



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EVOLUCIÓN DE LA ESTABILIDAD EN LA ENZIMA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE EUCARIONTES**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

**MARIANA SCHULTE-SASSE
JIMÉNEZ**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)
DR. LEÓN PATRICIO MÁRTINEZ CASTILLA
[Facultad de Química, UNAM](#)

MÉXICO, D. F., diciembre, 2015



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.

Agradecimientos académicos

Agradezco en primer lugar a la UNAM, máxima casa de estudios que me ha acogido durante tantos años.

Al LFQIP (Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas), en donde realicé los experimentos presentados en esta tesis.

A mi tutor, el Dr. D. Alejandro Fernández Velasco por su inigualable asesoría.

A mi comité tutor, Dr. León Martínez Castilla y Dr. Diego González-Halphen, por sus comentarios críticos y entusiasmo en el avance del proyecto.

Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) y la Dra. Adela Rodríguez Romero por su ayuda con la cristalografía.

A la Facultad de Medicina.

A la DGAPA de la UNAM por el proyecto PAPIIT-IN 219913.

A la Dra. María Isabel Velázquez López y a la Mtra. Laura Ileana Álvarez Añorve por el trabajo técnico en el laboratorio.

A CONACYT, por la beca de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por los apoyos económicos para asistir al XXX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. y al 29th Annual Symposium of the Protein Society.

ÍNDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	6
Plegamiento de proteínas.....	7
Reconstrucción ancestral	10
La triosafosfato isomerasa.....	16
Antecedentes	21
Hipótesis	24
Objetivos	24
Materiales y Métodos	25
Purificación de proteínas	25
Dicroísmo circular (DC).....	25
Espectrometría de fluorescencia	26
Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	26
Catálisis.....	27
Cromatografía de exclusión molecular	28
Calorimetría de titulación y disociación isotérmica (ITC e IDC)	28
Cristalización y colección de datos.....	29
Análisis de la estructura	30
Resultados	31
Conclusiones y Discusión	55
Perspectivas.....	58
Bibliografía	60

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Plegamiento tipo barril TIM	9
Figura 2. Diversificación funcional en una familia de proteínas.	11
Tabla 1. Trabajos de reconstrucción ancestral de proteínas.....	14
Figura 3. Características generales y del sitio activo de la TIM.	17
Tabla 2. Parámetros catalíticos para TIM eucariontes.	18
Tabla 3. Parámetros catalíticos de TIMs monoméricas.	20
Figura 4. Árbol filogenético de eucariontes usado en la reconstrucción ancestral de la TIM.	23
Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de ancTIMs, ScTIM y HsTIM.....	31
Figura 6. Árbol filogenético de eucariontes. E.....	34
Figura 7. Distribución de sitios con respecto a su verosimilitud de reconstrucción.	35
Figura 8. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano para las ancTIM y ScTIM.	36
Tabla 4. Porcentaje de estructura secundaria obtenido con el programa CDNN..	36
Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia después de excitar a 295 nm..	37
Tabla 5. Radio hidrodinámico de ancTIMs	37
Figura 10. Desplegamiento térmico de ancTIMs.....	38
Tabla 6. Temperatura media de desnaturalización para ancTIMs	38
Figura 11. Cinéticas de Michaelis-Menten para las ancTIM en la dirección.....	40
Tabla 7. Parámetros cinéticos para las ancTIM	40
Figura 12. Cristalización de TIM63.....	41
Tabla 8. Parámetros cristalográficos resultantes del afinamiento de la estructura de TIM63.	42
Figura 13. Alineamiento estructural entre TIM63 y ScTIM.	43
Tabla 9. Comparación de características estructurales entre cristales de TIMs eucariontes.....	44
Tabla 10. Áreas de superficie en cristales de TIMs eucariontes.	45
Figura 14. Puentes salinos en la interfase de TIM63.	46
Figura 15. Distribución filogenética de puentes salinos en la interfase de la TIM.	47

Figura 16. Superposición de los sitios activos de ScTIM y TIM63. ScTIM en verde y TIM63 en morado.	48
Figura 17. ITC de unión de PGH a TIM63.....	49
Figura 18. Pérdida de la actividad en ancTIM dependiente de la dilución.	51
Tabla 11. Valores de la constante de disociación para ancTIMs.	51
Figura 19. Cambio de ΔH_{diss} y ΔS_{diss} con respecto a la temperatura para la disociación de TIM63.....	52
Figura 19. Gráfico de Arrhenius para el desplegamiento de TIM63.....	53
Tabla 12. Parámetros experimentales y paramétricos para la disociación de TIM63 y EhTIM.	54

RESUMEN

La enzima oligomérica triosafosfato isomerasa (TIM) tiene una topología tipo barril (beta/alfa)₈ y cataliza la interconversión de D-Gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato en una reacción limitada por difusión. A pesar de que cada subunidad tiene todos los residuos necesarios para formar el sitio activo, no se han reportado monómeros silvestres de TIM activos y, de hecho, la asociación entre subunidades es muy fuerte. Por un lado, la topología general de la TIM está sumamente conservada en los tres dominios de la vida; por el otro, tanto la identidad de secuencia como los mecanismos de plegamiento o las propiedades particulares de inhibición varían entre especies. Los estudios comparativos de proteínas han sido muy útiles para entender mejor la relación que existe entre la secuencia y las propiedades fisicoquímicas, sin embargo, éstos no tienen la capacidad de dar una visión mucho más integrativa y evolutiva. Para poder determinar cómo es que se generaron las propiedades catalíticas, el estado de oligomerización y la estabilidad de las TIMs existentes que hoy se observan, en este trabajo se examinó la historia molecular de las TIMs eucariontes a partir de la reconstrucción de proteínas ancestrales por métodos de máxima verosimilitud y la posterior caracterización fisicoquímica de cinco enzimas ancestrales (ancTIMs): TIM63, el ancestro común más reciente de los opistocontos, esto es, animales y hongos; TIM64 y TIM65, ancestros en el linaje animal; y TIM86 y TIM87, ancestros del grupo de los hongos. Los espectros de dicroísmo circular y fluorescencia de las ancTIMs son similares a los de las TIMs existentes y la estructura secundaria se pierde de manera cooperativa en una sola transición con temperaturas medias de desnaturalización elevadas (~68 °C). Todos los ancestros pierden la actividad al diluirse, lo que sugiere que solamente el dímero es la especie activa. Dado que TIM63 es el ancestro más antiguo y la enzima que presentó resultados más alejados a los obtenidos para TIMs existentes, se profundizó la caracterización de este ancestro. Experimentos de calorimetría de disociación isotérmica indican que la entalpía de disociación es pequeña y que la capacidad calorífica es tres veces mayor a la esperada para una disociación de cuerpo rígido, lo que sugiere un desplegamiento parcial de los monómeros durante el proceso. Si se compara la actividad de TIM63 con la de las TIMs existentes, ésta es 10 veces menor para la enzima ancestral,

mientras que la firma termodinámica de unión a PGH, un análogo del estado de transición, es similar. Estos datos indican que a pesar de que la asociación entre monómeros pudo haber sido más débil en TIMs ancestrales, al menos desde la aparición de los opistocontos, la catálisis ha estado ligada a la oligomerización. El análisis de la estructura cristalográfica de TIM63 obtenida a 1.9 Å de resolución, sugiere que no todos los contactos responsables de la estabilidad del dímero se encuentran directamente en la interfase, si no, en zonas alejadas de ella que hasta ahora no han sido analizadas a profundidad. Los resultados aquí expuestos demuestran que las TIMs ancestrales son dímeros compactos, catalíticamente activos con alta termoestabilidad y que se disocian con mayor facilidad que las TIMs existentes. La reconstrucción ancestral de proteínas es por tanto, una metodología integral muy potente que ayuda a encontrar determinantes moleculares en las proteínas que el estudio comparativo no es capaz de encontrar.

INTRODUCCIÓN

Desde el fitoplancton que sólo podemos observar en un microscopio hasta las ballenas azules que pueden pesar hasta 190 toneladas, se estima que hoy en día cohabitan entre 10 y 14 millones de especies el planeta, de las cuales solamente 2 millones han sido clasificadas (Miller and Spoolman 2012). Si de por sí el número es impresionante, más aún es que esta enorme biodiversidad sea el producto de al menos 3.5 mil millones de años de evolución (Raven and Johnson 2002). Tiempo durante el cual las condiciones en la tierra han cambiado continuamente más de una vez provocando así la necesidad en los organismos de cambiar y adaptarse para sobrevivir. La evolución es un proceso largo y complejo que se basa en la aparición espontánea y aleatoria de mutaciones en los genes, su posterior fijación en una población y depende de un proceso estocástico de deriva o de selección de características en específico. Esto puede aplicarse no solamente a los organismos, sino también a las células que los componen y, de manera más específica, a las biomoléculas que ellas contienen. Así como las mutaciones en los genes determinan la adecuación a nivel del organismo, los cambios en los residuos de la secuencia de una proteína determinan el *fitness* de la molécula en su contexto celular.

Si se observa a una célula en el microscopio o se analiza su actividad eléctrica o bioquímica, lo que realmente se está observando o midiendo son sus proteínas. Las proteínas efectúan prácticamente cualquier proceso que sucede en una célula. Desde un punto de vista químico son las moléculas estructuralmente más complejas y funcionalmente más sofisticadas que se conocen. Algunos ejemplos de las muchas funciones en las que participan son transporte, estabilidad estructural, expresión génica, señalización, biosíntesis de otras moléculas, reconocimiento molecular y metabolismo. La relación estructura-función en las proteínas es fundamental para entender el proceso de la vida.

Plegamiento de proteínas

Las proteínas son polímeros de aminoácidos, también llamados polipéptidos, de diferentes longitudes. Son 20 aminoácidos los que se usan en las células para sintetizar proteínas y se distinguen por la estructura química de su cadena lateral. Cada proteína es resultado de una combinatoria específica entre ellos, es decir, cada proteína tiene una secuencia característica de aminoácidos. Dado que el enlace entre residuos es siempre el mismo (enlace peptídico), lo que determina las diferencias en la estructura tridimensional que adoptan las proteínas son las cadenas laterales. Se llama plegamiento al proceso mediante el cual una proteína adopta su conformación tridimensional funcional (conformación nativa), a partir de una secuencia lineal; todavía se desconoce específicamente aquello que guía la fisicoquímica del proceso. Ya desde 1961 Anfinsen publicó el primer trabajo en el que demuestra que la Ribonucleasa A puede plegarse hasta llegar a la estructura nativa en ausencia de cofactores, es decir, solamente a partir de la secuencia lineal de aminoácidos (Anfinsen et al. 1961).

Algunas preguntas que han intrigado a científicos por décadas con respecto al tema son las siguientes: ¿cómo dictan las cadenas laterales de los aminoácidos el proceso de plegamiento? ¿Cómo encuentra una secuencia lineal su estructura tridimensional en el paisaje conformacional posible? Se podría pensar que secuencias similares llevan al mismo plegamiento o que secuencias muy diferentes codifican para plegamientos también diferentes, sin embargo, la segunda aseveración es falsa. Un ejemplo muy claro de esto es el del plegamiento tipo barril $(\beta/\alpha)_8$, también llamado barril TIM, representado en aproximadamente el 10% de las estructuras depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB) (Farber and Petsko 1990). Bases de datos de proteínas como SCOP y CATH (Murzin et al. 1995, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>; Orengo et al. 1997, <http://www.cathdb.info/>), que clasifican a las proteínas en función de su estructura, distinguen 33 y 29 superfamilias de barriles TIM, respectivamente. La mayoría son enzimas y hay al menos una representante con la topología de barril $(\beta/\alpha)_8$ en cinco de las seis clases definidas por la comisión de enzimas (EC) (Nagano, Orengo, and Thornton 2002; Wierenga 2001). Las secuencias tienen una alta variabilidad entre ellas, incluso cuando se trate de la misma enzima, por ejemplo, la *triosafosfato isomerasa* de

Plasmodium falciparum y la de *Pyrococcus woesei* presentan una identidad cercana a 12%.

El plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ consta de ocho repeticiones del motivo hebra β -asa-hélice α -asa que globalmente se acomodan para formar una hoja β cerrada con las hebras paralelas en el interior del barril rodeada por las hélices. Cada elemento de estructura secundaria está conectado entre sí por medio de asas, de manera que existen ocho asas $\beta\alpha$, que conectan el extremo carboxilo de las hebras con las hélices, y ocho asas $\alpha\beta$ que conectan el extremo carboxilo de las hélices con las hebras (Figura 1). Para todas las enzimas con este tipo de estructura tridimensional, sin importar la baja conservación de la secuencia, el sitio activo está localizado en la cara C-terminal del barril (denominada de esta manera por ser el extremo carboxilo de las hebras β), formado por las asas $\beta\alpha$, a pesar de que no presenta una evidente ventaja sobre la cara N-terminal; por ello se ha sugerido que los barriles tienen un origen evolutivo común (Nagano, Orengo, and Thornton 2002).

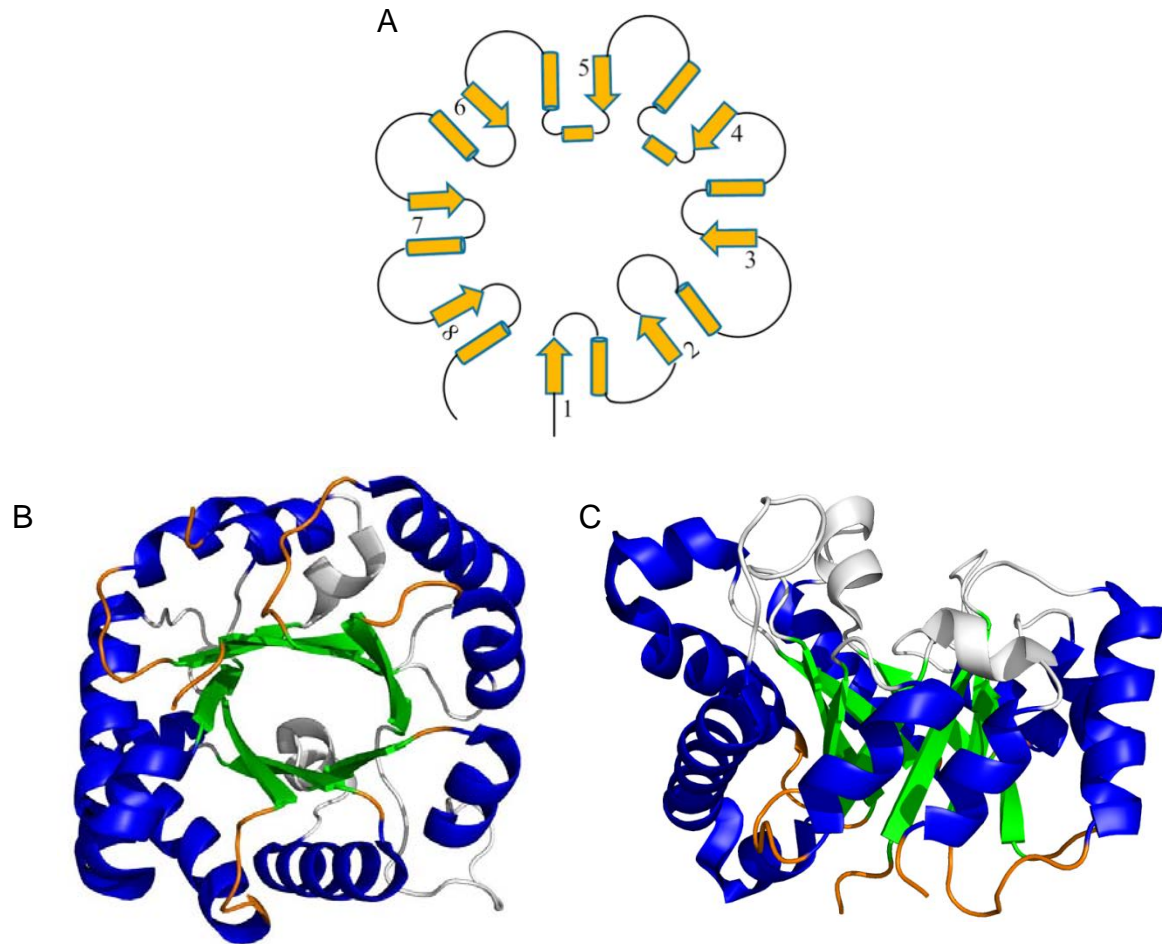


Figura 1. Plegamiento tipo barril TIM. A) Representación esquemática del plegamiento, las flechas representan las hebras β y los cilindros las hélices α . B) vista desde la base y C) vista lateral del barril. Código de colores, verde: hebras β , azul: hélices α , anaranjado: asas $\beta\alpha$, blanco: asas $\alpha\beta$.

Una aproximación común para estudiar el problema del plegamiento es hacer un estudio comparativo de proteínas homólogas. Si bien esto puede arrojar información muy valiosa sobre sitios específicos que son importantes, muchas veces queda poco claro cuáles son las posiciones importantes que llevan a diferencias sutiles.

Por ello, es importante tomar en cuenta que si bien las características fisicoquímicas de los aminoácidos que conforman una proteína determinan sus propiedades, las proteínas se encuentran en un ambiente celular que está sujeto al proceso evolutivo. Tanto las fuerzas evolutivas como las determinantes fisicoquímicas deben ser tomadas en cuenta si se quiere entender mejor el problema del plegamiento de proteínas.

Reconstrucción ancestral

Existen dos posibles caminos para realizar un análisis evolutivo en una familia de proteínas. El primero se basa en lo conocido, es decir, en las secuencias de las proteínas que existen hoy en día y se limita a una mínima exploración de las mismas. A partir de alineamientos se identifican las diferencias en las secuencias de proteínas homólogas que posiblemente generan diferencias en las propiedades funcionales. Por medio de mutagénesis sitio-dirigida se prueba el papel funcional de los residuos candidatos. Este enfoque “horizontal” encuentra en muchas ocasiones residuos importantes para una función, ya que al mutarlos se generan proteínas no funcionales, sin embargo, muy rara vez se encuentra el conjunto de aminoácidos necesarios para cambiar la función de una proteína por el de otra en la misma familia. Esto se debe, por un lado, a que pueden existir diferencias funcionalmente irrelevantes que se acumulan en las secuencias y, por el otro, a la epistasis. Esto último es el fenómeno en el que el efecto de una mutación depende del contexto genético en que se genere, es decir, de mutaciones previas y que por sí solas no hayan afectado la función de la proteína. Por ejemplo, hay mutaciones *permissivas* que propician el surgimiento de nuevas funciones y otras *restrictivas* que disminuyen la posibilidad de cambios. Si solamente se observan las diferencias en las secuencias existentes muchas veces se ignora la historia evolutiva (Figura 2) (Harms and Thornton 2010).

El segundo camino corresponde a un análisis filogenético explícito de manera “vertical”. Al conocer el contexto evolutivo de la proteína, es posible identificar los cambios que llevan a epistasis y tomarlos en cuenta. Para este tipo de enfoque es necesario primero conocer la historia evolutiva de las proteínas, es decir, conocer sus ancestros, los cuales por definición ya no existen. La única forma experimental de lograrlo es reconstruir a esos ancestros y “revivirlos” en el laboratorio. Para ello se utiliza la reconstrucción ancestral de secuencias (Thornton 2004; Liberles 2007).

