



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la interfaz dimérica de la tiorredoxina 1 del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, y el efecto de mutaciones en su estructura.

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA

M. en C. Adam Andres Campos Acevedo

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Enrique Rudiño Piñera, Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rosario Muñoz Clares, Facultad de Química, UNAM

Dr. Alfredo Torres Larios, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México, junio, 2016



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.

Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Rudiño Piñera.

Agradecemos el apoyo técnico de la Biól. Sonia Patricia Rojas Trejo.

Agradecemos al Laboratorio de estructura de proteínas del LANEM del Instituto de Química, UNAM, por las facilidades prestadas.

Agradecemos el apoyo al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Este proyecto fue financiado por CONACyT ciencia básica proyecto No. 204639 y por el PAPIIT IN209114.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera agradecerle por su motivación, dedicación, entrega, profesionalismo; por darme todas la herramientas, libertades y habilidades para poder desarrollarme en la ciencia, así como su valiosa amistad.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares y al Dr. Alfredo Torres Larios por su invaluable aportación en este proyecto.

Agradecer infinitamente por su cariño y su continuo apoyo a mi motor, mi energía a mis padres Guadalupe y Fernando, a mis hermanos, Fernando, Daniel, Nancy, en especial para Valeria y MariFer. A mi novia Sonia por su cariño, apoyo y paciencia durante todos estos años.

A la Biól. Sonia Rojas Trejo, al técnico Carlos Mújica Jiménez, a la M. en C. Georgina E. Espinosa Pérez, y al Dr. Abel Moreno Cárcamo por su asistencia, disposición y conocimiento en la obtención de experimentos claves para este proyecto.

A la prof. Elspeth Garman y a Robin L. Owen por su amistad, por su dedicación para la planeación de los experimentos y por darme la oportunidad de trabajar como parte de su grupo.

Al Dr. Javier Pérez, por su sencillez y capacidad para llevar a cabo los experimentos que fructificaron en una colaboración.

A los miembros del jurado la Dra. Adela Rodríguez Romero, la Dra. Lidia Riaño Umbarila, la Dra. Gloria Saab Rincón, el Dr. Lorenzo Segovia y al Dr. Carlos Amero Tello por las sugerencias, críticas constructivas y revisión de este trabajo.

A todos mis amigos que forman y formaron parte del grupo del laboratorio de cristalografía de rayos-X, por su ayuda, paciencia y buenos consejos.

Publicaciones derivadas de este trabajo

- **Campos-Acevedo, A.A.** Garcia-Orozco, K.D. Sotelo-Mundo, R.R. Rudino-Pinera, E. 2013. Expression, purification, crystallization and X-ray crystallographic studies of different redox states of the active site of thioredoxin 1 from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69, 488-493.
- Lopez-Falcon, B. Meyer-Nava, S. Hernandez-Rodriguez, B. **Campos, A.** Montero, D. Rudino, E. Vazquez, M. Zurita, M. Valadez-Graham, V. 2014. Characterization of the Drosophila Group Ortholog to the Amino-Terminus of the Alpha-Thalassemia and Mental Retardation X-Linked (ATRX) Vertebrate Protein *PLoS ONE*, 9, e113182.
- **Campos-Acevedo, A.A.** Rudino-Pinera, E. 2014. Crystallographic Studies Evidencing the High Energy Tolerance to Disrupting the Interface Disulfide Bond of Thioredoxin 1 from White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* *Molecules*, 19, 21113-21126.

En este escrito de tesis, las siglas, acrónimos y símbolos se utilizarán de acuerdo a su definición y uso original.

He aquí la explicación otorgada por el Dr. Ricardo Guerrero (Presidente de la Sociedad Española de Microbiología), del porque es importante mantener la nomenclatura en un lenguaje universal:

El español (o castellano), como los demás idiomas modernos, debería acatar las normas internacionales de nomenclatura química y bioquímica (IUPAC-IUBS), publicadas, por ejemplo, en el *Journal of Biological Chemistry* (Hellerman et al., 1966), recomiendan que las siglas, acrónimos y símbolos sean idénticos en todas las lenguas, y que se adopte la forma en la que fueron escritos inicialmente.

Por otra parte, al respetar estas normas, se mantiene también la más estricta lógica, dado que, si en cada lengua se cambiaran las letras o los símbolos, o su orden, podrían aparecer en español denominaciones tan extrañas como TFA para designar el “trifosfato de adenosina” (ATP en la nomenclatura internacional, y también en español), o tan ambiguas como DNA para el “dinucleótido de nicotina y adenina” (NAD en todas las lenguas).

Si “castellanizamos” todas las siglas bioquímicas, la explicación de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (descrita por Arthur Kornberg y Severo Ochoa, que les valió el premio Nobel de Fisiología o Medicina –no de Fisiología y Medicina, o de Medicina, solo– en 1959) quedaría de la siguiente e incomprensible forma:

“La síntesis del ADN requiere la acción conjunta de una transferencia de energía, aportada por el TFA (trifosfato de adenosina), y la intervención de la coenzima DNA (dinucleótido de nicotina y adenina).”

Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	7
Abstract	8
Resumen.....	9
Capítulo 1	10
1. Introducción	10
1.1 Antecedentes	11
1.1.1 Interacción proteína-proteína	11
1.1.2 Tiorredoxina.....	12
1.1.3 Estructura tridimensional de la tiorredoxina-1	13
1.1.4 Mecanismo de reacción	16
1.1.5 Sitio de interacción de la Trx	17
1.1.6 Formación de puentes disulfuro-intermoleculares en Trx.....	18
1.1.7 Homo-dímeros de Trx	18
Capítulo 2.....	24
2. Justificación.....	24
2.1 Hipótesis.....	25
2.2 Objetivos	25
2.2.1 Objetivos particulares.....	25
Capítulo 3	26
3. Sección experimental	26
3.1 Construcción de mutantes	26
3.1.2 Reacciones de amplificación	28
3.1.3 Construcción del Vector.....	29
3.1.4 Transformación de <i>E. coli</i>	30
3.2 Expresión y purificación de la <i>LvTrx_{wt}</i> y las <i>LvTrx_{mut}</i>	30
3.3 Ensayo de filtración en gel	31
3.4 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	32
3.5 Ensayo de actividad NADPH/TrxR- <i>LvTrx_{wt-mut}</i> -insulina	33
3.6 Cristalización de la <i>LvTrx_{wt}</i> y las <i>LvTrx_{mut}</i>	33
3.7 Colecta y determinación de las estructuras cristalográficas de la <i>LvTrx_{wt}</i> y las <i>LvTrx_{mut}</i>	34

3.8 Determinación de la forma y tamaño de la <i>LvTrx_{wt}</i> y las <i>LvTrx_{mut}</i> mediante la técnica de SAXS.....	34
3.9 Análisis cristalográfico del puente disulfuro-intermolecular a distintas dosis de energía depositada.....	36
3.9.1. Colecta de datos y experimentos de difracción	36
3.9.2. Colecta y determinación de las estructuras <i>LvTrx_{wt}-1x</i> y <i>LvTrx_{wt}-3x</i>	37
Capítulo 4.....	38
4. Resultados y discusión	38
4.1 Dimerización de la <i>LvTrx_{wt}</i>	38
4.2 Mutante Trp-31-Ala de la <i>LvTrx</i>	51
4.3 Mutante Asp-60-Ser de la <i>LvTrx</i>	56
4.4 Mutante Ala-66-Arg de la <i>LvTrx</i>	62
4.5 Mutante Cys-73-Ser de la <i>LvTrx</i>	65
4.6 Mutante Met-74-Glu de la <i>LvTrx</i>	69
4.7 Análisis cristalográfico del puente disulfuro-intermolecular a distintas dosis de energía	73
Capítulo 5.....	82
5.1 Discusión.....	82
5.2 Conclusiones	84
5.3 Perspectivas.....	85
5.4 Referencias.....	85
5.5 Lista de figuras	89
5.6 Lista de tablas.....	92
Anexo I.....	93
Daño por radiación en la cristalografía de rayos X	93
El daño por radiación en puentes disulfuro	94
Anexo II	95
Ensayo de actividad por insulina.....	95
Anexo III	97
Figuras extras	97

Abreviaturas y acrónimos

AChE- Acetilcolinesterasa.
Dif-RX- Difracción de rayos-X.
DLS- *Dynamic Light Scattering*.
DmTrx- Tiorredoxina de *Drosophila melanogaster*.
Dsb- Proteína promotora de puentes disulfuro.
DTT- Ditiotreitól
E. coli- *Escherichia coli*.
FTR- Ferredoxin-dependiente tiorredoxin reductasa.
Grx- Glutarredoxina.
hTrx- Tiorredoxina de humano.
IPTG- Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa- Kilodaltones.
LB- *Luria Broth*
LvTrx- Tiorredoxina de *Litopenaeus vannamei*.
LvTrx^{mut}- Tiorredoxina mutante de *Litopenaeus vannamei*.
LvTrx^{wr}- Tiorredoxina silvestre de *Litopenaeus vannamei*.
MX- Macromoléculas cristalográficas.
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NMR- *Nuclear Magnetic Resonance*.
NTR- NADPH-dependiente tiorredoxin reductasa.
O/N- Overnight
PAGE- *Polyacrylamide gel electrophoresis*.
PCR- *Polymerase Chain Reaction*.
PDAs- Parámetros de dispersión atómica.
PDB- *Protein Data Bank*.
PDI- Proteína disulfuro isomerasa.
RD- *Radiation Damage*/Daños por radiación.
RNS- *Reactive Nitrogen Species*.
ROS- *Reactive Oxygen Species*.
S- Tiolato.
SAXS- *Small-Angle X-ray Scattering*.
SDS-PAGE- *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*.
-SH- Tiol.
TRX- sistema Trx-TrxR.
Trx- Tiorredoxina.
TrxR- Tiorredoxina reductasa.

Abstract

Thioredoxin (Trx) is a type of oxidoreductase protein (~12 kDa) that has a conserved active site comprised of two cysteines, which catalyze the reduction of disulfide bonds in different biological systems. Trx is known for having redox activity as a monomer. However, the crystallographic structures of thioredoxin from shrimp *Litopenanaeus vannamei* (*LvTrx*) under different redox conditions reveal a dimeric form mediated by a disulfide bond through Cys-73 residue and other residues that are involved on the interface (Campos-Acevedo et al., 2013). Most of the contacts on the interface are formed by hydrophobic residues, Trp-31, Gly-33, Pro-34, Val-59, Ala-66, Ile-71, Ala-72 y Met-74, which bind closely with their monomeric counterpart such that they block the access of water molecules. The hydrophilic residues: Thr-30, Cys-32, Lys-36, Asp-60, Glu-63, Gln-67, Gln-70 and Cys-73 form other residues that are involved in the *LvTrx* interface. The total area of the *LvTrx* dimeric interface is 1294 Å².

The only report that describes the possible formation of a dimer in the crystalline state is for human thioredoxin (*hTrx*) (Weichsel et al., 1996; Andersen et al., 1997), which forms a dimer mediated by a disulfide bond (Cys-73) and other residues regardless of the redox state of the active-site. Following these investigations, NMR experiments were carried out with two mutants of *hTrx*, (Cys-62-Ala, Cys-69-Ala, Cys-73-Ala, Met-74-Thr) and (Cys-62-Ala, Cys-69-Ala, Cys-73-Ala), concluding that the monomeric species is predominant and no evidence was found for the existence of a dimeric form, as observed in the crystal structure of wildtype *hTrx* and the Cys-73-Ser mutant structure in *hTrx* (Gronenborn et al., 1999).

This project provides biochemical evidence for the existence of a monomer and dimer population. In order to determine which residues are responsible for the formation of the dimer in the *LvTrx*, five potential sites were investigated: Cys-73-Ser, Met-74-Glu, Trp-31-Ala, Asp-60-Ser and Ala-66-Arg.

Residue Cys-73 was found to be the main residue responsible for dimerization, based on biochemical assays and the crystallographic structures of the mutant Cys-73-Ser. This mutant is completely monomeric, making this residue essential for dimer formation and having the same preserved activity as the wild type *LvTrx*.

The Asp-60-Ser mutant was dimeric compromising its activity. The analysis of this structure shows the existence of more contacts due to the proximity of the interface residues.

In the case of the Trp-31-Ala mutant, the activity was compromised and showed a different structural arrangement when compared with the wild type.

In summary, this study provides evidence for the existence of a dimeric form of *LvTrx* both in solution and in crystalline state. The analysis of the interface by single mutations revealed that the Cys-73-Ser in the *LvTrx* is critical for dimer formation since the substitution of this residue by serine is sufficient to completely destabilize dimer formation resulting in only the monomeric form of *LvTrx*.

Resumen

La tiorredoxina-1 (Trx) es una proteína que forma parte del grupo de las oxidoreductasas. Su peso molecular es de aproximadamente 12 kDa y su sitio catalítico lo conforman dos cisteínas que catalizan la reducción de puentes disulfuro en diferentes sistemas biológicos.

Todos los reportes de la Trx establecen que el estado monomérico es fundamental para realizar la catálisis, sin embargo, la determinación de las estructuras cristalográficas bajo distintas condiciones redox de la tiorredoxina de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (*LvTrx*), siempre dieron lugar a una forma dimérica mediada por un puente disulfuro a través del residuo Cys-73 y de otros residuos que se encuentran involucrados en su interfaz (Campos-Acevedo et al., 2013). Considerando que las muestras empleadas para la cristalización mostraron actividad redox, se abrió la posibilidad de investigar si la forma dimérica de la *LvTrx* pudiera tener actividad, o bien si representa una variante inactiva de la enzima. Con respecto a los contactos que se encuentran involucrados en la interfaz dimérica, la mayoría son hidrofóbicos, conformados por los residuos de Trp-31, Gly-33, Pro-34, Val-59, Ala-66, Ile-71, Ala-72 y Met-74, bloqueando así, el acceso de moléculas de agua. Otros residuos que componen la interfaz de la *LvTrx* son residuos hidrofílicos, conformados por la Thr-30, Cys-32, Lys-36, Asp-60, Glu-63, Gln-67, Gln-70 y Cys-73. En total el área que compone la interfaz dimérica de la *LvTrx* es de 1,294 Å², todo lo anterior establece que el estado dimérico debería de ser muy estable incluso en solución.

El único reporte previo sobre la formación de un dímero casi idéntico al encontrado en la *LvTrx* en el estado cristalino, fue descrito para la tiorredoxina de humano (*hTrx*) (Weichsel et al., 1996; Andersen et al., 1997). Posteriormente, experimentos de RMN (Resonancia magnética nuclear), mostraron que la *hTrx* silvestre y ciertas mutantes en la zona de la interfaz, dieron lugar a especies monoméricas.

Este proyecto evidencia, mediante ensayos bioquímicos en solución, la existencia de dos poblaciones monómero-dímero en la *LvTrx*. Con la finalidad de determinar cuál de los residuos es o son responsables del mantenimiento de la forma dimérica en la *LvTrx*, se generaron mutantes en la zona de la interfaz: Cys-73-Ser, Met-74-Glu, Trp-31-Ala, Asp-60-Ser y Ala-66-Arg.

A través de diferentes ensayos en solución (SAXS, DLS, ensayos de actividad y filtración en gel), de la *LvTrx* silvestre y mutantes, así como mediante la obtención de la estructura cristalográfica de algunas de ellas (Cys-73-Ser, Asp-60-Ser y Trp-31-Ala), se determinó que la mutante Cys-73-Ser, da lugar a una Trx completamente monomérica, estableciendo que el puente disulfuro entre las Cys-73 es esencial para la formación del dímero. Además, la mutante Cys-73-Ser, conserva la misma actividad que la *LvTrx* silvestre.

En suma, este trabajo demuestra la existencia de un dímero de la *LvTrx* en solución, así como la coexistencia con su forma monomérica en la *LvTrx* silvestre. La disección de la interfaz de la *LvTrx*, permitió determinar que la Cys-73 es fundamental para la formación del dímero, ya que la sustitución de este residuo por el residuo serina es suficiente para evitar su formación, obteniendo la forma monomérica de la *LvTrx*. Un resultado intrigante en este trabajo es el hecho de que sin importar el estado oligomérico la *LvTrx* puede catalizar procesos redox.

Capítulo 1

1. Introducción

Es claro que las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés), juegan un papel esencial sobre las funciones celulares y fisiológicas en todos los organismos y que el exceder o no regular apropiadamente la producción de estas especies, provocan un mal funcionamiento. Estas especies reactivas ejercen su efecto en distintos blancos, tales como DNA, proteínas y lípidos, cambiando reversible o irreversiblemente su estructura molecular y función (Halliwell, 2001).

Una de las reacciones químicas empleadas para contener el efecto negativo de las ROS y RNS es la modificación reversible que presenta el grupo tiol, jugando un papel primordial en la regulación celular. Claramente, el sistema de enzimas que controlan los niveles de estas especies reactivas y aquellas que catalizan la reversibilidad de los grupos tioles tras su modificación inducida por estas especies reactivas, son elementos críticos para la viabilidad celular (Holmgren, 1985).

Uno de los sistemas más comunes de enzimas antioxidantes en diversos organismos es el sistema tiorredoxina (TRX) conformado por una tiorredoxina (Trx) y una tiorredoxin reductasa (TrxR). La Trx es una proteína de tamaño pequeño (~12 kDa), con un sitio redox compuesto por dos residuos de cisteínas embebidos en una secuencia conservada: Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (Holmgren, 1985). La Trx actúa como una reductasa, catalizando la reducción de proteínas que contienen puentes disulfuro, dando lugar a la formación de grupos tiol libres. Esta reacción resulta en la oxidación del ditiol del sitio catalítico de la Trx y la consecuente formación de un puente disulfuro transitorio. La reducción del estado oxidado de la Trx a la forma ditiol, es catalizada por la TrxR utilizando NADPH como agente reductor (Hashemy & Holmgren, 2008).

