23. **Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer.** 2002. *Biochemistry.* 5th edition. New York, USA: WH Freeman.
24. **Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. E. Meyer Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi.** 1977. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol.* **112(3)**: 535-542. Database website: <http://www.rcsb.org/pdb/>; deposit website: <http://www.deposit.rcsb.org/adit/>; validate website: <http://www.validate.rcsb.org/>
25. **Borchert, T. V., K. Prat, J. Zeelen, M. Callens, M. E. Noble, F. R. Opperdoes, P. A. M. Michels, and R. K. Wierenga.** 1993. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation of a dimer-interface mutant. *Eur J Bioche.* **211(3)**: 703-710.
26. **Borchert, T.V., K. V. Kishan, J. P. Zeelen, W. Schliebs, N. Thanki, R. Abagyan, R. Jaenicke, and R. K. Wierenga.** 1995. Three new crystal structures of point mutation variants of monoTIM: conformational flexibility of loop-1, loop-4 and loop-8. *Structure.* **3(7)**: 669-679.
27. **Borchert, T. V., R. Abagyan, R. Jaenicke, and R. K. Wierenga.** 1994. Design, creation and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci.* **91(2)**: 1515-1518.
28. **Brandts, J. F.** 1964. The thermodynamics of protein denaturation. *J Amer Chem Soc.* **86(20)**: 4291-4301.
29. **Brenner, D. J., N. R. Krieg, and J. T. Staley.** 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* 2nd edition. New York, USA: Springer.
30. **Brim, H., S. C. McFarlan, J. K. Fredrickson, K. W. Minton, M. Zhai, L. P. Wackett, and M. J. Daly.** 2000. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotech.* **18(1)**: 85-90.
31. **Brook, I.** 2007. The role of anaerobic bacteria in cutaneous and soft tissue abscesses and infected cysts. *Anaerobe.* **13(5-6)**: 171-177.
32. **Brown, J., and W. Doolittle.** 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61(4)**: 456-502.

33. **Bryngelson, J. D.** 1995. Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins*. **21(4)**: 164-195.

C

34. **Cabrera, N., G. Hernandez-Alcantara, G. Mendoza-Hernandez, A. Gomez-Puyou, and R. Perez-Monfort.** 2008. Key residues of loop 3 in the interaction with the interface residue at position 14 in triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*. **47(11)**: 3499-3506.
35. **Casal, J. I., T. J. Ahern, R. C. Davenport, G. A. Petsko, and A. M. Klibanov.** 1987. Subunit interface of triosephosphate isomerase: site-directed mutagenesis and characterization of the altered enzyme. *Biochemistry*. **100(3)**: 702-710.
36. **Cavalier-Smith, T.** 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International J Syst Evol Microbiol*. **52(2)**: 297-354.
37. **Cavalier-Smith, T.** 2006a. Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **361(1470)**: 969–1006.
38. **Cavalier-Smith, T.** 2006b. Rooting the tree of life by transition analyses. *Biol Direct*. **1(1)**: 19.
39. **Chanez-Cardenas, M. E., D. A. Fernandez-Velasco, E. Vazquez-Contreras, R. Coria-Ortega, G. Saab-Rincon, and R. Perez-Monfort.** 2002. Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Arch Biochem Biophys*. **399(2)**: 117-129.
40. **Chanez-Cardenas, M. E., G. Perez-Hernandez, B. G. Sanchez-Rebollar, M. Costas, and E. Vázquez-Contreras.** 2005. Reversible equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in guanidium hydrochloride involves stable dimeric and monomeric intermediates. *Biochemistry*. **44(32)**: 10883-10892.
41. **Chassy, B. M., and A. Giuffrida.** 1980. Method for the lysis of gram-positive, Asporogenous bacteria with lysozyme. *Appl Environ Microbiol*. **39(1)**: 153-158.
42. **Chiti, F., N. Taddei, P. M. White, M. Bucciantini, F. Magherini, M. Stefani, and C. M. Dobson.** 1999. Mutational analysis of acylphosphatase suggests the importance of topology and contact order in protein folding. *Nat Struct Biol*. **6(2)**: 1005-1009.
43. **Chu, C-H., Y-J. Lai, H. Huang, and Y-J. Sun.** 2008. Kinetic and structural properties of triosephosphate isomerase from *Helicobacter pylori*. *Proteins*. **71(2)**: 396–406.
44. **Ciccarelli, F.D., T. Doerks, C. von Mering, C. J. Creevey, B. Snel, and P. Bork.** 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*. **311(5765)**: 1283-1287.
45. **Cisneros-Armas, D. A.** 2003. Termodinámica de la disociación de la Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba histolytica*. Tesis de grado. Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
46. **Clarke, J., E. Cota, S. B. Fowler, and S. J. Hamill.** 1999. Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich suggest that they share a common folding pathway. *Structure*. **7(9)**: 1145-1153.
47. **Costas, M., D. Rodriguez-Larrea, L. de Maria, T. V. Borchert, A. Gomez-Puyou, and J. M. Sanchez-Ruiz.** 2009. Between-Species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J Mol Biol*. **385(2)**: 924-937.
48. **Creighton, T. E.** 1990. Protein Folding. *Biochemistry*. **270(1)**: 1-16.
49. **Creighton, T. E.** 1996. Proteins: Structure and molecular properties. **2nd edition**. New York, USA: W. H. Freeman and Company.

D

50. **D'Alessio, G.** 1999. The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility. *Biochemistry*. **72(1)**: 271-298.

51. **Dalessio, P. M., and I. J. Ropson.** 2000. β -sheet proteins with nearly identical structures have different folding intermediates. *Biochemistry*. **39(2)**: 860-871.
52. **Daly, M. J.** 2009. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol*. **7(1)**: 237-245.
53. **Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M. V. Omerchenko, H. M. Kostandarithes, K. S. Makarova, L. P. Wackett, J. K. Fredrickson, and D. Ghosal.** 2004. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*. **306(5698)**: 1025-1028.
54. **Dagan, T., M. Roettger, D. Bryant, and W. Martin.** 2010. Genome networks root the tree of life between prokaryotic domains. *Gen Biol Evol*. **2(1)**: 379-392.
55. **Davis, I. W., A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall III, J. Snoeyink, J. S. Richardson, and D. C. Richardson.** 2007. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucl Acids Res*. **35(W)**: W375-W383. Website: <http://www.molprobity.biochem.duke.edu/>
56. **Delboni, L. F., S. C. Mande, F. Reintier-Delrue, V. Mainfroid, S. Turtley, F. M.D. Vellieux, J. A. Martial, and W. G. J. Hol.** 1995. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Prot Sci*. **4(12)**: 2594-604.
57. **DeLong, E., and N. Pace.** 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol*. **50(4)**: 470-478.
58. **Derreumaux, P., and T. Schlick.** 1998. The loop opening/closing motion of the enzyme triosephosphate isomerase. *Biophys J*. **74(1)**: 72-81.
59. **Di Giulio, M.** 2003. The universal ancestor and the ancestor of bacteria were hyperthermophiles. *J Mol Evol*. **57(6)**: 721-730.
60. **Dill, K. A., and D. Shortle.** 1991. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem*. **60(5)**: 795-825.
61. **Dill, K. A., and H. S. Chan.** 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol*. **4(3)**: 10-18.
62. **Dobson, C. M.** 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*. **18526(6968)**: 884-890
63. **Dyall, S., M. Brown, and P. Johnson.** 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*. **304(5668)**: 253-257.

E

64. **Edwards, T. E., J. W. Fairman, and SSGCID.** 2012. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Burkholderia thailandensis*. To be published.
65. **Enriquez-Flores, S., A. Rodriguez-Romero, G. Hernandez-Alcantara, J. Oria-Hernandez, P. Gutierrez-Castrellon, G. Perez-Hernandez, I. de la Mora-de la Mora, A. Castillo-Villanueva, I. Garcia-Torres, S. T. Mendez, S. Gomez-Manzo, A. Torres-Arroyo, G. Lopez-Velazquez, and H. Reyes-Vivas.** 2011. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins*. **79(9)**: 2711-2724.
66. **Emsley, P., and K. Cowtan.** 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D*. **60(12)**: 2126-2132. Website: <http://www.biop.ox.ac.uk/coot/>

F

-
67. **Ferguson, N., A. P. Capaldi, R. James, C. Kleanthous, and S. E. Radford.** 1999. Rapid folding with and without populated intermediates in the homologous four-helix proteins Im7 and Im9. *J Mol Biol.* **286(6)**: 1597-1608.
68. **Fersht, A.** 1999. Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. **1st edition.** New York, USA: Freeman.
69. **Figuroa-Angulo, E. E., P. Estrella-Hernandez, H. Salgado-Lugo, A. Ochoa-Leyva, A. Gomez-Puyou, S. S. Campos, G. Montero-Moran, J. Ortega-Lopez, G. Saab-Rincon, R. Arroyo, C. Benitez-Cardoza, and L. G. Brieba.** 2012. Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerase from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology.* **139(2)**: 1729-1738.
70. **Frank, H. S., and M. W. Evans.** 1945. Free volume and entropy in condensed systems III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *J Chem Phys.* **13(11)**: 507-532.
71. **Freire, E.** 1995. Differential Scanning Calorimetry, in: Protein stability and folding: Theory and practice. Serie: Methods in molecular biology. Vol. 40. Shirley, B. A. Berlin, Germany: Springer. **1st edition**: 191-218.
72. **Fuerst, J. A., and R. I. Webb.** 1991. Membrane-bounded nucleoid in the eubacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc Natl Acad Sci.* **88(1)**: 8184-8188.