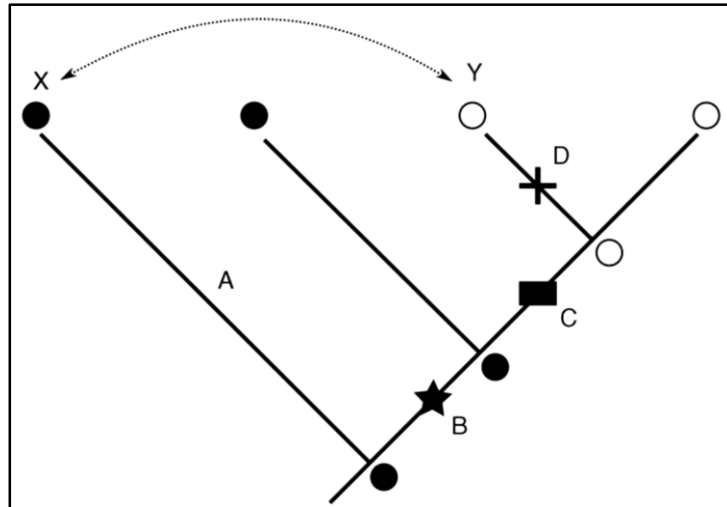
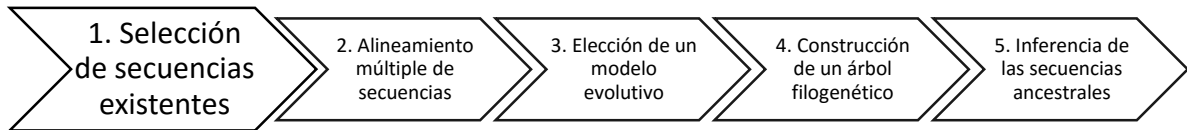


Figura 2. Diversificación funcional en una familia de proteínas. ●: función ancestral, ○: función derivada. El cambio funcional fue causado por un conjunto de cambios en la secuencia a lo largo de la rama C (■). En este escenario se requirieron mutaciones permisivas en la rama B (★) para que la proteína pueda tolerar las mutaciones necesarias para el cambio de función. En la rama D se acumularon mutaciones restrictivas incompatibles con la función ancestral (✕). El intercambio de residuos entre las proteínas modernas (flecha) es ineficiente porque las secuencias difieren en las mutaciones en las ramas A, B, C y D. La proteína X no tiene las mutaciones permisivas, por lo mismo, no puede aceptar la función derivada. La proteína Y tiene mutaciones restrictivas que le impiden tolerar la función ancestral. Tomado de (Harms and Thornton 2010).

El proceso evolutivo se genera a partir de mutaciones en la secuencia de un gen que por deriva génica y/o selección natural en algún momento se pueden fijar en una población. En caso de que la mutación sea en una región codificante para un carácter morfológico o fisiológico, los individuos de la población presentarán dicho fenotipo. Para poder rastrear el origen de los caracteres que observamos y entender el mecanismo evolutivo por el que se originaron, es necesario establecer un árbol filogenético que describa las relaciones evolutivas entre las secuencias existentes. De esta manera es posible inferir la secuencia de un gen o proteína ancestral. Los primeros científicos que plantearon esta idea fueron Zuckerkandl y Pauling en 1965 (Zuckerkandl and Pauling 1965), sin embargo, en ese tiempo era metodológicamente imposible llevar a cabo el

proceso. Gracias a la secuenciación masiva, el desarrollo de la teoría evolutiva molecular, la biología molecular y el aumento en el poder de cómputo, esta idea se ha convertido en una realidad. Aunque cada protocolo de reconstrucción ancestral de secuencias puede variar, el siguiente esquema describe los pasos generales que se deben de seguir:



Cada uno de las etapas en el proceso tiene su grado de complejidad. A continuación se presenta en forma muy reducida en qué consiste cada uno y en la sección de antecedentes se darán más detalles al respecto.

1. Normalmente las secuencias homólogas se obtienen de una base de datos como el GenBank del NCBI o UniProtKB del EBI y se depuran para evitar redundancia. El número de secuencias necesarias depende de la tasa de mutación específica para la molécula que se planea estudiar y la profundidad ancestral que se quiera alcanzar.
2. Debido a la complejidad de este paso, una aproximación heurística es la única forma de generar un alineamiento múltiple de secuencias (MSA). Para lograr esto hay programas cada vez más sofisticados que toman en cuenta un mayor número de variables. Entre los programas más utilizados para realizar reconstrucciones ancestrales se encuentran Clustal X, Clustal W (usados en Hobbs et al., 2012), así como MUSCLE (usado en Pérez-Jiménez et al., 2011 y Perica et al., 2014), entre otros. Básicamente lo que indica el modelo evolutivo es la frecuencia con la que suceden mutaciones en direcciones específicas. Dependiendo de la naturaleza de las secuencias que se utilicen en la reconstrucción ancestral (nucleótidos, codones o aminoácidos) se elige el modelo evolutivo a utilizar. Mientras que antes se usaban modelos de sustitución homogéneos para todos los sitios en el MSA, éstos han sido sustituidos por modelos más complejos que asignan tasas evolutivas específicas a cada

residuo. Un ejemplo de ello es el basado en la distribución gamma que representa toda una familia de distribución de probabilidades a lo largo de las secuencias. Una limitante en este paso es que la mayoría de los modelos evolutivos ignoran o usan ineficientemente la información genética contenida en las regiones con *gaps*. Esto se debe principalmente a la dificultad computacional de implementar modelos que tomen en cuenta inserciones y deleciones.

3. Tener un árbol filogenético que describa de manera correcta y estadísticamente significativa las relaciones filogenéticas de los organismos en él presentados es un paso crucial en el proceso. Normalmente éste se construye a partir del MSA y el modelo evolutivo por medio de métodos de máxima verosimilitud (ML) o Bayesianos. Estos últimos se diferencian en que la verosimilitud busca el árbol con la más alta probabilidad de existir dados los datos (las secuencias) y los parámetros del modelo evolutivo. Por el contrario, en una aproximación Bayesiana se busca árboles con la más alta probabilidad posterior, es decir, que los datos tengan la más alta probabilidad de existir dado el modelo evolutivo y la topología del árbol (Merkel and Sterner 2015).

Los trabajos en los que se ha utilizado la reconstrucción ancestral de secuencias son sumamente variados, como se demuestra en la Tabla 1. Es posible observar el gran potencial de la metodología, ya que no hay limitantes con respecto al tamaño de las proteínas a estudiar o de la profundidad filogenética a la que se puede llegar. Es interesante notar que un análisis común que se le realiza a las proteínas ancestrales es con respecto a su termoestabilidad. También es necesario destacar los algoritmos utilizados en el proceso de reconstrucción, en su mayoría se trata de máxima verosimilitud.

Tabla 1. Trabajos de reconstrucción ancestral de proteínas.

Reconstrucción	Método (número de secuencias)	Profundidad temporal (millones de años)	Análisis	Referencia
Proteína fluorescente ancestral	ML con aa, codones y nucleótidos (39)	20	Emisión de fluorescencia	Ugalde, Chang, and Matz 2004
RNAsa digestiva en primeros rumiantes	Max. Parsimonia (22)	40	Catálisis, especificidad por sustrato, termoestabilidad	Jermann et al., 1995
Alcohol deshidrogenasa ancestral	ML con aa y codones (25)	80	Catálisis	Thomson et al. 2005
Receptor corticoide ancestral	ML con aa (66)	450	Afinidad por sustrato, estructura	Ortlund et al., 2007
Congerina ancestral	ML con nucleótidos y Bayesiano (16)	--	Termoestabilidad, afinidad por sustrato, citotoxicidad	Konno et al., 2007
Factor ancestral de eubacteria	ML (31)	3500	Termoestabilidad	Gaucher et al., 2008
Tiorredoxina ancestral (bacterias, arqueas y eucariontes)	ML con aa (203)	~4200 a 3500	Termoestabilidad, catálisis, estructura ^h	Perez-Jimenez et al. 2011
Cinasa de nucleótidos ancestral (bacterias y arqueas)	ML con aa (204)	~4200 a 3500	Termoestabilidad, catálisis, estructura	Akanuma et al. 2013
3-isopropilmalato deshidrogenasas ancestral de género <i>Bacillus</i>	ML y Bayesiano con aa, codones y nucleótidos (19)	950	Termoestabilidad, catálisis, estructura, estabilidad cinética (Urea)	Hobbs et al. 2012
β -lactamasas de bacterias	Bayesiano con aa (75)	3000 a 1000	Termoestabilidad, catálisis, estudios in vivo, estructura	Risso et al., 2013
PyrR ancestral en género <i>Bacillus</i>	Bayesiano con aa (9)	950	Termoestabilidad, oligomerización, estructura	Perica et al. 2014

El estudio comparativo de proteínas ancestrales y existentes genera una infinidad de preguntas. Algunas se presentan a continuación.

En un primer nivel, se puede buscar simplemente el fenotipo de una proteína ancestral a partir de proteínas existentes que divergieron hace millones de años y presentan hoy en día fenotipos diferentes. El trabajo de Ugalde y colaboradores en 2004 logra no solamente resolver una pregunta de este tipo al proponer el color del ancestro de proteínas similares a la proteína verde fluorescente con una edad aproximada de 20 millones de años, sino que también descifra cuáles son las mutaciones implicadas en cambiar la longitud de onda de emisión de la fluorescencia (Ugalde, Chang, and Matz 2004).

Otro tipo de preguntas se pueden resolver de manera indirecta. Tal es el caso del trabajo en el que se estudió la termoestabilidad de factores de elongación ancestrales (EF-TU) y por medio de la determinación de su temperatura media de desnaturalización (T_m) se logró hacer una aproximación de la temperatura de la tierra en el precámbrico (hace 3500 millones de años); lo más interesante es que los resultados coinciden con datos geológicos (Gaucher, Govindarajan, and Ganesh 2008).

Por último, existen proteínas con la misma función, pero diferente especificidad por uno o más sustratos. Desde una aproximación no evolutiva se ha intentado hacer una comparación de las secuencias existentes y a partir de mutaciones puntuales cambiar la especificidad de la enzima por su sustrato. La mayoría de las veces esto ha fracasado y se debe a que a lo largo del proceso evolutivo las mutaciones que ocurren son varias y en muchas ocasiones están ligadas entre sí, por lo que una mutación no es suficiente para cambiar la especificidad. Esto se demostró en un trabajo en el que la reconstrucción de receptores de corticoides ancestrales permitió identificar los aminoácidos que promovían el reconocimiento diferencial de ligandos en las proteínas existentes (Ortlund et al. 2007).

La triosafosfato isomerasa

El modelo de estudio en la presente tesis es la enzima glucolítica *triosafosfato isomerasa* (TIM), proteína en la que se describió por primera vez el plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ y razón por la cual éste lleva su nombre (Banner et al. 1975). La TIM es responsable de catalizar la interconversión de D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), una reacción esencial en la glucólisis (Figura 3A). La TIM se localiza en citoplasma, cloroplastos y mitocondria. Dado que algunos organismos patógenos anaerobios son estrictamente dependientes de su actividad, se ha usado como blanco en el diseño de drogas (Enríquez-Flores et al. 2011). Su participación en múltiples vías metabólicas, como son la glucólisis, la gluconeogénesis, la síntesis de triglicéridos y el ciclo de Calvin (Voet and Voet 2010), sugiere que la enzima se encuentra en la cercanía de otras enzimas participantes en las vías e incluso podría estar interaccionando con ellas, sin embargo, la mayoría de los estudios realizados sobre esta enzima en diferentes organismos han sido *in vitro*. Es muy poco lo que se puede inferir del contexto celular en el que normalmente está la proteína y se desconoce cuál es el papel que juegan los mecanismos de estabilización *in vivo*, como son las chaperonas, el fenómeno de “crowding” y la asociación en complejos proteicos mayores. Los estudios y resultados que a continuación se presentan se llevaron a cabo con proteínas aisladas y purificadas.

La reacción de isomerización ocurre sin cofactores y la enzima aumenta la reacción en una tasa de 10^9 en relación a la reacción no enzimática y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) es del orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 2). Este valor es cercano al estimado teórico para una reacción limitada por difusión, lo que quiere decir que la cinética está solamente limitada por la difusión del sustrato al sitio activo de la enzima; es por lo anterior que la TIM se clasifica como un “catalizador perfecto” (Albery and Knowles 1976).

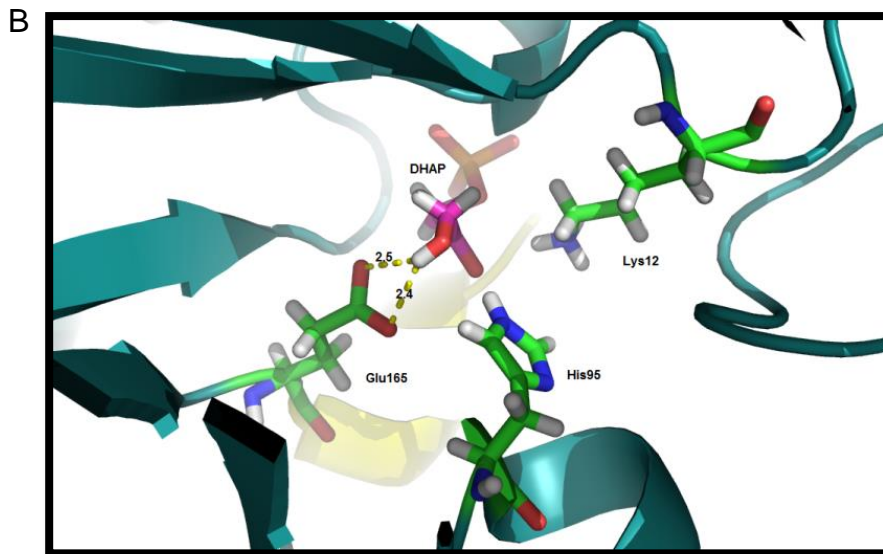
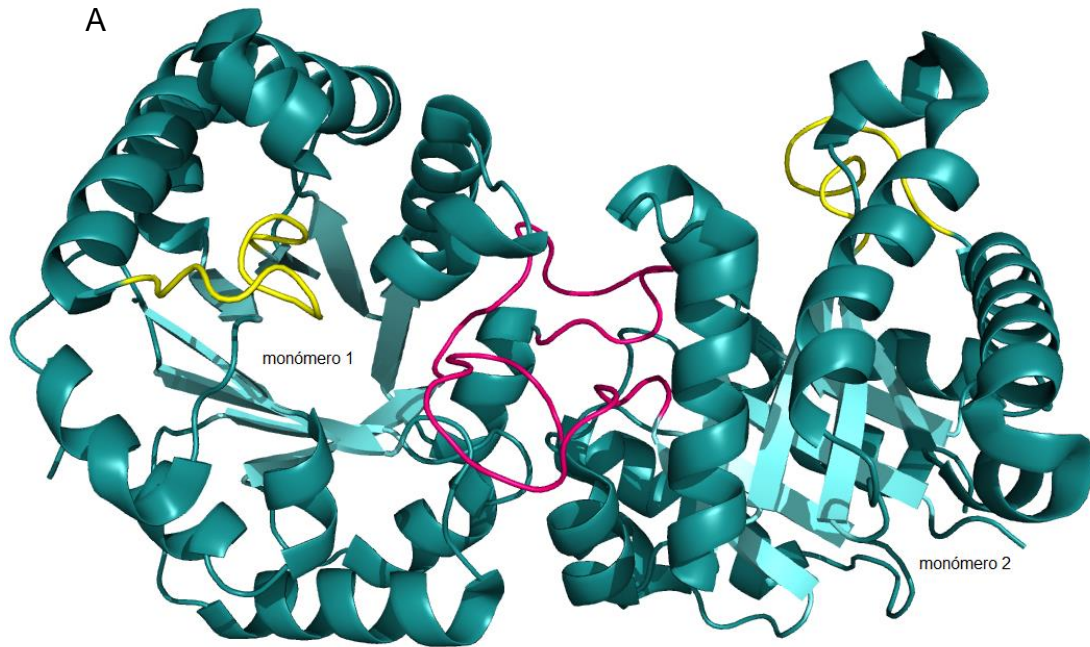


Figura 3. Características generales y del sitio activo de la TIM. A) Representación del dímero de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 1YPI). En amarillo el asa $\beta\alpha$ 6 y en rosa el asa $\beta\alpha$ 3. B) Arquitectura del sitio activo en presencia del sustrato DHAP para ScTIM, los números representan la distancia en Å para los puentes formados entre el carboxilo del glutámico catalítico hacia DHAP (PDB ID: 1NEY).

Tabla 2. Parámetros catalíticos para TIM eucariontes.

TIM	k_{cat} ($\times 10^3 \text{ s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	referencia
HsTIM	4.50	0.49	2.30×10^8	Mande et al. 1994
TbTIM	6.17	0.25 ± 0.05	6.17×10^8	Lambeir, Opperdoes, and Wierenga 1987
EhTIM	4.00	0.61 ± 0.46	1.64×10^8	Landa et al. 1997
PfTIM	1.80	0.48 ± 0.16	7.54×10^7	Joubert, Neitz, and Louw 2001
GITIM	4.80	0.53 ± 0.03	2.28×10^8	López-Velázquez et al. 2004
TcTIM	4.33	0.48 ± 0.01	2.26×10^8	H Reyes-Vivas et al. 2001
OcTIM	8.67	0.32 ± 0.01	6.77×10^8	Krietsch et al. 1970
TmTIM	4.33	0.84	1.28×10^8	Knobeloch et al. 2010
ScTIM	16.7	1.27 ± 0.06	1.14×10^8	Krietsch et al. 1970

Hs: Homo sapiens; Tb: Trypanosoma brucei; Eh: Entamoeba histolytica; Pf: Plasmodium falciparum; Gl: Giardia lamblia; Tc: Trypanosoma cruzi; Oc: Oryctolagus cuniculus; Tm: Tenebrio molitor; Sc: Saccharomyces cerevisiae;

El sitio activo está conservado entre las TIMs de diferentes organismos y se conforma por la triada catalítica Lys12 (asa $\beta\alpha$ 1), His95 (asa $\beta\alpha$ 4) y Glu165 (asa $\beta\alpha$ 6) (numeración según la TIM de *Saccharomyces cerevisiae*) (Figura 3B). El perfil de energía para la formación de los complejos TIM-G3P, TIM-enediol (intermediario de la reacción) y TIM-DHAP fue caracterizado por Knowles, Alberly y colaboradores hace ya casi 40 años (Alberly and Knowles 1976) y presenta los siguientes pasos en el mecanismo de reacción: 1) unión del sustrato, 2) formación del enediolato por deprotonación del carboxilato de Glu165, 3) formación del producto por reprotonación y 4) liberación del producto. Algunas de las características claves del sitio activo son la estabilización del intermediario por la lisina y la histidina, estabilización del fosfato del sustrato por puentes de hidrógeno con la cadena principal de la proteína y la exclusión del solvente. Para lograr este último rasgo, se ha observado que el asa 6 funciona como una tapa que presenta un movimiento de aproximadamente 7 Å al unir el ligando y ocultar al sitio activo, así como posicionar al Glu165 para la catálisis (asa amarilla en la Figura 3A). La ausencia de dicha asa genera la liberación temprana del intermediario y la transformación del sustrato a metilgloxal

fosfato, una molécula sumamente tóxica para las células (Pompliano, Peyman, and Knowles 1990).

Otra asa que participa de manera indirecta en la estabilización del sitio activo es el asa 3, que se asoma de su subunidad y se inserta en el monómero vecino entre las asas 1 y 4 en la interfase (asa magenta en la Figura 3A). Para mantener a los aminoácidos catalíticos en la posición correcta se requiere una red compleja de puentes de hidrógeno (Maithal et al. 2002).

Fuera de las mutaciones que afectan el sitio activo o la interfase, el plegamiento es sumamente estable y permite una gran variabilidad en la secuencia, por ejemplo, en 2001 Silverman y colaboradores lograron generar mutantes puntuales en 142 sitios distintos de la TIM de levadura que resultaron en enzimas con actividad comparable a la silvestre (Silverman, Balakrishnan, and Harbury 2001).