En este proyecto se trabajó con la tiorredoxina de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. La LvTrx a diferencia de las Trx's previamente reportadas, tiene la característica de formar un dímero cristalográfico mediado por un puente disulfuro entre el residuo Cys-73 de cada monómero y otros residuos que conforman su interfaz (Campos-Acevedo et al., 2013). El único antecedente acerca de la dimerización de la Trx, se ha reportado para la estructura cristalográfica de la tiorredoxina de humano (*hTrx*). Sin embargo, experimentos de NMR, mostraron un comportamiento monomérico en la *hTrx* silvestre así como también en ciertas mutantes (Gronenborn et al., 1999); concluyendo los autores que el arreglo dimérico de la *hTrx* obtenido por cristalografía, podría ser resultado del arreglo en la matriz cristalina.

Este proyecto doctoral fue diseñado principalmente para evidenciar la existencia del dímero de la LvTrx en solución y en su caso, tratar de explicar su existencia en un contexto biológico. Para hacerlo, primero se hizo un análisis estructural que describe las fuerzas que estabilizan las interacciones entre monómeros en la

estructura cristalográfica de la *LvTrx* silvestre (*LvTrx_{wt}*). Este análisis permitió proponer mutaciones puntuales, alguna de las cuales dieron lugar a la obtención de nuevas estructuras cristalográficas. Adicionalmente se realizaron estudios bioquímicos-estructurales en solución (SAXS), tanto de la *LvTrx_{wt}*, como de las mutantes diseñadas y expresadas. También, utilizando a la *LvTrx_{wt}* se realizó un análisis cristalográfico enfocado en el deterioro de los puentes disulfuro de los sitios catalíticos y del puente disulfuro Cys-73-Cys-73' de la interfaz bajo diferentes dosis de radiación depositadas en el transcurso de un experimento de difracción de rayos-X. Por último, se discuten los resultados obtenidos en el contexto de la información existente con respecto a las Trx's, así como en el contexto del camarón *Litopenaeus vannamei* (*Lv*).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Interacción proteína-proteína

Uno de los temas centrales y de gran interés para la biología estructural son las interacciones proteína-proteína. Estas interacciones son determinantes en la mayoría de los procesos biológicos y la detección del o de los residuos específicos que contribuyen a la estabilidad, así como la fuerza de estas interacciones, son fundamentales para entender su función biológica (Moreira et al., 2007). Por lo tanto, la exploración a nivel atómico de las interacciones proteína-proteína, permitirá un mejor entendimiento acerca de las fuerzas que establecen estas interacciones; así como de los procesos de reconocimiento de complejos biológicos.

Algunos estudios han dividido a las interacciones proteína-proteína en varios subtipos y han analizado las características de cada uno de ellos. Se ha propuesto una distinción entre interacciones obligadas e interacciones transitorias (Jones & Thornton, 1996). Otros autores han dividido a las interacciones proteína-proteína en seis tipos: intra-dominio, dominio-dominio, homo-obligómero, hetero-obligómero, homo-complejo y hetero-complejo (Ofrañ & Rost, 2003). Incluso se ha propuesto la división de la zona de la interfaz en áreas *Core* y *Rim*, con base en la accesibilidad que tienen los residuos involucrados de la interfaz hacia el solvente (Chakrabarti & Janin, 2002).

Las interacciones proteína-proteína son complejas, por lo tanto, pueden ser caracterizadas por su tamaño, forma, y complementariedad en su superficie. Las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, así como la flexibilidad de las moléculas involucradas, son fundamentales para su interacción (Cho et al., 2006; Yan et al., 2008). El sitio de reconocimiento proteína-proteína es regido tanto por la forma en su superficie, así como de su complementariedad electrostática (Janin & Chothia, 1990; Jones & Thornton, 1996). Se ha descrito que la superficie necesaria para hablar de interacciones entre monómeros va del rango de 1,200-2,000 Å². Interfaces de menor tamaño, del rango de 1,150-1,200 Å², normalmente constituyen complejos de vida corta y de muy baja estabilidad (Lo Conte et al., 1999). Interfaces de mayor tamaño, del rango de 2,000-4,600 Å², están presentes entre proteasas y una clase particular de inhibidores, entre proteínas G y otros componentes que

forman parte del sistema de transducción de señales, etc. (Horton & Lewis, 1992). En la mayoría de los casos un área de aproximadamente 600 Å² corresponde a un área mínima necesaria para hacer un sello hermético hidrofóbico para que estas interacciones sean energéticamente favorables (Jones & Thornton, 1995).

1.1.2 Tiorredoxina

La Trx es una proteína que se caracteriza por la presencia de un sitio catalítico conservado Trp-Cys-Gly-Pro-Cys. La Trx cataliza la reducción de proteínas blanco que contienen puentes disulfuros a través de un intercambio reversible ditiol-disulfuro. La Trx fue originalmente descrita como un donador de electrones para la ribonucleótido reductasa en *E. coli*. (Laurent et al., 1964). En protistas y animales existen dos formas o parálogos de Trx. La Trx-1, encontrada en el citosol y la Trx-2, encontrada en la mitocondria (Powis & Montfort, 2001). La Trx-2 mitocondrial de mamíferos tiene un alto porcentaje de similitud con la Trx-1 de *E. coli*. En plantas, existen múltiples genes que codifican para más de 20 diferentes tipos de Trx, las cuales se clasifican en seis isoformas: Trx-*f*, Trx-*h*, Trx-*m*, Trx-*y*, Trx-*x* y Trx-*o*. Estas y otras características de las Trx's en plantas y su relación con las Trx's animales y bacterianas han sido revisadas (Sahrawy et al., 1996; Besse & Buchanan, 1997). Análisis filogenéticos muestran que la Trx-1 y la Trx-2 de *E. coli*, la Trx-2 de humano y las isoformas de Trx en plantas *y*, *m* y *x*, pueden ser categorizadas como Trx's del "tipo bacterial", mientras que la Trx-1 de animales, protistas y las isoformas de Trx en plantas *f*, *h* y *o*, pueden ser categorizadas como del "tipo eucarionte". Durante la evolución de las Trx's se han presentado eventos de divergencia, sin embargo, al realizar un análisis comparativo, las Trx's muestran una alta conservación de residuos alrededor de la región del sitio catalítico (**Figura 1**), así como en otras posiciones (Pro-40, Asp-60, Iso/Met-74, Pro-75, Thr-76 y Lys-81, considerando la numeración de la Trx-1 de *E. coli*) que son residuos importantes para su función. Por ejemplo, la secuencia Ile/Met, Pro y Thr que conforman el asa CisPro son importante para la interacción con el sustrato, para el potencial redox de la enzima y se utilizan como firmas para distinguir secuencias de otros miembros de la familia de la Trx, las cuales incluyen a las ditiol oxidoreductasas como DsbA, DsbC, DsbG, glutaredoxinas (Grx) y las proteínas disulfuro isomerasas (Meyer et al., 2009, Ren et al., 2009).

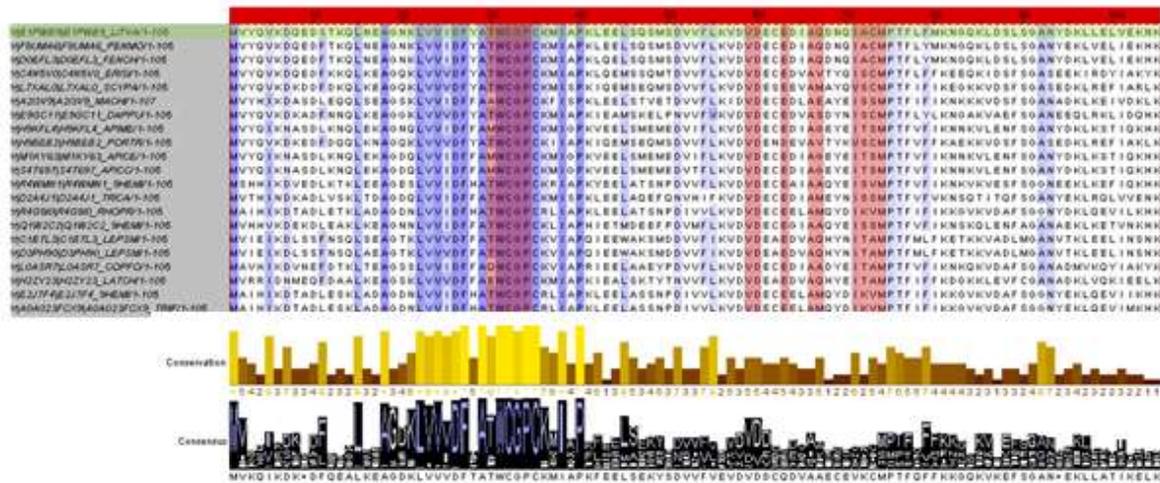


Figura 1. Alineamiento de secuencia entre varias Trx's de diversas especies. En color verde se muestra la secuencia de la *LvTrx_{int}*, en color azul se muestra los residuos que se encuentran conservados en las Trx's reportadas en la base de datos UniProt. Por último, en color rojo se resaltan los residuos que forman parte de la zona de la interfaz en la *LvTrx_{int}*, los cuales se mantienen conservados en la mayoría de la Trx's. Para la realización del alineamiento se utilizó el programa Jalview.

1.1.3 Estructura tridimensional de la tiorredoxina-1

La primera estructura tridimensional de una Trx fue la estructura cristalográfica de la forma oxidada de la Trx de *E. coli* (Holmgren et al., 1975). Desde entonces, varias estructuras de Trx's en su estado oxidado o reducido se han determinado por cristalografía de rayos-X y NMR, y se han depositado en el (*Protein Data Bank*)¹. Todos estos estudios revelaron la conservación estructural de la Trx cuyo plegamiento es conocido como “plegamiento Trx” (Ren et al., 2009). Este plegamiento no está presente solamente en las Trx's, sino además lo comparten otras proteínas oxidoreductasas, tales como proteína disulfuro isomerasas, glutaredoxinas, las oxidoreductasas bacteriales (DsbA, DsbC, DsbD y DsbG), así como también la glutatión transferasa, glutatión peroxidasas, por mencionar algunas. En muchas de estas proteínas se conserva el motivo que constituye al sitio catalítico Cys-X-X-Cys (X representa cualquier aminoácido); (Eklund et al., 1991; Martin, 1995).

Como se ha mencionado, la estructura tridimensional de la Trx, está altamente conservada y consiste en un núcleo hidrofóbico, conformado por 5 hebras- β (3 paralelas y 2 antiparalelas), a su vez rodeadas por 4 hélices- α (**Figura 2**). La topología de todas las Trx's es: $\beta_1, \alpha_1, \beta_2, \alpha_2, \beta_3, \alpha_3, \beta_4, \beta_5$ y α_4 . El sitio catalítico está compuesto por dos cisteínas Cys-32 y Cys-35 (de acuerdo a la numeración de *E. coli*), el cual se encuentra localizado en un asa que sobresale del resto de la estructura entre la hebra- β_2 y la hélice- α_2 , con la segunda cisteína integrada a la hélice- α_2 , en una prominencia de un ambiente hidrofóbico, pero con la presencia de residuos cargados en posiciones conservadas dentro de cada Trx. Esta zona se encuentra expuesta al solvente, presentando de esta forma características superficiales que le ayudan a seleccionar la interacción con diferentes proteínas blanco (Eklund et al., 1991). Además de las cisteínas que componen al sitio catalítico, en vertebrados se encuentran

¹PDB (*Protein Data Bank*): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

otras tres cisteínas conservadas (Cys-62, Cys-69 y Cys-73, de acuerdo a la numeración de la *hTrx*), que no están presentes en las Trx's bacterianas, de hongos, plantas y en la mayoría de invertebrados. En las Trx's de vertebrados se ha descrito que la presencia de estas cisteínas provee mecanismos regulatorios para el control de diversas funciones, como factor de crecimiento, como regulador apoptótico, etc. (Bai et al., 2003). Para el caso de la *LvTrx*, la secuencia contiene 4 cisteínas, dos cisteínas que forman parte del sitio catalítico (Cys-32 y Cys-35), y otras dos cisteínas (Cys-62 y Cys-73), que se encuentran localizadas en la misma posición que las Trx's de vertebrados, sin embargo, en la posición 69 se encuentra el residuo de asparagina.

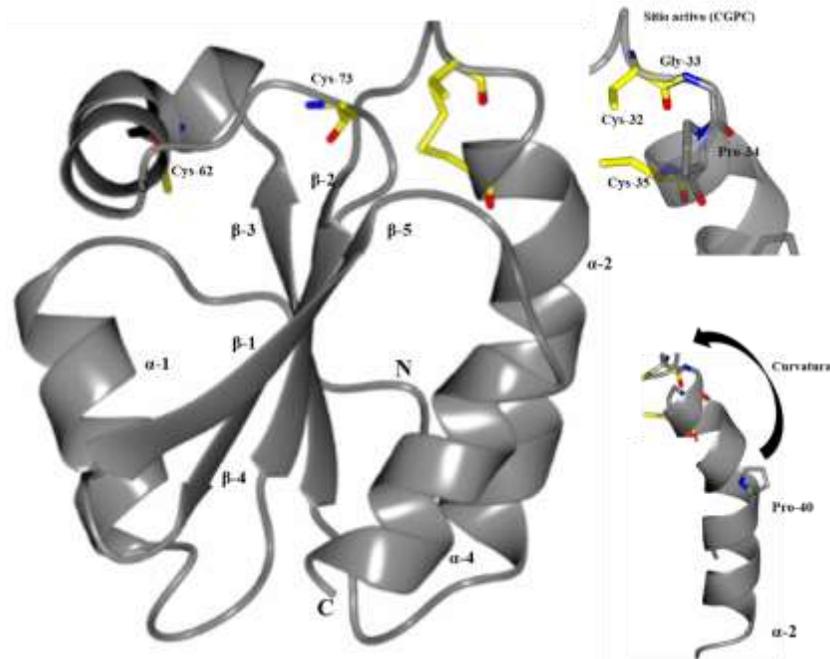


Figura 2. Estructura cristalográfica de la *LvTrx_{wt}* (PDB 3zzx), conformada por una estructura secundaria β_1 , α_1 , β_2 , α_2 , β_3 , α_3 , β_4 , β_5 y α_4 . En un costado se muestra el sitio catalítico compuesto por los residuos Cys-Gly-Pro-Cys, así como las otras dos cisteínas presentes en esta Trx (Cys-73 y Cys-62). Se ha reportado que la Pro-40 es importante para el mantenimiento del sitio catalítico, provocando una curvatura en la hélice- α_2 .

Hasta el momento (mayo de 2016), se han determinado 272 estructuras cristalográficas de Trx's en diversos organismos: *Homo sapiens*, *Plasmodium falciparum*, *Litopenaeus vannamei*, *Staphylococcus aureus*, *Drosophila melanogaster*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus subtilis*, entre otros. Todas están disponibles en la base de datos PDB, mostrando estructuras altamente conservadas. Incluso, el plegamiento Trx se conserva cuando la identidad entre las secuencias de aminoácidos puede llegar a ser tan bajas como el 25%. Existen otros residuos conservados que no son estrictamente requeridos para la actividad, pero dictan las propiedades estructurales, termodinámicas y redox de la proteína. De hecho algunos autores analizaron el posible papel que cumplen cada uno de ellos en la estructura y función de las Trx's (Eklund et al., 1991). Como se ha mencionado, la secuencia del sitio catalítico está ampliamente conservada, los residuos glicina y prolina (que siempre se encuentra en conformación *cis*), localizados entre las dos cisteínas catalíticas, contribuyen a mantener una conformación característica del sitio catalítico, principal responsable del elevado potencial redox

de las Trx's. El Trp-31 presenta una interacción con el residuo Asp-61 (tomando la numeración de la Trx de *E. coli*), que se encuentran ampliamente conservados al igual que la secuencia –Pro-Thr- al inicio de la hebra- β_4 . Estos residuos se encuentran en interacción directa con el sitio catalítico, contribuyendo de esta forma a su estabilidad. En el *cluster* hidrofóbico contiguo al sitio catalítico, constituido por la hebra- β_2 , se encuentra el residuo Lys-57 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del Asp-26, que sugiere que estos grupos pueden estar participando en la transferencia de protones asociados a la reducción del sitio catalítico. Además 2 residuos de fenilalanina, están localizados en el N-terminal de la hélice- α_1 y al final de la hebra- β_2 , respectivamente, ambos residuos forman parte del mismo *cluster* hidrofóbico, en el cual varias isoleucinas y residuos de valina en el centro de las hebras- β también forman parte de éste. Por último el papel del residuo Pro-40 y de dos glicinas (Gly-84 y Gly-92), es principalmente estructural: El residuo Pro-40 provoca una torcedura en la hélice- α_2 , contribuyendo a mantener la conformación del sitio catalítico que se encuentra localizado al principio de esta hélice (de Lamotte-Guéry et al., 1997); mientras las dos glicinas se encuentran en una zona de giros entre elementos estructurales, donde contribuyen, por su menor volumen, a mantener la estructura cerrada de estos giros. Adicionalmente, la Gly-84 es parte del giro β responsable de la separación de las hebras- β_4 y β_5 , mientras que la Gly-92 tiene la misma función entre la hebra- β_5 y la hélice- α_4 (Figura 3).

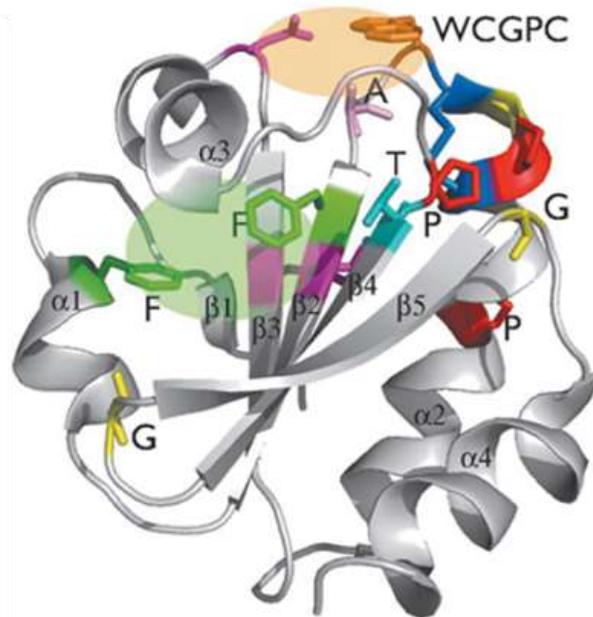


Figura 3. Regiones conservadas localizadas en el centro y alrededor del sitio catalítico de las Trx's. Los residuos conservados se muestran en forma de cilindros. Tryptófano (naranja), residuos con carga (magenta), cisteínas (azules), glicinas (amarillas), fenilalaninas (verdes) y prolinas (rojo). Las regiones hidrofóbicas (verde) las regiones con carga (magenta) y las zonas estructurales expuestas, son indicadas con un ovalo semitransparente. Figura tomada de Collet & Messens, 2010.