G

-
73. **Garel, J. R.** 1992. Folding the large proteins: multidomain and multisubunit proteins, in: Protein Folding. T. E. Creighton. **2nd edition**: 405-454.
74. **Garza-Ramos, G., M. T. de Gomez-Puyou, and R. W. Gracy.** 1992. Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur J Biochem.* **208(2)**: 389-395.
75. **Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch.** 2005. Protein identification and analysis tools on the Expasy server, in: The proteomics protocols handbook. Walker, J. M. New York, USA: Humana Press. **1st edition**: 571-607. Website: <http://web.expasy.org/protparam/>
76. **Gayathri, P., M. Banerjee, A. Vijayalakshmi, S. Azeez, H. Balaram, P. Balaram, and M. R. N. Murthy.** 2007. Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr Sect D.* **63(2)**: 206-220.
77. **Gokhale, R.S., S. S. Ray, H. Balaram, and P. Balaram.** 1999. Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry.* **38(1)**: 423-431.
78. **Gomez-Puyou, A., E. Saavedra-Lira, I. Becker, R. A. Zubillaga, A. Rojo-Dominguez, and R. Perez-Montfort.** 1995. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *J Chem Biol.* **2(12)**: 847-55.
79. **Gonzalez-Mondragon, E., R. A. Zubillaga, E. Saavedra, M. E. Chanez-Cardenas, R. Perez-Montfort, and A. Hernandez-Arana.** 2004. Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry.* **43(11)**: 3255-3263.
80. **Goodsell, D. S., and A. J. Olson.** 2000. Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **20(1)**: 105-153.
81. **Gopal, B., S. S. Ray, R. S. Gokhale, H. Balaram, M. R. N. Murthy, and P. Balaram.** 1999. Cavity-creating mutation at the dimer interface of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry.* **38(1)**: 478-486.
82. **Gruebele, M.** 2005. Downhill protein folding: evolution meets physics. *C R Biol.* **238(8)**: 701-712.

83. **Gunasekaran, K., S. J. Eyles, A. T. Hagler, and L. M. Gierasch.** 2001. Keeping it in the family: folding studies of related proteins. *Curr Opin in Struct Biol.* **11(1)**: 83-93.
84. **Gupta, R.** 2000. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit Rev Microbiol.* **26(2)**: 111-131.
85. **Guruprasad, K., B. V. Reddy, and M. W. Pandit.** 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Prot Eng.* **4(2)**: 155-161.
86. **Guzman-Casado, M., A. Parody-Morreale, S. Robic, S. Marqusee, and J. M. Sanchez-Ruiz.** 2003. Energetic evidence for formation of a pH-dependent hydrophobic cluster in the denatured state of *Thermus thermophilus* ribonuclease H. *J Mol Biol.* **329(4)**: 731-743.
87. **Guzman-Luna, V., and G. Garza-Ramos.** 2012. The folding pathway of glycosomal triosephosphate isomerase: Structural insights into equilibrium intermediates. *Proteins.* **80(2)**: 1669–1682.

H

88. **Hadley, C., and D. T. Jones.** 1999. A systematic comparison of protein structure classifications: SCOP, CATH and FSSP. *Structure.* **7(9)**: 1099-1112. SCOP website: <http://www.scop.mrc-lmb.cam.ac.uk>; CATH website: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath>; FSSP website: <http://www2.embl-ebi.ac.uk/dali/fssp>
89. **Hernandez-Alcantara, G., G. Garza-Ramos, G. M. Hernandez, A. Gomez-Puyou, and R. Perez-Montfort.** 2002. Catalysis and stability of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry.* **41(13)**: 4230-4238.
90. **Hernandez-Alcantara, G., A. Rodriguez-Romero, H. Reyes-Vivas, J. Peon, N. Cabrera, C. Ortiz, S. Enríquez-Flores, I. de la Mora-de la Mora, and G. Lopez-Velazquez.** 2008. Unraveling the mechanisms of tryptophan fluorescence quenching in the triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia*. *Biochim Biophys Acta.* **1784(11)**: 1493-1500.

I

91. **Ibarra-Molero, B., and J. M. Sanchez-Ruiz.** 2006. Differential Scanning Calorimetry of proteins: An overview and some recent developments, in: *Advanced Techniques on Biophysics*. Arrondo J. L. R., and A. Alonso. Berlin, Germany: Springer. **1st edition**: 27-48.

J

92. **Jacobs, C., J-M. Frere, and S. Normark.** 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* **88(6)**: 823-832.
93. **Jaenicke, R.** 1991. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Adv Protein Chem.* **30(13)**: 3147-3461.
94. **Jimenez, L., D. A. Fernandez-Velasco, K. Willms, and A. Landa.** 2003. A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *J Parasitol.* **89(2)**: 209-214.
95. **Jimenez, L., N. Vibanco-Perez, L. Navarro, and A. Landa.** 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol.* **30(9)**: 1007-1012.

96. **Joseph-McCarthy, D., E. Lolis, E. A. Komives, and G. A. Petsko.** 1994. Crystal structure of the K12M/G15A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry*. **33(10)**: 2815-2823.
97. **Joubert, F., A. W. H. Neitz, and A. I. Louw.** 2001. Structure-based inhibitor screening: a family of sulfonated dye inhibitors for malaria parasite triosephosphate isomerase. *Prot Struct Funct Genet*. **45(2)**: 136-143.

K

98. **Kabsch, W.** 2010. XDS. *Acta Crystallogr Sect D*. **66(2)**: 125-132. Website: <http://www.xds-viewer.sourceforge.net/>
99. **Katoh, K., and D. M. Standley.** 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. **30(4)**: 772-780.
100. **Kauzmann, W.** 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Prot Chem*. **14(2)**: 1-63.
101. **Kim, D. E., C. Fisher, and D. Baker.** 2000. A breakdown of symmetry in the folding transition state of protein L. *J Mol Biol*. **298(5)**: 971-984.
102. **Kishan, R., J. P. Zeelen, M. E. Noble, T. V. Borchert, V. Mainfroid, K. Goraj, J. A. Martial, and R. K. Wierenga.** 1994. Modular mutagenesis of a TIM-barrel enzyme: the crystal structure of a chimeric *E. coli* TIM having the eighth beta alpha-unit replaced by the equivalent unit of chicken TIM. *Protein Eng*. **7(8)**: 945-951.
103. **Knobeloch, D., A. Schmidt, P. Scheerer, N. Krauss, H. Wessner, Ch. Scholz, G. Küettner, T. Von Rintelen, A. Wessel, and W. Höehne.** 2010. A coleopteran triosephosphate isomerase: X-ray structure and phylogenetic impact of insect sequences. *Ins Mol Biol*. **19(1)**: 35-48.
104. **Knowles, J. R.** 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*. **350(2)**: 121-124.
105. **Knowles, J. R., and W. J. Albery.** 1977. Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Acc Chem Res*. **10(4)**: 105-111.
106. **Kohl, L., M. Callens, R. K. Wierenga, F. R. Opperdoes, and P. A. Michels.** 1994. Triosephosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur J Biochem*. **220(2)**: 331-338.
107. **Komives, E. A., L. C. Chang, E. Lolis, R. F. Tilton, G. A. Petsko, and J. R. Knowles.** 1991. Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine 95. *Biochemistry*. **30(12)**: 3011-3019.
108. **Kragelund, B. B., P. Højrup, M. S. Jensen, C. K. Schjerling, E. Juul, J. Knudsen, and F. M. Poulsen.** 1996. Fast and one-step folding of closely and distantly related homologous proteins of a four-helix bundle family. *J Mol Biol*. **256(1)**: 187-200.
109. **Krebs, H., F. X. Schmid, and R. Jaenicke.** 1983. Folding of homologous proteins. The refolding of different ribonucleases is independent of sequence variations, proline content and glycosylation. *J Mol Biol*. **169(2)**: 619-635.
110. **Krietsch, W. K. G., P. G. Pentchev, H. Klingenburg, T. Hofstätter, and T. Bücher.** 1970. The isolation and crystallization of yeast and rabbit liver triose phosphate isomerase and a comparative characterization with the rabbit muscle enzyme. *Eur J Biochem*. **14(2)**: 289-300.
111. **Kumar, K., P. Bhargava, and U. Roy.** 2012. Cloning, overexpression and characterization of *Leishmania donovani* triosephosphate isomerase. *Exp Parasitol*. **130(4)**: 430-436.

L

112. **Lake, J. A., R. G. Skophammer, C. W. Herbold, and J. A. Servin.** 2009. Genome beginnings: rooting the tree of life. *Phil Trans R Soc B*. **364(1)**: 2177-2185.