Hasta el momento (octubre de 2015) hay 180 estructuras cristalográficas de TIMs depositadas en el PDB, 150 de eucariontes, 27 de bacterias y 3 de arqueas, todas ellas pertenecientes a 36 especies distintas. La identidad de secuencia varía desde 98.4 % entre la TIM de humano (HsTIM) y la TIM de conejo (OcTIM) hasta 12 % entre PfTIM (TIM de *Plasmodium falciparum*) y PwTIM (TIM de *Pyrococcus woesei*), sin embargo, el alineamiento estructural revela que la topología tiene una alta conservación y a excepción de las TIMs de arqueas, que son tetraméricas, el resto presentan una estructura cuaternaria dimérica.

A pesar de que cada monómero cuenta con los residuos necesarios para formar un sitio activo independiente, la disociación de la enzima resulta en la inactivación de la misma. Hasta ahora no se han encontrado monómeros nativos catalíticamente activos. Existen varios trabajos en los que se ha intentado generar monómeros activos al realizar ingeniería de proteínas en la interfase del dímero para desestabilizarlo; desde mutaciones puntuales hasta cambiar la longitud y composición del asa 3, sin embargo, la eficiencia catalítica del monómero es aproximadamente 1000 veces menor que la de una enzima dimérica nativa (Tabla 3) aún cuando el monómero está plegado (Saab-Rincon et al., 2001; Schliebs et al., 1996).

Tabla 3. Parámetros catalíticos de TIMs monoméricas.

		TbTIM	MonoTIM ^a	RE-TIM ^a	RMM0-1 ^b
k_{cat}	(G3P)	6.2×10^3	5.2	2.2	58
K_m	(G3P)	0.25 ± 0.05	4.1 ± 0.6	1.4 ± 0.2	1.1
k_{cat}/K_m	(G3P)	6.17×10^8	3.1×10^4	3.1×10^4	1.3×10^6
k_{cat}	(DHAP)	1.1×10^3	0.2	0.5	--
K_m	(DHAP)	1.2 ± 0.1	12.2 ± 1.9	17.2 ± 5.8	--
k_{cat}/K_m	(DHAP)	2.3×10^7	409.8	726.7	--
K_i	(PGH)	0.008 ± 0.001	0.5 ± 0.07	1.75 ± 0.3	--
K_i	(PGA)	0.026 ± 0.007	0.052 ± 0.007	0.034 ± 0.005	--

TbTIM: TIM de *Trypanosoma brucei*; monoTIM: mutante monomérica de TbTIM con reemplazo en el asa 3; RE-TIM: doble mutante monomérica de TbTIM en el asa 3; RMM0-1: mutante monomérica obtenida de la monoTIM por evolución dirigida. ^aTomado de (Schliebs et al., 1997). ^bTomado de (Saab-Rincon et al. 2001) k_{cat} en s^{-1} , K_m y K_i en mM, k_{cat}/K_m en $s^{-1}M^{-1}$

Existen dos hipótesis para explicar este comportamiento, la primera sugiere 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. 1997). La segunda hipótesis presupone que la asociación genera una estabilidad conformacional máxima y que los monómeros son termodinámicamente inestables (Mainfroid et al. 1996a).

El estudio comparativo de proteínas ha sido útil para entender mejor la relación entre la secuencia y las propiedades fisicoquímicas, sin embargo, este enfoque no ofrece una explicación integrativa y evolutiva que describa la naturaleza de las mismas. Para dilucidar cómo se generaron las propiedades catalíticas, el estado de asociación y la estabilidad de estas enzimas, en esta tesis se examinó la historia molecular de la TIM mediante la reconstrucción de proteínas ancestrales y su posterior caracterización fisicoquímica.

ANTECEDENTES

En un trabajo previo en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM, se realizó la reconstrucción ancestral para las TIMs de eucariontes. A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos (Pardo-Ávila 2011).

En dicho trabajo se recompilaron 44 secuencias de nucleótidos de la base de datos del NCBI correspondientes solamente a organismos del dominio *Eukarya* y se tradujeron al código de aminoácidos en el programa SE-AL. Este mismo programa sirvió para refinar un alineamiento inicial de las secuencias en el programa Clustal-X. A partir del alineamiento se calculó el índice de conservación para cada residuo en la proteína y se observó que las regiones cercanas a los aminoácidos catalíticos tienen los mayores índices de conservación.

Para poder inferir la secuencia de un ancestro a partir de las secuencias existentes, primero se calculó el tiempo evolutivo transcurrido, el cual depende de la tasa de sustituciones por residuo. Para el caso de los aminoácidos, existen matrices empíricas que describen las tasas de cambio de un residuo a otro y es importante analizar cuál es la matriz que se ajusta mejor a los datos. A partir del análisis de los datos con el programa Protest, se eligió la matriz de sustitución LG porque mostró una clara mejora en la verosimilitud de la reconstrucción para los datos. Esta matriz fue creada a partir de 3912 alineamientos de la base de datos Pfam, y contiene la información de las probabilidades de sustitución de aminoácidos al analizar ~50,000 secuencias y ~6.5 millones de residuos (Le and Gascuel 2008).

Normalmente, cuando se realiza una reconstrucción ancestral de proteínas se infiere un árbol filogenético con los datos. El árbol filogenético es una representación de las relaciones evolutivas que existen entre los organismos; en él se localizan las secuencias existentes en los extremos de las ramas y la distancia entre ellas representa la distancia evolutiva entre organismos; por ejemplo, secuencias parecidas estarán en ramas adyacentes y se unirán en una rama común debajo de ellas mientras que secuencias distantes formarán parte de ramas alejadas. Cada unión de dos ramas (nodo)

corresponde al último ancestro común de las mismas y la longitud de cada una está determinada por el número de cambios por sitio (distancia evolutiva). El objetivo del análisis filogenético es descubrir el arreglo de las ramas, así como la longitud de éstas que mejor represente la relación entre las secuencias (Page and Holmes 1998).

Debido a que existen eventos como transferencia horizontal de genes, la historia evolutiva de una proteína no siempre representa la historia evolutiva del organismo. La inferencia de un árbol filogenético a partir de las secuencias de TIM da resultados poco confiables (como que los insectos no aparecen como un grupo monofilético) y por ello se concluyó que no es un buen marcador evolutivo (Pardo-Ávila 2011), sin embargo, como es parte del metabolismo central, se supuso que la historia evolutiva de la TIM es la misma que la de los organismos que la contienen. Por ello, se trabajó con una fusión de dos árboles, el primero es el propuesto por Ciccarelli en 2006 (Ciccarelli et al. 2006), el cual fue reconstruido a partir de 36 genes de 191 organismos que no presentan transferencia horizontal y el segundo, especializado en hongos, publicado por Lutzoni en 2004 (Lutzoni et al. 2004). Con ayuda del programa MacClade se acoplaron la topología del árbol y los alineamientos previamente realizados (Figura 4) (Pardo-Ávila 2011).

La reconstrucción de estados ancestrales fue realizada por métodos de máxima verosimilitud. Dependiendo de los datos observados y la matriz de sustitución elegida, a cada residuo en cada posición se le asignó un valor de verosimilitud. Para cada nodo en el árbol se obtuvo una secuencia ancestral hipotética inferida a partir de los aminoácidos que tuvieron mayor probabilidad de reconstrucción en cada sitio (Pardo-Ávila 2011).

Una vez que se obtuvieron secuencias con alta frecuencia de sitios con buena verosimilitud de reconstrucción, mi proyecto de tesis de licenciatura consistió en la caracterización del ancestro común más reciente de animales y hongos (ancestro de los opistoncontes, TIM63). En ese estudio se demostró que la enzima ancestral es un dímero compacto y activo que a pesar de tener una termoestabilidad comparable a la de TIMs de eucariontes previamente caracterizadas, pierde su actividad rápidamente cuando se diluye (Schulte-Sasse Jiménez 2013). Estos resultados fueron interesantes, ya que todas las TIM existentes son muy estables a la dilución y no se había encontrado ninguna que tuviera una disociación tan rápida e inestable. Por lo anterior, se consideró relevante

profundizar la caracterización de TIM63, así como estudiar otros ancestros más recientes que pudieran ayudar a explicar el comportamiento evolutivo de la enzima. En eso consiste el trabajo experimental llevado a cabo en esta tesis.

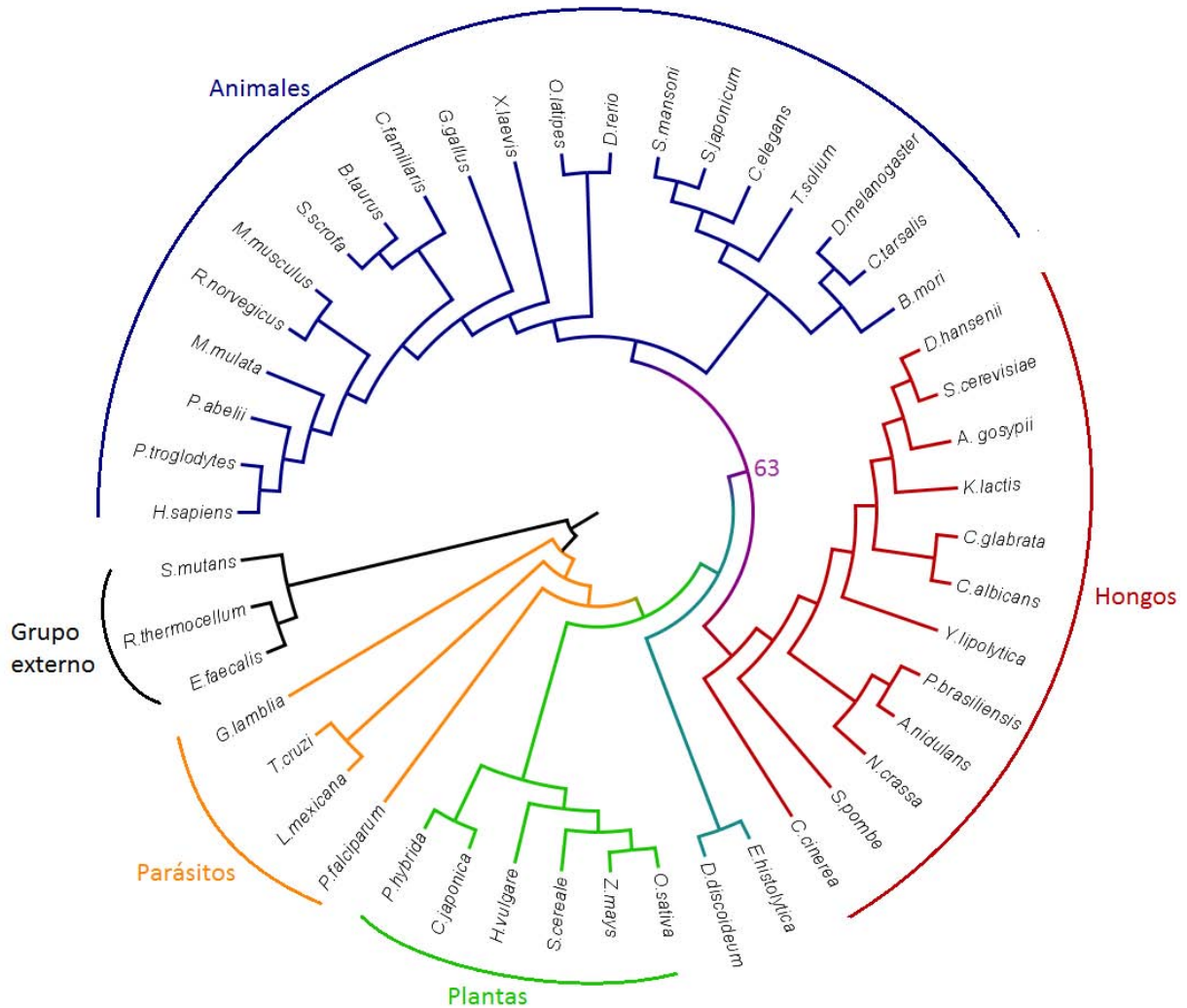


Figura 4. Árbol filogenético de eucariontes usado en la reconstrucción ancestral de la TIM.

En la circunferencia del árbol se encuentran los nombres de los organismos cuya secuencia de TIM fue utilizada para llevar a cabo la reconstrucción ancestral. Para cada nodo se obtuvo la secuencia ancestral con mayor verosimilitud de reconstrucción. La proteína correspondiente al nodo 63 fue la que se caracterizó en un trabajo previo.

HIPÓTESIS

Los ancestros inferidos de las TIMs de eucariontes son dímeros estables cuya eficiencia catalítica está limitada por difusión.

OBJETIVOS

Objetivo general: Comenzar a reconstruir la historia molecular de la evolución de la estabilidad de la TIM a partir de la caracterización fisicoquímica de cinco proteínas producto de la reconstrucción ancestral de la enzima (ancTIMs).

Objetivos particulares:

- Purificar las proteínas ancestrales.
- Medir los espectros de dicroísmo circular y fluorescencia de las ancTIMs.
- Determinar el estado de oligomerización de las ancTIM por medio de cromatografía de exclusión molecular.
- Determinar la estabilidad de las ancTIM al desplegamiento térmico
- Determinar los parámetros catalíticos de las ancTIM.
- Determinar la estabilidad a la dilución de las ancTIMs por medio de ensayos de actividad.
- Resolver la estructura cristalográfica de TIM63
- Determinar los parámetros termodinámicos de la unión de TIM63 con el análogo del estado de transición PGH.
- Hacer un análisis comparativo de las estructuras cristalográficas de las TIM de eucariontes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos son de la más alta pureza disponibles en Sigma-Aldrich®, excepto la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa comprada en Roche.

Purificación de proteínas

Los genes que codifican para las proteínas ancestrales seleccionadas se sintetizaron de manera comercial en el vector de expresión pET28b+ que adiciona un sitio de corte de trombina en el N-terminal seguido por una etiqueta de histidinas. Las células *E. coli* BL21 pLys quimiocompetentes transformadas con dicho plásmido se crecieron a 37 °C y 250 rpm hasta una densidad óptica de 0.8 para posteriormente ser inducidas toda la noche con 0.8 mM de IPTG. Las células se cosecharon y se resuspendieron en el amortiguador A (35 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8.0) con 0.2 mM de PMSF para proceder con la lisis en la prensa de French. La fracción soluble obtenida se cargó en una columna de afinidad por níquel (Protino® NiTED, 25 ml) previamente equilibrada con el amortiguador A acoplada a un sistema de FPLC. Las proteínas recombinantes se eluyeron con un gradiente de imidazol (0-300 mM). Las fracciones se juntaron, concentraron y dializaron contra el amortiguador B (50 mM Tris pH 8.0). Se utilizó el kit CleanCleave™ de Sigma® para separar la etiqueta de histidinas de las enzimas ancestrales con una incubación de 4 horas a temperatura ambiente. Las proteínas se recuperaron y dializaron contra el amortiguador C (10 mM trietanolamina pH 7.6, 1 mM EDTA y 1 mM DTT) para ser cargadas en una columna Mono Q 10/10 de Pharmacia Biotech (equilibrada en amortiguador C) y eluidas con un gradiente de NaCl (0-500 mM). De acuerdo a técnica de SDS-PAGE la pureza de todas las proteínas fue mayor al 95%.

Dicroísmo circular (DC)

La elipticidad se midió en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics) equipado con un sistema de control de temperatura PTC-348WI tipo Peltier. Los espectros de DC se obtuvieron a una concentración de proteína de 250 µg/ml en el amortiguador C con 40 mM NaCl en una celda de cuarzo con un paso de luz de 0.1

cm. Para los experimentos de desplegamiento térmico se siguió el cambio en la intensidad de la señal de DC a 222 nm. La temperatura se incrementó desde 20 °C hasta 90°C a una velocidad de 1 °C/min. Los datos crudos se normalizaron hacia fracción desnaturalizada (f_D) de acuerdo a la ecuación 1. Las temperaturas medias de desnaturalización (T_m , mitad de la transición) se obtuvieron al hacer un ajuste con la ecuación de Boltzman (eq. 2) a los datos normalizados.

$$f_D = \frac{y_{obs} - y_N}{y_D - y_N} \quad ((1))$$

$$f_D = y_{min} \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \exp \frac{Tm_{app} - T}{m}} \quad ((2))$$

Para hacer la deconvolución de los datos se usó el programa CDNN de Applied Photophysics (ref. CDNN).

Espectrometría de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia se midieron en intervalo de 310 a 450 nm con un espectrofluorómetro ISS PC1. La proteínas se encontraban a una concentración de 50 µg/ml en el amortiguador C dentro de una celda de cuarzo de 0.5 x 0.5 cm a una temperatura de 25 °C controlada por un equipo peltier de la marca Quantum Northwest Peltier.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Todos los experimentos de DSC se realizaron en un sistema de DSC VP-Capillary (MicroCal, GE Healthcare). Se determinó la línea base instrumental con el amortiguador de referencia (10 mM TEA, 100 mM NaCl, pH 7.6) en ambas celdas. Se checó la irreversibilidad de la desnaturalización al recalentar a la solución de proteína después de haberla enfriado al terminar el barrido previo. Previo al análisis de los datos de DSC se restó la línea base instrumental con el programa de Microcal Origin DSC v.7.0. Se determinaron las entalpías calorimétricas (ΔH_{cal}) a partir de una integración del área bajo la curva o con el modelo de Lumry-Eyring para un proceso de dos estados irreversible (J M Sanchez-Ruiz, 1992) en el que la capacidad calorífica puede expresarse como:

$$C_p^{exc} = \Delta H \frac{E_{act}}{RT_m^2} \exp(x) * \exp[-\exp(x)] \quad (3)$$

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_{act} la energía de activación del estado nativo (N) al desnaturalizado (F). La señal del calorímetro se ajustó mediante la siguiente ecuación:

$$C_p^{AP} = C_p^{Pre} + (C_p^{Post} - C_p^{Pre})(1 - x_N) - \Delta H \frac{dx_N}{dT} \quad (4)$$

En este caso x_N es al fracción molar del estado nativo, C_p^{Pre} y C_p^{Post} son las líneas de pre y post-transición, respectivamente.

La conversión cinética de N a F a cada velocidad de barrido se describió con la constante de velocidad de primer orden (k) que cambia con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$k = \exp \left[-\frac{E_{act}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \right] \quad (5)$$

Catálisis

La actividad enzimática de los ancestros se midió en la dirección de isomerización desde gliceraldehído-3-fosfato (G3P) hacia dihidroxiacetona-fosfato. El ensayo de 0.7 ml contenía amortiguador de catálisis (100mM trietanolamina, 10 mM EDTA, 1 mM DTT), 0.1 mM NADH, α -glicerolfosfato deshidrogenasa (7 μ g/ml) y 0.1- 10 mM G3P. La velocidad de reacción se calculó en un ensayo acoplado a partir del decaimiento de la absorbancia del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-7500 a 25 °C. La reacción se inició al adicionar TIM en una concentración final de 10 ng/ml. La dependencia de la velocidad inicial con la concentración de sustrato se analizó de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores para los parámetros cinéticos (K_m , k_{cat}) se calcularon a partir de una regresión no lineal en el programa Graphpad Prism, versión 5.