1.1.4 Mecanismo de reacción

La Trx es un potente agente reductor de puentes disulfuro de otras proteínas y su función redox está relacionada con tal actividad. Existen muy pocos casos publicados en los que la Trx ejerce una función estrictamente estructural e independiente de su propiedad redox, ejemplo de ello es: en la participación del ensamblaje de fagos en *E. coli* (Feng et al., 1999), en la formación de vacuolas en levaduras (Xu & Wickner, 1996) y en la estimulación del crecimiento celular, en plasma sanguíneo (Pekkari et al., 2000).

La reacción catalizada por la Trx es una reacción bi-molecular con sustitución nucleofílica (S_N2). La reacción puede ser vista como una transferencia de puente disulfuro, de la proteína sustrato a la Trx. En otras palabras, los electrones provenientes de la Trx son transportados a la proteína sustrato. El hecho fundamental de este mecanismo, es que las dos cisteínas del sitio catalítico actúan de manera diferencial, debido a que presentan distintos valores de pK_a (Holmgren, 1981). A pesar del ambiente reductor en el cual la Trx se encuentra localizada a nivel celular; la Trx es capaz de formar un puente disulfuro después de cada ciclo catalítico; el puente disulfuro catalítico no es un disulfuro estructural, sino que funciona como un *switch* redox, el cual se encuentra expuesto en la superficie de la enzima. La diferencia en estabilidad entre el estado oxidado y reducido de las cisteínas catalíticas provee a la Trx del potencial redox necesario para la reacción. Normalmente, el valor de pK_a de los grupos tioles de las cisteínas se encuentran entre 8.0 y 9.0 (Lindley, 1960); sin embargo, una de las cisteínas del sitio catalítico de la Trx posee un pK_a más bajo: Por ejemplo, en *E. coli*, el pK_a del grupo tiol de la Cys-32 es de 6.3, mientras que el pK_a de la Cys-35 tiene un valor de 9.0 (Dyson et al., 1991). El bajo valor de pK_a de la Cys-32 (la Cys más expuesta al solvente), le confiere reactividad a un pH fisiológico. Además, el par de electrones desapareados del azufre de la Cys-32 la convierten en un buen nucleófilo, a estos valores de pH. La reacción catalizada por la Trx comienza con un ataque nucleofílico del grupo tiol del N-terminal del motivo Cys-Gly-Pro-Cys al disulfuro de la proteína blanco, liberando un grupo tiol y formando un puente disulfuro transitorio entre la Cys-32 en forma de tiolato (desprotonación reactiva del grupo tiol) de la Trx y la proteína blanco. El bajo valor de pK_a de la Cys-32, resulta en la estabilización de la carga negativa del anión tiolato. En contraste, el azufre de la Cys-35 tiene un alto pK_a (~9) y está presente como grupo tiol. Una vez formado el puente disulfuro transitorio entre la Trx y la proteína blanco, el grupo tiol de la Cys-35 ha sido activado como un tiolato que permite la disociación del complejo (segundo paso de la reacción). Desde el punto de vista mecánico, el pK_a de la Cys-35 necesita disminuir momentáneamente, para que el ataque nucleofílico tome lugar. (**Figura 4**).

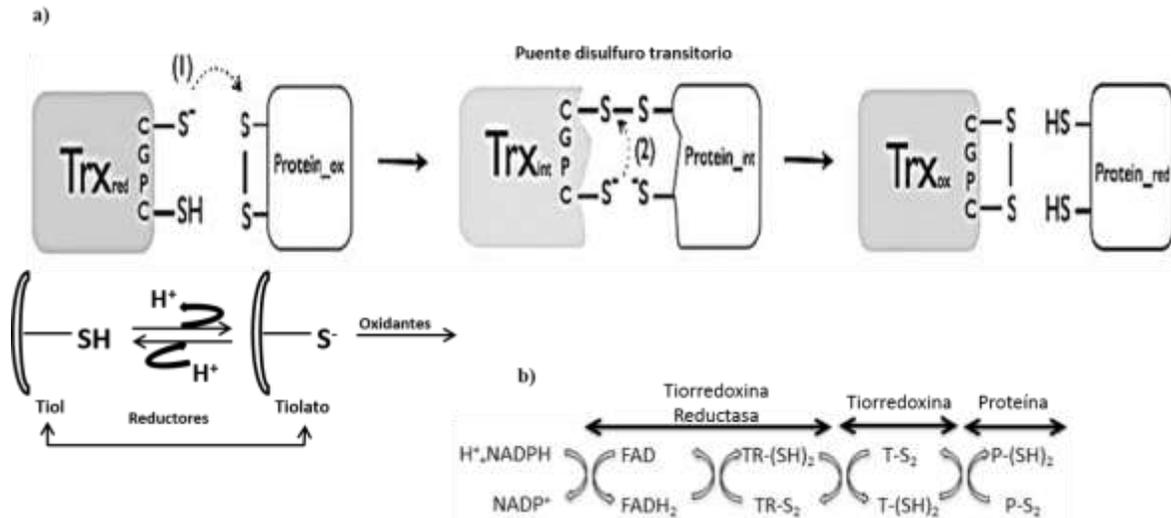


Figura 4. Esquema de regulación de la actividad de la proteína por control tiorredoxina en presencia del sistema TRX (Trx-TrxR). **a)** mecanismo de acción de la Trx frente a una proteína blanco. **b)** mecanismo de acción, por el cual la Trx regenera su capacidad reductora, mediante la TrxR dependiente de NADPH. Figura modificada de Collet & Messens, 2010.

Este mecanismo de acción no es exclusivo de las Trx's, las Grx's y otros reductores de puentes disulfuro reaccionan de forma similar. Incluso las proteínas TrxR (tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH) y FTR (tiorredoxina reductasa dependiente de Ferredoxina), reducen el puente disulfuro de las Trx's oxidadas utilizando un ataque ditiol en dos tiempos (Gan et al., 1990). El descubrimiento de este mecanismo de reacción abrió la posibilidad de producir Trx's recombinantes mutadas en la segunda cisteína (Cys-35) del sitio catalítico, la cual ha permitido la obtención de complejos estables entre la Trx y otras posibles proteínas, como por ejemplo la TrxR (Verdoucq et al., 1999).

1.1.5 Sitio de interacción de la Trx

La Trx tiene una amplia especificidad por diferentes proteínas sustrato. Algunas de las proteínas que interactúan y que son reducidas por la Trx son: la proteína Ref-1, ASK1, NF- κ B, p40 phox, lipocalina, entre otras (Saitoh et al., 1998; Nishiyama et al., 1999; Redl et al., 1999; Ueno et al., 1999). La mayoría de estos sustratos han sido identificados para la *h*Trx por métodos como el sistema de dos híbridos y NMR. Los residuos que se encuentran involucrados en la interacción con estas proteínas de acuerdo a la numeración de la *h*Trx son: Trp-31, Cys-32, Val-59, Gln-63, Ala-66, Val-71, Lys-72, Met-74, Gly-91 y Ala-92 (Qin et al., 1995, 1996).

Como se mencionó, la TrxR es una proteína crucial para que la Trx pueda ser activa. Mediante la elaboración de dobles mutantes de la *h*TrxR Cys-497-Ser/Sec-498-Cys y de la *h*Trx Cys-35-Ser/Cys-73-Ser, fue posible identificar por estudios cristalográficos la zona de contacto entre estas dos proteínas que conforman el sistema TRX (Fritz-Wolf et al., 2011). De manera global y sin describir cada una de las interacciones, la generación del

complejo involucra un puente disulfuro entre la cisteína catalítica (Cys-32) de la *hTrx* y la mutante Sec-498-Cys, así como algunos residuos de la *hTrx*: Trp-31, Ala-29, Met-74, Asp-60, Val-59, Val-71, Lys-72 y Lys-36. Los residuos de la *hTrxR* involucrados en esta interacción son: Trp-114, Asn-107, Gly-110, Ser-111, Glu-103, Arg-117, Lys-146, Arg-121 y Glu-122. A partir de estos estudios, es evidente que existe una zona de contacto en donde la Trx puede actuar frente a otras proteínas y puede ser reducida por la TrxR, esta zona aparte de ser crucial para su función, será de gran relevancia para el desarrollo y discusión de este trabajo.

1.1.6 Formación de puentes disulfuro-intermoleculares en Trx

Si bien, mediante experimentos de proteómica, se ha reportado la posible existencia de un puente disulfuro-intermolecular entre las Cys-62 y la Cys-69 de la *hTrx*, la estructura cristalográfica de la *hTrx* ha mostrado que la Cys-62 se encuentra inmersa en la estructura de la proteína, sin acceso al solvente y separada por 10 Å de cualquier extremo de la hélice- α_3 , lugar donde se localiza la Cys-69, siendo una distancia muy grande para la formación de un puente disulfuro sin un considerable cambio conformacional de la Trx (Watson et al., 2003; Weichsel et al., 2007). En este estudio proteómico la *hTrx* fue oxidada con diamida, seguida por una carboximetilación con ácido iodo acético y posteriormente separada mediante electroforesis PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*). Las bandas de la *hTrx* fueron cortadas y sujetas a un proceso de digestión con tripsina para su identificación de fragmentos por medio de un análisis de espectrometría de masas. El resultado indicó la presencia de dos disulfuros-intermoleculares en la *hTrx*. Uno de ellos fue en su sitio catalítico y el otro entre la Cys-62 y Cys-69. La espectrometría de masas no fue particularmente clara con respecto al estado oxidación de la Cys-73. Estudios de dinámica molecular indicaron que para que existiera la formación del puente disulfuro entre la Cys-62 y Cys-69 es necesario un cambio conformacional que involucre el desplegamiento de la hélice- α_3 . Por todo lo anterior, la observación del puente disulfuro entre la Cys-62 y Cys-69 de la *hTrx* reportado por proteómica, es poco probable que exista en un sistema biológico. Sin embargo, los autores del estudio proteómico proponen que la existencia de un puente disulfuro adicional en la *hTrx* que podría dar lugar a una Trx temporalmente inhibida y que resista la regeneración de la TrxR atenuando su potencial redox por medio de la formación de un homo-dímero.

1.1.7 Homo-dímeros de Trx

Existen varios reportes sobre la formación de homo-dímeros en las Trx's, siendo los primeros estudios de aislamiento y caracterización de las Trx's de vertebrados. Se ha observado que las Trx's de vertebrados son más susceptibles a la oxidación y a la formación de dímeros u oligómeros, mediados por los residuos de cisteínas que las componen (Herrmann & Moore, 1973). Sin embargo, las observaciones de la formación dimérica, mediadas por puentes disulfuro, siempre implican la pérdida de actividad debida a la oxidación del sitio catalítico (Holmgren, 1981; Weichsel et al., 1996; Berndt et al., 2008). En estos estudios, la oxidación de los

residuos de cisteína de la *hTrx* silvestre y de algunas de sus mutantes (Cys-73-Ser, Cys-32/Cys-35-Ser y Cys-62/Cys-73-Ser), dieron lugar a la formación de dímeros. Sin embargo estas oxidaciones se realizaron bajo condiciones muy oxidantes como largas exposiciones al aire o un tratamiento con H₂O₂ y diamida (Gasdaska et al., 1996 Hashemy & Holmgren, 2008). Estos resultados sugieren que la doble mutante Cys-62/Cys-73-Ser, sólo puede formar dímeros a través de los residuos de Cys-69 y que la mutante es activa como dímero. Sin embargo, para la *hTrx* silvestre, estos y otros estudios concluyen que el residuo Cys-73 de cada monómero se encuentra involucrado en la formación de un dímero inactivo mediado por un puente disulfuro-intermolecular. Esta conclusión fue apoyada por estudios cristalográficos, que revelan la formación del puente disulfuro entre la Cys-73 y la Cys-73' de dos monómeros distintos de *hTrx*. Es importante mencionar que la estructura cristalográfica de la *hTrx* con el puente disulfuro entre las Cys-73 muestra que el sitio catalítico de cada monómero queda bloqueado o inaccesible al solvente para llevar a cabo su actividad reductora, esto junto al hecho de que la *hTrx* dimérica no presenta actividad reductora parecía resaltar el carácter anecdótico de la existencia de un homo-dímero, sin embargo, como se verá más adelante en esta tesis este no es el caso para la *LvTrx*.

En los estudios estructurales que llevó a cabo Weichsel y colaboradores (Weichsel et al., 1996, 2007; Andersen et al., 1997), reportaron en la literatura 14 estructuras cristalográficas de la *hTrx*. La primera estructura descrita por Weichsel en 1996 para la *hTrx* (PDB 1ert), encontró que la estructura forma un dímero mediado por el residuo de Cys-73 de cada monómero, a pesar de que el cristal fue crecido en un medio que contenía 5 mM de DTT (*Dithiothreitol*). Los otros residuos de cisteína (Cys-32, Cys-35, Cys-62 y Cys-69) permanecieron como tioles libres. El resultado más notorio acerca de esta estructura, es la estabilidad que presenta el puente disulfuro-intermolecular ante la presencia de 5 mM de DTT, siendo éste, el puente disulfuro más expuesto al solvente. La razón de esta estabilidad no fue claramente explicada, pero se sugirió que la estabilidad del dímero, deriva de la perfecta orientación del puente disulfuro-intermolecular y del espacio que existe entre los dos monómeros. Posteriormente se publicó la versión del dímero en estado oxidado en su sitio catalítico (PDB 1eru), mientras que la Cys-62 y Cys-69 aparecen como cisteínas libres. La estructura de una mutante, de la *hTrx* (Cys-32-Ser, Cys-35-Ser, PDB 1erw) en presencia de DTT, reporta un comportamiento dimérico y los autores mencionan que esta estructura presenta más similitud estructural con la *hTrx* silvestre en estado oxidado en su sitio catalítico (PDB 1eru). También, los residuos de Cys-62 y Cys-69 aparecen como cisteínas libres. La estructura de la mutante Cys-73-Ser de la *hTrx*, (PDB 1erv), en presencia de 5 mM de DTT, muestra un comportamiento dimérico a pesar de la ausencia del puente disulfuro-intermolecular. Esta estructura presenta un dímero no covalente y los otros residuos de cisteínas se encuentran libres, presentando una similitud estructural con la *hTrx* silvestre (PDB 1ert).

En 1997, Andersen (integrante del mismo grupo de Weichsel), publicó la estructura cristalográfica de una mutante de la *hTrx*: Asp-60-Asn. El cristal fue crecido en presencia de 5 mM de DTT, en el cual reportan un dímero mediado por el residuo de Cys-73 de cada monómero y las otras cisteínas se encuentran nuevamente libres. Posteriormente con un tratamiento con diamida (un reactivo oxidante), se obtuvo una estructura de la *hTrx* silvestre dimérica formando el puente disulfuro-intermolecular (PDB 1auc). Sin embargo, los otros residuos de cisteína, incluyendo los del sitio catalítico, se encuentran como cisteínas libres.

En el 2007, Weichsel publicó las estructuras cristalográficas de la *h*Trx-nitrosilada. Nuevamente todas estas estructuras (PDB's 2hxx, 2ifq y 2iyy) son similares a la estructura de la *h*Trx silvestre en estado oxidado en su sitio catalítico (PDB 1eru); en donde, el dímero es mediado por las Cys-73 de cada monómero, el sitio catalítico esta oxidado y los residuos de Cys-62 y Cys-69 son variablemente nitrosilados, dependiendo de la condición descrita para cada estructura (PDB's 2hxx, 2ifq y 2iyy).

Finalmente se reportó un cristal de una mutante de la *h*Trx (Cys-73-Ser) en ausencia de DTT, utilizando 8% de H₂O₂ en el medio de cristalización. Esta estructura revela nuevamente la formación de un dímero no covalente (PDB 2hsh) y los residuos Cys-62 y Cys-69 aparecen libres.

Al analizar la zona de la interfaz de cada una de estas estructuras descritas en este apartado, se definen los 24 residuos de aminoácidos que se encuentran involucrados en la interacción dimérica. La interfaz cubre una superficie de ~575 Å² (alrededor de un 10% de la superficie total de la *h*Trx). Los residuos que se encuentran involucrados en esta interacción son: Thr-30, Trp-31, Val-59, Ala-66, Ile-71, Ala-72, Met-74, Cys-32, Asp-60, Glu-63, Gln-67 y Cys-73.

La mayoría de las tiorredoxinas reportadas se encuentran en forma monomérica tanto en solución como en estado cristalino (145 estructuras son monómeros en las PDB), a excepción de algunas tiorredoxinas que están comprometidas con una interacción dimérica no covalente en su estado cristalino (contactos cristalinos), lo cual no implica que el estado cristalino sea el estado oligomérico en solución; *Drosophila melanogaster* (PDB: 1xw9, 1xwa, 1xwb), *Chlamydomonas reinhardtii* (PDB: 1ep7), tiorredoxina F de cloroplasto de espinaca (PDB: 1f9m), *Trichomonas vaginalis* (PDB: 2f51) y *E. coli* (PDB: 2trx).

Estas observaciones ponen de manifiesto la dificultad de describir el estado oligomérico de cualquier enzima basado solamente en observaciones cristalográficas.

Aunque el posible papel biológico del dímero en la *h*Trx no ha sido determinado, se han sugerido un número de posibilidades: Una de ellas, menciona que la formación del dímero resulta en la inactivación de la proteína, resultando en un mecanismo de regulación para la *h*Trx como factor de crecimiento. Existe la posibilidad de que el dímero pueda estar involucrado como un sensor del estrés oxidativo, o podría actuar como un mecanismo de protección para el sitio catalítico de la tiorredoxina durante su secreción (Andersen et al., 1997).