113. **Lambeir, A. M., F. R. Opperdoes, and R. K. Wierenga.** 1987. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei*: a comparison with the rabbit muscle and yeast enzymes. *Eur J Biochem.* **168(1)**: 69-74.
114. **Lambeir, A. M., J. Backmann, J. Ruiz-Sanz, V. Filimonov, J. E. Nielsen, I. Kursula, B. V. Norledge, and R. K. Wierenga.** 2000. The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur J Biochem.* **267(9)**: 2516-2524.
115. **Landa, A., A. Rojo-Dominguez, L. Jimenez, and D. A. Fernandez-Velasco.** 1997. Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem.* **247(2)**: 348-355.
116. **Lang, B., M. Gray, and G. Burger.** 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet.* **33(1)**: 351-397.
117. **Lecomte, T. J. J., D. A. Vuletich, and A. M. Lesk.** 2005. Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. *Curr Opin in Struct Biol.* **15(2)**: 290-301.
118. **LiCata, V. J., and C-C. Liu.** 2011. Analysis of free energy versus temperature curves in protein folding and macromolecular interactions. *Meth Enzymol.* **488(4)**: 219-238.
119. **Lodi, P. J., L. C. Chang, J. R. Knowles, and E. A. Komives.** 1994. Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the roles of lysine-12. *Biochemistry.* **33(10)**: 2809-2814.
120. **Lolis, E., and G. A. Petsko.** 1990. Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate 2.5 Å resolution: implication for catalysis. *Biochemistry.* **29(28)**: 6619-6625.
121. **Lopez-Velazquez, G., D. Molina-Ortiz, N. Cabrera, G. Hernandez-Alcantara, J. Peon-Peralta, L. Yepez-Mulia, R. Perez-Montfort, and H. Reyes-Vivas.** 2004. An unusual triosephosphate isomerase from early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins.* **55(4)**: 824-834.
122. **Lyubarev, A. E., B. I. Kurganov, A. A. Burlakova, and V. N. Orlov.** 1998. Irreversible thermal denaturation of uridine phosphorylase from *Escherichia coli* K-12. *Biophys Chem.* **70(3)**: 247-257.

M

123. **Madden, T. L., R. L. Tatusov, and J. Zhang.** 1996. Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* **266(1)**: 131-141. Website: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
124. **Maes, D., J. P. Zeelen, N. Thanki, N. Beaucamp, M. Alvarez, M. H. D. Thi, J. Backmann, J. A. Martial, L. Wyns, R. Jaenicke, and R. K. Wierenga.** 1999. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins.* **37(3)**: 441-453.
125. **Mainfroid, V., S. C. Mande, W. G. J. Hol, J. Martial, and K. Goraj.** 1996a. Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual α -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry.* **35(13)**: 4110-4117.
126. **Mainfroid, V., P. Terpstra, M. Beauregard, J-M. Frère, S. C. Mande, W. G. J. Hol, J. A. Martial, and K. Goraj.** 1996b. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J Mol Biol.* **257(2)**: 441-456.
127. **Maithal, K., G. Ravindra, H. Balaram, and P. Balaram.** 2002. Inhibition of *Plasmodium falciparum* triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *J Biol Chem.* **277(28)**: 25106-25114.
128. **Makhatadze, G. I., V. N. Medvedkin, and P. L. Privalov.** 1990. Partial molar volumes of polypeptides and their constituent groups in aqueous solution over a broad temperature range. *Biopolymers.* **30(11-12)**: 1001-1010.
129. **Maldonado, E., M. Soriano-Garcia, A. Moreno, N. Cabrera, G. Garza-Ramos, M. T. de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, and R. Perez-Montfort.** 1998. Differences in the intersubunit contacts in

- triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J Mol Biol.* **283(1)**: 193-203.
130. **Mande, S. C., V. Mainfroid, K. H. Kalk, K. Goraj, J. A. Martial, and W. G. Hol.** 1994. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Prot Sci.* **3(5)**: 810-821.
131. **Mathur, D., G. Malik, and L. C. Garg.** 2006. Biochemical and functional characterization of triosephosphate isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEMS Microbiol Lett.* **263(2)**: 229–235.
132. **Mathews, C. K., K. E. Van Holde, D. R. Appling, and S. J. Anthony-Cahill.** 2012. *Biochemistry, 4th edition.* New Jersey, USA: Prentice Hall.
133. **Mattimore, V., and J. R. Battista.** 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bact.* **178(3)**: 633–637.
134. **McCallister, E. L., E. Alm, and D. Baker.** 2000. Critical role of beta-hairpin formation in protein G folding. *Nat Struct Biol.* **7(8)**: 669–673.
135. **McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read.** 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst.* **40(4)**: 658-674. Website: <http://www.phaser.cimr.cam.ac.uk/>
136. **McFadden, G.** 1999. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol.* **2(6)**: 513-519.
137. **Milardi, D., C. la Rosa, S. Fasone, and D. Grasso.** 1997. An alternative approach in the structure-based predictions of the thermodynamics of protein unfolding. *Biophys Chem.* **69(5)**: 43-51.
138. **Moraes, J., R. Arreola, N. Cabrera, L. Saramago, D. Freitas, A. Masuda, I. Vaz da Silva, M. T. de Gomez-Puyou, R. Perez-Montfort, A. Gomez-Puyou, and C. Logullo.** 2011. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem Mol Biol.* **41(2)**: 400-409.
139. **Morgan, C. J., D. K. Wilkins, L. J. Smith, Y. Kawata, and C. M. Dobson.** 2000. A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J Mol Biol.* **300(1)**: 11-16.
140. **Mukherjee, S., A. Roychowdhury, D. Dutta, B. Saha, and A. K. Das.** 2011. Crystal structure of Triosephosphate isomerase from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* at 1.9 Angstrom resolution. **To be published.**
141. **Myers, J. K., C. N. Pace, and J. M. Scholtz.** 1995. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein folding. *Prot Sci.* **4(3)**: 2138-2148.

N

142. **Nagano, N., C. A. Orengo, and J. M. Thornton.** 2002. One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol.* **321(5)**: 741–765.
143. **Najera, H., M. Costas, and D. A. Fernandez-Velasco.** 2003. Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reos for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J.* **370(3)**: 785-792.
144. **Nakamura, T., K. Makabe, K. Tomoyori, K. Maki, A. Mukaiyama, and K. Kuwajima.** 2010. Different holding pathways taken by highly homologous proteins, g α -lactalbumin and canine milk lysozyme. *J Mol Biol.* **396(8)**: 1361-1378.
145. **Nakashima, H., K. Nishikawa, and T. Ooi.** 1986. The folding type of a protein is relevant to the aminoacid composition. *J Biochem.* **99(1)**: 153-162.

146. Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd edition. New York, USA: Worth.
147. Neumann, N., and G. Snatzke. 1990. Circular dichroism of proteins, in: Proteins: Form and function. Bradshaw, R. A., and M. Purton. New York, USA: Elsevier. 1st edition: 107-117.
148. Nguyen, T.N., Abendroth, J., Leibly, D.J., Le, K.P., Guo, W., Kelley, A., Stewart, L., Myler, P.J., Van Voorhis, W.C, and SSGCID. 2011. Structure of triosephosphate isomerase from *Cryptosporidium parvum*. Acta Crystallogr Sect F. **67(3)**: 1095-1099.
149. Nishimura, C., S. Prytulla, H. J. Dyson., and P. E. Wright. 2000. Conservation of folding pathways in evolutionarily distant globin sequences. Nat Struct Biol. **7(8)**: 679-687.
150. Noble, M. E., J. P. Zeelen, and R. K. Wierenga. 1993. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. Acta Crystallogr Sect D. **49(4)**: 403-417.
151. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). 1992. Enzyme Nomenclature. 1st edition. California, USA: Academic Press.
152. Norledge, B. V., A. M. Lamberir, A. R. Abagyan, A. Rottman, A. M. Fernández, V. V. Filimonov, M. G. Peter, and R. W. Wierenga. 2001. Modeling, mutagenesis, and structural studies on the fully conserved phosphate-binding loop (loop 8) of triosephosphate isomerase: Toward a new substrate specificity. Proteins. **42(3)**: 383-389.

P

153. Pace, C. N., B. A. Shirley, M. McNutt, and K. Gajiwala. 1996. Forces contributing to the conformational stability of proteins. FASEB J. **10(1)**: 75-83.
154. Pace, C. N., F. Vadjos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Prot Sci. **4(11)**: 2411-2423.
155. Pain, R. H. 2000. Mechanisms of protein folding. 2nd Edition. New York, USA: Oxford University Press.
156. Pardo-Avila, F. 2011. Evolución de la Triosafosfato Isomerasa. Tesis de grado. Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
157. Pavankumar, T. L., A. K. Sinha, and M. K. Ray. 2010. All three subunits of RecBCD enzyme are essential for DNA repair and low-temperature growth in the Antarctic *Pseudomonas syringae* Lz4W. PLoS One. **5(2)**: 9412-9431.
158. Pearson. T., P. Giffard, S. Beckstrom-Sternberg, R. Auerbach, H. Hornstra1, A. Tuanyok, E. P. Price, M. B. Glass, B. Leadem, J. S. Beckstrom-Sternberg, G. J. Allan, J. T. Foster, D. M. Wagner, R. T. Okinaka, S. H. Sim, O. Pearson, Z. Wu. J. Chang, R. Kaul, A. R. Hoffmaster, T. S. Brettin, R. A. Robison, M. Mayo, J. E. Gee, P. Tan, B. J. Currie, and P. Keim. 2009. Phylogeographic reconstruction of a bacterial species with high levels of lateral gene transfer. BMC Biol. **7(1)**: 78-92.
159. Peimbert, M., L. Dominguez-Dominguez, and D. A. Fernandez-Velasco. 2008a. Hydrophobic repacking of the dimer interface of triosephosphate isomerase by *in silico* design and directed evolution. Biochemistry. **47(20)**: 5556-5564.
160. Peimbert, M., L. Dominguez-Ramirez, L. A. Tellez, L. M. Blancas, and D. A. Fernandez-Velasco. 2008b. Triosephosphate Isomerase, in: Advances in Protein Physical Chemistry. Garcia-Hernandez, E., and D. A. Fernandez-Velasco. Kerala, India: Transworld Research Network. 1st edition: 193-217.
161. Perez-Montfort, R., G. Garza-Ramos, G. H. Alcantara, H. Reyes-Vivas, X. G. Gao, E. Maldonado, M. T. de Gomez-Puyou, and A. Gomez-Puyou. 1999. Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. Biochemistry. **38(13)**: 4114-4120.