Para los experimentos de inactivación dependiente de dilución se diluyeron las muestras en el amortiguador de catálisis para alcanzar la concentración deseada. La actividad enzimática se determinó después de una incubación durante 24 horas a 25 °C. Los datos se normalizaron y ajustaron a un modelo de disociación (ecuación 6, Cisneros Armas 2003) en el que se asume que la única forma activa de la enzima es el dímero y el equilibrio se desplaza hacia la especie monomérica después de la dilución. De esta manera se obtuvo la constante aparente de disociación (K_{dis}).

$$f_N = \frac{K_{dis} + 4Pt - \sqrt{(K_{dis}^2 + 8K_{dis} * Pt)}}{4Pt} \quad (6)$$

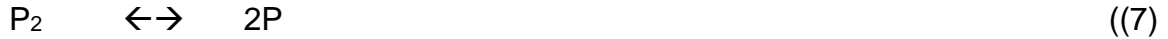
Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía analítica de exclusión molecular se llevó a cabo a temperatura ambiente en una columna Superdex-75 10/300 GL (Pharmacia Amersham) calibrada con los estándares de Biorad y equilibrada con el amortiguador C con 40 mM de NaCl. Las proteínas se cargaron en la columna usando un sistema Äkta de FPLC a un flujo de 1 ml/min.

Calorimetría de titulación y disociación isotérmica (ITC e IDC)

Los experimentos calorimétricos se llevaron a cabo en un calorímetro de titulación de alta precisión ITC 200 (Microcal, GE Healthcare). Las muestras se equilibraron en el amortiguador de trabajo por diálisis y la solución fue desgasificada antes de llenar la celda. La concentración de TIM en la jeringa para IDC fue entre 0.35 y 0.45 mM (10-12 mg/ml). Los experimentos de dilución se realizaron a diferentes temperaturas con agitación constante y consistieron en inyecciones de 1 µL cada 150 segundos en una celda con 200 µL de amortiguador (10 mM TEA, 100 mM NaCl, pH 7.6). Los datos fueron analizados en el software de AFFINIMETER (www.affinimeter.com).

Si se asume el siguiente modelo de disociación de dos estados:



la constante de disociación está definida por el equilibrio entre las especies:

$$K_{dis} = \frac{P^2}{P_2} \quad (8)$$

Las curvas se ajustaron al siguiente modelo

$$q_i = \Delta H_{dis} * (P_2)_{syr} * dV_i - \Delta H_{dis} [(P_2)_i - (P_2)_{i-1}] [V_0 + \frac{dV_i}{2}] \quad (9)$$

donde q_i es el calor liberado en la inyección i , V_i el volumen adicionado en cada inyección, $(P_2)_{syr}$ la concentración total del proteína en la jeringa, V_0 el volumen de la celda y ΔH_{diss} el calor de disociación. ΔG_{diss} y ΔS_{diss} se calcularon a partir de las relaciones termodinámicas básicas.

Para el ITC la celda contenía la muestra de TIM. Los experimentos comenzaron con una inyección preliminar de 0.1 μ L seguida de 15 adiciones de 0.8 μ L de PGH a una concentración de 10 mM con un intervalo de 4 minutos entre inyecciones. Se realizaron titulaciones con amortiguador solo en la celda (10 mM TEA, pH 7.6) en condiciones idénticas para determinar el calor de dilución del inhibidor. Estos valores se substrajeron al calor de unión entre PGH y TIM. La constante de unión (K_b), el cambio en la entalpía (ΔH_b) y la estequiometría (n) se determinaron por un ajuste no lineal de los datos normalizados a un modelo de unión con sitios idénticos e independientes (10).

$$Q = \frac{nM_t \Delta H_b V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_u M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_b M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (10)$$

En donde Q es el calor total de intercambio hasta la adición i , X_t y M_t son las concentraciones de ligando y proteínas totales, y V_0 es el volumen de la celda de reacción.

Cristalización y colección de datos

Se usó el método de difusión de vapor con gota colgante para probar las condiciones cristalizantes en los kits HR Crystal Screen I y II (Hampton Research). Los cristales se obtuvieron a 18 °C después de incubar las gotas de proteína con las soluciones precipitantes en una relación 1:1. Los cristales de TIM63 se crecieron en presencia de 10 mM de fosfoglicohidroxamato (PGH) usando 0.1 M de HEPES, 20% de PEG 10 000, pH 7.0 como solución cristalizante. Los datos de difracción se colectaron en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) a 100 K con una oscilación de 0.5°/marco en un detector de placa R-AXIS IV++ (Rigaku, The Woodlands, TX) con rayos X (longitud de onda: 1.5418 Å) generados por un ánodo rotatorio Rigaku MicroMax-007 HF (Rigaku, The Woodlands, TX). Se integraron todos los datos con XDS100 y se escalaron con SCALA en la suite de programas CCP4 v.6.1.2.101. El contenido de la celda unitaria se analizó con el coeficiente de Matthews. El reemplazo molecular se llevó a cabo en el programa Phaser de la suite de PHENIX con la TIM de *Tenebrio molitor* (PDB ID: 2I9E) como el modelo inicial. Dado que la densidad electrónica en el asa $\alpha\beta 2$ (residuos 52-58) era muy pobre, esta región se construyó manualmente usando Coot. La estructura fue afinada con phenix.refine y los modelos mejorados a partir de ciclos iterativos de reconstrucción del modelo en COOT hasta alcanzar valores finales de R_{work} y R_{free} de 16 % y 20 %, respectivamente. Los valores estadísticos de afinación se presentan en la tabla x.

Análisis de la estructura

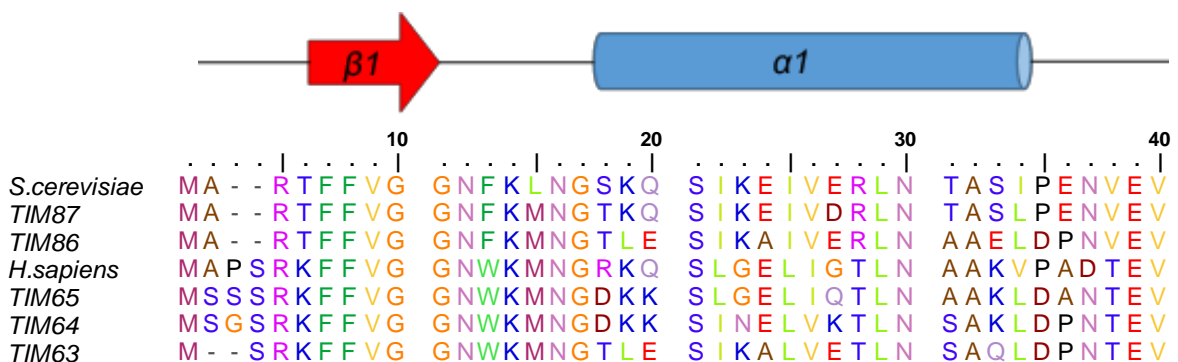
El área total, polar y no polar se calculó con el programa NACCESS con los parámetros predeterminados. El área de la interfase se calculó a partir de una resta entre el área total de los monómeros asociados y la de los monómeros aislados. Los puentes de hidrógeno se calcularon tanto con el programa HBPLUS, como con el programa Chimera y el servidor en línea PiSA del ePDB.

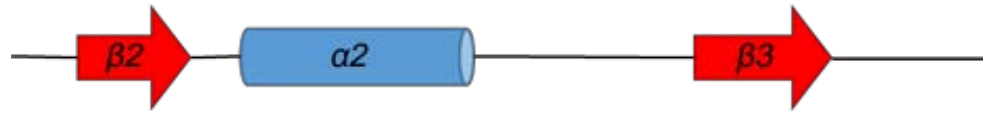
RESULTADOS

Dado que los animales y los hongos son los organismos con mayor número de representantes en el árbol filogenético usado para este estudio, se eligieron cinco secuencias ancestrales dentro de este clado para “revivir” en el laboratorio. Dichas secuencias corresponden a los nodos del ancestro común más reciente de los opistocontos (TIM63), dos ancestros dentro del linaje de los animales (TIM64 y TIM65), así como dos ancestros de los hongos (TIM86 y TIM87) (Figura 5, Figura 6). Es importante recalcar que todas las secuencias elegidas tienen un gran número de sitios (>60%) con una elevada verosimilitud de reconstrucción (>0.8), lo que lleva a una probabilidad posterior de reconstrucción promedio entre 0.88 y 0.97 (Figura 7). El hecho de que estos valores sean elevados habla de un buen proceso de reconstrucción y una alta confiabilidad en las secuencias.

Las cinco proteínas ancestrales (ancTIMs) fueron sobreexpresadas de manera exitosa fusionadas a una etiqueta de histidinas en células de *E. coli* (ver materiales y métodos) y purificadas a homogeneidad con altos rendimientos (~60 mg de proteína por litro de cultivo).

Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de ancTIMs, ScTIM y HsTIM. Los segmentos en la parte superior del alineamiento corresponden a los elementos de estructura secundaria correspondientes a TIM63. Las flechas rojas representan a las hebras β , mientras que los cilindros azules representan a las hélices α .

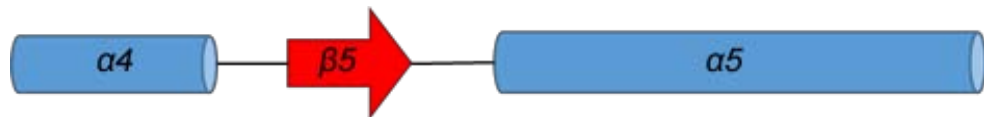




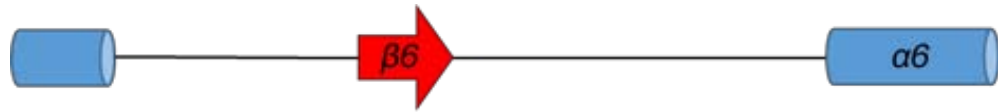
	50	60	70	80
<i>S.cerevisiae</i>	V I C P P A T Y L D	Y S V S L V K K P Q	- V T V G A Q N A Y	L K A S G A F T G E
<i>TIM87</i>	V I C P P A T Y L D	Y A V S L V K K P Q	- V T V G A Q N A Y	T K A S G A Y T G E
<i>TIM86</i>	V I S P P A P Y L L	F A K E S L K K P Q	- V S A V A Q N A F	D K A N G A F T G E
<i>H.sapiens</i>	V C A P P T A Y I D	F A R Q K L - D P K	- I A V A A Q N C Y	K V T N G A F T G E
<i>TIM65</i>	V C G A P S I Y L D	F A R S K L - D P K	- I G V A A Q N C Y	K V P K G A F T G E
<i>TIM64</i>	V V G P P A I Y L S	Y A R S K L - P K E	- I G V A A Q N C Y	K V P K G A F T G E
<i>TIM63</i>	V V A P P A I Y L P	F A R S K L K K P K	E I Q V A A Q N C Y	T K P N G A F T G E



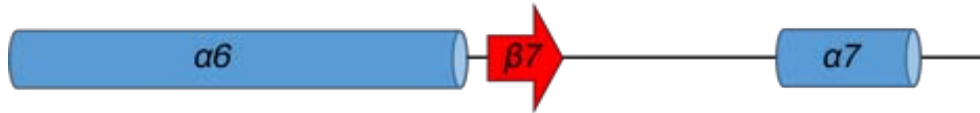
	90	100	110	120
<i>S.cerevisiae</i>	N S V D Q I K D V G	A K W V I L G H S E	R R S Y F H E D D K	F I A D K T K F A L
<i>TIM87</i>	N S V D Q I K D V G	A K W V I L G H S E	R R T Y F H E D D E	F V A E K T K F A L
<i>TIM86</i>	V S V E Q L K D V G	A K W V I L G H S E	R R T I F K E S D E	F I A E K T K Y A L
<i>H.sapiens</i>	I S P G M I K D C G	A T W V V L G H S E	R R H V F G E S D E	L I G Q K V A H A L
<i>TIM65</i>	I S P A M I K D C G	V N W V I L G H S E	R R H V F G E S D E	L I G Q K V A H A L
<i>TIM64</i>	I S P A M I K D L G	V D W V I L G H S E	R R H I F G E S D E	L I A E K V A H A L
<i>TIM63</i>	I S A E M L K D L G	V P W V I L G H S E	R R T I F G E S D E	L I A E K V K Y A L



	130	140	150	160
<i>S.cerevisiae</i>	G Q G V G V I L C I	G E T L E E K K A G	K T L D V V E R Q -	L N A V L E E V K D
<i>TIM87</i>	D Q G L G V I L C I	G E T L E E K K A G	V T L D V V E R Q I	L D A V I E K V K D
<i>TIM86</i>	D N G L D V I L C I	G E T L E E K K A G	K T L D V V E R Q I	L D A V I E K I K D
<i>H.sapiens</i>	A E G L G V I A C I	G E K L D E R E A G	I T E K V V F E Q -	T K V I A D N V K D
<i>TIM65</i>	E E G L G V I A C I	G E K L D E R E A G	I T E K V V F E Q I	T K A I A D N V K D
<i>TIM64</i>	E E G L K V I A C I	G E T L E E R E A G	K T E E V V F R Q I	L K A I A D K I K D
<i>TIM63</i>	D Q G L K V I A C I	G E T L E E R E A G	K T M E V V A R Q I	L K A I A D K I K D



	170	180	190	200
<i>S.cerevisiae</i>	W T N V V V A Y E P	V W A I G T G L A A	T P E D A Q D I H A	S I R K F L A S K L
<i>TIM87</i>	W T N V V I A Y E P	V W A I G T G L A A	T A E D A Q D I H H	S I R S Y L A E K L
<i>TIM86</i>	W S N V V I A Y E P	V W A I G T G L A A	T A E D A Q E I H H	E I R A Y L K E K I
<i>H.sapiens</i>	W S K V V L A Y E P	V W A I G T G K T A	T P Q Q A Q E V H E	K L R G W L K S N V
<i>TIM65</i>	W S K V V L A Y E P	V W A I G T G K T A	T P Q Q A Q E V H E	K L R E W L K S N V
<i>TIM64</i>	W S N V V I A Y E P	V W A I G T G K T A	T P E Q A Q E V H E	A L R K W L K E N V
<i>TIM63</i>	W S N V V I A Y E P	V W A I G T G K V A	T P E Q A Q E V H A	A L R K W L K E N V



	210	220	230	240
<i>S.cerevisiae</i>	G D K A A S E L R I	L Y G G S A N G S N	A V T F K D K A D V	D G F L V G G A S L
<i>TIM87</i>	G K D V A D K T R I	L Y G G S A N G K N	A G T F K D K A D V	D G F L V G G A S L
<i>TIM86</i>	G A E V A D K T R I	I Y G G S V N G K N	S G T F K D K S D V	D G F L V G G A S L
<i>H.sapiens</i>	S D A V A Q S T R I	I Y G G S V T G A T	C K E L A S Q P D V	D G F L V G G A S L
<i>TIM65</i>	S D A V A D S V R I	I Y G G S V T G G T	C K E L A S Q P D V	D G F L V G G A S L
<i>TIM64</i>	S P A V A D S V R I	I Y G G S V T A A N	C K E L A K Q P D I	D G F L V G G A S L
<i>TIM63</i>	S P E V A E S T R I	I Y G G S V N A A N	C K E L A K Q P D I	D G F L V G G A S L



	250	260
<i>S.cerevisiae</i>	K - P E F V D I I N	S R N - - - - -
<i>TIM87</i>	K A P E F V D I I N	S R N - - - - -
<i>TIM86</i>	K A P E F V D I I N	S R L - - - - -
<i>H.sapiens</i>	K - P E F V D I I N	A K Q - - - - -
<i>TIM65</i>	K A P E F V D I I N	A R H - - - - -
<i>TIM64</i>	K A P E F V D I I N	A R Q - - - - -
<i>TIM63</i>	K A P E F V D I I N	A R Q A - - - - -

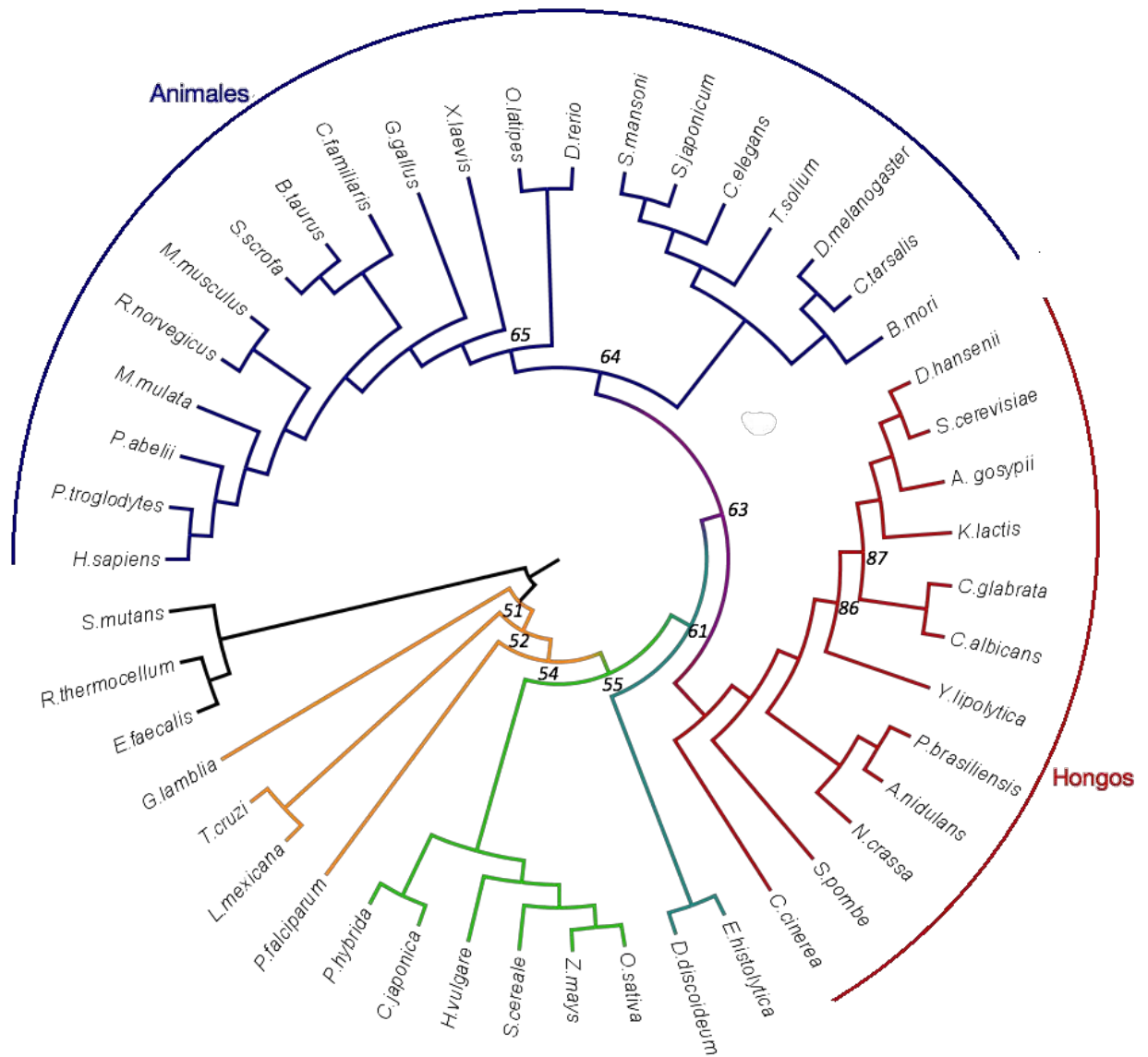


Figura 6. Árbol filogenético de eucariontes. En la circunferencia se encuentran los organismos cuyas secuencias de TIM se utilizaron en la reconstrucción. Los números corresponden a algunos de los nodos reconstruidos.