En paralelo a estas investigaciones, experimentos de NMR se llevaron a cabo con dos mutantes múltiples de la *h*Trx (Cys-62-Ala, Cys-69-Ala, Cys-73-Ala, Met-74-Thr) y (Cys-62-Ala, Cys-69-Ala, Cys-73-Ala). La primera de ellas, no presentó ninguna evidencia de la existencia de un dímero en solución (Qin et al., 1995).

Posteriormente se realizó la segunda variante (Cys-62-Ala, Cys-69-Ala, Cys-73-Ala), la cual ya no contenía la mutante Met-74-Thr. Este experimento concluye, que la especie predominante es monomérica y no se encontró evidencia alguna para la existencia de una forma dimérica, como se observó en la estructura cristalográfica de la *h*Trx silvestre y en la estructura de la mutante Cys-73-Ser (Qin et al., 1996). Además, mediante ensayos por ultra centrifugación analítica se determinó un peso molecular de la Trx que corresponde al monómero de la *h*Trx silvestre, así como de las mutantes (Gronenborn et al., 1999).

Estos datos, así como el análisis de las estructuras cristalográficas previamente descritas, parecen indicar que de existir un dímero en solución de la *h*Trx, la posición 74 es crucial, debido a que este residuo forma parte de la interfaz cristalina.

Por lo tanto, la única evidencia de la formación dimérica se encuentra en el estado cristalino de la *h*Trx, donde la densidad electrónica (mapa $2F_o - F_c$) entre los residuos de las Cys-73 de cada monómero es continua y bien definida (PDB 2hxx). Sin embargo, las estructuras cristalográficas de la *h*Trx obtenidas por difracción de rayos-X a excepción de aquellas que fueron tratadas con S-nitrosoglutation (PDB's 2hxx, 2ifq, 3m9j, 3m9k y 4oo4) contienen un monómero en la unidad asimétrica y los monómeros que forman el dímero, están relacionados a través de un eje de rotación de orden dos, propio del grupo espacial al que pertenecen. Esta observación, abre la posibilidad de que la formación del dímero en la *h*Trx sea producto de un posible artefacto cristalográfico. Recientemente se han llevado a cabo estudios cristalográficos de la *Lv*Trx (Campos-Acevedo et al., 2013), los cuales revelan que la proteína puede formar homo-dímeros en el sistema cristalino, sin importar el estadio redox en el cual se encuentre su sitio catalítico como se reportó para la *h*Trx (**Figura 5**). La diferencia con las estructuras cristalinas de la *h*Trx radica, en que las estructuras de la *Lv*Trx no fueron sometidas a un tratamiento oxidante como los realizados para la *h*Trx.

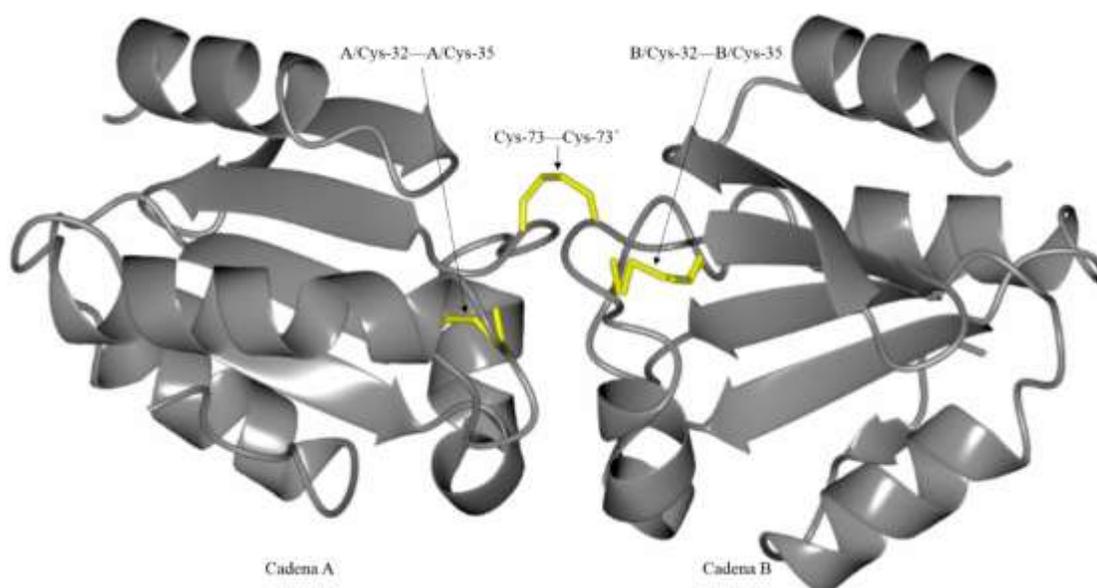


Figura 5. Estructura cristalográfica de la *Lv*Trx_{wt} a 1.54 Å de resolución. En color amarillo se muestran los puentes disulfuro que componen al dímero, dos puentes disulfuro catalíticos (Cys-32—Cys-35) y un puente disulfuro intermolecular (Cys-73—Cys-73').

Se obtuvieron cuatro estructuras cristalográficas de la *Lv*Trx variando las concentraciones de DTT, dando lugar a que las cisteínas 32 y 35 (sitio catalítico), se encontraran reducidas, parcialmente reducidas, parcialmente oxidadas y oxidadas (**Figura 6**). El dímero presente en la unidad asimétrica contiene un puente disulfuro formado por los residuos de Cys-73 de cada monómero y un puente de hidrógeno entre los residuos Asp-60 de cada monómero, que fue descrito en la *h*Trx, como uno de los residuos responsables de la dimerización dependiente de pH.

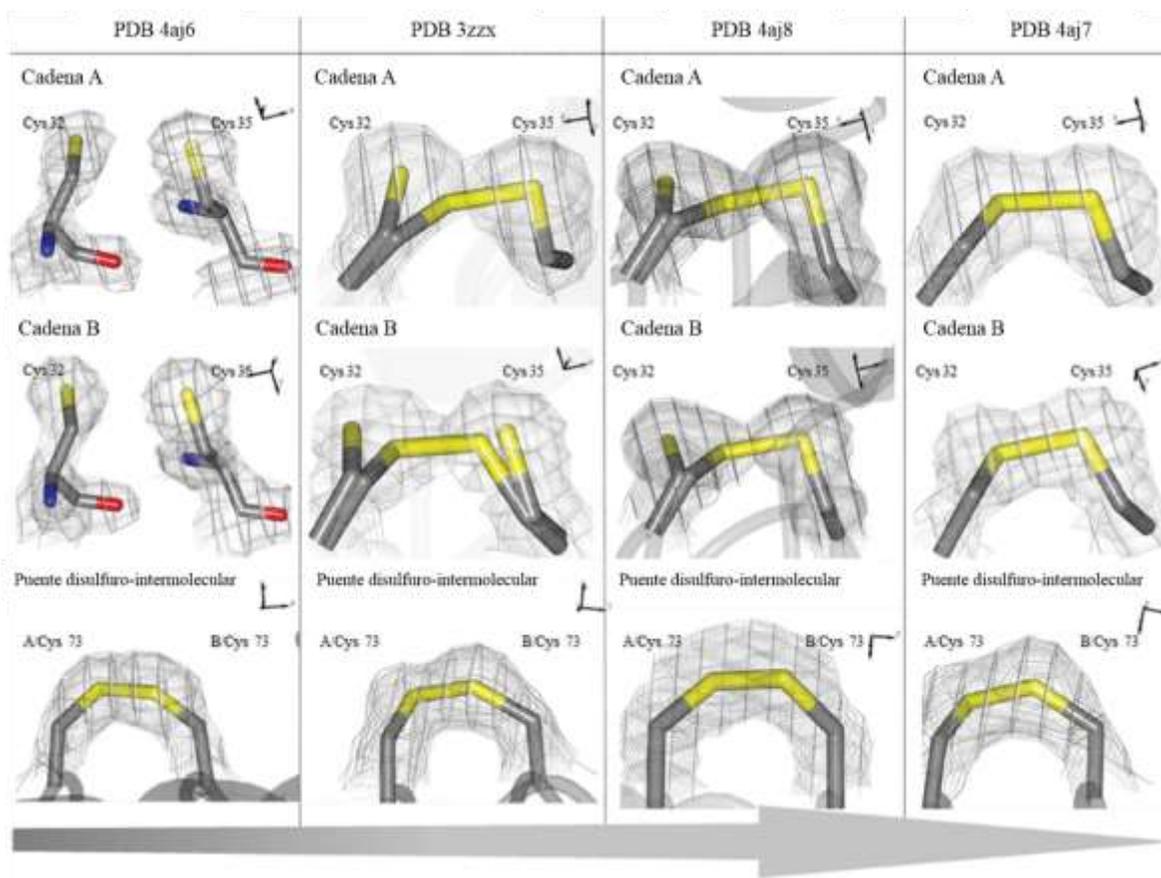


Figura 6. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1 σ para los diferentes estados de oxidación de las cisteínas 32 y 35 de la *LvTrx_{wt}*. La flecha indica el tránsito del estado reducido al estado oxidado. Para cada una de las estructuras se muestra el puente disulfuro del sitio catalítico de la cadena A y B, así como el puente disulfuro-intermolecular. Los códigos PDB para cada estructura se encuentran en la parte superior de la figura.

La interfaz de la *LvTrx_{wt}* está compuesta por un área de 1,294 Å² (B/A 647 Å²; A/B 647 Å²), cubriendo un área total correspondiente al 11% de la superficie que no está expuesta al solvente por cada monómero.

La zona de la interfaz está conformada por 32 aminoácidos (16 residuos de cada monómero), la mayoría de los contactos entre monómeros son hidrofóbicos conformados por Trp-31, Val-59, Ala-66, Ile-71, Ala-72, Met-74 posicionando las cadenas laterales dentro de la interfaz y estos contactos son suficientemente estrechos, de manera que no existe espacio para moléculas de agua. También se encuentran residuos hidrofílicos, conformados por Thr-30, Cys-32, Gly-33, Pro-34, Lys-36, Asp-60, Glu-63, Gln-67, Gln-70 y un puente disulfuro-intermolecular (Cys-73-Cys-73') (Campos-Acevedo et al., 2013) (**Figura 7**).

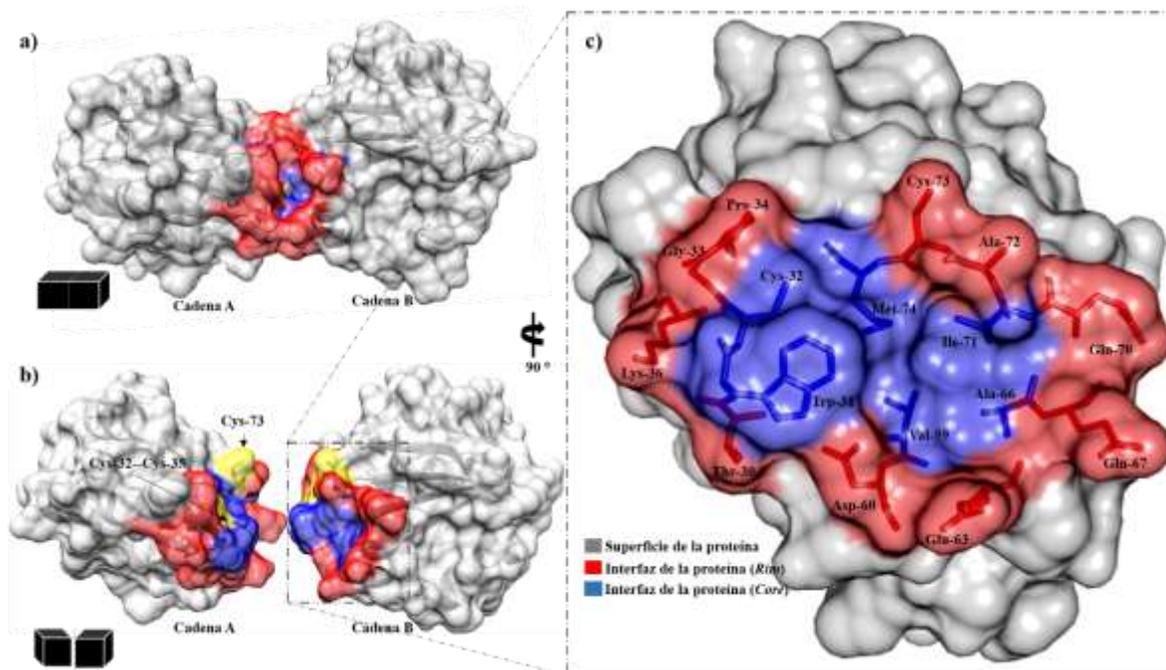


Figura 7. Estructura cristalográfica de *LvTrx_{WT}*, que muestra un dímero en la unidad asimétrica para todas las estructuras de *LvTrx_{WT}* depositadas en el PDB (3zxx, 4aj6, 4aj7, 4aj8). El mapa 2Fo-Fc se muestran en gris con un valor sigma de 1.0 σ , para los puentes disulfuro. La estructura de la *LvTrx_{WT}* muestra la ubicación que tiene el puente disulfuro-intermolecular (Cys-73-Cys-73'), que es el más expuesto al solvente, en comparación con el puente disulfuro del sitio catalítico de cada monómero. En el cuadro con líneas punteadas se muestra un acercamiento de los residuos que se encuentran involucrados en la interfaz de la *LvTrx_{WT}*. La interfaz se encuentra dividida en dos partes: el Core en color azul (residuos de la interfaz que no se encuentran en contacto con el solvente) y el Rim en color rojo (aquellos residuos que mantienen contacto con el solvente). La división de interfaz fue obtenida utilizando el programa ProFace (Saha et al., 2006).

Este comportamiento, sugiere que la dimerización de la *LvTrx_{WT}* puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas, debido a que en este estudio se mostrarán diversas evidencias experimentales (bioquímicos-estructurales), que sustentan la existencia de la formación dimérica en la *LvTrx_{WT}* a pH 7.5; sugiriendo que la dimerización no solo existe en el estado cristalino y podría, de alguna forma, jugar un papel en la función biológica.

En el anexo I se describen con mayor detalle los daños por radiación en proteínas, enfocado a los puentes disulfuro.

Capítulo 2

2. Justificación

La interacción proteína-proteína, representa uno de los niveles más complejos de organización estructural en las moléculas biológicas. La determinación de la estructura cristalográfica de la $LvTrx_{wt}$, evidencia un posible comportamiento dimérico en solución, como se ha descrito para la $hTrx$. Por lo tanto, el estudio de los factores que contribuirían a la asociación estable del dímero, es fundamental para poder entender y definir su posible función biológica. Analizando las estructuras cristalográficas, los residuos implicados en la dimerización de la $LvTrx_{wt}$, se encuentran en su mayoría conservados en las Trx 's, específicamente aquellos que se encuentran en el centro de la zona de la interfaz (*Core*). Ejemplo de ello, es que, de los 12 residuos reportados en la interfaz cristalográfica de la $hTrx$, 9 de ellos se encuentran también presentes en la interfaz cristalográfica de la $LvTrx_{wt}$. Por lo tanto, el estudio y entendimiento de la posible dimerización en solución de la $LvTrx_{wt}$, puede ser tomado en consideración para extrapolar los resultados a otras Trx 's de distintas especies. De esta manera, en esta tesis se analizará y describirá la zona de la interfaz que mantiene la formación del dímero cristalográfico en la $LvTrx_{wt}$, a través de mutaciones puntuales, de ensayos de actividad, de estudios de DLS (*Dynamic Light scattering*, por sus siglas en inglés), de estudios estructurales en estado cristalino, así como en solución. Además, esta tesis, ofrece una estrategia para analizar interacciones entre homo-dímeros, que puede ser utilizada para el estudio de otros sistemas que presenten cuestionamientos similares a los planteados en este trabajo.

2.1 Hipótesis

La diferencia que caracteriza la formación de dímeros en la *LvTrx* y no de otras *Trx*, está determinada por la existencia del residuo Cys-73 que establece la formación de un puente disulfuro-intermolecular entre los residuos Cys-73 y Cys-73', sin involucrar las otras interacciones entre los residuos situados en la interfaz dimerica.

2.2 Objetivos

Identificar mediante mutaciones puntuales y experimentos bioquímico-estructurales, tanto en solución como en estado cristalino si el residuo Cys-73 u otro residuo de la interfaz es responsable de la dimerización.

2.2.1 Objetivos particulares

- Identificar el arreglo dimérico de la *LvTrx_{wf}* en solución.
- Identificar los posibles residuos claves del mantenimiento dimérico en la *LvTrx_{wf}*.
- Generar las mutantes en la zona de la interfaz de la *LvTrx*
- Expresar y purificar a la *LvTrx_{wf}* y a las mutantes.
- Cristalizar y determinar la estructura cristalográfica de las mutantes.
- Determinar el estado oligomérico en solución de la *LvTrx_{wf}* y de las mutantes mediante ensayos de filtración en gel y DLS.
- Determinar el modelo *ab-initio* de baja resolución de la *LvTrx_{wf}* y de las mutantes en solución, mediante la técnica de SAXS.
- Determinar la actividad de la *LvTrx_{wf}* y de las mutantes por turbidimetría mediante un sistema heterólogo TRX (TrxR/Trx).
- Determinar el daño en los puentes disulfuro de la *LvTrx_{wf}* por dosis de radiación absorbida y establecer el orden de labilidad como producto de la interacción con los rayos-X.

Capítulo 3

3. Sección experimental

3.1 Construcción de mutantes

El análisis de los datos estructurales en estado cristalino con respecto al comportamiento dimérico de la *LvTrx_{wr}*, ha permitido establecer un amplio espectro de aproximaciones metodológicas, para constatar la existencia en solución de este comportamiento oligomérico. Por lo tanto, se diseñaron mutaciones en la zona de la interfaz cristalográfica, con el fin de identificar cuál de los residuos de aminoácidos es o son los responsables de mantener esta interacción en la *LvTrx_{wr}* en solución. Existen sitios potenciales que podrían ocasionar la eliminación del dímero, los candidatos más probables fueron la Cys-73, la Met-74, el Trp-31, el Asp-60, la Ala-66 y la Met-74, debido a que estos residuos están localizados directamente en el centro de la interfaz dimérica, y participan en interacciones implicadas en la formación de la misma.