162. **Perl, D. C. Welker, T. Schindler, K. Schroder, M. A. Marahiel, R. Jaenicke, and F. X. Schmid.** 1998. Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat Struct Biol.* **5(1)**: 229-235.
163. **Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin.** 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* **25(13)**: 1605-1612. Website: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
164. **Plaut, B., and J. R. Knowles.** 1972. pH-Dependence of the triose phosphate isomerase reaction. *Biochemistry.* **129(1)**: 311-320.
165. **Pompliano, D.L., A. Peyman, and J. R. Knowles, J.R.** 1990. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* **29(13)**: 3186–3194.
166. **Poole, A., and D. Penny.** 2007. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioessays.* **29(1)**: 74-84.
167. **Privalov, P. L.,** 1980. Scanning microcalorimeters for studying macromolecules. *Pure Appl Chem.* **52(2)**: 479-497.
168. **Privalov, P. L., and N. N. Khechinashvili.** 1974. A thermodynamic approach to the protein problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J Mol Biol.* **86(3)**: 665-684.
169. **Puigbo, P., E. Guzmán, A. Romeu, and S. Garcia-Vallvé.** 2007 OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucl Acids Res.* **35(2)**: W126-W131. Website: <http://www.genomes.urv.es/OPTIMIZER/>
170. **Puigbo, P., Y. I. Wolf, and E. V. Koonin.** 2010. The tree and net components of prokaryote evolution. *Gen Biol Evol.* **2(1)**: 745-756.
171. **Putman, S. J., A. F. W. Coulson, I. R. T. Farley, B. Riddleston, and J. R. Knowles.** 1972. Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochemistry.* **129(2)**: 301-310.

R

172. **Razvi, A., and J. M. Scholtz.** 2006. Lessons in stability from thermophilic proteins. *Prot Sci.* **15(2)**: 1569-1578.
173. **Reardon, D., and G. K. Faber.** 1995. The structure and evolution of α/β proteins. *FASEB J.* **9(2)**: 497-503.
174. **Rees, D. C., and A. D. Robertson.** 2001. Some thermodynamic implication for the thermostability of proteins. *Prot Sci.* **10(1)**: 1187-1194.
175. **Reid, K. L., H. M. Rodriguez, N. J. Hillier, and L. M. Gregoret.** 2000. Stability and folding properties of a model β -sheet protein, *Escherichia coli* CspA. *Prot Sci.* **9(3)**: 1993-2000.
176. **Reyes-Vivas, H., A. Diaz, J. Peon, G. Mendoza-Hernandez, G. Hernandez-Alcantara, I. de la Mora-de la Mora, S. Enriquez-Flores, L. Dominguez-Ramirez, and G. Lopez-Velazquez.** 2007. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *J Mol Biol.* **365(3)**: 752-763.
177. **Reyes-Vivas, H., E. Martinez-Martinez, G. Mendoza-Hernandez, G. Lopez-Velazquez, R. Perez-Monfort, M. T. de Gomez-Puyou, and A. Gomez-Puyou.** 2002. Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins.* **48(3)**: 580-590.
178. **Reyes-Vivas, H., G. Hernandez-Alcantara, G. Lopez-Velazquez, N. Cabrera, R. Perez-Montfort, M. T. de Gomez-Puyou, and A. Gomez-Puyou.** 2001. Factors that control the reactivity of the interace cysteine of trisephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry.* **40(10)**: 3134-3140.

179. Rietveld, A. W., and S. T. Ferreira. 1996. Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: persistent heterogeneity of a protein dimer. *Biochemistry*. **35(24)**: 7743-7751.
180. Robertson, A. D., and K. P. Murphy. 1997. Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem Rev*. **97(1)**: 1251-1267.
181. Rodriguez-Romero, A., A. Hernandez-Santoyo, L. Del Pozo-Yauner, A. Kornhauser, and D. A. Fernandez-Velasco. 2002. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J Mol Biol*. **322(4)**: 669-675.
182. Ropson, I. J., J. A. Boyer, B. A. Schaeffer, and P. M. Dalessio. 2008. Comparison of the folding mechanism of highly homologous proteins in the lipid-binding protein family. *Proteins*. **75(4)**: 799-806.
183. Rose, I. A., and E. O'Connell. 1961. Intramolecular hydrogen transfer in the phosphoglucose isomerase reaction. *J Biol Chem*. **236(1)**: 3086-3092.
184. Röthlisberger, D., O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, and D. Baker. 2008. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*. **453(7192)**: 190-195.

S

185. Saab-Rincon, G., V. Rivelino-Juarez, J. Osuna, F. Sanchez, and J. Soberon. 2001. Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Prot Engin*. **14(3)**: 149-155.
186. Salgado-Lugo, H., S. Lara-Gonzalez, and L. G. Brieba. 2012. Crystal structure of *Trichomonas vaginalis* triosephosphate isomerase TVAG_096350 gene. **To be published**.
187. Salton, M. R. J. 1953. Cell structure and the enzymic lysis of bacteria. *J Gen Microbiol*. **9(1)**: 512-523.
188. Sanchez-Ruiz, J. M. 1992. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J*. **61(4)**: 921-935.
189. Sanchez-Ruiz, J. M. 2010. Protein kinetic stability. *Biophys Chem*. **148(1-3)**: 1-15.
190. Sanchez-Ruiz, J. M. 2011. Probing free-energy surfaces with differential scanning calorimetry. *Annu Rev Phys Chem*. **62(2)**: 231-255.
191. Schindler, T., P. L. Graumann, D. Perl, S. Ma, F. X. Schmid, and M. A. Marahiel. 1999. The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. Stability and dynamics in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. **274(2)**: 3407-3413.
192. Schliebs, W., N. Thanki, R. Eritja, and R. K. Wierenga. 1996. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Prot Sci*. **5(2)**: 229-239.
193. Schliebs, W., N. Thanki, R. Jaenicke, and R. K. Wierenga. 1997. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*. **36(32)**: 9655-9962.
194. Schopf, J. 1994. Disparate rates, differing fates: tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proc Natl Acad Sci*. **91(15)**: 6735-6742.
195. Scott, K. A., S. Batey, K. A. Hooton, and J. Clarke. 2004. The folding of spectrin domains I: wild-type domains have the same stability but different kinetic properties. *J Mol Biol*. **344(2)**: 195-205.
196. Seiki, E., N. Matsuda, S. Yokoyama, and T. Kigawa. 2008. Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. *Anal Biochem*. **377(2)**: 156-161.
197. Shi, Y., J. H. Liu, H. J. Zhang, and Y. Ding. 2008. Equilibrium unfolding mechanism of chicken muscle triose phosphate isomerase. *Prot Pept Lett*. **15(4)**: 365-370.

198. **Shiao, D. F., R. Lymry, and J. Fahey.** 1971. Studies of chymotrypsinogen family proteins. Heat capacity changes accompanying reversible unfolding of proteins. *J Amer Chem Soc.* **93(8)**: 2024-2035.
199. **Skoog, D. A., F. J. Holler, and S. R. Crouch.** 2006. Principles of instrumental analysis. **6th edition.** Connecticut, USA: Cengage Learning.
200. **Somero, G.** 1995. Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol.* **57(2)**: 43-68.
201. **Sun, A. Q., K. U. Yuksel, and R. W. Gracy.** 1992a. Interaction between the catalytic centers and subunit interface of triosephosphate isomerase probed by refolding, active site modification, and subunit exchange. *J Biol Chem.* **267(3)**: 20168-20174.
202. **Sun, A. Q., K. U. Yuksel, and R. W. Gracy.** 1992b. Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation. *Arch Biochem Biophys.* **293(2)**: 382: 390.
203. **Sun, J., and N. S. Sampson.** 1999. Understanding protein lids, kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* **38(35)**: 11474-11481.
204. **Sun, W. Y., S. X. Liu, P. J. Brindley, and D. P. McManus.** 1999. Bacterial expression and characterization of functional recombinant triosephosphate isomerase from *Schistosoma japonicum*. *Prot Expr Purif.* **17(3)**: 410-413.
205. **Symersky, J., S. Li, M. Carson, and M. Luo.** 2003. Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Prot Struct Funct Genet.* **51(3)**: 484-486.

T

206. **Takahashi, K., and J. M. Sturtevant.** 1981. Thermal denaturation of *Streptomyces* subtilisin inhibitor, subtilisin BPN', and the inhibitor-subtilisin complex. *Biochemistry.* **20(21)**: 6185-90
207. **Tellez L.A., L. M. Blancas-Mejia, E. Carrillo-Nava, G. Mendoza-Hernandez, D. A. Cisneros, and D. A. Fernandez-Velasco.** 2008. Thermal unfolding of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*: dimer dissociation leads to extensive unfolding. *Biochemistry.* **47(44)**:11665-11673.
208. **Thanki, N., J. Zeelen, M. Mathieu, R. Jaenicke, R. A. Abagyan, R. K. Wierenga, and W. Schliebs.** 1997. Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): the modeling and structure verification of a seven residue loop. *Prot Engin.* **10(2)**: 159-167.
209. **Trentham, D. R., C. H. McMurray, and C. I. Pogson.** 1969. The active chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reaction with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochem J.* **114(1)**: 19-24.