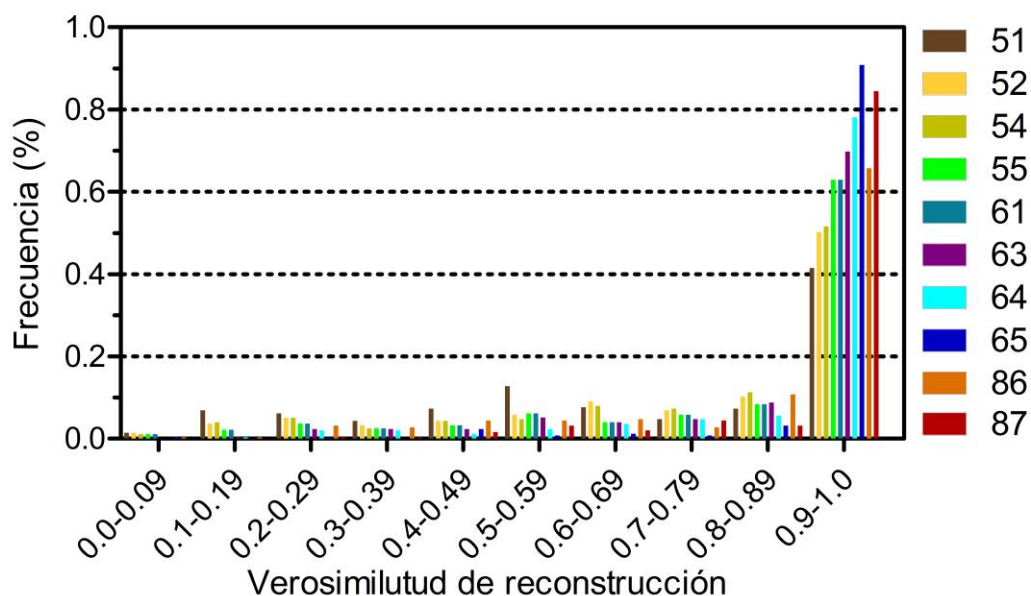


Figura 7. Distribución de sitios con respecto a su verosimilitud de reconstrucción. Los números de los nodos corresponden a los presentados en el árbol de la Figura 6.

Las secuencias ancestrales que son inferidas en el proceso de reconstrucción, en realidad resultan ser hipótesis de secuencias que pudieron haber existido en el pasado. Esto implica que no se puede estar seguro de que su traducción *in vitro* genere productos de proteínas plegadas, por lo que una gran duda tras su purificación consistía en la conformación de su estado nativo. Una primera aproximación para resolver esta incógnita fue con la ayuda de técnicas espectroscópicas.

Se tomaron los espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV-lejano para todos los ancestros y se encontró que todos tienen una alta semejanza con el de la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (ScTIM) y presentan el máximo y los mínimos típicos para proteínas β/α plegadas (190 nm, 220 y 210 nm, respectivamente) (Figura 8). Además, el contenido de estructura secundaria obtenido a partir de la deconvolución de dichos espectros es similar al calculado para la estructura cristalográfica de ScTIM (Tabla 4).

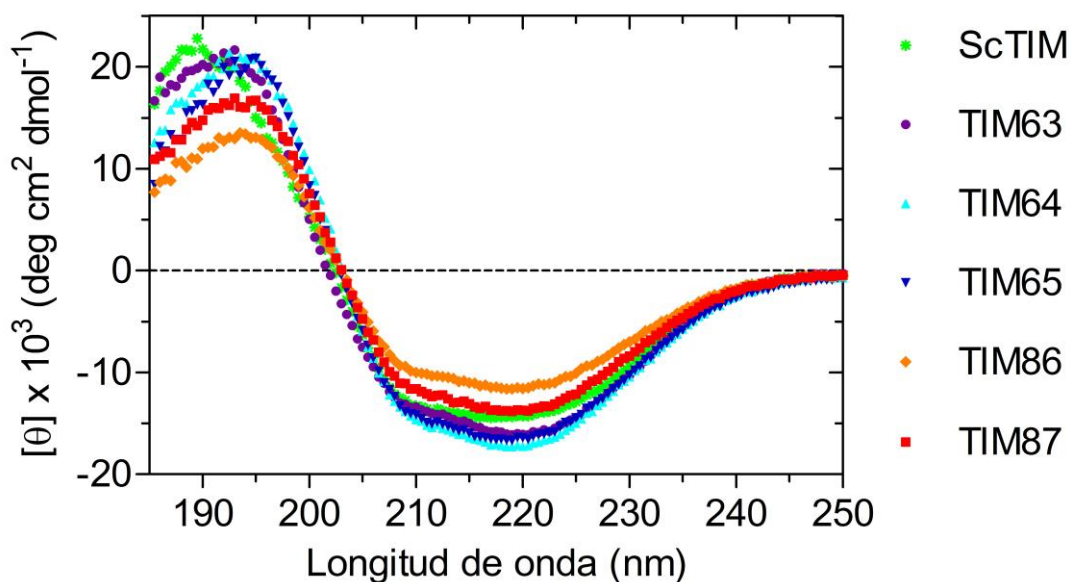


Figura 8. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano para las ancTIM y ScTIM.

Tabla 4. Porcentaje de estructura secundaria obtenido con el programa CDNN a partir de la deconvolución de los espectros presentados en la Figura 8.

TIM	hélice	hebra	giros	no repetitiva
ScTIM	38	13	16	30
TIM63	41	12	16	29
TIM64	42	11	15	30
TIM65	41	11	15	30
TIM86	31	19	17	30
TIM87	35	15	16	34

Posteriormente se midieron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca para todas las ancTIMs. La longitud de onda de máxima emisión de fluorescencia (λ_{\max}) para todas las proteínas ancestrales indica que los residuos de triptófano están aislados del solvente, probablemente debido a la presencia de estructura terciaria (Figura 9).

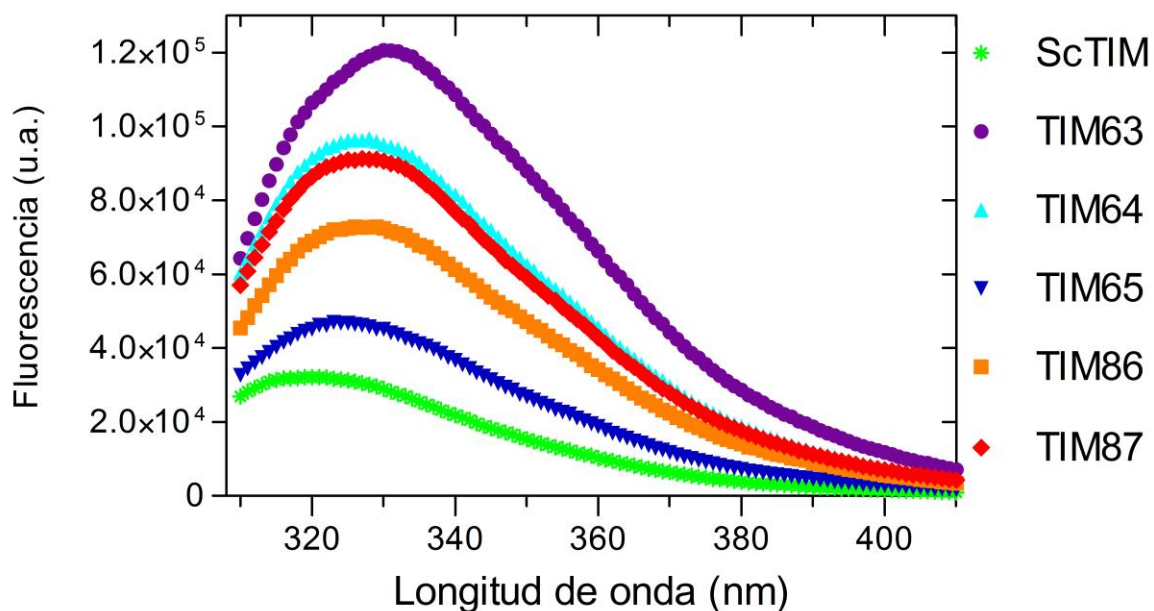


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia después de excitar a 295 nm.

Todas las ancTIMs también se sometieron a una cromatografía analítica de exclusión molecular para determinar el valor de su radio hidrodinámico (radio de Stokes: R_s), los valores obtenidos corresponden a lo esperado para un dímero compacto de TIM (Tabla 5).

Tabla 5. Radio hidrodinámico de ancTIMs obtenido por cromatografía de exclusión molecular

TIM	R_s (Å)
ScTIM	30
TIM63	29.5
TIM64	30
TIM65	30.5
TIM86	29.9
TIM87	29.9

Posteriormente se investigó la termoestabilidad siguiendo el cambio en la señal de dicroísmo circular a 220 nm al aumentar la temperatura. Se observó que todas las proteínas se despliegan de manera irreversible con una transición monofásica y cooperativa. Mientras que TIM65 presenta un T_m parecida a las observadas en TIMs existentes, todas las otras ancTIMs demuestran tener una mayor termoestabilidad (Figura 10, Los datos hasta ahora presentados indican que las ancTIMs estudiadas en este trabajo son dímeros compactos y estables. A pesar del gran éxito que esto representa, es decir, que secuencias inferidas por métodos bioinformáticos generen proteínas plegadas, todavía era necesario analizar si dichos ancestros presentaban actividad enzimática.

Tabla 6).

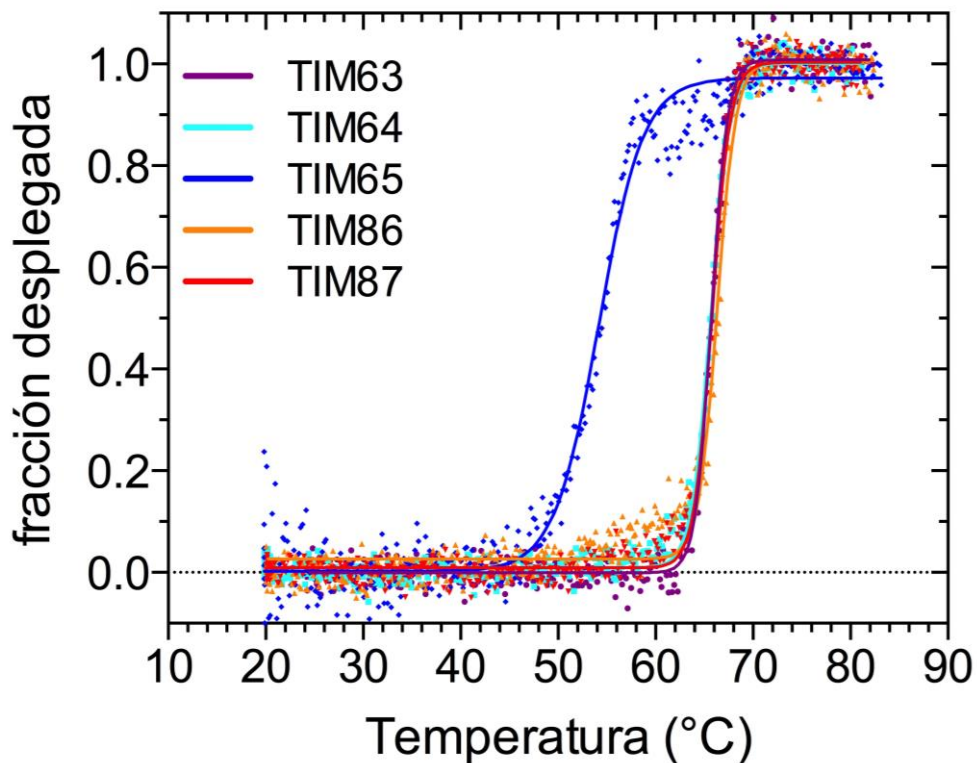


Figura 10. Despliegamiento térmico de ancTIMs. Tasa de calentamiento: 1.5 °C/min.

Los datos hasta ahora presentados indican que las ancTIMs estudiadas en este trabajo son dímeros compactos y estables. A pesar del gran éxito que esto representa, es decir, que secuencias inferidas por métodos bioinformáticos generen proteínas plegadas, todavía era necesario analizar si dichos ancestros presentaban actividad enzimática.

Tabla 6. Temperatura media de desnaturalización para ancTIMs

TIM	T_m^{app} (°C)	referencia
TIM63	65.7 ± 0.03	Schulte-Sasse Jiménez 2013
TIM64	65.7 ± 0.03	Este trabajo
TIM65	54.2 ± 0.10	Este trabajo
TIM86	66.3 ± 0.05	Este trabajo
TIM87	65.8 ± 0.03	Este trabajo
ScTIM	59.1	Benítez-Cardoza, Rojo-Domínguez, and Hernández-Arana 2001
TcTIM	58.5	Costas et al. 2009

La alta eficiencia catalítica observada en las TIMs existentes recae principalmente en el posicionamiento específico de los residuos catalíticos. Por ejemplo, la k_{cat} de la TIM de pollo disminuye en tres órdenes de magnitud cuando el carboxilato del sitio activo (E165) se mueve 1 Å en la mutante E165D (Raines et al. 1986). La catálisis de las cinco ancTIMs estudiadas en este proyecto se describe adecuadamente con un comportamiento tipo Michaelis-Menten con eficiencias catalíticas muy parecidas a las reportadas para TIM existentes (Figura 11, Tabla 7). Es importante remarcar que TIM65, el ancestro con menor termoestabilidad, fue el que presentó la mayor eficiencia catalítica. A pesar de que TIM63 exhibe la menor eficiencia catalítica dentro de los ancestros, ésta es solamente un orden de magnitud menor a la de ScTIM.

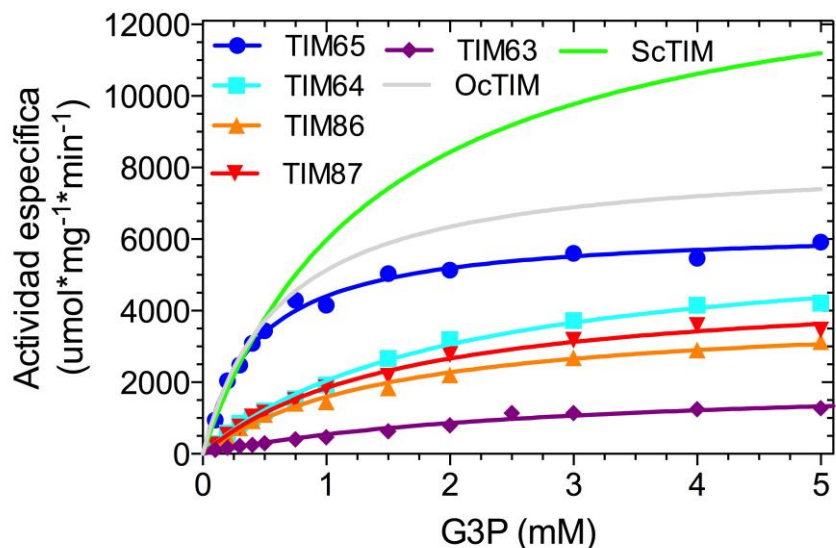


Figura 11. Cinéticas de Michaelis-Menten para las ancTIM en la dirección G3P → DHAP.

Tabla 7. Parámetros cinéticos para las ancTIM en comparación con TIMs existentes.

TIM	k_{cat} ($\times 10^3 \text{ s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	Referencia
HsTIM	6.20	0.25 ± 0.05	6.2×10^8	Schliebs et al., 1997
TIM65	2.88 ± 0.06	0.43 ± 0.03	1.67×10^8	Este trabajo
AFAAS	7.02	1.09 ± 0.07	1.61×10^8	Peimbert et al., 2008
ScTIM	6.40	1.40	1.14×10^8	Peimbert et al., 2008
ccTIM	1.18	0.34 ± 0.04	8.68×10^7	Sullivan et al., 2011
PLATA	4.16	2.44 ± 0.20	4.26×10^7	Peimbert et al., 2008
TIM64	2.80 ± 0.09	1.98 ± 0.14	3.54×10^7	Este trabajo
TIM87	2.19 ± 0.08	1.59 ± 0.13	3.44×10^7	Este trabajo
TIM86	1.83 ± 0.07	1.51 ± 0.13	3.04×10^7	Este trabajo
TIM63	0.96 ± 0.05	2.82 ± 0.34	8.51×10^6	Schulte-Sasse, 2013
monoTIM	5.20	4.10 ± 0.6	3.17×10^4	Schliebs et al., 1997
LFYAA	1.04 ± 0.04	1.26 ± 0.12	2.06×10^4	Peimbert et al., 2008
LFFFL	0.69 ± 0.05	1.20 ± 0.21	1.44×10^4	Peimbert et al., 2008

LFFFL, LFFYA: TIMs diseñadas para estabilizar la interfase con el programa Rosetta. PLATA, AFAAS: TIMs modificadas por evolución dirigida. ccTIM: TIM consenso a partir de 639 secuencias.

Debido a que TIM63 corresponde al nodo más antiguo que se “revivió” en este proyecto, se decidió llevar a cabo una caracterización más profunda de ella para así poder comprender mejor la correlación entre estructura, estabilidad y función en la evolución de la TIM.

En un principio se hizo el intento de cristalizar TIM63 en ausencia de ligando, sin embargo, a pesar de que sí se formaron cristales, éstos eran maclas y no fue posible separar las redes cristalinas. Esto se debe probablemente a una heterogeneidad de poblaciones. La única condición exitosa para la cristalización de este ancestro fue en presencia del análogo del estado de transición fosfoglicohidroamato (PGH) (Figura 12), la estructura final se resolvió a una resolución de 1.9 Å (Tabla 8). La unidad asimétrica para TIM63 consiste en un dímero y una primera observación a la estructura confirmó lo que se había observado previamente con un modelo de la estructura de la enzima: que los residuos con baja verosimilitud de reconstrucción se encuentran principalmente expuestos al solvente en la parte externa del barril, lejos de sitios importantes como la interfase entre monómeros o el sitio activo.

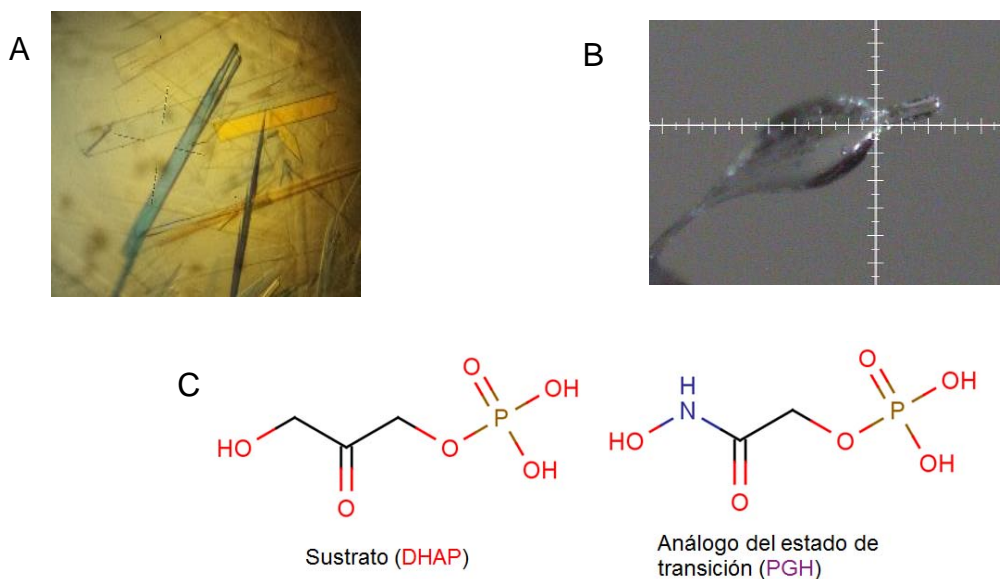


Figura 12. Cristalización de TIM63. A) Foto del cristal de TIM63. B) Cristal de TIM63 montado en el asa listo para ser colectado. C) Comparación de la composición química y de la geometría entre DHAP y PGH.

Tabla 8. Parámetros cristalográficos resultantes del afinamiento de la estructura de TIM63.