A continuación, se enlistan las mutaciones realizadas en este trabajo, así como los argumentos por los cuales se eligieron:

- a) **Trp-31-Ala**: en la interfaz cristalina, los dos residuos de Trp-31, provenientes de cada monómero, representan al residuo hidrofóbico con mayor volumen. Al reemplazar este residuo voluminoso por un residuo de menor volumen, como la alanina, el cambio en el *Core* hidrofóbico podría desestabilizar la dimerización. Sin embargo, al mutar este residuo se podría comprometer la actividad redox de la proteína, debido a que el residuo Trp-31 juega un papel importante en determinar el potencial redox de la Cys-32 (cisteína catalítica), ya que es vecino a ésta.
- b) **Asp-60-Ser**: en la interfaz cristalina, los dos residuos de Asp-60, provenientes de cada monómero, están enfrentados y contribuyen con la formación de un puente de hidrógeno para estabilizar el dímero cristalográfico de la *LvTrx_{wr}*. Adicionalmente, este mismo residuo ha sido propuesto en la *hTrx* como el residuo responsable de la existencia del dímero a pH ácidos.
- c) **Ala-66-Arg**: este residuo está localizado en la parte central del *Core* hidrofóbico de la interfaz, por lo que un reemplazo de este residuo por un residuo largo y cargado como la arginina podría desestabilizar al dímero.
- d) **Cys-73-Ser**: la Cys-73 es responsable de la formación del único enlace covalente en la interfaz: un puente disulfuro-intermolecular con la Cys-73 del otro monómero. Al mutar este residuo por una serina, se podría discernir si la dimerización es dependiente principalmente de este puente disulfuro o bien, es causada por las otras interacciones presentes en la interfaz, como fue el caso para la *hTrx*.

- e) **Met-74-Glu**: es otro de los residuos que se encuentran involucrados en la formación del *Core* hidrofóbico. Al sustituirlo por un residuo con carga y de cadena larga como el ácido glutámico, este podría desestabilizar la dimerización.

3.1.1 Diseño de oligonucleótidos para las *LvTrx_{mut}* propuestas y diseñadas en este trabajo.

Los oligonucleótidos propuestos en este proyecto fueron diseñados individualmente de acuerdo a la mutación deseada, tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Los oligonucleótidos tienen una longitud de entre 25 y 45 nucleótidos, con una temperatura de fusión (T_m) de $>58^\circ\text{C}$.
2. La mutación deseada se estableció en la mitad del oligonucleótido con ~ 10 -15 bases de la secuencia silvestre en ambas direcciones.
3. Los oligonucleótidos presentan un mínimo de contenido de GC del 40% y terminan en una o más bases C o G.
4. Se analizó que ninguno de los oligonucleótidos formara horquillas (*hairpins*) internas.
5. Para la realización de las amplificaciones se utilizó una concentración de 125 ng de oligonucleótido.

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM.

En las siguientes secuencias, el codón mutado se muestra subrayado (secuencia 5' \rightarrow 3'):

Trp-31-Ala: CATTTTGCACGGCCACAGGCGGTGGC

Asp-60-Ser: GTCTTCCACATTCAGACACATCCACCTTCAG

Ala-66-Arg: TGTGAAGACATTCGCCAAGATAACCAGATT

Cys-73-Ser: GCCCAAGATAACCAGATTGCATCTATGCCTACTTTTC

Met-74-Glu: CCAGATTGCATGCAGCCCTACTTTTCT

Los oligonucleótidos utilizados que flanquean el inserto de 356 pb. Fueron los siguientes:

Trx-Fwd (NdeI): ATAACCATATGGTTTACCAAGTGAAAGACCAGGAAGA

Trx-Rev (EcoRI): AAATAAAGAATTCTCATTACTTGTTCTTCTCAACGA

Los sitios de restricción introducidos fueron para NdeI y EcoRI, que se muestran subrayados. Estos flanquean el inserto del gen de la *LvTrx_{wt}*.

3.1.2 Reacciones de amplificación

Para la obtención de la secuencia nucleotídica de las mutantes de *LvTrx* se utilizó un protocolo de acuerdo a lo reportado por Tyagi en el 2004: esta es una estrategia que evita el paso de purificación intermedia del DNA entre dos rondas de PCR (por sus siglas en inglés). La estrategia depende del uso de una concentración limitante de uno de los oligonucleótidos que flanquean el inserto del gen de la proteína deseada (*forward* o *reverse*), con una concentración normal del oligonucleótido que contiene la mutación, más un prolongado ciclo de extensión final en la primera ronda de amplificación de la PCR. Esta primera ronda genera un *megaprimer* que es utilizado subsecuentemente en la segunda ronda de PCR en conjunto, con el otro oligonucleótido que flanquea la otra parte del inserto, evitando de esta forma el paso de purificación intermedio de la técnica convencional (Tyagi et al., 2004), (**Figura 8**).

Se utilizaron dos programas de amplificación: el primero de ellos fue para las mutantes Trp-31-Ala, Asp-60-Ser y Ala-66-Arg; la primera ronda de PCR consistió en 1 ciclo de desnaturalización por 5 min. a 95°C, seguido de 10 ciclos de amplificación, 1 min. a 95°C, 30s a 50°C, 2 min. a 72°C y finalmente un ciclo de extensión de 10 min. a 72°C; la segunda ronda de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización por 1 min. a 95°C, seguido de 30 ciclos de amplificación, 1 min. 52-60°C, 2 min. a 72°C y finalmente una extensión de 10 min. a 72°C. Para las mutantes Cys-73-Ser y Met-74-Glu el programa utilizado para la primera ronda de PCR fue: 1 ciclo de desnaturalización por 5 min. a 95°C, seguido de 20 ciclos de amplificación, 1 min. a 95°C, 1 min. 60-73°C, 2 min. a 72°C y finalmente un ciclo de extensión de 25 min. a 72°C; la segunda ronda de PCR consistió en 1 ciclo de desnaturalización por 1 min. a 95°C, seguido de 25 ciclos de amplificación, 1 min. a 60°C, 2 min. a 72°C y finalmente una extensión de 10 min. a 72°C.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador marca BIO-RAD T100® *Thermal Cycler*. La mezcla de reacción consistió en: 50-100 ng de plásmido 3U de *pfu*-DNA polimerasa (New England Biolabs®), utilizando un amortiguador 1x *pfu*-DNA polimerasa, 0.2 mM dNTP, 1.0 pmol del oligonucleótido mutagénico y 0.05 pmol del oligonucleótido que flanquea el inserto, posteriormente en la segunda ronda de PCR se agregó el oligonucleótido que flanquea el otro lado del gen para amplificar completamente el inserto con la mutación deseada, en un volumen final de 50 µl. El producto final de las reacciones de amplificación por *megaprimer* fueron analizadas en un gel de agarosa al 1%. El fragmento de la longitud esperada (356 pb) que se obtuvo después de cada una de las amplificaciones, se extrajo del gel de agarosa al 1% utilizando el kit de *Thermo Scientific GeneJET* de extracción de banda.

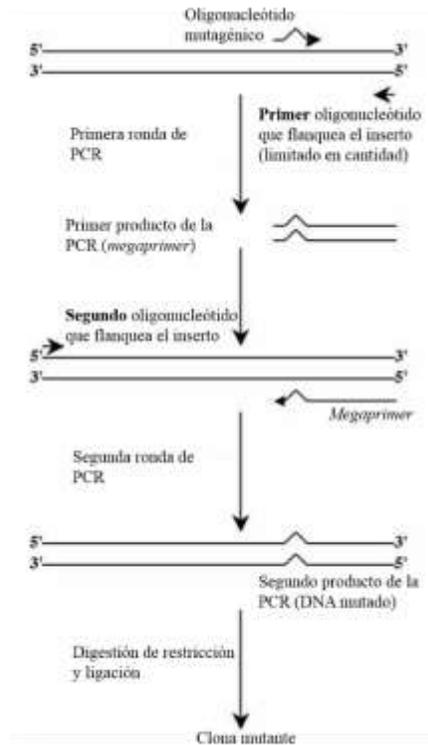


Figura 8. Esquema que describe los pasos para la realización de las mutantes de acuerdo a lo reportado por (Tyagi et al., 2004).

3.1.3 Construcción del Vector

Para la construcción del vector de propagación se utilizó el *kit* pGEM-T *Easy Vector* de PROMEGA®, adicionando en la reacción el fragmento amplificado de la *LvTrx_{mut}* previamente purificado del gel de agarosa, generando de esta forma el vector de propagación denominado pGEM-*LvTrx_{mut}* (para cada una de las mutantes), mediante una reacción de ligación. Posteriormente para obtener los fragmentos de las *LvTrx_{mut}* derivado de los vectores de propagación, los plásmidos fueron digeridos mediante una doble digestión con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI. Este mismo tratamiento fue aplicado al plásmido de expresión pET22b (+) de Novagen®, el fragmento resultante de las restricciones para cada una de las mutantes se extrajo de un gel de agarosa al 1% con el *kit* de *Thermo Scientific GeneJET* de extracción de banda.

La estrategia de clonación se diseñó de manera que la secuencia codificante de las *LvTrx_{mut}* se ligue entre los sitios de NdeI y EcoRI, después del promotor T7 y antes del casete de resistencia a ampicilina. Los fragmentos codificantes de las *LvTrx_{mut}* se ligaron al vector utilizando la ligasa T4 DNAligasa (New England Biolabs®), generando un vector de expresión pET-*LvTrx_{mut}* para cada caso.

3.1.4 Transformación de *E. coli*

Las reacciones de ligación de las construcciones previamente mencionadas fueron purificadas por precipitación con butanol y etanol, el botón resultante se disolvió en 10 μl de H_2O tetra destilada. La transformación se realizó por electroporación, tomando aproximadamente 150 ng de vector, en 40 μl de células competentes DH5 α , que fueron sometidas a un choque eléctrico de 1.8 V en un electroporador (BIO-RAD) ajustado a 25 μF y 200 Ω . Posteriormente las células transformadas se recuperaron mediante agitación por una hora a 37°C en 1 ml de medio LB. Finalmente se sembraron 100 μl en placas de medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C para obtener colonias aisladas, a partir de las cuales se purificó el plásmido. Es importante mencionar que para cada una de las mutantes se confirmó la presencia de cada variante construida mediante secuenciación (ver Anexo III). Posteriormente, los plásmidos fueron introducidos por electroporación en la cepa BL21 (DE3), para su posterior expresión y purificación de cada una de las mutantes.

3.2 Expresión y purificación de la *LvTrx_{wt}* y las *LvTrx_{mut}*

Para el proceso de sobreexpresión de la *LvTrx_{wt}* y las *LvTrx_{mut}*, se tomó una colonia y se incubó en 40 ml de medio LB con ampicilina (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ O/N 12 horas a 37°C a 250 rpm). Posteriormente, se inoculó 1 L de medio LB con 10 ml del cultivo O/N y se adicionó 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina a 37°C en agitación a 250 rpm. La expresión de la *LvTrx_{wt}* y las *LvTrx_{mut}*, se indujeron con IPTG cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.6 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. La concentración final de IPTG empleada fue 0.4 mM para la *LvTrx_{wt}*, mientras que, para las *LvTrx_{mut}*, esta concentración fue de 0.8 mM . Posteriormente, los cultivos se incubaron a 37°C y se mantuvieron en agitación por 5 horas. Las células se cosecharon por centrifugación a 6,000 rpm por 20 minutos para recuperar la pastilla bacteriana. Es importante mencionar que se utilizó una proporción de 20 ml de solución amortiguadora por gramo de pastilla. Posteriormente, las células se re-suspendieron en 40 ml de solución amortiguadora TRIS 100 mM , pH 8.0 y se adicionó una pastilla de inhibidores de proteasas *complete* (Roche). Para lisar, se ‘sonicaron’ las células 3 veces por 1 min c/u con 5 minutos de reposo entre cada pulso (este procedimiento se lleva a cabo en hielo). Después de haber *sonicado* cada muestra se centrifugó a 13,800 x g por 20 min a 4°C, para eliminar contaminantes celulares. La *LvTrx_{wt}* y las *LvTrx_{mut}* se localizan en el sobrenadante. Seguida de la centrifugación, el sobrenadante se sometió a precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio al 50% w/v y el sobrenadante del 50% se llevó a 85% de saturación. En todos los casos la Trx se localizó en el precipitado del 85% de saturación.

Posteriormente el precipitado proteico del 85% de saturación de sulfato de amonio se disolvió en 20 ml de solución amortiguadora TRIS 20 mM , pH 7.5, y se calentó al baño maría a 70°C durante 20 min para precipitar a las proteínas termolábiles de *E. coli*. La mezcla se clarificó por centrifugación a 13,800 x g por 20 minutos y se desechó el precipitado. Por último, el sobrenadante se dializó en 2 L de solución

amortiguadora TRIS 20 mM, pH 7.5 por 5 horas. El rendimiento global de proteína en este punto fue de alrededor $\sim 5\text{-}6\text{ mg L}^{-1}$ de cultivo.

La purificación de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$, se realizaron mediante el uso de una columna de intercambio iónico, (*Q-SepharoseTM GE Healthcare*), pre-equilibrada con el amortiguador TRIS 20 mM, pH 7.5 y utilizando un cromatógrafo Bio-Rad (*Standard BioLogic LP System*). Posteriormente la muestra se aplicó en la columna de intercambio iónico, conteniendo 15 ml de matriz, y la $LvTrx$ se eluyó con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl a un flujo de 1 ml min^{-1} . Las fracciones colectadas se analizaron en un espectrofotómetro a 280 nm, posteriormente el pico correspondiente a la $LvTrx$ se concentró por ultrafiltración (*Amicon Ultra-3, Millipore*) con una membrana de corte de 3 kDa o 5 kDa y se inyectó en una columna de filtración en gel (Superdex 75 HR 10/30 de 24 ml), pre-equilibrada con TRIS 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM con un flujo de 0.2 ml min^{-1} .

Después de cada cromatografía se realizaron electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 15% para detectar la fracción correspondiente a la $LvTrx$. En todos los casos los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (*Sigma*). La proteína pura de cada variante fue cuantificada utilizando un *NanoDrop 2000, Thermo Scientific* a una absorbancia de 280 nm, tomando el coeficiente de extinción de la Trx ($10.22\ \epsilon/1000$).

3.3 Ensayo de filtración en gel

El ensayo de filtración en gel fue utilizado para estimar el estado de oligomerización de la $LvTrx_{wt}$ y de las $LvTrx_{mut}$. Para realizar este ensayo se utilizó una columna pre-empacada Superdex[®] 75 HR 10/30 *GE Healthcare*. La columna tiene un diámetro interno de 10 mm, la altura es de 30-31 cm. El volumen total de la columna es de ~ 24 ml. La columna fue conectada a un sistema de cromatografía *ÄKTA pure*, que utiliza el software UNICORN como interface gráfica.

Las condiciones para llevar cabo el ensayo para cada una de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$ fueron en todos los casos las mismas. El experimento se llevó a cabo con un amortiguador TRIS 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, a un flujo de 0.2 ml min^{-1} , con un límite de presión de 1.8 MPa. Previo a la inyección de la proteína, la columna se equilibró amortiguador utilizando dos volúmenes de ésta y se realizó un paso de lavado al *loop* de inyección. La concentración de proteína utilizada para cada corrida fue de alrededor de 2 mg mL^{-1} , con un volumen de 400 a 500 μl a distintas concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). El tiempo de retención de los picos de elución fueron determinados usando un detector-UV U9-L: 280nm.

3.4 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de dispersión dinámica de luz fue utilizada en este proyecto para identificar el estado oligomérico de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$ en solución. En esta técnica, el tamaño de la partícula es considerado como el diámetro de una esfera que fluctúa a la misma velocidad de la partícula que está siendo medida tomando como base el movimiento Browniano y la difusión traslacional de las proteínas dispersantes en solución. Debido al movimiento Browniano, la velocidad de decaimiento de la función de correlación está relacionada con el tamaño de la partícula, así, la velocidad de decaimiento es mucho mayor para partículas pequeñas que para partículas grandes, debido a que las partículas pequeñas se mueven más rápido que las grandes (Figura 9).

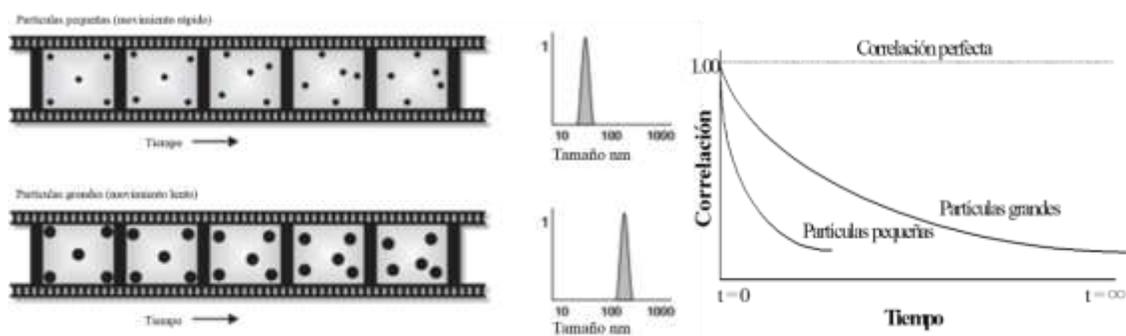


Figura 9. Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en una medición de DLS y representación esquemática de una perfecta correlación entre partículas grandes y partículas pequeñas (modificada del manual Zetasizer Nano Series).

El equipo de DLS utilizado fue un *Zetasizer* nano (proporcionado por el Dr. Abel Moreno Cárcamo del Instituto de Química, UNAM). Este equipo irradia a las moléculas de proteína con un haz monocromático de luz y analiza las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por las proteínas en solución (analito) en función del tiempo. De esta manera el DLS proporciona información acerca del diámetro hidrodinámico de la proteína, pudiéndose observar partículas de tamaño uniforme en solución o la formación de agregados de proteína.