V

210. **Vazquez-Contreras, E., B. G. Sanchez-Rebollar, and M. E. Chanez-Cardenas.** 2004. The equilibrium unfolding of triosephosphate isomerase from *T. Cruzi* in guanidinium hydrochloride is a four state process. *Intrinsic Fluorescence Studies. Rev Soc Quim Mex.* **48(2)**: 296-299.
211. **Vazquez-Perez, A. R., and D. A. Fernandez-Velasco.** 2007. Pressure and denaturants in the unfolding of triosephosphate isomerase: the monomeric intermediates of the enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry.* **46(29)**: 8624-8633.
212. **Velanker, S. S., S. S. Ray, R. S. Gokhale, S. Suma, H. Balaram, P. Balaram, and M. R. N. Murthy.** 1997. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: The crystal structure provides insights into antimalarial drugs design. *Structure.* **5(6)**: 751-761.
213. **Vivian, J. T., and P. R. Callis.** 2001. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J.* **80(5)**: 2093-2109.
214. **Voet, D., J. Voet, and C. Pratt.** 2006. Fundamentals of Biochemistry. Life at the molecular level. **2nd edition.** New York, USA: Wiley.

W

215. **Walden, H., G. S. Bell, R. J. M. Rusell, B. Siebers, R. Hensel, and G. L. Taylor.** 2001. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* **306(2)**: 745-754.
216. **Walden, H., G. L. Taylor, E. Lorentzen, E. Pohl, H. Lilie, A. Schramm, T. Knura, K. Stubble, B. Tjaden, and R. Hensel.** 2004. Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J Mol Biol.* **342(3)**: 861-875.
217. **Wallace, L. A., and R. Matthews.** 2002. Highly divergent dihydrofolate reductases conserve complex folding mechanisms. *J Mol Biol.* **315(2)**:193-211.
218. **Wang, M., L. S. Yafremava, D. Caetano-Anolles, J. E. Mittenthal, and G. Caetano-Anolles.** 2007. Reductive evolution of architectural repertoires in proteomes and the birth of the tripartite world. *Gen Res.* **17(11)**: 1572–85.
219. **Waterhouse, A.M., J. B. Procter, D. M. A. Martin, and G. J. Barton.** 2009. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* **25(9)**: 1189-1191. Website: <http://www.jalview.org/>
220. **Watve, M. G., R. Tickoo, M. M. Jog, and B. D. Bhole.** 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch microbiol.* **176(5)**: 386-390.
221. **Wells, C.L., and T. D. Wilkins.** 1996. Clostridia: Sporeforming anaerobic bacilli, in: Barron's Medical Microbiology. S. Barron. Texas, USA: University of Texas Medical Branch. **4th edition**: 28-31.
222. **Wensley, B. G., M. Gärtner, W. X. Choo, S. Batey, and J. Clarke.** 2009. Different members of a simple three-helix bundle protein family have very different folding rate constants and fold by different mechanisms. *J Mol Biol.* **390(5)**: 1074-1085.
223. **Wierenga, R. K.** 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492(3)**: 193–198.
224. **Wierenga, R. K., K. H. Kalk, and W. G. J. Hol.** 1987. Structure determination of the glycosomal triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei brucei* at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.* **198(1)**: 109-121.
225. **Wierenga, R. K., M. E. M. Noble, G. Vriend, and S. Nauche.** 1991. Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J Mol Biol.* **220(4)**: 995-1015.
226. **Wierenga, R. K., M. E. Noble, and R. C. Davenport.** 1992. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J Mol Biol.* **224(4)**: 1115-1126.
227. **Williams, J. C., J. P. Zeelen, G. Neubauer, G. Vriend, J. Backmann, P. A. Michels, A. M. Labeir, and R. K. Wierenga.** 1999. Structural and mutagenesis studies of *Leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Prot Eng.* **12(3)**: 243-250.
228. **Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, and K. S. Wilson.** 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr Sect D.* **67(4)**: 235-242. Website: <http://www.ccp4.ac.uk/>
229. **Woese, C., O. Kandler, and M. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proc Natl Acad Sci.* **87(12)**: 4576-4579.
230. **Wolynes, P. G., Z. Luthey-Schulten, and J. N. Onuchic.** 1996. Fast folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes. *Chem Biol.* **3(6)**: 425-432.
231. **Wong, T. Y., and X. T. Yao.** 1994. The DeLey-Duodoroff pathway of galactose metabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Env Microb.* **60(6)**: 2065-2068.

Y

232. Yamamoto, H., and N. Kunishima. 2005. Crystal structure of TT0473, putative triosephosphate isomerase from *Thermus thermophilus* HB8. **To be published.**

Z

233. Zabori, S., R. Rudolph, and R. Jaenicke. 1980. Folding and association of triose phosphate isomerase from rabbit muscle. *Z Naturforsch.* **35(11-12)**: 999-1004.
234. Zarate-Perez, F., M. E. Chanez-Cárdenas, R. Arreola, A. Torres-Larios, and E. Vazquez-Contreras. 2009. Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. *Biochem Biophys Commun.* **382(3)**: 626-630.
235. Zarrine-Afsar, A., S. M. Larson, and A. R. Davidson. 2005. The family feud: do proteins with similar structures fold via the same pathway? *Curr Opin in Struct Biol.* **15(2)**: 42-49.
236. Zhu, C., A. Anderson, Z. Zhang, S. Xiao, A. Schubart, H. B. Xiong, J. Imitola, S. Khoury, X. X. Zheng, T. Strom, and V. Kuchroo. 2006. The TIM-3 and its ligand mediated signaling negatively regulates T helper type 1 immunity. *Clin Immunol.* **119(2)**: S110.
237. Zomosa-Signoret, V., B. Aguirre-Lopez, G. Hernandez-Alcantara, R. Perez-Montfort, M. T. de Gomez-Puyou, and A. Gomez-Puyou. 2007. Crosstalk between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *Proteins.* **67(1)**: 75-83.
238. Zomosa-Signoret, V., G. Hernandez-Alcantara, H. Reyes-Vivas, E. Martinez-Martinez, G. Garza-Ramos, R. Perez-Montfort, M. T. de Gomez-Puyou, and A. Gomez-Puyou. 2003. Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry.* **42(11)**: 3311-3318.

APÉNDICE A

El siguiente cladograma muestra más en detalle los supertaxones a los que pertenecen las bacterias y señala además las relaciones entre los distintos grupos bacterianos, de acuerdo con las ideas de Cavalier-Smith (figura 83) (Cavalier-Smith, 2006).

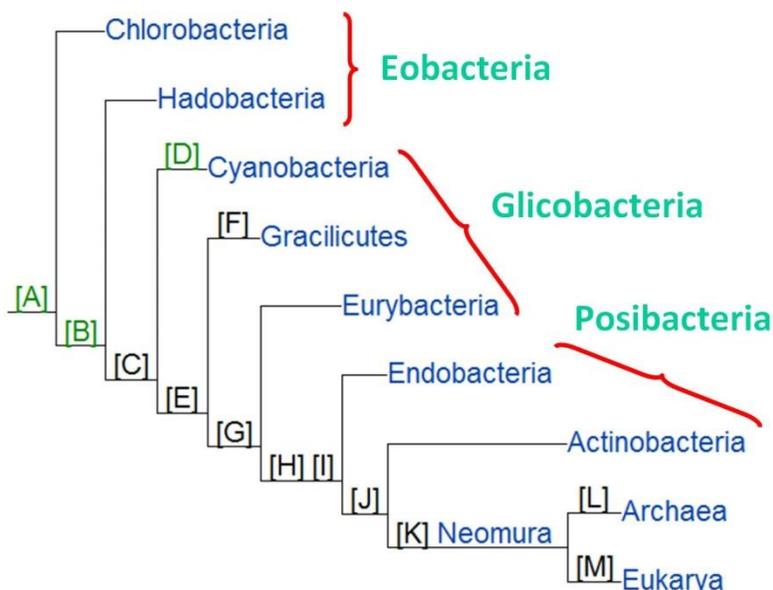


Figura 83. Cladograma que muestra la relación genética entre los distintos grupos bacterianos y su relación con los dominios Archaea y Eukarya. Se detallan los 3 supertaxones y los taxones incluidos en cada uno de ellos (fuente: Cavalier-Smith, 2006a-b).

Eobacteria (Chlorobacteria + Hadobacteria): [A] Bacteria gramnegativa con pared de peptidoglicano; membrana externa carente de lipopolisacáridos; carencia de flagelos y endosporas; movilidad por deslizamiento bacterial; biología celular completamente desarrollada; presencia de citocromo c, clorosomas y fotosíntesis anoxigénica. [B] Surgimiento de Omp85 (un componente del mecanismo de inserción de proteínas en la membrana externa); desarrollo de cuatro nuevas catalasas; presencia de citocromo b; realización de fotosíntesis oxigénica, que podría haberse desarrollado en el antecesor común de Hadobacteria y Cyanobacteria, aunque los primeros son actualmente no fotosintéticos.