Parámetro	Valor
Grupo espacial	P1 (triclínico)
Dimensiones de la celda unitaria	a=43.02 Å; b=48.77 Å; c=71.20 Å $\alpha = 91.28^\circ$; $\beta = 100.14^\circ$; $\gamma = 118.65^\circ$
Rango de resolución (Å)	42.47 – 1.9
R _{work} – R _{free}	0.166 – 0.202
Integridad (%)	94.7
Número total de átomos	4294
Átomos de proteína	3843
Moléculas de agua	431
Átomos de PGH	20
Factor B promedio, todos los átomos (Å)	27.0
Residuos en regiones preferidas (%)	96
Residuos en regiones permitidas (%)	4
Residuos en regiones prohibidas (%)	0

Se analizó la estructura de TIM63 para compararla con otras estructuras de TIMs existentes de eucariontes (Tabla 9). A pesar de que la identidad de secuencia entre TIM63 y todas las demás varía entre el 59 y el 71%, el RMSD está entre 0.38 y 0.76 Å. Los resultados de los cálculos de área en la molécula demuestran que no hay diferencia significativa en el área accesible al solvente (ASA) total del dímero (ASA_{tot}) o el ASA de la interfase (ASA_{diss}), así como tampoco en el número de puentes de hidrógeno del dímero. La única diferencia es muy pequeña y corresponde a la fracción de ASA polar del dímero (Tabla 10). Más adelante se discutirá este resultado.

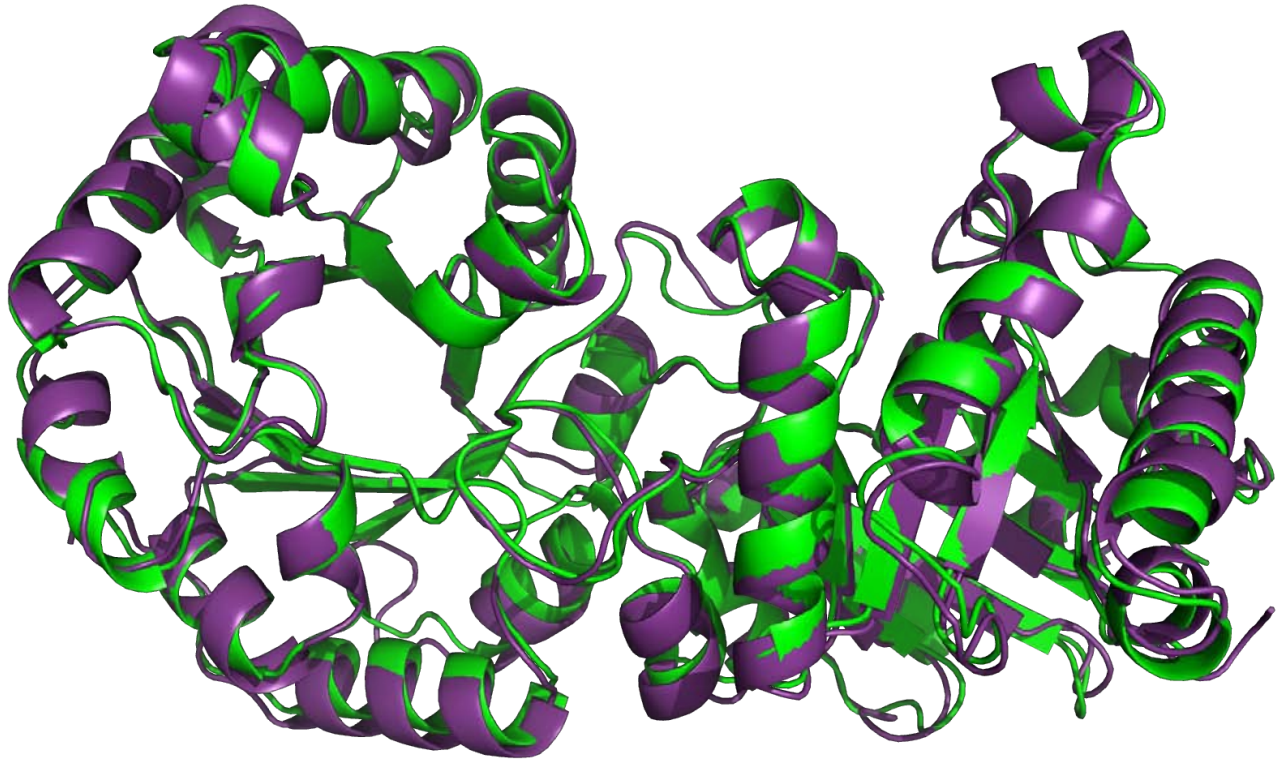


Figura 13. Alineamiento estructural entre TIM63 y ScTIM. Se presenta a TIM63 en morado y ScTIM (PDB ID 7TIM) en verde.

Se consideró pertinente hacer un análisis más profundo en las regiones del sitio activo y la interfase del dímero, ya que se requiere la integridad de ambas para llevar a cabo una catálisis exitosa.

En lo que corresponde a interacciones de la interfase, es posible dividir las estructuras de TIMs eucariontes depositadas en el PDB en dos grupos dependiendo del número de puentes salinos que presentan: cuatro u ocho. Los residuos que participan en los primeros cuatro puentes salinos están conservados en las secuencias de TIMs eucariontes (R99 y E78 en la numeración de ScTIM). Los otros cuatro puentes salinos se forman entre residuos presentes solamente en algunas estructuras cristalográficas (K17 y D48 en ScTIM) y están conservados en grupos específicos del árbol filogenético (

Figura 14 y Figura 15).

Tabla 9. Comparación de características estructurales entre cristales de TIMs eucarionotes.

	1HTI	7TIM	1TPH	1MOO	1M6J	Promedio	TIM63	
Resolución (Å)	2.8	1.9	1.8	1.7	1.5	--	1.9	
Ligando	PGA	PGH	PGH	--	--	--	PGH	
Conformación del asa 6	abierto/ cerrado	cerrado	cerrado	cerrado	abierto	--	cerrado	
RMSD (Å)	0.673	0.667	0.384	0.717	0.762	--	--	
puentes de H (totales)	494	491	519	522	542	514 ± 21	514	
puentes de H (interfase)	31	27	29	21	28	27 ± 4	22	
Puentes salinos (interfase)	8	8	8	4	4	6 ± 2	4	
Estructura secundaria (STRIDE)	Coil	22.2%	19.4%	20.4%	21.0%	19.6%	20.5 ± 1.1 %	19.6%
	Hebra	15.3%	15.8%	16.3%	16.1%	14.2%	15.6 ± 0.8 %	15.2%
	Giros	16.5%	19.0%	15.1%	16.9%	11.1%	14.8 ± 3.2 %	16.8%
	Hélice	45.9%	45.7%	48.2%	45.9%	55.0%	43.4 ± 1.7 %	43.6%

Tabla 10. Áreas de superficie en cristales de TIMs eucariontes.

	1HTI	7TIM	1TPH	1MO0	1M6J	Promedio	TIM63
	1280.6	1400.2	1092.8	991.4	934.8	1139.96 ± 196.1	916.4
$\Delta\text{ASA}_{\text{diss}}$	2090.1	1854.3	2182.0	2141.1	2164.0	2086.3 ± 134.2	2347.0
total	3370.7	3254.5	3274.8	3132.5	3098.8	3226.26 ± 110.7	3263.4
fracción polar	0.38	0.43	0.33	0.32	0.30	0.35 ± 0.1	0.28
	4087.0	4370.3	6474.0	4543.6	4848.1	4864.6 ± 941.1	4728.3
$\Delta\text{ASA}_{\text{des}}$	13614.8	13023.0	14779.9	13237.5	13583.7	13647.78 ± 679.3	13889.6
total	17701.8	17393.3	21253.9	17781.1	18431.8	18512.38 ± 1578.5	18617.9
	5367.6	5770.5	7566.8	5535.0	5782.9	6004.56 ± 890.3	5644.7
$\Delta\text{ASA}_{\text{rot}}$	15704.9	14877.3	16961.9	15378.6	15747.7	15734.08 ± 769.6	16236.6
total	21072.5	20647.8	24528.7	20913.6	21530.6	21738.64 ± 1592.3	21881.3
$\Delta\text{ASA}_{\text{diss}} / \Delta\text{ASA}_{\text{rot}}$	0.16	0.16	0.13	0.15	0.14	0.15 ± 0.01	0.15

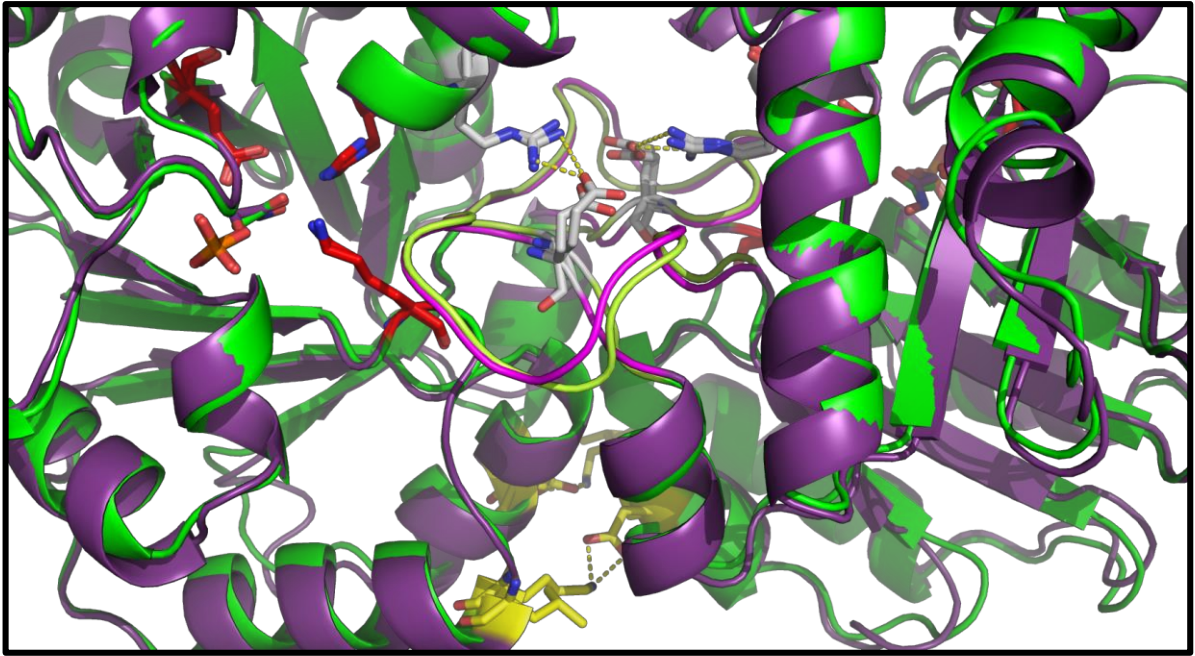


Figura 14. Puentes salinos en la interfase de TIM63. La figura presenta una superposición de TIM63 (morada) y ScTIM (verde, PDB ID 7TIM). En rojo se encuentran resaltados los residuos del sitio activo. El asa 3 de la interfase de TIM63 y ScTIM está en rosa y verde, respectivamente. Los pares de residuos conservados están en blanco mientras que los no conservados están en amarillo.

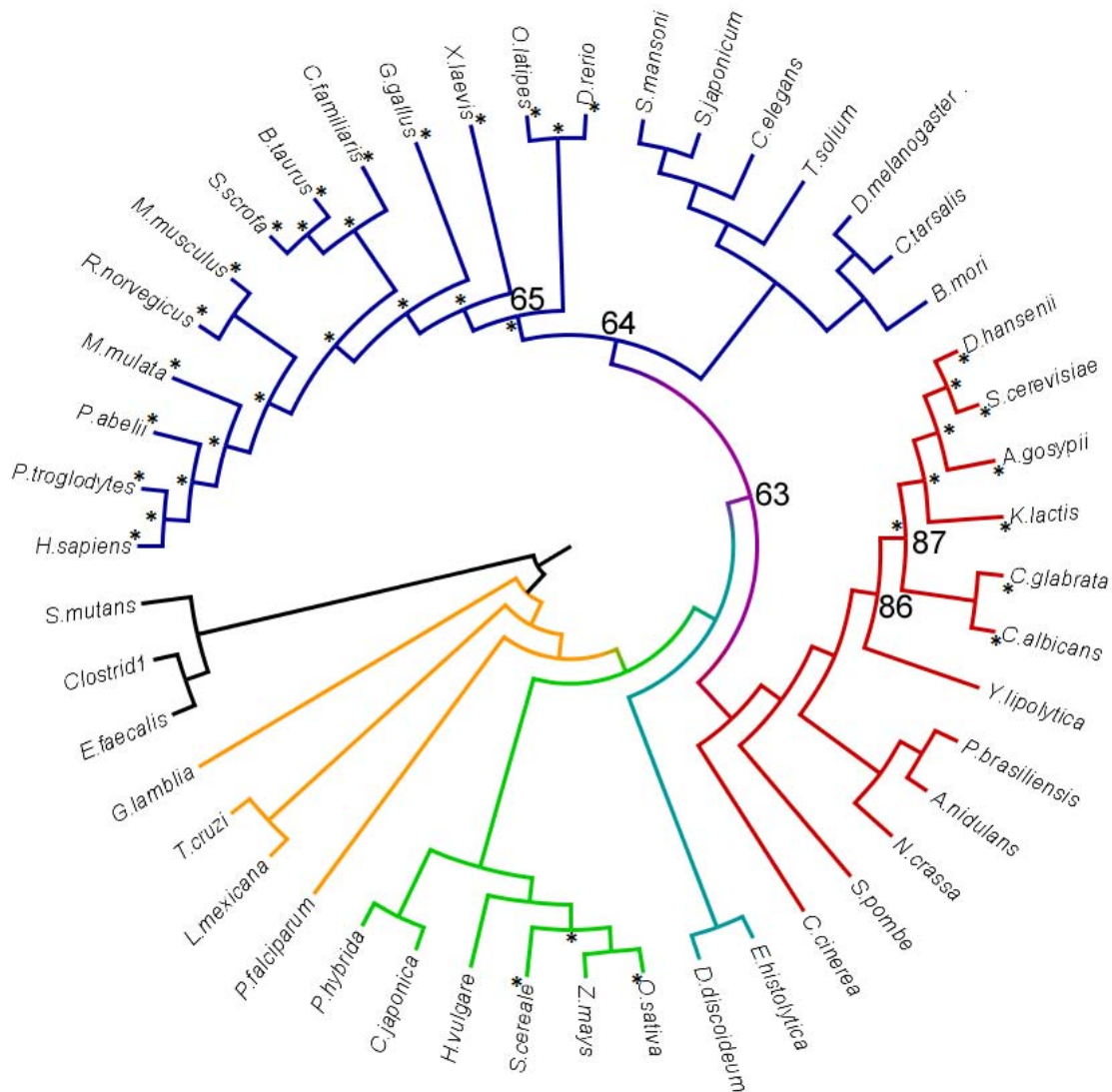


Figura 15. Distribución filogenética de puentes salinos en la interfase de la TIM. Los asteriscos indican aquellas secuencias (existentes o ancestrales) que tienen los residuos necesarios para formar los 8 puentes salinos de la interfase.

La unión del ligando al sitio activo de la TIM induce un cambio conformacional que provoca el cierre del asa catalítica $\beta\alpha 6$. Esta transición es relevante ya que posiciona al carboxilo catalítico de E165 para facilitar la transferencia de protones, además de que protege al sustrato del solvente para evitar la descomposición no deseada hacia metilgloxal y fosfato (Pompliano, Peyman, and Knowles 1990). Mencionado lo anterior, la molécula de PGH también está protegido del solvente en TIM63 y los tres residuos catalíticos están orientados para la catálisis tal y como están en el complejo ScTIM-PGH

(Figura 16). De hecho, los 15 puentes de hidrógeno entre PGH y ScTIM, cuatro de ellos mediados por moléculas de agua, están conservados en ambas estructuras. Estos resultados coinciden con datos termodinámicos obtenidos en experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (Figura 17). Los valores de la energía libre asociada a la unión de PGH (ΔG_b) en ScTIM y TIM63 (-7.15 ± 0.03 y -6.29 ± 0.09 kcal mol⁻¹, respectivamente) son muy similares, además de que ambas reacciones están favorecidas entálpicamente (Figura 17C).

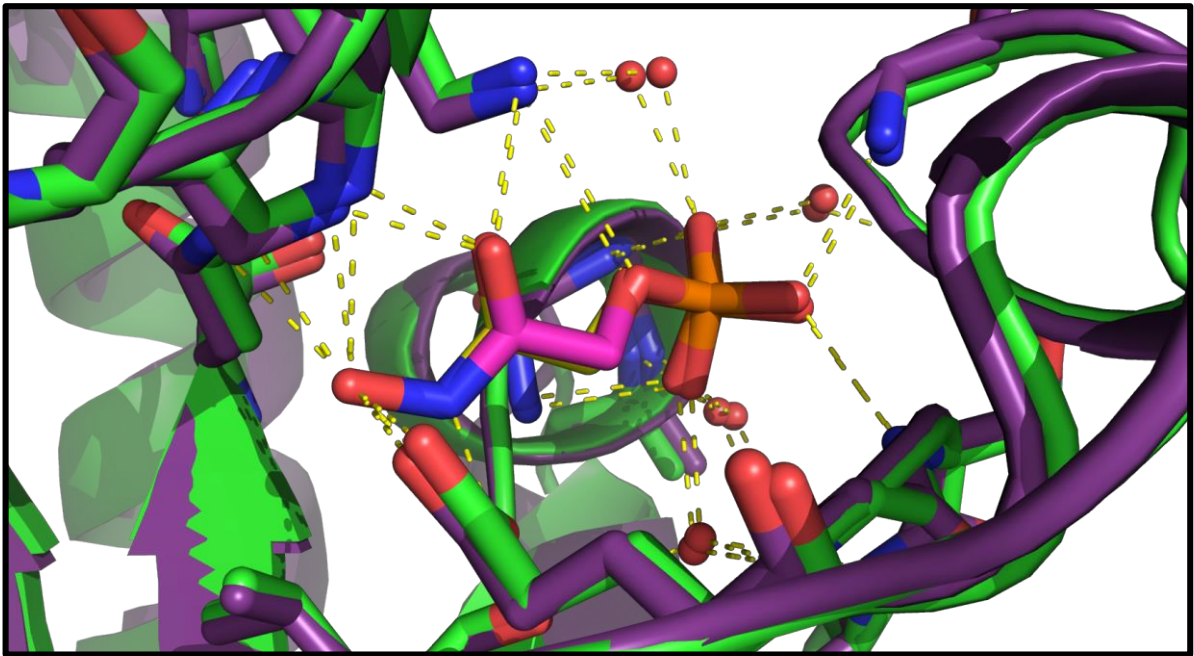


Figura 16. Superposición de los sitios activos de ScTIM y TIM63. ScTIM en verde y TIM63 en morado.