En este experimento se utilizó el mismo amortiguador con el cual se llevaron a cabo los experimentos de filtración en gel: TRIS 20 mM, pH 7.5 sin la adición de sales. La concentración de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$ para este experimento fue de 1 mg mL^{-1} y cada muestra fue pasada por un filtro *Millipore* de $0.22 \mu\text{m}$. Para cada variante se tomaron $100 \mu\text{l}$ y se analizaron en una celda de cuarzo. Cada muestra fue medida 35 veces por minuto y por triplicado.

3.5 Ensayo de actividad NADPH/TrxR-LvTrx_{wt-mut}-insulina

La actividad de la LvTrx_{wt} y las LvTrx_{mut} fueron monitoreadas tomando como base el método reportado por (Holmgren, 1979). Para llevar a cabo el ensayo se utilizó un amortiguador de fosfato de sodio monobásico monohidratado 100 mM, pH 7.0 a 25°C con EDTA 1 mM. La mezcla de reacción que se utilizó fue 60 nM de TrxR, 0.5 mM de NADPH, 0.2 mM insulina y 1 μM de la LvTrx_{wt} y de las LvTrx_{mut}. El incremento de la absorbancia a 650 nm fue monitoreada a 30 °C. Los controles que se utilizaron para comprobar la actividad de la LvTrx_{wt} y las LvTrx_{mut} fueron la ausencia de Trx y la ausencia de NADPH. Es importante mencionar que la TrxR fue obtenida a través de la compañía *Sigma-Aldrich* (T9698). La TrxR proviene del hígado de rata y la elección de utilizar ésta, fue debida a que la zona en la cual la Trx de mamíferos tiene contacto con la TrxR es muy parecida a la superficie encontrada en la LvTrx_{wt}. Además, la TrxR de rata tiene la capacidad de reducir a las Trx's de mamíferos y a la Trx de *E. coli*. Por estas razones se determinó que la TrxR de hígado de rata debería tener la capacidad de reducir a la LvTrx_{wt} y las LvTrx_{mut}, hecho que se comprobó en la sección de resultados.

3.6 Cristalización de la LvTrx_{wt} y las LvTrx_{mut}

Las pruebas de cristalización para la LvTrx_{wt}, se realizaron con el método de difusión en fase de vapor utilizando la metodología de gota colgante. Para ello se utilizaron dos *Kits* de *Hampton Research* (*Crystal Screen I/Crystal Screen II*). La concentración de proteína fue de 6 mg mL⁻¹ en un amortiguador TRIS 10 mM pH 7.5. La condición de cristalización encontrada fue: Sulfato de amonio 2.0 M, Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6 a 18°C (Campos-Acevedo et al., 2013).

Para la cristalización de las LvTrx_{mut}, las pruebas de cristalización se realizaron con el método de *microbatch*, en la cual la solución de la proteína se coloca en una solución que contiene un pH fijo y concentración de precipitante; como el precipitante se difunde en la proteína, se reduce la solubilidad de la proteína y pueden formar cristales. Para ello se utilizaron los *Kits* de *Jena Bioscience*® (*Wizard I-IV*), como primer acercamiento a la cristalogénesis para cada una de las LvTrx_{mut}.

Para la mutante Trp-31-Ala la condición que favoreció el proceso de cristalogénesis estaba compuesta por una solución 30% w/v de PEG 3000, TRIS ácido hidroclicórico 100 mM pH 7.0, NaCl 200 mM, a una temperatura de crecimiento de 18°C, a una concentración de proteína de 12 mg mL⁻¹.

La condición de cristalización para la mutante Asp-60-Ser estaba compuesta por una solución 10% w/v de PEG 8000, MES/hidróxido de sodio 100 mM pH 6.0, acetato de zinc 200 mM. La temperatura de crecimiento fue a 18°C, a una concentración de proteína de 14 mg mL⁻¹. Por último, Los cristales de la mutante Cys-73-Ser crecieron en 20% w/v de PEG 3000, imidazol/ácido clorhídrico 100 mM pH 8.0, acetato de zinc 200 mM, a una temperatura de 18°C, a una concentración de proteína de 14 mg mL⁻¹.

3.7 Colecta y determinación de las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$

Los datos de difracción de los cristales de la $LvTrx_{wt}$ se colectaron en dos sitios (Campos-Acevedo et al., 2013): uno de los cristales fue colectado en el laboratorio de estructura de proteínas del LANEM, en el Instituto de Química de la UNAM, en un ánodo rotatorio Rigaku micromax-007 HF, a una longitud de onda de 1.54 Å (se agradece a la Dra. Adela Rodríguez Romero, por la asignación de tiempo). El tipo de detector utilizado fue un *image plate* (RAXIS-IV++) con un rango de oscilación, $\Delta\phi$, de 0.5° con una longitud de onda de $\lambda=0.96$ Å, a una temperatura de 100 K y el crioprotector empleado contenía 30% v/v glicerol. Posteriormente, se obtuvieron más datos de difracción, a partir de dos cristales, en la línea X6A del *National Synchrotron Light Source* (Upton, New York). Los datos fueron colectados utilizando un detector ADSC Quantum 210 y el crioprotector empleado contenía 30% v/v glicerol.

Se obtuvieron datos de difracción a partir de dos cristales (Asp-60-Ser y Cys-73-Ser), en la línea 19ID del *Advanced Photon Source* (APS). Los datos fueron colectados utilizando un detector ADSC Quantum 315 y la solución crioprotectora estaba compuesta por 30% v/v glicerol. Para el cristal de la $LvTrx_{mut}$ Asp-60-Ser, la longitud de onda fue de $\lambda=0.97$ Å, la distancia al detector se mantuvo en 219.80 mm, con un intervalo de oscilación por imagen, $\Delta\phi$, de 1.0°. Para la $LvTrx_{mut}$ Cys-73-Ser, la longitud de onda fue de $\lambda=0.97$ Å, la distancia al detector se mantuvo en 150.0 mm, con un intervalo de oscilación por imagen, $\Delta\phi$, de 1.0°. Posteriormente se difractó el cristal para la mutante Trp-31-Ala en un ánodo rotatorio Rigaku micromax-007HF; en el laboratorio de estructura de proteínas LANEM. El crioprotector empleado contenía 30% v/v glicerol. La longitud de onda fue de $\lambda=1.54$ Å, la distancia al detector se mantuvo en 89.934 mm, con un intervalo de oscilación por imagen de 0.5°. Todas las colectas se realizaron a 100 K (-173 °C).

La determinación del grupo espacial, la estimación del mosaicismo, el indexado y la integración de los datos se realizó con el programa XDS (Kabsch, 2010). El ordenamiento y escalado de los datos se realizó en SCALA (Evans, 2006). El problema de las fases para cada una de las mutantes fue resuelto en *Phaser* (McCoy et al., 2007), por medio de reemplazo molecular (utilizando el monómero de la tiorredoxina de $LvTrx_{wt}$ (Campos-Acevedo et al., 2013; código PDB 3zzx). El afinamiento de cuerpos rígidos y restricción geométrica se realizó en el programa Refmac (Murshudov et al., 1997). Todos los programas anteriores a excepción de XDS pertenecen y trabajan bajo la *suite* CCP4 versión 6.4.0 (*Collaborative Computational Project, Number 4*, 1994). La construcción del modelo y el afinamiento final del mismo se realizó con los programas PHENIX (Adams et al., 2010) y Coot (Emsley et al., 2010).

3.8 Determinación de la forma y tamaño de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$ mediante la técnica de SAXS

La dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS) es una técnica ampliamente usada en la biología estructural para complementar la determinación estructural de alta resolución obtenida por cristalografía de rayos-X o NMR. La técnica de SAXS-COACH (*Combined Online Automated CHanger and high-performance liquid*

chromatography, HPLC) (David & Pérez, 2009) se utilizó en este proyecto, con la finalidad de obtener una curva de dispersión de solución que puede ser calculada usando un determinado número de coordenadas atómicas derivadas de la cristalografía macromolecular, proporcionando, así, una manera de comparar estructuras en solución con estructuras cristalográficas.

El método para obtener los perfiles de SAXS está basado en la fórmula de Debye:

$$I_m(q) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_A} f_i(q) f_j(q) \frac{\sin(qd_{ij})}{qd_{ij}} \quad (1)$$

Donde la intensidad, $I(q)$ es una función del momento de transferencia $q = (4\pi \sin \theta)/\lambda$, donde 2θ es el ángulo de dispersión y λ es la longitud de la línea de rayos-X incidente; d_{ij} es la distancia entre átomos de i y j , y N es el número de átomos en la molécula (Svergun, 2010).

En este modelo el factor de forma $f_i(q)$ toma en cuenta el desplazamiento del solvente, así como la capa de hidratación:

$$f_i(q) = f_v(q) - c_1 f_s(q) + c_2 s_i f_w(q) \quad (2)$$

Donde $f_v(q)$ es el factor de forma atómico en vacío, $f_s(q)$ es el factor de forma atómico “dummy” que representa el desplazamiento del solvente, si es la fracción de la accesibilidad del átomo al solvente i , y $f_w(q)$ es el agua del factor de la forma. El parámetro c_1 es utilizado para ajustar el total del volumen excluido de los átomos (valor por default = 1.0) y c_2 es utilizado para ajustar la densidad del agua en la capa de hidratación (valor por default = 0.0). $I(q)$ es calculado con la ecuación 1. El perfil computarizado es ajustado a un perfil experimental de SAXS por minimización de la función χ con respecto a c , c_1 y c_2 :

$$\chi = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \left(\frac{I_{\text{exp}}(q_i) - cI(q_i)}{\sigma(q_i)} \right)^2} \quad (3)$$

Donde $I_{\text{exp}}(q)$ y $I(q)$ representa el perfil experimental y el teórico, respectivamente. $\sigma(q)$ es el error experimental del perfil medido, M es el número de puntos en el perfil, y c es el factor de escala (Putnam et al., 2007).

Este ensayo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Javier Pérez (científico principal de la línea sincrotrón SWING-SOLEIL, Saint-Aubin, Francia). Para llevar a cabo este ensayo se utilizó una columna de filtración en gel de Shodex [KW402.5-4F, 4.6mm de diámetro interno (ID) x 300 mm de largo] acoplada a un HPLC. La columna fue equilibrada por 90 minutos con un amortiguador TRIS 20 mM y NaCl 100 mM pH 7.5, a un flujo de 100 $\mu\text{l min}^{-1}$; el amortiguador fue previamente filtrado en una membrana de corte de 0.22 μm . La muestra de la $Lv\text{Trx}_{wt}$ y las $Lv\text{Trx}_{mut}$ utilizadas en este ensayo tenían una concentración de 2 mg mL^{-1} y se inyectaron a la columna con un volumen de 60 μl ; previo a la inyección, las muestras de las Trx's fueron filtradas en una membrana de corte de 0.22 μm . El flujo utilizado para la elución de las muestras fue de 200 $\mu\text{l min}^{-1}$. Las

muestras pasaron a través de una cámara UV-Vis (*multi-wavelength detector module of the Agilent system*) antes de pasar por la cámara de SAXS. Los datos fueron colectados en la línea SWING en SOLEIL. El tamaño del haz fue de 0.4 x 0.1 mm y el flujo fue de alrededor de 10^{12} $ph\ s^{-1}$. Las imágenes de dispersión fueron capturadas en un detector CCD (AVIEX170170). Durante la cromatografía se colectaron 50 *frames* de la solución amortiguadora como blanco. Cuando se registró un aumento en la intensidad de la absorbancia a $\lambda=280$ nm en el espectrofotómetro UV se colectaron 200 *frames* adicionales. Estos *frames* corresponden al pico de la proteína, los cuales se normalizaron y promediaron, mientras que los *frames* correspondientes a la solución amortiguadora se promediaron y se llevó a cabo la sustracción entre la intensidad de la solución amortiguadora y de la muestra de proteína. La comparación entre la curva experimental y las curvas de dispersión teóricas calculadas para las estructuras cristalográficas fueron obtenidas por medio del programa *FoXS* (Schneidman-Duhovny et al., 2010), que se encuentra dentro del programa Chimera 1.9 (Pettersen et al., 2004). Para la realización del análisis gráfico de las intensidades de dispersión se hizo uso de la *suite* ATSAS (Konarev et al., 2006), para obtener finalmente el modelo a baja resolución *de novo* de la $LvTrx_{wt}$ y las $LvTrx_{mut}$.

3.9 Análisis cristalográfico del puente disulfuro-intermolecular a distintas dosis de energía depositada

En este estudio, se determinó el deterioro de los puentes disulfuro en dos cristales de proteína de la $LvTrx_{wt}$ bajo diferentes flujos de rayos-X ($ph\ s^{-1}$). Este estudio se centra en el comportamiento del puente disulfuro-intermolecular de la $LvTrx_{wt}$, debido a que esta interacción covalente se mantiene estable en el cristal a pesar de la presencia de DTT a una concentración de 5 *mM* (Campos-Acevedo et al., 2013); concentración suficiente para reducir el puente disulfuro del sitio catalítico durante todo el proceso de cristalización.

Dos cristales de la $LvTrx_{wt}$ fueron utilizados en este ensayo ($LvTrx_{wt}$ -1x y $LvTrx_{wt}$ -3x); cada uno de estos cristales fueron crecidos bajo las mismas condiciones de cristalización (Sulfato de amonio 2.0 *M*, Acetato de Sodio 0.1 *M* pH 4.6 a 18°C); con una concentración de proteína de 6 $mg\ mL^{-1}$, utilizando como solución crioprotectora 30% (*v/v*) de glicerol. Las dimensiones aproximadas para el cristal $LvTrx_{wt}$ -1x fueron de $0.2 \times 0.04 \times 0.04$ mm y $0.3 \times 0.06 \times 0.06$ mm para el cristal $LvTrx_{wt}$ -3x. En este estudio, 10 *datasets* (10 estructuras) se obtuvieron de cada cristal a 100 K en la línea I-24 ($\lambda = 0.97$ Å) en *Diamond Light Source* en Oxford, Reino Unido.

3.9.1. Colecta de datos y experimentos de difracción

El objetivo del experimento fue el monitorear los cambios globales y locales que se producen en el cristal conforme aumenta la dosis de energía depositada en el cristal. Durante este experimento, 10 *datasets* se colectaron consecutivamente exponiendo la misma región de cada cristal a 100 K. La orientación de los cristales, el intervalo de oscilación ($\Delta\phi=0.2^\circ$), el tiempo de exposición por imagen (0.2 s), el número de imágenes colectadas por *dataset* (300 imágenes), la longitud de onda ($\lambda=0.97$ Å) y la distancia del detector (300

mm), fueron los mismos para todos los *datasets*, a excepción del porcentaje de transmitancia. Los flujos de energía fueron del 8% ($1.33 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$) y del 25% ($4.14 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$), para los cristales $LvTrx_{wt-1x}$ y $LvTrx_{wt-3x}$, respectivamente.

El tamaño de los *slits* fue 0.03×0.03 mm horizontal \times vertical en todos los casos. La dosis depositada en el cristal para cada *dataset* se calculó utilizando el programa RADDOSE (Paithankar & Garman, 2010; Zeldin et al., 2013).

3.9.2. Colecta y determinación de las estructuras $LvTrx_{wt-1x}$ y $LvTrx_{wt-3x}$

Para todos los *datasets* provenientes de los cristales $LvTrx_{wt-1x}$ y $LvTrx_{wt-3x}$, las fases fueron determinadas por el método de reemplazo molecular (MR). Las fases iniciales se obtuvieron utilizando la estructura de la $LvTrx_{wt}$ código PDB 3zxx como modelo de búsqueda. Los *frames* se indexaron e integraron utilizando el programa XDS (Kabsch, 2010), el escalamiento de los datos se realizó con SCALA dentro la suite CCP4 (Proyecto de Colaboración Computacional, Número 4) (Evans, 2006). El programa, *Phaser* (McCoy et al., 2007) se utilizó para obtener las fases y un modelo inicial. Posteriormente el modelo fue mejorado basado en la inspección manual del mapa 2Fo-Fc y posteriormente se realizó un afinamiento de cuerpo rígido y restricción geométrica en REFMAC (Murshudov et al., 2011). El afinamiento final fue completado usando los programas PHENIX (Adams et al., 2010) y Coot (Emsley et al., 2010).

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1 Dimerización de la *LvTrx_{wt}*

Las estructuras cristalográficas de la *LvTrx_{wt}* bajo distintas condiciones redox en su sitio catalítico, mostraron un arreglo dimérico, basado en el área ocupada de la interfaz y mediado por un puente disulfuro-intermolecular y otros residuos que participan en la misma (PDB's 3zzx, 4aj6, 4aj7, 4aj8) (Campos-Acevedo et al., 2013). La zona de la interfaz puede ser dividida en dos partes de acuerdo a (Chakrabarti & Janin, 2002). Una de estas divisiones está compuesta por aquellos residuos que no tienen interacción con el solvente (*Core*): formada por los residuos hidrofóbicos Cys-32, Trp-31, Val-59, Ala-66, Ile-71 y Met-74, bloqueando el acceso de moléculas de agua. Y la otra parte, formada por todos aquellos residuos de la interfaz en que al menos uno de sus átomos tiene contacto con el solvente (*Rim*): estos residuos, que componen la zona periférica al *Core* de la interfaz de la *LvTrx_{wt}*, son residuos polares e hidrofílicos y son Thr-30, Gly-33, Pro-34, Lys-36, Asp-60, Glu-63, Gln-67, Gln-70, Ala-72 y Cys-73 (**Figura 10**).