Glycobacteria (Cyanobacteria + Gracilicutes + Eurybacteria): [C] Surgimiento de la revolución glicobacteriana: bacteria gramnegativa con pared de peptidoglicano; membrana externa con inserción de moléculas complejas de lipopolisacáridos; presencia de hopanoides (agentes reforzantes de las membranas), ácido diaminopimérico, TolC y TonB en la pared de peptidoglicano. [D] Producción de ficobilisomas (estructuras de antena fotosintéticas presentes únicamente en cianobacterias y en ciertas algas). [E] Origen de los flagelos. [F] Cuatro inserciones en diversas proteínas: un aminoácido en Hsp60 y FtsZ y un dominio en las ARN polimerasas β y σ . [G] Formación de endosporas.

Posibacteria (Endobacteria + Actinobacteria): [H] Bacteria grampositiva: hipertrofia de la pared de peptidoglicano, pérdida de la membrana externa y origen de enzimas sortasas para enlazar las proteínas periplasmáticas a la pared celular y así evitar su pérdida. [I] Producción de glicerol 1-P deshidrogenasa (enzima que forma el glicerolfosfato de imagen especular al encontrado en los éter fosfolípidos bacterianos y eucariotas y característico de las arqueas). [J] Origen de los proteasomas; producción de fosfatidilinositol.

Neomura (Archaea + Eukarya): [K] Surgimiento de la revolución Neomura: el peptidoglicano y las lipoproteínas son sustituidos por glicoproteínas. [L] Producción de ADN girasa inversa (que induce un superenrollamiento positivo en el ADN para aumentar su estabilidad térmica); presencia de lípidos éter isoprenoides en la membrana citoplasmática. [M] Surgimiento de la fagotrofia; adquisición de mitocondrias; cambio en la estructura general de la célula.

Taxonomía bacteriana

Los fila bacterianos que se incluyen en el esquema evolutivo actualmente aceptado del dominio Bacteria, son los siguientes (Cavalier-Smith, 2006a-b; Cicarelli *et al.*, 2006):

- Supertaxón Eobacteria
 - **Taxón Chlorobacteria**
 - *Filo Chloroflexi* (bacterias verdes no del azufre). Pequeño filo de bacterias que realizan la fotosíntesis anoxigénica mediante bacterioclorofila, por lo que no producen oxígeno. Su vía de fijación del carbono también difiere de la de otras bacterias fotosintéticas. Son aerobias facultativas y típicamente filamentosas.
 - *Filo Thermomicrobia*. Pequeño filo de termófilos quimioheterótrofos.
 - **Taxón Hadobacteria**
 - *Filo Deinococcus-Thermus*. Grupo de quimiorganotrofos extremófilos altamente resistentes. Unas especies soportan el calor y el frío extremo, mientras que otras son resistentes a la radiación y a un gran número de sustancias tóxicas.
- Supertaxón Glycobacteria
 - **Taxón-Filo Cyanobacteria** (algas verde-azuladas). El grupo más importante de bacterias fotosintéticas. Presentan clorofila y realizan la fotosíntesis oxigénica. Son unicelulares o coloniales filamentosas.
 - **Taxón Gracilicutes**
 - *Filo Spirochaetes*. Bacterias quimioheterótrofas con forma alargada típicamente enrollada en espiral que se desplazan mediante rotación. Muchas producen enfermedades.

- *Filo Chlorobi* (bacterias verdes del azufre). Es un pequeño filo de bacterias fototrofas mediante bacterioclorofila y anaerobias obligadas. Una especie es termófila y vive en fuentes hidrotermales.
- *Filo Bacteroidetes*. Un extenso filo de bacterias con amplia distribución en el medio ambiente. Es un grupo heterogéneo que incluye aerobios obligados o anaerobios obligados, comensales, parásitos y formas de vida libre.
- *Filo Fibrobacteres*. Pequeño filo que incluye muchas de las bacterias estomacales que permiten la degradación de la celulosa en los rumiantes.
- *Filo Proteobacteria*. Es un grupo muy diverso y el segundo más extenso entre las bacterias. Casi todas son heterótrofas y muchas causantes de enfermedades, pero los rizobios son simbioses al realizar la fijación de nitrógeno y las bacterias púrpuras son fototrofas con bacterioclorofila.
- *Filo Aquificae*. Un pequeño grupo de bacterias quimiolitotrofas, termófilas o hipertermófilas. Se les encuentra en manantiales calientes, pozos sulfurosos y fuentes hidrotermales oceánicas.
- *Filo Deferribacteres*. Grupo de bacterias acuáticas anaerobias.
- *Filo Chrysiogenetes*. Comprende una sola especie de quimiolitotrofo. Tiene una bioquímica y una forma de vida únicas: en vez de respirar oxígeno, respira arseniato.
- *Filo Acidobacteria*. Pequeño filo de bacterias acidófilas comunes en el suelo. Incluye una bacteria fototrofa usando bacterioclorofila.

- *Filo Planctomycetes*. Bacterias principalmente acuáticas aerobias encontradas en agua dulce, salobre y marina. Su ciclo biológico implica la alternancia entre células sésiles y flageladas. Se reproducen por gemación.
 - *Filo Chlamydiae*. Un pequeño grupo de parásitos intracelulares obligados de las células eucariotas.
 - *Filo Lentisphaerae*. Pequeño grupo de bacterias recientemente descubiertas en aguas marinas y hábitats terrestres anaerobios.
 - *Filo Verrucomicrobia*. Comprende bacterias terrestres, acuáticas y algunas asociadas con huéspedes eucariotas.
- **Taxón Eurybacteria**
 - *Filo Fusobacteria*. Comprende un sólo género de bacterias heterótrofas anaerobias causantes de infecciones en humanos. Constituyen uno de los principales tipos de flora del aparato digestivo.
 - *Filo Thermotogae*. Un filo de hipertermófilos, anaerobios obligados, heterótrofos fermentativos.
- Supertaxón Posibacteria
 - **Taxón Endobacteria**
 - *Filo Dictyoglomi*. Comprende una sola especie de hipertermófilo, quimioorganotrofo y aerobio.

- *Filo Firmicutes*. Es el grupo más extenso y comprende a las bacterias Gram positivas con contenido GC bajo. Se encuentran en diversos hábitats, incluyendo algunos patógenos notables. Una de las familias, Heliobacteria, obtiene su energía a través de la fotosíntesis.

- **Taxón-filo Actinobacteria**. Un extenso filo de bacterias Gram positivas de contenido GC alto. Son comunes en el suelo aunque algunas habitan en plantas y animales, incluyendo algunos patógenos.

APÉNDICE B

Se muestran las curvas de estabilidad para *Dr*TIM, *Cp*TIM y *Sc*oTIM (figuras 66-68), que fueron construidas con los diferentes valores de ΔC_p (tablas 29-31) obtenidos por los métodos distintos antes explicados (sección de materiales y métodos). Se puede notar la semejanza de todas las curvas, razón por la cual se decidió únicamente utilizar la magnitud del ΔC_p obtenido del promedio de los datos experimentales para comparar los datos calorimétricos con los espectroscópicos (DC) (figuras 84-86).

Tabla 29. Valores utilizados para construir las distintas curvas de estabilidad para *Dr*TIM. Cada curva fue construida con un valor distinto ΔC_p (calculado por un método diferente en cada caso).

| Valor de ΔC_p utilizado para construir la curva | ΔH (kcal mol ⁻¹) | T_m (K) | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|--|--------------------------------------|-----------|--|
| Programa Microcal-Origin | 232 | 318.0 | 6.6 |
| Utilizando el método de Guzman-Casado <i>et al.</i> , 2003 | 232 | 318.0 | 6.6 |
| Promedio del ajuste al modelo de 2 estados con disociación | 232 | 318.0 | 6.2 |
| Paramétrico (Robertson y Murphy, 1997) | 232 | 318.0 | 6.9 |
| Promedio de los datos experimentales | 232 | 318.0 | 6.5 |

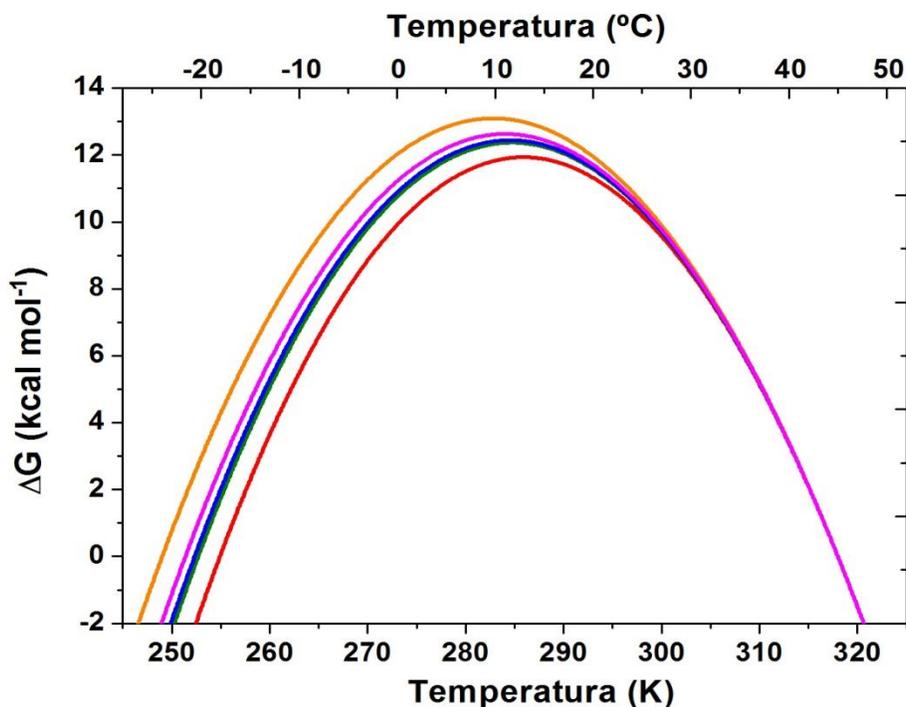


Figura 84. Curvas de estabilidad para *D_rTIM*. Las curvas fueron construidas con distintos valores de ΔC_p indicados en la tabla 4; Microcal-Origin (---), Guzman-Casado (---), Ajuste al modelo (---), Paramétrico (---), Promedio de los datos experimentales (---).