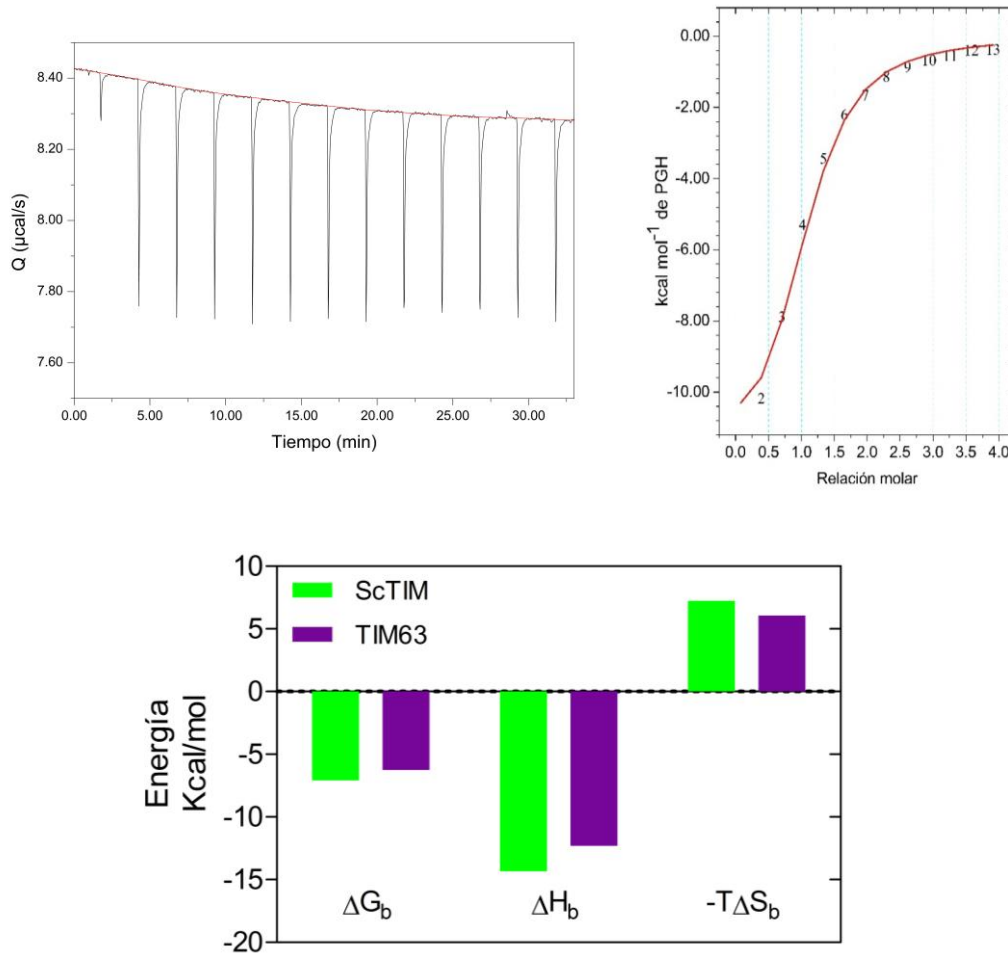


Figura 17. ITC de unión de PGH a TIM63. A) Termograma de unión a 25 °C. B) Isotherma a partir de la integración de los picos del termograma en A. C) Comparación de la firma termodinámica de unión de TIM63 y ScTIM(Serratos et al. 2011).

Por lo anterior es posible proponer que las particularidades de la topología tipo barril TIM, su estado de asociación y su función son características altamente conservadas desde la divergencia del linaje opistoconto hace 1.37 mil millones de años.

Una característica que comparten todas las TIM silvestres hasta ahora estudiadas es su naturaleza oligomérica. A pesar de que cada monómero tiene los residuos necesarios para llevar a cabo la catálisis, esta especie es inactiva y poco estable. Como consecuencia de lo anterior la dilución de TIM lleva a una disminución de la actividad específica que, a su vez, depende de la magnitud de la energía libre del proceso de disociación (ΔG_{diss}). Por ejemplo, ScTIM es un dímero muy estable que no pierde

actividad a una concentración de 1 nM; en contraste, todas las ancTIMs presentan una inactivación dependiente de la concentración de proteína en el rango μM (Figura 18). La disminución en la actividad descrita por la ecuación de disociación al equilibrio (ecuación 6) predice un cambio en la fracción de moléculas activas desde 0.9 a 0.1 en un rango de 2.86 unidades logarítmicas decimales al diluir a las enzimas (Weber 1992). Tanto las TIMs de especies bacterianas (Romero-Romero et al. 2015) como TIM63 se ajustan exitosamente con este modelo, además de que una muestra diluida e inactiva de estas proteínas recupera su actividad al ser concentrada, lo cual implica que la disociación de estas proteínas se puede modelar como un proceso reversible de dos estados (símbolo vacío en la Figura 18). Por el contrario, el resto de los ancestros presenta un decaimiento agudo en la actividad que no se describe de manera adecuada por modelos al equilibrio, lo que implica la presencia de un paso irreversible (Weber 1992). Mientras que la concentración requerida para la inactivación de la mitad de las moléculas de los cuatro ancestros más recientes (0.03 – 0.05 μM , Tabla 11) es similar a las de las TIMs de tripanosomas (Horacio Reyes-Vivas et al. 2002); TIM63 presenta un valor bastante menor, similar al que se encontró para una mutante de HsTIM parcialmente monomérica (M14Q) (Mainfroid et al. 1996b). En resumen, las evidencias presentadas en el párrafo anterior sugieren que TIM63 presenta la menor energía libre de asociación entre los ancestros estudiados en este proyecto, sin embargo, los monómeros generados durante la disociación son capaces de reasociarse de manera reversible. Un dato interesante que complementa esta hipótesis es que los espectros de TIM63 a altas y bajas concentraciones (1 mg/ml vs. 0.005 mg/ml) tienen un λ_{max} muy similar, lo que sugiere que los monómeros no sufren cambios drásticos en la exposición de residuos aromáticos al disociarse. De manera concordante, el R_s de los monómeros de TIM63 obtenido por cromatografía de exclusión molecular es de 25 Å (Schulte-Sasse Jiménez 2013), similar al esperado para un monómero compacto (Morgan et al. 2000).

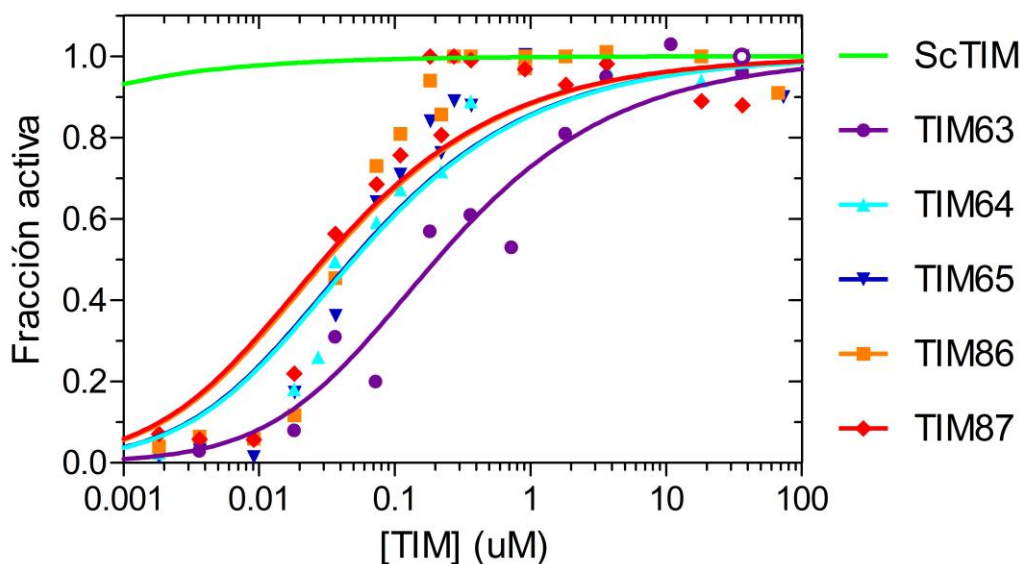


Figura 18. Pérdida de la actividad en ancTIM dependiente de la dilución.

Tabla 11. Valores de la constante de disociación para ancTIMs.

TIM	K_{dis}^{app} (M)	Referencia
ScTIM	10.1×10^{-12}	
TIM63	20.29×10^{-8}	(Schulte-Sasse Jiménez 2013)
TIM64	49.92×10^{-9}	Este trabajo
TIM65	48.43×10^{-9}	Este trabajo
TIM86	31.44×10^{-9}	Este trabajo
TIM87	30.13×10^{-9}	Este trabajo
TcTIM	41.11×10^{-9}	(Zomosa-Signoret et al. 2003)

Debido a la alta estabilidad del dímero de las TIMs silvestres, no ha sido posible evaluar la energética de la asociación entre subunidades, sin embargo, las características de TIM63 arriba discutidas permitieron hacer un análisis termodinámico de este proceso

por medio de experimentos de calorimetría de disociación isotérmica (IDC). Mientras que el cambio en la entalpía durante la disociación de los monómeros (ΔH_{diss}) es ligeramente exotérmico a 25 C y pasa a ser endotérmico al aumentar la temperatura, el término entrópico ($T\Delta S_{\text{diss}}$) favorece las asociación a temperaturas bajas y promueve la disociación a temperaturas mayores (Schulte-Sasse Jiménez 2013). El cambio en la capacidad calorífica ($\Delta C_{p_{\text{diss}}}$) estimado a partir de la dependencia de la temperatura contra ΔH_{diss} o $T\Delta S_{\text{diss}}$ es muy similar (2092 ± 122 y 2100 ± 138 cal mol⁻¹ K⁻¹, respectivamente, Figura 19). El hecho de que el valor obtenido de $\Delta C_{p_{\text{diss}}}$ por IDC para TIM63 sea mayor al calculado para un proceso de disociación de cuerpo rígido ($0.5\text{-}1.0$ Kcal mol⁻¹ K⁻¹) indica que la separación de los monómeros no sucede en ausencia de cambios conformacionales. Este valor corresponde a la tercera parte del obtenido para el proceso total de disociación y desplegamiento en TIM bacterianas ($\Delta C_{p_{\text{tot}}}$, 6 Kcal mol⁻¹ K⁻¹)(Romero-Romero et al. 2015).

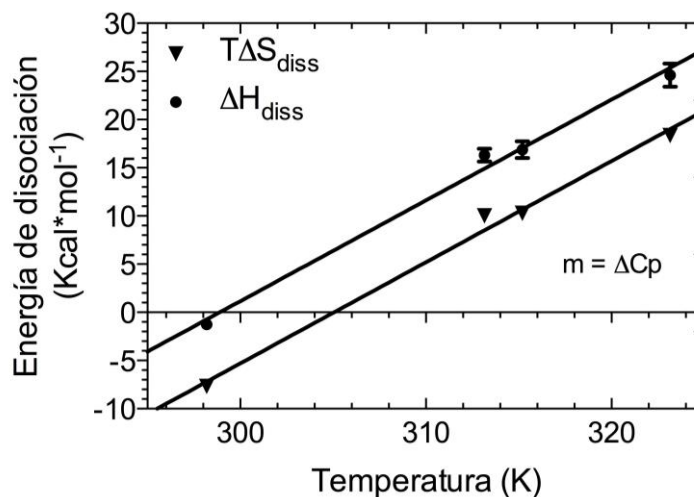


Figura 19. Cambio de ΔH_{diss} y ΔS_{diss} con respecto a la temperatura para la disociación de TIM63. La pendiente del cambio en la entalpía y en la entropía corresponde al cambio en la capacidad calorífica del proceso.

Para poder poner lo anterior en el contexto del desplegamiento completo de la enzima, se llevaron a cabo experimentos de Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC). Todas las endotermas obtenidas a diferentes concentraciones de proteína y velocidades de barrido presentan una sola transición que no se recupera en un segundo barrido, es decir, su proceso de desplegamiento es irreversible. Los valores de T_m (66.5 - 68.4 °C)

son muy similares a los obtenidos por CD a concentraciones bajas de proteína (65.8 °C). Los valores de ΔH_{tot} obtenidos a partir del área bajo la curva o por un ajuste de la misma a un modelo irreversible de dos estados (182 ± 6 y 159 ± 3 , Kcal/mol, respectivamente) son menores que los de la TIM de *Entamoeba histolytica* (EhTIM, 266 Kcal/mol) (Tellez et al. 2008) pero están dentro del rango de los calculados a partir de parametrizaciones empíricas basadas en el cambio en ASA (ΔASA) o en el número de residuos (155 y 350 Kcal/mol, respectivamente) (Tabla 12) (Spolar and Record 1994; Murphy and Freire 1992; Makhatadze and Privalov 1995; Robertson and Murphy 1997; Madan and Sharp 2001). Para profundizar la caracterización del proceso de desplegamiento se calculó la energía de activación (E_{act}) a partir de los análisis de Arrhenius y Lumry-Eyring (Figura 20). El promedio de E_{act} para TIM63 es de 200.7 ± 3.2 Kcal/mol, un valor mayor a los observados en TIMs eucariontes nativas (66-191 Kcal/mol) (Tellez et al. 2008; Costas et al. 2009). En resumen, TIM63 presenta valores bajos de ΔH_{Tot} pero T_m y E_{act} altas. Esto concuerda con la propuesta de que evolutivamente la estabilidad cinética se selecciona con mayor fuerza que la estabilidad termodinámica (Sanchez-Ruiz 2010).

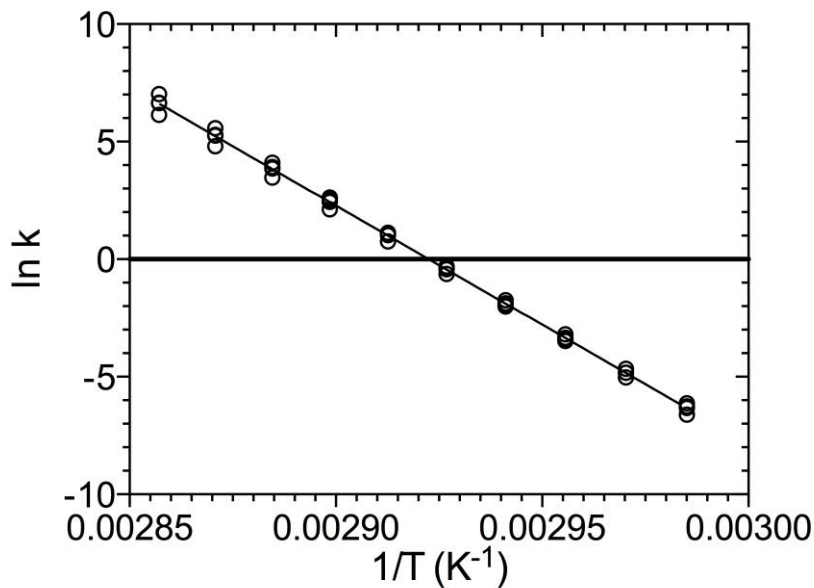


Figura 20. Gráfico de Arrhenius para el desplegamiento de TIM63. La pendiente equivale a E_{act} .

Tabla 12. Parámetros experimentales y paramétricos para la disociación de TIM63 y EhTIM.

	TIM63		EhTIM	
	Paramétrico	Experimental	Paramétrico	Experimental
ΔH_{diss} (Kcal/mol)	9.0 - 61	71.2	10.9 - 51	146.8
ΔH_{unf} (Kcal/mol)	32 - 145	49.6	105 - 155	59.6
ΔH_{tot} (Kcal/mol)	75 - 350	170.4	220 - 360	266
$\Delta H_{diss}/\Delta H_{tot}$	0.06 - 0.17	0.42	0.05 - 0.14	0.55

ΔH_{diss} : entalpía de disociación por dímero; ΔH_{unf} : entalpía de desplegamiento por monómero;

ΔH_{tot} : $2 \times \Delta H_{unf} + \Delta H_{diss}$

La fracción del cambio total de área que corresponde a la de la asociación entre monómeros ($\Delta ASA_{diss}/\Delta ASA_{tot}$) es muy similar entre TIM63 y las estructuras cristalográficas reportadas para TIMs eucariontes ($15 \pm 1 \%$) además de que no presenta diferencias significativas en sus contribuciones de área polar y no polar (Tabla 10). A pesar de que el valor de la fracción $\Delta H_{diss}/\Delta H_{tot}$ (0.42) es más alta que la calculada a partir de ecuaciones paramétricas (0.06 - 0.17), es menor que el obtenido para EhTIM, lo que sugiere que los cambios conformacionales en TIM63 son menos drásticos.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizaron cinco proteínas ancestrales eucariontes reconstruidas a partir de secuencias de enzimas *triosafosfato isomerasa* existentes. A partir de los resultados presentados es posible concluir que todos los ancestros son dímeros compactos con alto contenido de estructura secundaria que protegen a sus residuos hidrofóbicos del solvente. Además se demostró que, a excepción de TIM65, el resto de las proteínas presentan una alta termoestabilidad.

Al igual que las TIM existentes, la única forma activa para todas las ancTIM es el dímero, estado en el que llevan a cabo la reacción de isomerización con una alta eficiencia catalítica, sin embargo, TIM63 (el ancestro más antiguo) muestra una eficiencia dos órdenes de magnitud menor a la observada tanto en TIMs existentes como ancestrales. Es interesante recalcar que en la historia de la TIM se observa que conforme se avanza en la profundidad del árbol, aparecen enzimas con mayor termoestabilidad y menor actividad. Tanto en la rama de los animales, como en la de los hongos, las enzimas más “jóvenes” presentan una mayor actividad; por ejemplo, TIM63 tiene alta termoestabilidad y baja eficiencia catalítica, mientras que TIM65 muestra justamente el comportamiento opuesto con baja termoestabilidad y muy alta eficiencia catalítica. Lo anterior lleva a dos conclusiones distintas e independientes, por un lado, la necesidad de la TIM de formar un oligómero para poder ser activa es una característica que se remonta muy atrás en la historia evolutiva de esta enzima, al menos en todo el linaje opistoconto. Por otro lado, parecería que hay un “intercambio” entre la selección por función o por estabilidad (Tokuriki and Tawfik 2009). En cuanto a la estabilidad, los resultados demuestran que todos los ancestros, pero especialmente TIM63, se disocian más fácilmente que sus TIMs descendientes. Esto quiere decir que la estabilidad del dímero ancestral está disminuida. Como se menciona en la sección de resultados, los cuatro ancestros más recientes (TIM65, 64, 86 y 87) no se ajustan al modelo de disociación por dilución, lo que indica la presencia de un paso irreversible (Figura 18). El único proceso que se ajusta bien es el de la disociación de TIM63. Esto podría parecer paradójico si se piensa que ésta es la enzima más inestable, sin embargo, es la única ancTIM que presenta reversibilidad en el proceso de disociación por dilución (Figura 18). Así pues,

sería posible sugerir que las TIMs ancestrales fueron enzimas menos estables en su asociación, que probablemente desde mucho tiempo atrás habrían perdido la capacidad catalítica del monómero, pero que tenían la capacidad de reasociarse reversiblemente. Esto implicaría que la TIM no siempre ha sido una enzima perfecta, si no que con el tiempo ha mejorado su estabilidad como dímero y a la vez su catálisis, sin embargo, esto ha sido a costa de su termoestabilidad.

Por otra parte se observó que el desplegamiento térmico de TIM63 presenta un valor de ΔH_{tot} pequeño, al menos 70 Kcal/mol menor al observado para EhTIM. Esto proviene principalmente de que ΔH_{diss} es también pequeño, a pesar de que el número de interacciones en la interfase del dímero es semejante al observado en las TIMs de eucariontes existentes.

Una posibilidad con respecto al origen de la TIM en todos los organismos es que originalmente haya sido un monómero activo que en algún momento de la evolución comenzó a asociarse y perdió su capacidad catalítica como monómero. Hasta ahora no se tiene evidencia para demostrar esto, sin embargo, a pesar de que TIM63 cuenta con una menor eficiencia catalítica y menor estabilidad a la dilución que las TIMs existentes, presenta una muy alta termoestabilidad y una energía de activación muy elevada. Esto aunado al hecho de que es el único ancestro que presenta reversibilidad en el proceso de disociación, esto sugiere que el ancestro opistoconto de la TIM perdió la capacidad de funcionar como monómero. La hipótesis que se desprende de este trabajo es que el ancestro opistoconto posiblemente se encontraba en la transición entre el monómero activo y el dímero estable. Las TIMs que existen hoy en día tienen energías de asociación más altas que las de TIM63, lo que provoca que su proceso de disociación sea menos frecuente, de tal manera que rara vez están en estado monomérico, sin embargo, una vez que se disocian les es imposible regresar al dímero. Por el contrario, a pesar de que TIM63 tiene la capacidad de reasociarse, lo que le confiere una ventaja que compensa la baja energía de asociación.