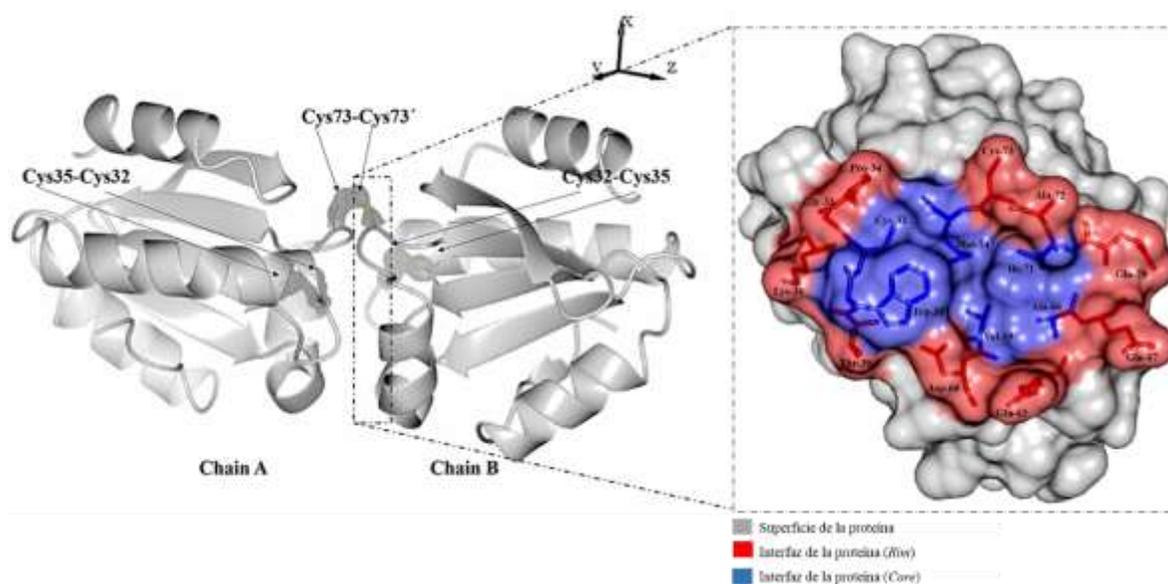


Figura 10. Estructura cristalográfica de *LvTrx_{wt}*, que muestra un dímero en la unidad asimétrica para todas las estructuras de *LvTrx_{wt}* depositadas en el PDB (3zzx, 4aj6, 4aj7, 4aj8). El mapa 2Fo-Fc se muestran en gris con un valor sigma de 1.0 σ , para los puentes disulfuro. La estructura de la *LvTrx_{wt}* muestra la ubicación que tiene el puente disulfuro-intermolecular (Cys-73-Cys-73'), que es el más expuesto al solvente, en comparación con el puente disulfuro del sitio catalítico de cada monómero. En el cuadro con líneas punteadas se muestra un acercamiento de los residuos que se encuentran involucrados en la interfaz de la *LvTrx_{wt}*. La interfaz se encuentra dividida en dos partes: el *Core* en color azul (residuos de la interfaz que no se encuentran en contacto con el solvente) y el *Rim* en color rojo (aquellos residuos que mantienen contacto con el solvente). La división de interfaz fue obtenida utilizando el programa, ProFace (Saha et al., 2006).

La zona de la interfaz dimérica en la *LvTrx_{wt}* consta de una extensión de 1,294 Å², mantenida por un promedio de 85 átomos que se encuentran a menos de 4 Å entre sí (siendo la mayoría de los contactos hidrofóbicos), de estos pares de átomos vecinos, se forman siete puentes de hidrógeno. De acuerdo a lo establecido por (Jeffrey, 1997), los puentes de hidrógeno pueden ser clasificados en tres categorías dependiendo de su distancia (fuerte, moderado y débil). La interfaz de la *LvTrx_{wt}* esta compuesta por un puente de hidrógeno fuerte conformado por el residuo Asp-60 (Oδ1) y Asp-60' (Oδ1) a 2.22 Å; por dos puentes de hidrógeno moderados entre los residuos Ala-72 (O) y Met-74' (N) a 2.83 Å, Ala-72' (O) y Met-74 (N) a 2.85 Å; y finalmente por cuatro puentes de hidrógeno débiles conformados por el residuo Thr-30 (Oγ1) y Glu-63' (Oε1) a 3.80 Å, Glu-63 (Oε1) y Thr-30' (Oγ1) a 3.41 Å, Ile-71 (O) y Cys-32' (Sγ) a 3.65 Å, Trp-31 (Nε1) y Val-59' (O) a 3.82 Å. Además, se encuentra involucrado la formación de un puente disulfuro entre los residuos Cys-73 (Sγ) y Cys-73' (Sγ) a 2.02 Å (**Figura 11**). En el anexo III, se muestran los contactos involucrados en la interfaz dimérica.

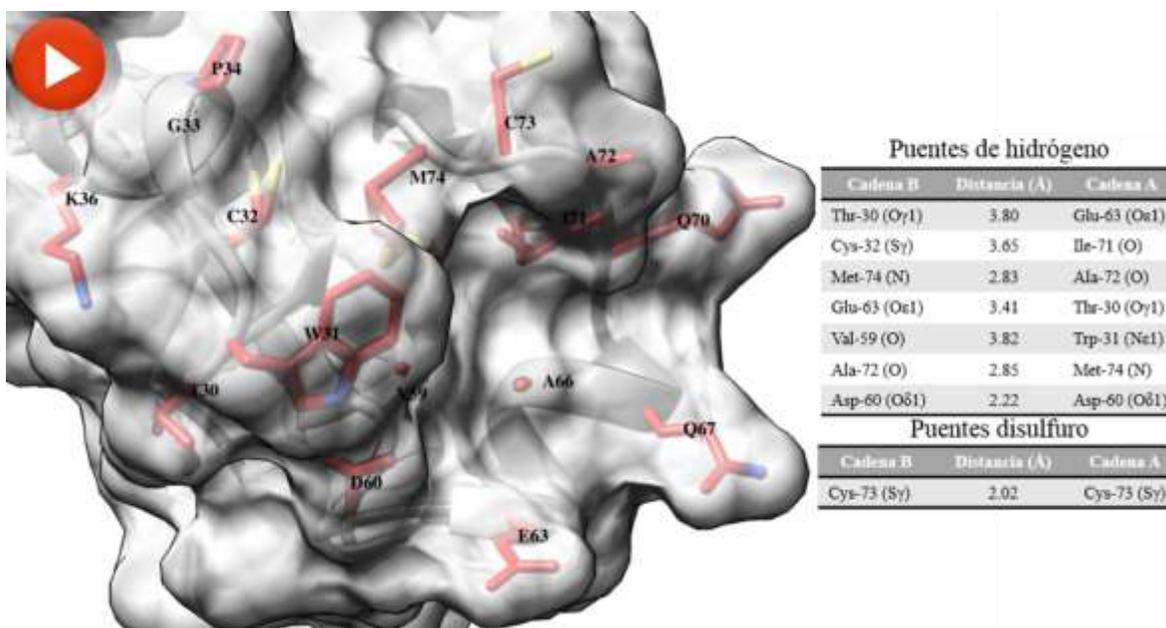


Figura 11. Monómero de la *LvTrx_{wt}*, mostrando los residuos que participan en la formación del dímero cristalográfico. Esta interacción está conformada por 7 puentes de hidrógeno y un puente disulfuro-intermolecular (video de la interacción entre monómeros en la sección suplementaria).

Además de las propiedades químicas que establecen los residuos involucrados en la interfaz, la complementariedad geométrica (*Sc*, por sus siglas en ingles), es un parámetro estadístico fundamental para medir el ajuste geométrico entre dos superficies moleculares. El rango que utiliza este parámetro va de 0 a 1.0, donde el valor 1.0 se define como una interfaz con un ajuste geométrico perfecto. Se ha reportado que las superficies de proteínas de inhibición proteolítica y proteasas tienen valores de $Sc = 0.73 \pm 0.03$, para superficies antígeno-anticuerpo tienen valores de $Sc = 0.66 \pm 0.02$ y para interacciones de tipo cremallera (*dry steric zipper*), donde no existe la interacción en la interfaz con moléculas de agua, el valor de *Sc* es de 0.86 mostrando una alta complementariedad (Nelson et al., 2005).

La complementariedad geométrica, Sc , entre monómeros de la $LvTrx_{wt}$ es de $Sc= 0.66$, este valor fue obtenido por el programa Sc (Winn et al., 2011). La complementariedad geométrica es dependiente de los residuos que componen la superficie de interacción, por lo tanto, en la **Tabla 1**, se muestra la contribución que aporta cada residuo involucrado en la interfaz para la formación de un dímero estable de la $LvTrx_{wt}$. El residuo Trp-31, es el aminoácido que más contribuye con la superficie de contacto con su contraparte monomérica con 169.4 \AA^2 de su superficie como residuo y contribuye con un 26% de la superficie total de la interfaz; seguido por la Ala-72, el Gln-63, el Gln-67, la Cys-73 y el Asp-60 que contribuyen con aproximadamente 250 \AA^2 , estos cinco residuos dan lugar al 45% de la superficie total de la interfaz. Finalmente, la Thr-30, la Cys-32, la Gly-33, la Pro-34, la Lys-36, la Val-59, la Ala-66, el Gln-70, Ile-71 y la Met-74 contribuyen con aproximadamente 167 \AA^2 totales y representan el 29% de la superficie total de la interfaz.

Tabla 1. Superficie accesible al solvente (ASA, por sus siglas en ingles) y superficie aportada de cada uno de los residuos involucrados en la interfaz de la $LvTrx_{wt}$. Datos obtenidos mediante el programa CoCoMaps (Vangone et al., 2011).

Residuo	ASA (\AA^2)	ASA (\AA^2) involucrada en la interfaz	% de ASA involucrada en la interfaz
Thr-30	88.22	12.74	14.44
Trp-31	178.38	169.4	94.97
Cys-32	30.63	25.89	84.52
Gly-33	31.63	2.54	8.03
Pro-34	61.24	13.35	21.80
Lys-36	123.22	20.16	16.36
Val-59	26.99	20.07	74.36
Asp-60	68.19	46.64	68.40
Gln-63	120.27	59.92	49.82
Ala-66	13.03	13.03	100
Gln-67	145.37	57.44	39.51
Gln-70	147.85	3.37	2.28
Ile-71	40.13	31.1	77.50
Ala-72	96.96	70.9	73.12
Cys-73	99.61	58.18	58.41
Met-74	40.50	30.52	75.36

A pesar de contar con un dímero de la estructura cristalográfica de la $LvTrx_{wt}$, el análisis de la $LvTrx_{wt}$ mediante ensayos de filtración en gel, muestra dos poblaciones, una de ellas corresponde a una fracción dimérica y la otra corresponde a una fracción monomérica (**Figura 12**). Este perfil de elución fue comparado con la Trx de *E. coli*, ya que ésta se ha reportado como una Trx monomérica (Katti et al., 1990). Para analizar el comportamiento de las dos poblaciones de la $LvTrx_{wt}$, se probaron otros factores como concentración de proteína ($.5, 1, 5, 10, 14 \text{ mg mL}^{-1}$), pH, tiempo de incubación (temperatura ambiente, 4 y $18 \text{ }^\circ\text{C}$); sin embargo, no hubo ningún cambio evidente entre las dos poblaciones. El único factor que modificó las proporciones entre estas dos poblaciones sin comprometer alguna de estas, fue la presencia o la ausencia de DTT. En ausencia de

DTT, la población dimerica es predominante, mientras que en presencia de DTT a concentraciones de 10-50 *mM*, la población predominante es monomérica.

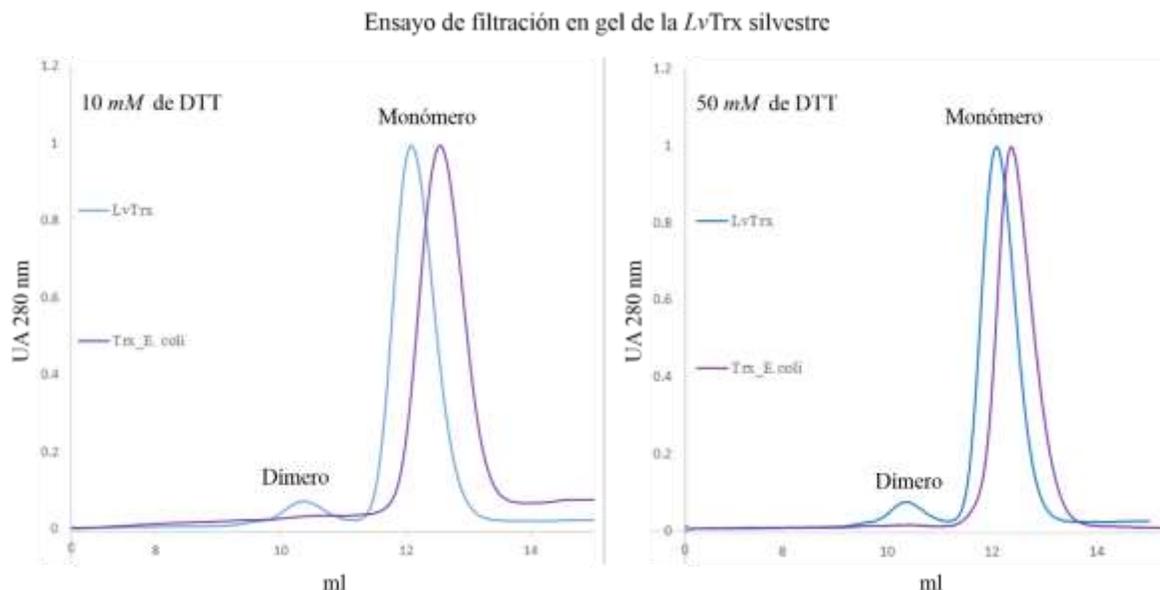


Figura 12. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la proteína *LvTrx_{wt}* (color azul) y de la Trx de *E. coli* (color violeta), bajo diferentes concentraciones de DTT (10 *mM* y 50 *mM*). En ambas condiciones la *LvTrx_{wt}* muestra dos poblaciones (dímero-monómero), la población monomérica es predominante bajo condiciones reductoras. La calibración de la columna puede verse en el anexo III.

Al obtener este comportamiento en ensayos de filtración en gel, se decidió utilizar la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para confirmar los datos obtenidos. Para este ensayo, se utilizó a la *LvTrx_{wt}* y a la Trx de *E. coli* en presencia de 10 *mM* de DTT (condiciones reductoras). Los resultados para ambas Trx's mostraron una sola población que corresponde al monómero con un radio hidrodinámico (R_H) de 1.55 nm. Sin embargo, para el caso de la *LvTrx_{wt}*, en ausencia de DTT, la población que detecta la técnica corresponde a un dímero con un R_H de 2.4 nm (**Figura 13**).

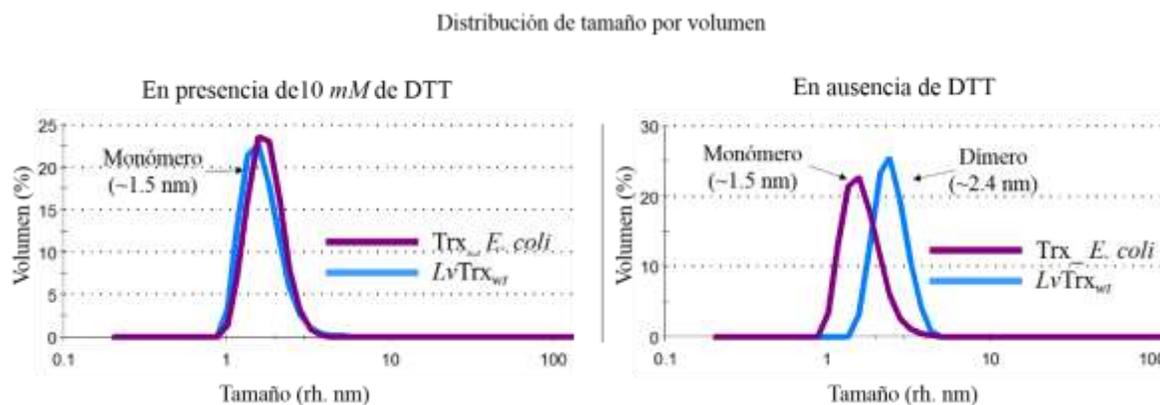


Figura 13. Radios hidrodinámicos por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la $LvTrx_{wt}$ (en color azul) y de la Trx de *E. coli* (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de un agente reductor. El radio hidrodinámico, (R_H), en presencia de DTT para ambas muestras fue de ~ 1.55 nm, que corresponde a una población monomérica; mientras que en ausencia de DTT, es evidente el desplazamiento del equilibrio de la $LvTrx_{wt}$ hacia la población dimerica. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la $LvTrx_{wt}$ fue de ~ 2.4 nm, mientras que para la Trx de *E. coli*, bajo la misma condición se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presente en presencia de DTT.

Los resultados a partir de estos dos experimentos (filtración en gel y DLS), evidencian la existencia de dos poblaciones en la $LvTrx_{wt}$, mostrando un desplazamiento dependiente del ambiente redox en el que se encuentren. En cuestiones estructurales, el proceso de cristalogénesis de la $LvTrx_{wt}$, dio lugar a la formación de un dímero en la unidad asimétrica, incluso al adicionar 5 mM de DTT en la gota de cristalización.

En la búsqueda por determinar el comportamiento estructural de la $LvTrx_{wt}$ en solución, se hizo uso de la técnica SAXS para determinar la intensidad de dispersión de una molécula en función de la frecuencia espacial y así obtener una estructura a baja resolución, en solución del equilibrio existente en la $LvTrx_{wt}$ a un pH de 7.5. El objetivo de la utilización de esta técnica fue evidenciar la conformación que tiene en solución la $LvTrx_{wt}$ con su correspondiente estructura cristalográfica y así poder obtener la comparación del perfil teórico obtenido de la estructura de la $LvTrx_{wt}$ con el perfil experimental de elución de la $LvTrx_{wt}$, para lo cual se utilizó el programa FoXS, evaluando tres muestras de la $LvTrx_{wt}$.

En la **Figura 14**, se muestra el perfil de elución de la $LvTrx_{wt}$ a una concentración de 1 mg mL^{-1} en ausencia de DTT. Antes de realizar las mediciones de SAXS, la muestra fue aplicada en una columna de filtración en gel (ver materiales y métodos). El perfil de elución de esta columna muestra una forma compleja, indicando que la muestra de la $LvTrx_{wt}$ es altamente poli-dispersa. Se observan cinco picos, el pico que presentó mayor absorción a 280 nm eluyó a los 17.30 min y puede ser atribuido al dímero de la $LvTrx_{wt}$. El pico precedente (18.38 min) puede ser atribuido a la población monomérica de la $LvTrx_{wt}$, mientras el resto de los picos (20.30 min) y (24.46 min) no tienen una explicación clara, pero probablemente sea debido a productos de degradación o contaminantes, considerando que la muestra fue enviada de Cuernavaca a Francia en solución y manteniendo, en la medida de lo posible, la temperatura de la muestra a 4°C .