Tabla 30. Valores utilizados para construir las distintas curvas de estabilidad para *C_pTIM*. Cada curva fue construida con un valor distinto ΔC_p (calculado por un método diferente en cada caso).

| Valor de ΔC_p utilizado para construir la curva | ΔH (kcal mol ⁻¹) | T_m (K) | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|--|--------------------------------------|-----------|--|
| Programa Microcal-Origin | 251 | 332.00 | 6.7 |
| Utilizando el método de Guzman-Casado <i>et al.</i> , 2003 | 251 | 332.00 | 6.8 |
| Promedio del ajuste al modelo de 2 estados con disociación | 251 | 332.00 | 6.8 |
| Paramétrico (Robertson y Murphy, 1997) | 251 | 332.00 | 6.7 |
| Paramétrico (Milardi <i>et al.</i> , 1997) | 251 | 332.00 | 7.0 |

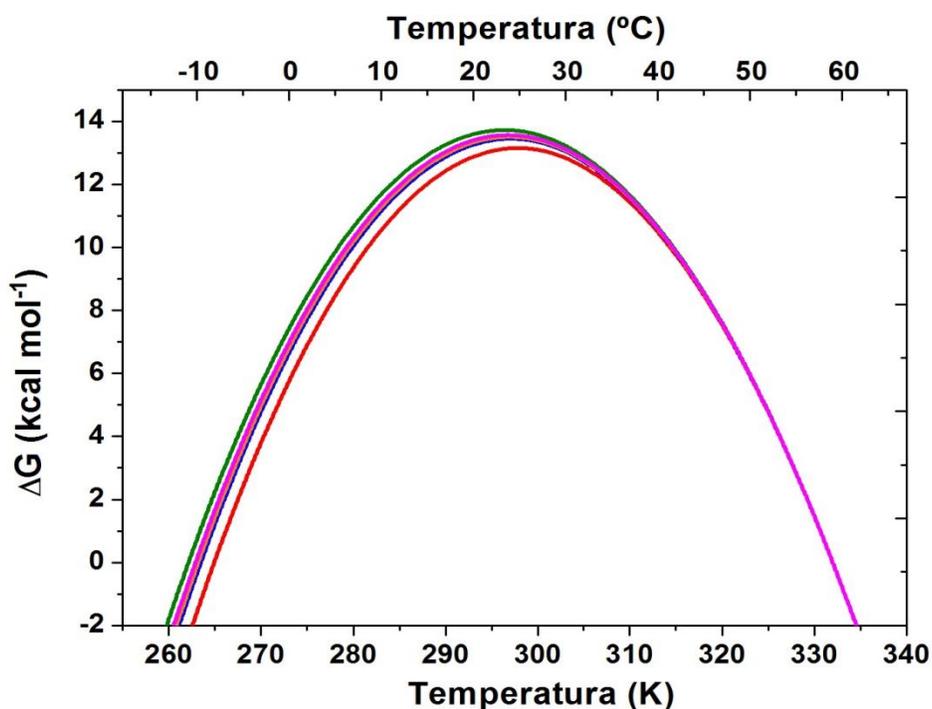


Figura 85. Curvas de estabilidad para C_p TIM. Las curvas fueron construidas con distintos valores de ΔC_p indicados en la tabla 4; Microcal-Origin (---), Guzman-Casado (---), Ajuste al modelo (---), Paramétrico (---), Promedio de los datos experimentales (---).

Tabla 31. Valores utilizados para construir las distintas curvas de estabilidad para Sco TIM. Cada curva fue construida con un valor distinto ΔC_p (calculado por un método diferente en cada caso).

| Valor de ΔC_p utilizado para construir la curva | ΔH (kcal mol ⁻¹) | T_m (K) | ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|--|--------------------------------------|-----------|--|
| Programa Microcal-Origin | 203 | 318.5 | 6.2 |
| Utilizando el método de Guzman-Casado <i>et al.</i> , 2003 | 203 | 318.5 | 6.2 |
| Promedio del ajuste al modelo de 2 estados con disociación | 203 | 318.5 | 6.6 |
| Paramétrico (Robertson y Murphy, 1997) | 203 | 318.5 | 6.3 |
| Paramétrico (Milardi <i>et al.</i> , 1997) | 203 | 318.5 | 7.2 |

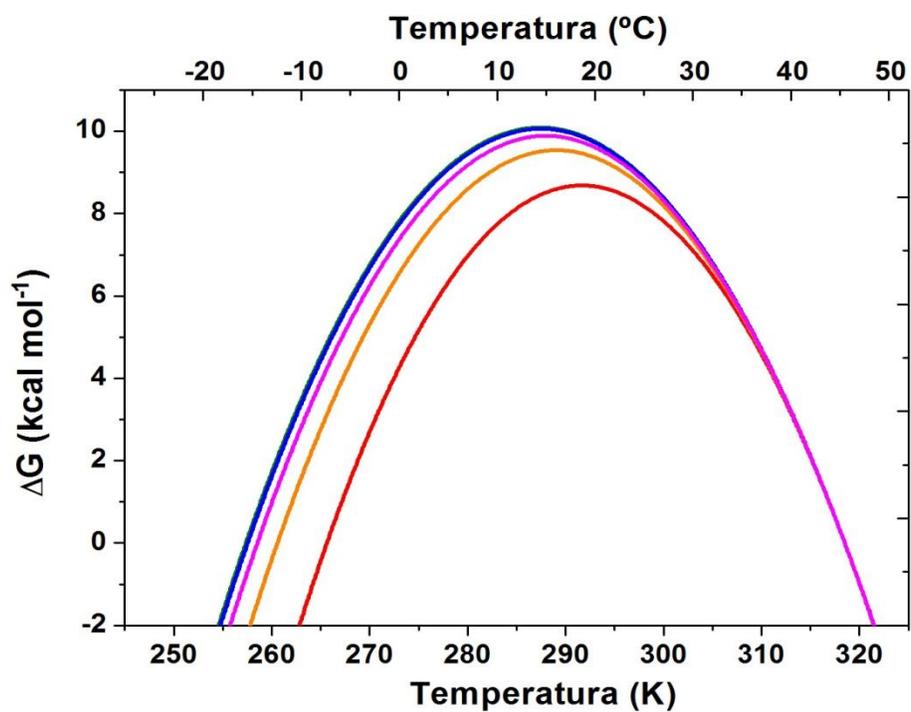


Figura 86. Curvas de estabilidad para ScoTIM. Las curvas fueron construidas con distintos valores de ΔC_p indicados en la tabla 4; Microcal-Origin (—), Guzman-Casado (—), Ajuste al modelo (—), Paramétrico (—), Promedio de los datos experimentales (—).

APÉNDICE C

En el presente apéndice se muestran las tablas de identidad y similitud en secuencia de aminoácidos para diversas TIMs estudiadas hasta el momento (tablas 32-33).

Tabla 32. Identidad en secuencia de aminoácidos para diversas TIMs estudiadas al momento.

En color blanco se indican los porcentajes de identidad del 0-39%, en amarillo del 40-59% y en rojo $\geq 60\%$.