El análisis de los cristales de TIM63 indica que no hay diferencias estructurales evidentes entre este ancestro y TIMs existentes que pudieran indicar en dónde radica la inestabilidad de la asociación. Hay dos posibles explicaciones a este resultado: 1) la

conformación del estado cristalográfico (en presencia de PGH) no es la misma que en solución o 2) los contactos que estabilizan al dímero no se localizan en la interfase. Con respecto a la primera hipótesis, está demostrado que la unión de un ligando al sitio activo le confiere rigidez y estabilidad a la enzima. Para calcular la contribución del PGH a la estabilidad de la enzima sería necesario hacer experimentos de desplegamiento de TIM63 en presencia de diferentes concentraciones de PGH. Con respecto a la segunda posibilidad, Perica y colaboradores hicieron un análisis de redes de contactos en enzimas homólogas que presentaban diferentes estados oligoméricos (Perica et al. 2014) y encontraron que las interacciones responsables no se localizaban directamente en la interfase de las subunidades. Para comprobar si ese es nuestro caso se podría hacer un análisis de la red de contactos que diferencian a TIM63 (poco estable), TIM65 (estable) y HsTIM (muy estable) y generar mutantes de esos sitios.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis nos permiten sugerir que probablemente la TIM ha evolucionado a partir de un dímero con alta termoestabilidad pero poca afinidad entre sus monómeros (no activos) y con una eficiencia catalítica que no está limitada por difusión hacia enzimas con termoestabilidad moderada pero una muy alta eficiencia catalítica y alta estabilidad del estado dimérico. Las estrategias moleculares para lograr lo anterior no están bien definidas, ya que los residuos responsables no están localizados únicamente en la interfase del dímero, si no que probablemente se trata de mutaciones epistáticas en regiones alejadas.

PERSPECTIVAS

Al realizar la reconstrucción ancestral de proteínas es necesario tener en mente que las secuencias con las que se está trabajando son las de mayor probabilidad de reconstrucción, sin embargo, esto no implica que se estudia la secuencia exacta de la proteína que existió en el tiempo ancestral. Si se plantea de manera optimista que cada sitio de la proteína (250 aminoácidos) tiene una probabilidad de reconstrucción del 95%, entonces la probabilidad de encontrar la secuencia correcta es de 0.95^{250} (2.7×10^{-6}); en resumen, una probabilidad realmente baja. A partir de lo anterior, es claro que no se puede tener la certeza de que se ha encontrado “LA secuencia ancestral”, sin embargo, es posible hacer consideraciones y tener el mayor cuidado posible, para que las secuencias reconstruidas sean lo más cercanas a lo que pudo haber existido en el pasado. Por ello, hay que tomar en cuenta que los parámetros utilizados en la reconstrucción (secuencias existentes, árbol filogenético, matriz de sustitución y método de reconstrucción) modelan el proceso y deben ser escogidos con criterio para tener la mayor confianza en todo el proceso. El método demostrará ser suficientemente robusto cuando los resultados de reconstrucciones independientes sean comparables.

Existen diferentes opciones para aumentar la confiabilidad de la reconstrucción. La primera es hacer una nueva reconstrucción con el mismo conjunto de secuencias pero cambiando el método usado, es decir, ahora usar métodos Bayesianos. La discusión sobre qué método es más preciso sigue siendo debatible, sin embargo, ya hay trabajos de reconstrucción en donde se han utilizado ambos métodos en paralelo y se ha reportado que los resultados son similares (Hobbs et al. 2012). La segunda posibilidad es cambiar el set de datos para realizar un segundo ciclo de reconstrucción. En la reconstrucción de la TIM aquí reportada se utilizaron 44 secuencias de eucariontes entre las cuales se incluían 20 de animales, 12 de hongos y 6 de plantas. En una nueva reconstrucción se podrían usar las secuencias de animales y hongos que ya se tienen, así como nuevas secuencias de ambos reinos, tomando en cuenta que es necesario tener un balance entre ambas para no generar un sesgo en el procedimiento. Todo esto con el fin de generar de nuevo la reconstrucción del nodo correspondiente al ancestro común más reciente de animales y hongos, pero a la vez, poder aumentar la resolución del árbol

con respecto a los nodos más recientes. Estudiar un ancestro inferido en un segundo ciclo de reconstrucción, ya sea a la misma profundidad del árbol o a una profundidad mayor, podría confirmar los resultados observados para TIM63- o incluso acercarnos más a la TIM que realmente existió en el pasado.

Es evidente que la reconstrucción ancestral de secuencias tiene un amplio potencial para explicar problemas de diferente índole. Incluso se ha propuesto que el siguiente paso en la aplicación de esta metodología es la integración de los complejos proteicos ancestrales en organismos modernos y a muy largo plazo reconstruir por completo un microorganismo ancestral (Merkl and Sterner 2015).

BIBLIOGRAFÍA

Akanuma, S., Y. Nakajima, S.-i. Yokobori, M. Kimura, N. Nemoto, T. Mase, K.-i. Miyazono, M. Tanokura, and A. Yamagishi. 2013. "Experimental Evidence for the Thermophilicity of Ancestral Life." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): 11067–72.

Albery, W J, and J R Knowles. 1976. "Evolution of Enzyme Function and the Development of Catalytic Efficiency." *Biochemistry* 15 (25): 5631–40.

Anfinsen, C B, E Haber, M Sela, and F H White. 1961. "The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease during Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47 (September): 1309–14.

Banner, D W, A C Bloomer, G A Petsko, D C Phillips, C I Pogson, I A Wilson, P H Corran, et al. 1975. "Structure of Chicken Muscle Triose Phosphate Isomerase Determined Crystallographically at 2.5 Angstrom Resolution Using Amino Acid Sequence Data." *Nature* 255 (5510): 609–14.

Benítez-Cardoza, C G, a Rojo-Domínguez, and a Hernández-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): 9049–58.

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). AAAS: 1283.

Cisneros Armas, David Alejandro. 2003. "Termodinámica de La Disociación de La Triosafosfato Isomerasa de *Entamoeba Histolytica*."

Costas, Miguel, David Rodríguez-Larrea, Leonardo De Maria, Torben V Borchert, Armando Gómez-Puyou, and Jose M Sanchez-Ruiz. 2009. "Between-Species Variation in the Kinetic Stability of TIM Proteins Linked to Solvation-Barrier Free Energies." *Journal of Molecular Biology* 385 (3). Elsevier Ltd: 924–37.

Enríquez-Flores, Sergio, Adela Rodríguez-Romero, Gloria Hernández-Alcántara, Jesús Oria-Hernández, Pedro Gutiérrez-Castrellón, Gerardo Pérez-Hernández, Ignacio de la Mora-de la Mora, et al. 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): 2711–24.

Farber, G K, and G A Petsko. 1990. "The Evolution of Alpha/beta Barrel Enzymes." *Trends in Biochemical Sciences* 15 (6): 228–34.

Gaucher, Eric a, Sridhar Govindarajan, and Omjoy K Ganesh. 2008. "Palaeotemperature Trend for Precambrian Life Inferred from Resurrected Proteins." *Nature* 451 (7179): 704–7.

Harms, Michael J, and Joseph W Thornton. 2010. "Analyzing Protein Structure and Function Using Ancestral Gene Reconstruction." *Current Opinion in Structural Biology* 20 (3). Elsevier Ltd: 360–66.

Hobbs, Joanne K, Charis Shepherd, David J Saul, Nicholas J Demetras, Svend Haaning, Colin R Monk, Roy M Daniel, and Vickery L Arcus. 2012. "On the Origin and Evolution of Thermophily: Reconstruction of Functional Precambrian Enzymes from Ancestors of *Bacillus*." *Molecular Biology and Evolution* 29 (2): 825–35.

Jermann, T.M., J.G. Opitz, J. Stackhouse, and S.A. Benner. 1995. "Reconstructing the Evolutionary History of the Artiodactyl Ribonuclease Superfamily." *Nature* 374 (6517): 57–59.

Joubert, F, A W Neitz, and A I Louw. 2001. "Structure-Based Inhibitor Screening: A Family of Sulfonated Dye Inhibitors for Malaria Parasite Triosephosphate Isomerase." *Proteins* 45 (2): 136–43.

Knobeloch, D, a Schmidt, P Scheerer, N Krauss, H Wessner, Ch Scholz, G Küttner, T von Rintelen, a Wessel, and W Höhne. 2010. "A Coleopteran Triosephosphate Isomerase: X-Ray Structure and Phylogenetic Impact of Insect Sequences." *Insect Molecular Biology* 19 (1): 35–48.

Konno, Ayumu, Tomohisa Ogawa, Tsuyoshi Shirai, and Koji Muramoto. 2007. "Reconstruction of a Probable Ancestral Form of Conger Eel Galectins Revealed Their Rapid Adaptive Evolution Process for Specific Carbohydrate Recognition." *Molecular Biology and Evolution* 24 (11): 2504–14.

Krietsch, W K, 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." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 14 (2): 289–300.

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." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 168 (1): 69–74.

Landa, A, A Rojo-Domínguez, L Jiménez, and D A Fernández-Velasco. 1997. "Sequencing, Expression and Properties of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba Histolytica*." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 247 (1): 348–55.

Le, Si Quang, and Olivier Gascuel. 2008. "An Improved General Amino Acid Replacement Matrix." *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1307–20.

Liberles, David. 2007. *Ancestral Sequence Reconstruction. Annals of Physics*. First Edit. Vol. 54. Oxford University Press.

López-Velázquez, Gabriel, Dora Molina-Ortiz, Nallely Cabrera, Gloria Hernández-Alcántara, Jorge Peon-Peralta, Lilian Yépez-Mulia, Ruy Pérez-Montfort, and Horacio Reyes-Vivas. 2004. "An Unusual Triosephosphate Isomerase from the Early Divergent Eukaryote *Giardia Lamblia*." *Proteins* 55 (4): 824–34.

Lutzoni, F., F. Kauff, C. J. Cox, D. McLaughlin, G. Celio, B. Dentinger, M. Padamsee, et al. 2004. "Assembling the Fungal Tree of Life: Progress, Classification, and Evolution of Subcellular Traits." *American Journal of Botany* 91 (10): 1446–80.

Madan, Bhupinder, and Kim A. Sharp. 2001. "Hydration Heat Capacity of Nucleic Acid Constituents Determined from the Random Network Model." *Biophysical Journal* 81 (4): 1881–87.

Mainfroid, V, P Terpstra, M Beauregard, J M Frère, S C Mande, W G Hol, J a Martial, and K Goraj. 1996a. "Three hTIM Mutants That Provide New Insights on Why TIM Is a Dimer." *Journal of Molecular Biology* 257 (2): 441–56.

Mainfroid, V, P Terpstra, M Beauregard, J M Frère, S C Mande, W G Hol, J A Martial, and K Goraj. 1996b. "Three hTIM Mutants That Provide New Insights on Why TIM Is a Dimer." *Journal of Molecular Biology* 257 (2): 441–56.

Maithal, Kapil, Gudihal Ravindra, G Nagaraj, S Kumar Singh, Hemalatha Balaram, and P Balaram. 2002. "Subunit Interface Mutation Disrupting an Aromatic Cluster in Plasmodium Falciparum Triosephosphate Isomerase: Effect on Dimer Stability." *Protein Engineering* 15 (7): 575–84.

Makhatadze, G I, and P L Privalov. 1995. "Energetics of Protein Structure." *Advances in Protein Chemistry* 47 (January): 307–425.

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." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 3 (5): 810–21.

Merkel, Rainer, and Reinhard Sterner. 2015. "Ancestral Protein Reconstruction: Techniques and Applications." *Biological Chemistry*, January.

Miller, G., and Scott Spoolman. 2012. *Environmental Science*. Cengage Learning.

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." *Journal of Molecular Biology* 300 (1): 11–16.

Murphy, K P, and E Freire. 1992. "Thermodynamics of Structural Stability and Cooperative Folding Behavior in Proteins." *Advances in Protein Chemistry* 43 (January): 313–61.

Murzin, A G, S E Brenner, T Hubbard, and C Chothia. 1995. "SCOP: A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures." *Journal of Molecular Biology* 247 (4): 536–40.

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." *Journal of Molecular Biology* 321 (5): 741–65.

Orengo, C A, A D Michie, S Jones, D T Jones, M B Swindells, and J M Thornton. 1997. "CATH--a Hierarchic Classification of Protein Domain Structures." *Structure (London, England : 1993)* 5 (8): 1093–1108.

Ortlund, Eric a, Jamie T Bridgham, Matthew R Redinbo, and Joseph W Thornton. 2007. "Crystal Structure of an Ancient Protein: Evolution by Conformational Epistasis." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5844): 1544–48.

Page, R.D., and E. Holmes. 1998. *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science.

Pardo-Ávila, Fátima Alejandra. 2011. "Evolución de La Triosafosfato Isomerasa." Universidad Nacional Autónoma de México.

Perez-Jimenez, Raul, Alvaro Inglés-Prieto, Zi-Ming Zhao, Inmaculada Sanchez-Romero, Jorge Alegre-Cebollada, Pallav Kosuri, Sergi Garcia-Manyes, et al. 2011. "Single-Molecule Paleoenzymology Probes the Chemistry of Resurrected Enzymes." *Nature Structural & Molecular Biology*, no. January (April). Nature Publishing Group: 1–6.

Perica, T., Y. Kondo, S. P. Tiwari, S. H. McLaughlin, K. R. Kemplen, X. Zhang, A. Steward, N. Reuter, J. Clarke, and S. A. Teichmann. 2014. "Evolution of Oligomeric State through Allosteric Pathways That Mimic Ligand Binding." *Science* 346 (6216): 1254346–1254346.

Pompliano, D L, a Peyman, and J R Knowles. 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): 3186–94.

Raines, R T, E L Sutton, D R Straus, W Gilbert, and J R Knowles. 1986. "Reaction Energetics of a Mutant Triosephosphate Isomerase in Which the Active-Site Glutamate Has Been Changed to Aspartate." *Biochemistry* 25 (22): 7142–54.

Raven, Peter H., and George B. Johnson. 2002. *Biology*. McGraw-Hill.

Reyes-Vivas, H, G Hernández-Alcantara, G López-Velazquez, N Cabrera, R Pérez-Montfort, M T de Gómez-Puyou, and A Gómez-Puyou. 2001. "Factors That Control the Reactivity of the Interface Cysteine of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma Brucei* and *Trypanosoma Cruzi*." *Biochemistry* 40 (10): 3134–40.

Reyes-Vivas, Horacio, Eduardo Martínez-Martínez, Guillermo Mendoza-Hernández, Gabriel López-Velázquez, Ruy Pérez-Montfort, Marietta Tuena de Gómez-Puyou, and Armando Gómez-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): 580–90.

Risso, Valeria A, Jose A Gavira, Diego F Mejia-Carmona, Eric A Gaucher, and Jose M Sanchez-Ruiz. 2013. "Hyperstability and Substrate Promiscuity in Laboratory Resurrections of Precambrian B-Lactamases." *Journal of the American Chemical Society* 135 (8). American Chemical Society: 2899–2902.

Robertson, Andrew D., and Kenneth P. Murphy. 1997. "Protein Structure and the Energetics of Protein Stability." *Chemical Reviews* 97 (5): 1251–68.

Romero-Romero, Sergio, Miguel Costas, Adela Rodríguez-Romero, and D Alejandro Fernández-Velasco. 2015. "Reversibility and Two State Behaviour in the Thermal Unfolding of Oligomeric TIM Barrel Proteins." *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 17 (32). The Royal Society of Chemistry: 20699–714.

Saab-Rincon, G., V. R. Juarez, J. Osuna, F. Sanchez, and X. Soberon. 2001. "Different Strategies to Recover the Activity of Monomeric Triosephosphate Isomerase by Directed Evolution." *Protein Engineering Design and Selection* 14 (3): 149–55.

Sanchez-Ruiz, Jose M. 2010. "Protein Kinetic Stability." *Biophysical Chemistry* 148 (1-3): 1–15.

Schliebs, W, N Thanki, R Eritja, and R Wierenga. 1996. "Active Site Properties of Monomeric Triosephosphate Isomerase (monoTIM) as Deduced from Mutational and Structural Studies." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 5 (2): 229–39.

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): 9655–62.

Schulte-Sasse Jiménez, Mariana. 2013. "Caracterización Físicoquímica de Un Ancestro Eucariote de La Enzima Triosafofato Isomerasa." Universidad Nacional Autónoma de México.

Serratos, Iris N, Gerardo Pérez-Hernández, Georgina Garza-Ramos, Andrés Hernández-Arana, Edith González-Mondragón, and Rafael a Zubillaga. 2011. "Binding Thermodynamics of Phosphorylated Inhibitors to Triosephosphate Isomerase and the Contribution of Electrostatic Interactions." *Journal of Molecular Biology* 405 (1). Elsevier Ltd: 158–72.

Silverman, J A, R Balakrishnan, and P B Harbury. 2001. "Reverse Engineering the (beta/alpha)₈ Barrel Fold." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3092–97.

Spolar, R S, and M T Record. 1994. "Coupling of Local Folding to Site-Specific Binding of Proteins to DNA." *Science (New York, N.Y.)* 263 (5148): 777–84.

Tellez, Luis a, Luis M Blancas-Mejia, Ernesto Carrillo-Nava, Guillermo Mendoza-Hernández, David a Cisneros, and D Alejandro Fernández-Velasco. 2008. "Thermal Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba Histolytica*: Dimer Dissociation Leads to Extensive Unfolding." *Biochemistry* 47 (44): 11665–73.

Thomson, J Michael, Eric a Gaucher, Michelle F Burgan, Danny W De Kee, Tang Li, John P Aris, and Steven a Benner. 2005. "Resurrecting Ancestral Alcohol Dehydrogenases from Yeast." *Nature Genetics* 37 (6): 630–35.

Thornton, Joseph W. 2004. "Resurrecting Ancient Genes: Experimental Analysis of Extinct Molecules." *Nature Reviews. Genetics* 5 (5): 366–75.

Tokuriki, Nobuhiko, and Dan S Tawfik. 2009. "Stability Effects of Mutations and Protein Evolvability." *Current Opinion in Structural Biology* 19 (5): 596–604.

Ugalde, Juan a, Belinda S W Chang, and Mikhail V Matz. 2004. "Evolution of Coral Pigments Recreated." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5689): 1433.

Voet, Donald, and Judith G. Voet. 2010. *Biochemistry, 4th Edition*. Vol. 22. John Wiley & Sons.

Weber, Gregorio. 1992. *Protein Interactions*. Chapman and Hall.

Wierenga, R. 2001. "The TIM-Barrel Fold: A Versatile Framework for Efficient Enzymes." *FEBS Letters* 492 (3): 193–98.

Zomosa-Signoret, Viviana, Gloria Hernández-Alcántara, Horacio Reyes-Vivas, Eduardo Martínez-Martínez, Georgina Garza-Ramos, Ruy Pérez-Montfort, Marietta Tuena De Gómez-Puyou, and Armando Gómez-Puyou. 2003. "Control of the Reactivation Kinetics of Homodimeric Triosephosphate Isomerase from Unfolded Monomers." *Biochemistry* 42 (11). American Chemical Society: 3311–18.

Zuckerkandl, E, and L Pauling. 1965. "Molecules as Documents of Evolutionary History." *Journal of Theoretical Biology* 8 (2): 357–66.