| Especies elegidas / Especie comparada | Pw | Tt | Mj | Ec | Mm | Tth | Bh | Hp | Mt | Tm | Bs | Sc | Eh | Pf | Tb | Tc | Lm | Gi | Gg | Hs | Ce | Oc | Tmo | Rm | Dr | Np | Av | Go | Cp | Sco | |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|--|
| <i>Pyrococcus woesei</i> | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Thermoproteus tenax</i> | 52 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> | 66 | 47 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 15 | 19 | 20 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Moritella marina</i> | 18 | 21 | 16 | 64 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Thermus thermophilus</i> | 16 | 17 | 15 | 40 | 38 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bartonella henselae</i> | 17 | 16 | 17 | 35 | 33 | 34 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 15 | 14 | 14 | 28 | 26 | 37 | 27 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 17 | 19 | 17 | 39 | 39 | 47 | 33 | 26 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Thermotoga maritima</i> | 15 | 17 | 15 | 41 | 37 | 47 | 36 | 25 | 41 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 18 | 18 | 15 | 39 | 38 | 44 | 35 | 23 | 42 | 49 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 17 | 22 | 16 | 41 | 38 | 38 | 36 | 29 | 36 | 40 | 35 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 16 | 16 | 16 | 39 | 39 | 33 | 33 | 24 | 35 | 37 | 40 | 39 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 12 | 12 | 15 | 36 | 34 | 36 | 34 | 27 | 31 | 39 | 35 | 40 | 41 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | 17 | 17 | 13 | 38 | 35 | 36 | 32 | 26 | 36 | 40 | 38 | 47 | 41 | 40 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | 15 | 19 | 14 | 39 | 36 | 36 | 31 | 25 | 37 | 39 | 38 | 44 | 42 | 40 | 74 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Leishmania mexicana</i> | 17 | 20 | 16 | 38 | 34 | 37 | 31 | 26 | 36 | 40 | 42 | 44 | 49 | 42 | 70 | 68 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Giardia intestinalis</i> | 17 | 18 | 16 | 38 | 33 | 39 | 32 | 23 | 35 | 41 | 36 | 48 | 41 | 38 | 42 | 44 | 44 | 100 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Gallus gallus</i> | 17 | 17 | 19 | 40 | 36 | 35 | 35 | 27 | 36 | 40 | 37 | 52 | 46 | 42 | 50 | 47 | 48 | 43 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> | 18 | 17 | 20 | 40 | 36 | 34 | 35 | 26 | 35 | 40 | 36 | 52 | 45 | 42 | 50 | 49 | 48 | 44 | 89 | 100 | | | | | | | | | | | |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | 16 | 17 | 18 | 43 | 40 | 39 | 36 | 29 | 37 | 40 | 36 | 53 | 45 | 42 | 44 | 45 | 46 | 46 | 64 | 62 | 100 | | | | | | | | | | |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 19 | 18 | 20 | 39 | 34 | 34 | 34 | 27 | 30 | 38 | 36 | 51 | 43 | 41 | 48 | 48 | 47 | 42 | 88 | 98 | 62 | 100 | | | | | | | | | |
| <i>Tenebrio molitor</i> | 18 | 19 | 21 | 43 | 38 | 36 | 34 | 27 | 32 | 42 | 38 | 53 | 49 | 44 | 48 | 45 | 48 | 43 | 72 | 68 | 64 | 67 | 100 | | | | | | | | |
| <i>Rhipicephalus micropus</i> | 15 | 17 | 19 | 42 | 36 | 39 | 33 | 26 | 33 | 42 | 37 | 53 | 46 | 41 | 46 | 43 | 45 | 44 | 67 | 66 | 62 | 67 | 67 | 100 | | | | | | | |
| <i>Deinococcus radiodurans</i> | 17 | 18 | 17 | 36 | 38 | 50 | 40 | 25 | 45 | 36 | 39 | 34 | 32 | 32 | 34 | 36 | 34 | 34 | 36 | 36 | 36 | 35 | 35 | 35 | 100 | | | | | | |
| <i>Nostoc punctiforme</i> | 15 | 16 | 14 | 37 | 41 | 39 | 35 | 27 | 37 | 41 | 45 | 42 | 35 | 30 | 31 | 28 | 32 | 32 | 32 | 32 | 33 | 31 | 36 | 33 | 36 | 100 | | | | | |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> | 15 | 19 | 17 | 51 | 48 | 44 | 35 | 31 | 41 | 42 | 40 | 36 | 40 | 33 | 36 | 39 | 37 | 34 | 37 | 36 | 43 | 35 | 37 | 38 | 39 | 72 | 100 | | | | |
| <i>Gemmata obscuriglobus</i> | 19 | 18 | 18 | 44 | 41 | 47 | 35 | 27 | 44 | 50 | 44 | 39 | 40 | 37 | 39 | 38 | 37 | 38 | 43 | 43 | 45 | 42 | 42 | 41 | 36 | 37 | 46 | 100 | | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 18 | 16 | 16 | 44 | 42 | 43 | 37 | 23 | 40 | 51 | 55 | 38 | 40 | 36 | 39 | 39 | 41 | 38 | 38 | 37 | 39 | 37 | 40 | 40 | 40 | 40 | 45 | 40 | 43 | 100 | |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> | 14 | 15 | 16 | 40 | 39 | 45 | 34 | 27 | 66 | 44 | 46 | 34 | 39 | 31 | 33 | 35 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 34 | 36 | 38 | 47 | 43 | 38 | 43 | 51 | 100 | |

Tabla 33. Similitud en secuencia de aminoácidos para diversas TIMs estudiadas al momento.

En color blanco se indican los porcentajes de identidad del 0-39%, en amarillo del 40-59% y en rojo ≥ 60%.

| Especies elegidas / Especie comparada | Pw | Tt | Mj | Ec | Mm | Tth | Bh | Hp | Mt | Tm | Bs | Sc | Eh | Pf | Tb | Tc | Lm | Gi | Gg | Hs | Ce | Oc | Tmo | Rm | Dr | Np | Av | Go | Cp | Sco | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| <i>Pyrococcus woesei</i> | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Thermoproteus tenax</i> | 59 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> | 72 | 58 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 36 | 60 | 29 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Moritella marina</i> | 42 | 61 | 63 | 68 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Thermus thermophilus</i> | 46 | 60 | 60 | 41 | 68 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bartonella henselae</i> | 42 | 68 | 61 | 68 | 45 | 39 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 43 | 62 | 72 | 42 | 36 | 72 | 36 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 41 | 39 | 36 | 39 | 78 | 59 | 38 | 51 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Thermotoga maritima</i> | 40 | 65 | 68 | 78 | 80 | 68 | 61 | 52 | 54 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 44 | 72 | 32 | 49 | 61 | 58 | 70 | 52 | 59 | 48 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 42 | 63 | 62 | 58 | 62 | 66 | 62 | 52 | 39 | 49 | 37 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 46 | 54 | 54 | 62 | 72 | 39 | 72 | 58 | 59 | 42 | 45 | 39 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 41 | 52 | 48 | 72 | 68 | 59 | 62 | 54 | 62 | 72 | 56 | 51 | 52 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | 40 | 81 | 61 | 72 | 78 | 39 | 54 | 39 | 62 | 59 | 68 | 58 | 56 | 59 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | 43 | 52 | 69 | 68 | 72 | 59 | 63 | 65 | 69 | 52 | 59 | 58 | 56 | 54 | 68 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Leishmania mexicana</i> | 42 | 51 | 51 | 54 | 49 | 56 | 72 | 38 | 70 | 56 | 58 | 54 | 52 | 59 | 69 | 72 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Giardia intestinalis</i> | 40 | 63 | 62 | 72 | 74 | 78 | 51 | 62 | 49 | 54 | 72 | 59 | 63 | 39 | 64 | 56 | 68 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Gallus gallus</i> | 42 | 45 | 49 | 57 | 52 | 68 | 74 | 53 | 38 | 52 | 72 | 76 | 58 | 53 | 54 | 58 | 50 | 43 | 100 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> | 60 | 41 | 63 | 58 | 36 | 62 | 45 | 48 | 57 | 58 | 72 | 68 | 64 | 49 | 62 | 72 | 74 | 62 | 90 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | 38 | 42 | 64 | 59 | 54 | 39 | 64 | 59 | 62 | 57 | 69 | 58 | 52 | 48 | 61 | 59 | 62 | 72 | 78 | 74 | 100 | | | | | | | | | | | |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 62 | 46 | 52 | 60 | 59 | 54 | 55 | 58 | 52 | 37 | 56 | 49 | 47 | 52 | 68 | 72 | 55 | 65 | 91 | 99 | 74 | 100 | | | | | | | | | | |
| <i>Tenebrio molitor</i> | 61 | 62 | 54 | 52 | 56 | 62 | 72 | 54 | 66 | 54 | 49 | 61 | 58 | 61 | 60 | 59 | 61 | 58 | 74 | 71 | 68 | 70 | 100 | | | | | | | | | |
| <i>Rhipicephalus microplus</i> | 52 | 55 | 62 | 57 | 37 | 62 | 64 | 54 | 69 | 56 | 55 | 66 | 58 | 58 | 57 | 56 | 55 | 54 | 78 | 76 | 81 | 80 | 70 | 100 | | | | | | | | |
| <i>Deinococcus radiodurans</i> | 56 | 55 | 62 | 64 | 72 | 70 | 61 | 39 | 59 | 42 | 58 | 59 | 54 | 57 | 39 | 52 | 37 | 64 | 37 | 62 | 31 | 62 | 34 | 49 | 100 | | | | | | | |
| <i>Nostoc punctiforme</i> | 54 | 56 | 37 | 36 | 58 | 34 | 62 | 72 | 78 | 59 | 54 | 55 | 34 | 52 | 54 | 56 | 49 | 61 | 54 | 62 | 69 | 57 | 58 | 54 | 62 | 100 | | | | | | |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> | 59 | 58 | 57 | 62 | 64 | 68 | 39 | 39 | 51 | 64 | 66 | 69 | 58 | 59 | 37 | 38 | 62 | 61 | 36 | 68 | 54 | 38 | 37 | 68 | 72 | 82 | 100 | | | | | |
| <i>Gemmata obscuriglobus</i> | 39 | 62 | 81 | 56 | 61 | 68 | 64 | 69 | 71 | 62 | 59 | 60 | 51 | 59 | 58 | 49 | 36 | 69 | 59 | 57 | 62 | 59 | 62 | 54 | 69 | 35 | 56 | 100 | | | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 55 | 59 | 36 | 62 | 68 | 78 | 34 | 68 | 69 | 72 | 78 | 39 | 68 | 45 | 48 | 49 | 52 | 58 | 59 | 51 | 63 | 68 | 67 | 72 | 58 | 59 | 54 | 56 | 100 | | | |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> | 59 | 58 | 61 | 54 | 62 | 78 | 75 | 71 | 72 | 70 | 58 | 72 | 64 | 58 | 54 | 56 | 57 | 51 | 52 | 59 | 53 | 39 | 68 | 39 | 62 | 55 | 39 | 56 | 58 | 100 | | |