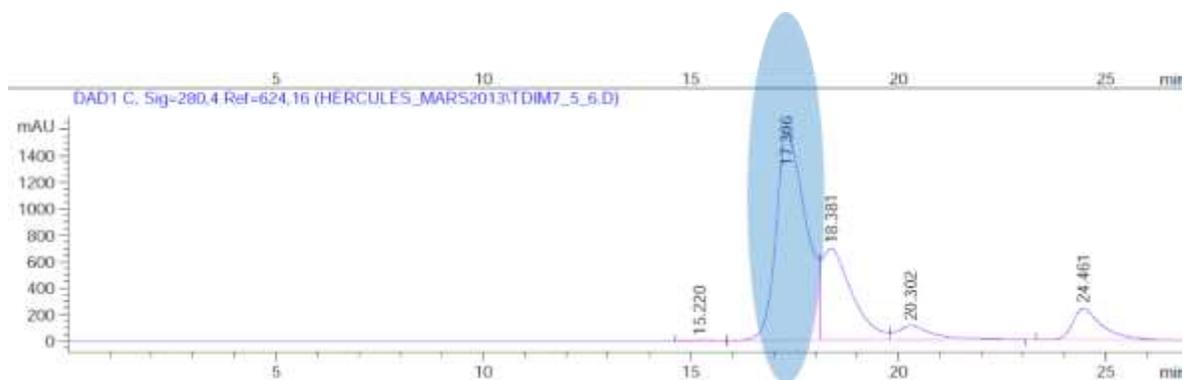


Figura 14. Perfil de elución de la $LvTrx_{wt}$ en ausencia de DTT previo a la colecta de datos por SAXS. La muestra que fue analizada mediante SAXS corresponde a la población dimerica y está señalada con un ovalo azul.

El objetivo de llevar a cabo este primer ensayo fue el analizar si la dimerización presente en el estado cristalino era posible en solución a un pH de 7.5. Por la técnica de SAXS sólo se analizó el pico que presentaba una mayor absorción (17.30 min, ovalo en color azul), pensando en la importancia que podría tener si esta fracción correspondiera a la población dimérica. Cabe mencionar que por cuestiones de tiempo en la línea SWING-SOLEIL solo se pudo analizar este pico. Para esta muestra, la función de distribución ($P(r)$) muestra un perfil bimodal y refleja las dimensiones de una proteína dimérica, con una dimensión máxima estimada (D_{\max}) de 60 Å. El radio de giro (R_g) calculado a partir de los datos de SAXS es de 19.5 ± 0.02 Å que son consistentes con el R_g teórico del dímero de la estructura cristalográfica de la de $LvTrx_{wt}$ $R_g = 19.5 \pm 0.15$ Å. En la segunda muestra se colectaron datos de la $LvTrx_{wt}$ en una fuente casera (Xeuss 2.0, en la Universidad de São Paulo, Brasil), a una concentración de 5 mg mL^{-1} , la cual no tiene acoplado un HPLC, por lo tanto, en este segundo experimento se midió una muestra de la $LvTrx_{wt}$ tomando en cuenta la fracción dimérica y monomérica. A pesar de que en la primera muestra sólo se analizó el pico dimérico y en esta se analizó toda la muestra, los resultados fueron similares, obteniendo un $R_g = 19.5 \pm 0.62$ Å, con una función de distribución $P(r)$ bimodal y una D_{\max} de 60 Å. La ausencia de la población monomérica en este experimento puede deberse a que la dispersión del monómero fue mucho menor frente a la dispersión dimérica. Para el análisis de todos los datos de SAXS se utilizó el programa AutoRg (*suite* ATSAS) (Konarev et al., 2006). La correspondiente curva de dispersión para la primera muestra se representa en la **Figura 15**. La grafica de Guinier (gráfico de los datos de dispersión por rayos-X), muestra una tendencia lineal y paralela al perfil de SAXS, mostrando que no hay presencia de agregados (la agregación está tipificada por una región de Guinier no lineal).

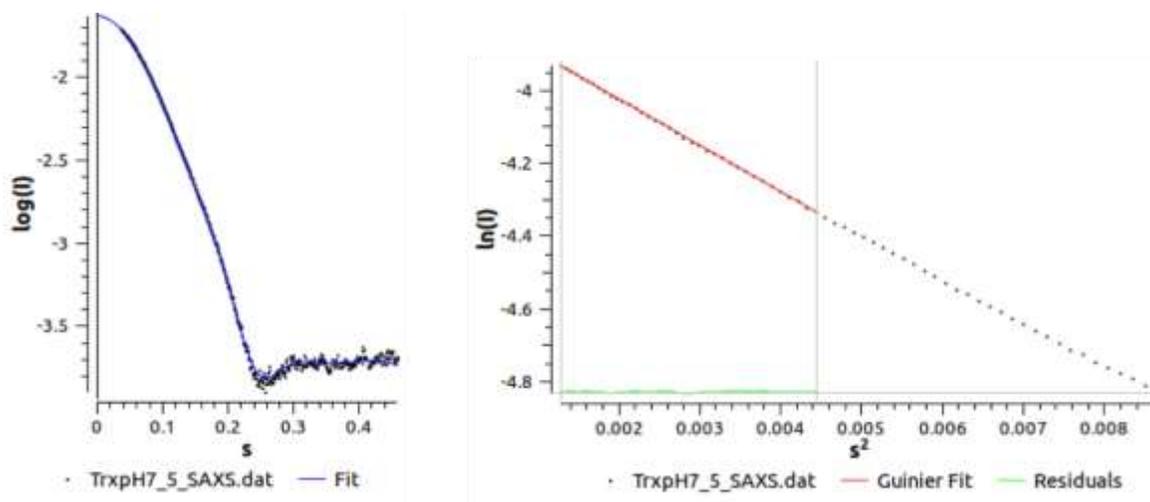


Figura 15. Curva experimental del perfil SAXS y gráfica de Guinier que permitió calcular un R_g de 19 ± 0.02 Å. Dicho valor se aproxima al valor teórico del dímero cristalino de la $LvTrx_{wt}$.

En la **Figura 16**, se muestra el perfil obtenido por SAXS, junto con el ajuste de los modelos derivados de las coordenadas de las estructuras cristalográficas reportadas con anterioridad de la $LvTrx_{wt}$ (PDB 3zzx, 4aj6, 4aj7, 4aj8), obtenidos mediante el servidor FoXS (*suite* Chimera). Es importante recordar que todas las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ presentan un dímero en la unidad asimétrica, las cuales presentan un buen ajuste

(χ), comparando el perfil teórico (PDB de la $LvTrx_{wt}$) con el perfil experimental obtenido por SAXS (PDB 3ZZX, $\chi=1.74$; PDB 4aj6, $\chi=1.43$; PDB 4aj7, $\chi=1.99$; PDB 4aj8, $\chi=1.76$); obteniendo un perfil residual similar para las 4 estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$, validando que el dímero presenta el mismo arreglo tanto en solución como en el estado cristalino a pH de 7.5.

Aunque los perfiles teóricos de los PDB de las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ se ajustan muy bien al perfil experimental de SAXS, en la **Figura 16**, se muestra el ajuste de los perfiles teóricos de cada monómero que constituye el dímero (cadena A y cadena B) de la $LvTrx_{wt}$, con la finalidad de observar que la calidad del ajuste medido por la función de χ , muestra que los perfiles teóricos de cada monómero no corresponden con el perfil experimental obtenido por SAXS.

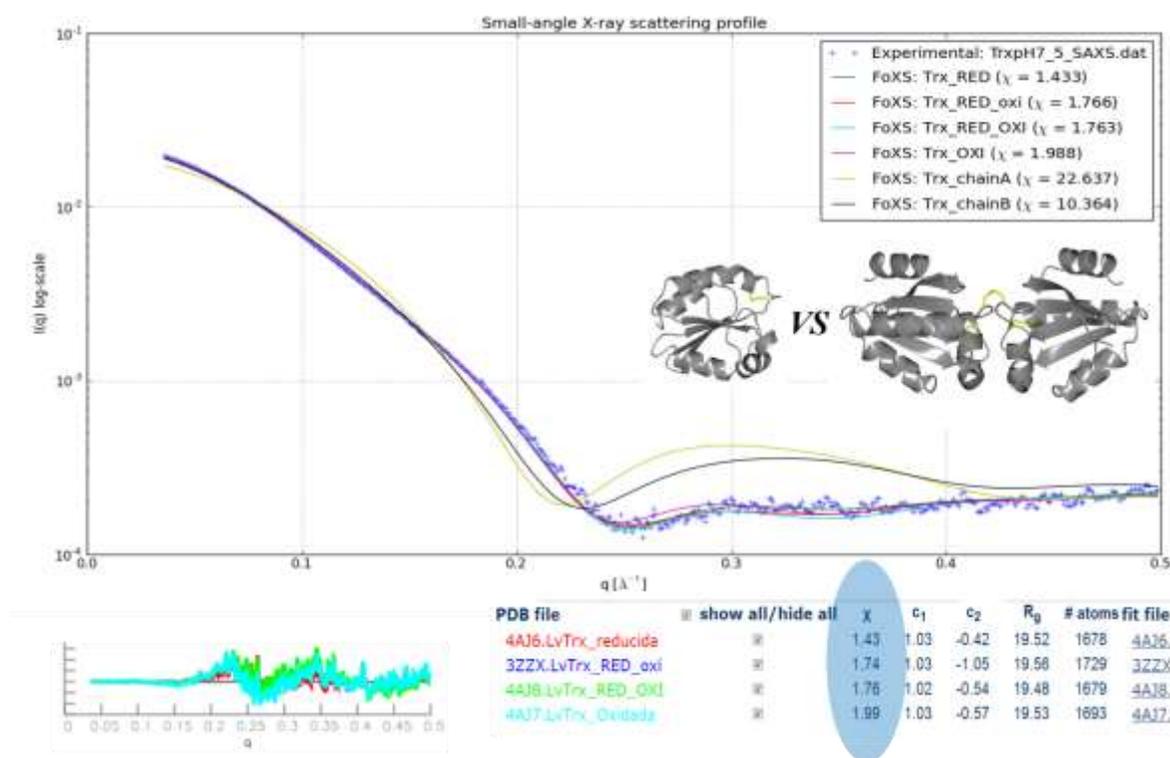


Figura 16. Ajuste de los datos experimentales con los teóricos obtenidos por el programa FoXS. Comparación entre el perfil experimental obtenido por SAXS y los perfiles teóricos obtenidos a partir de las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ (pdb 3ZZX, 4aj6, 4aj7, 4aj8). Gráfico de residuales obtenidos como resultado del ajuste entre los datos experimentales y teóricos (χ^2), teniendo la $LvTrx_{wt}$ un radio de giro de 19 ± 0.02 Å. La comparación entre el perfil experimental con cada uno de los monómeros, muestra un mal ajuste (χ^2 : 22 cadena para la cadena A y χ^2 : 10 para la cadena B).

Una vez confirmada la existencia del dímero en solución, a pH de 7.5, de la $LvTrx_{wt}$, el siguiente paso fue conocer si éste es tridimensionalmente equivalente al determinado en las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$. Para ello se decidió comparar el perfil experimental de SAXS, con dímeros cristalográficos de otras Trx's no covalentes distintas a la $LvTrx_{wt}$ (PDB 2trx de *E. coli*, PDB 2f51 de *T. vaginalis* y PDB 1xw9 de *D. melanogaster*), con la finalidad de discriminar si la técnica de SAXS puede diferenciar entre dímeros de Trx's en distintas orientaciones.

El valor de χ obtenido del ajuste para el dímero cristalográfico de la Trx de *E. coli* fue de $\chi=4.68$, para el dímero cristalográfico de la Trx de *T. vaginalis* el ajuste fue de $\chi=4.25$ y para el dímero cristalográfico de la Trx de *D. melanogaster* el ajuste fue de $\chi=12.70$ (**Figura 17a, b**), determinando de esta forma que el arreglo cristalográfico del dímero en la $LvTrx_{wt}$, ~ 1.5 , ajusta muy bien con el perfil experimental de SAXS. Otra aproximación que se utilizó para poder identificar si el arreglo dimérico observado en las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ es similar al encontrado en solución, fue el sustituir el dímero cristalográfico de las tres Trx mencionadas (*E. coli*, *T. vaginalis* y *D. melanogaster*) por la orientación del dímero de la $LvTrx_{wt}$, analizando de esta forma, si alguna de estas diferentes orientaciones diméricas cristalinas, tendría alguna posibilidad de obtener un mejor ajuste con los datos experimentales obtenidos por SAXS. Los resultados muestran un mejor ajuste al perfil experimental obtenido por SAXS con relación a los dímeros cristalográficos originales, sin embargo, como se muestra en la **Figura 17c, d**, estos perfiles teóricos no se ajustan tan bien al modelo experimental de SAXS, como el arreglo original presente en las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$.

Todas estas evidencias confirman que a pesar de que estas Trx dan lugar a la formación de un dímero cristalográfico, derivado del arreglo en la matriz cristalina, el mejor ajuste sigue siendo con las estructuras de la $LvTrx_{wt}$, estableciendo que el arreglo dimérico observado en las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ es el mismo que se encuentra en solución bajo estas condiciones.

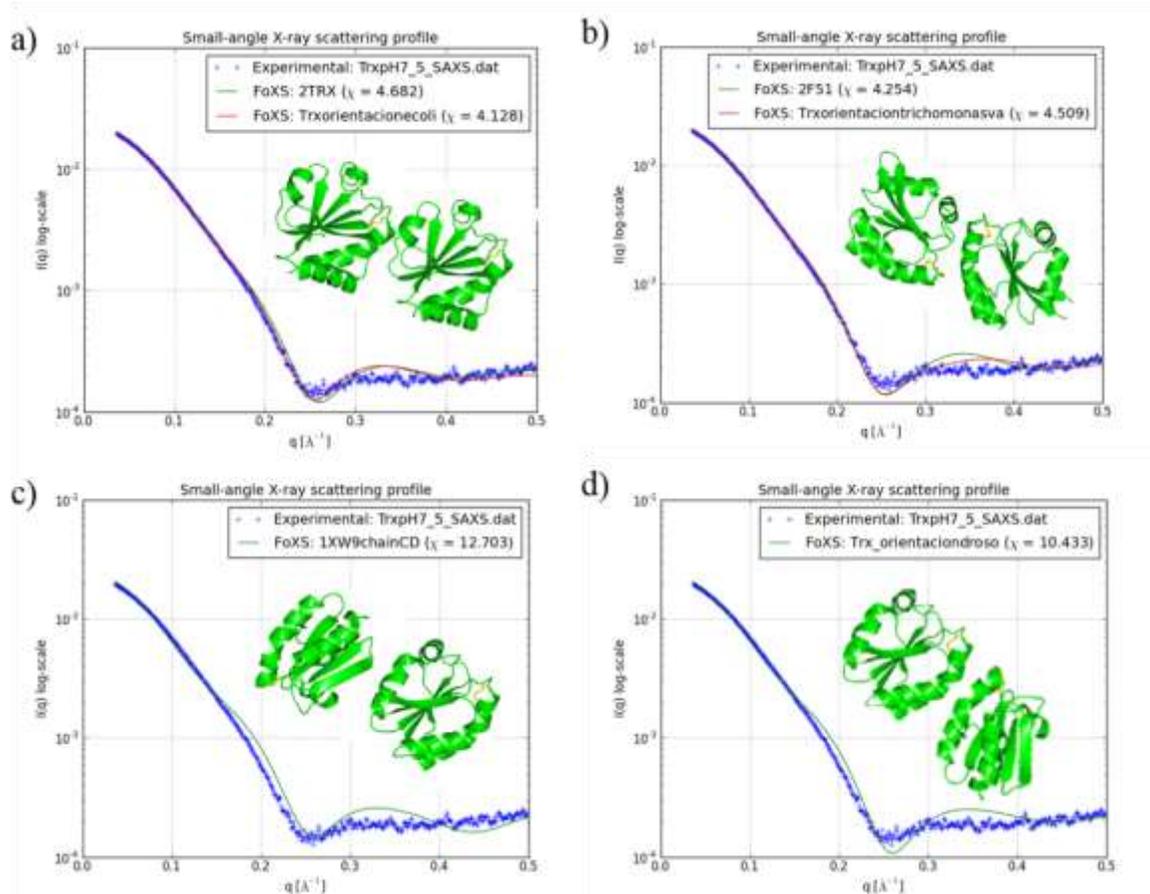


Figura 17. Comparación entre el perfil experimental obtenido por SAXS de la $LvTrx_{wt}$ con los perfiles teóricos de tres Trx's, que en su sistema cristalino presentan dímeros no-covalentes. **a,b)** comparación del ajuste (χ) entre los datos experimentales y teóricos de la Trx de *E. coli* panel **a** y la Trx de *T. vaginalis* panel **b** y la comparación del ajuste entre los datos experimentales y el perfil teórico de la $LvTrx_{wt}$ utilizando la orientación de los respectivos dímeros no covalentes de estas Trx's. **c, d)** un ejemplo más, basado en la explicación de los paneles anteriores, tomando como muestra la Trx de *D. melanogaster*, observando en el panel **c**, el ajuste con la estructura de *D. melanogaster* y en el panel **d**, el ajuste con la estructura de la $LvTrx_{wt}$, pero utilizando la orientación del dímero cristalino de *D. melanogaster*.

Para poder generar el modelo tridimensional, *de novo* a baja resolución a partir de los datos por SAXS de la $LvTrx_{wt}$, se utilizó el programa DAMMIN; este programa tiene como objetivo la determinación espacial de la forma, en este caso de la proteína, por el método *ab initio*, usando un modelo de átomos “dummy” por recocido simulado. A partir de cada paso del proceso de recocido simulado y tomando como base el perfil experimental de SAXS, se obtuvo un modelo tridimensional (archivo en formato pdb). Este proceso se realizó diez veces, generando varios modelos, que promediados mediante el programa DAMAVER, resultaron en la estructura tridimensional final a baja resolución, de entre 8 y 10 Å, de la $LvTrx_{wt}$ (**Figura 18**).

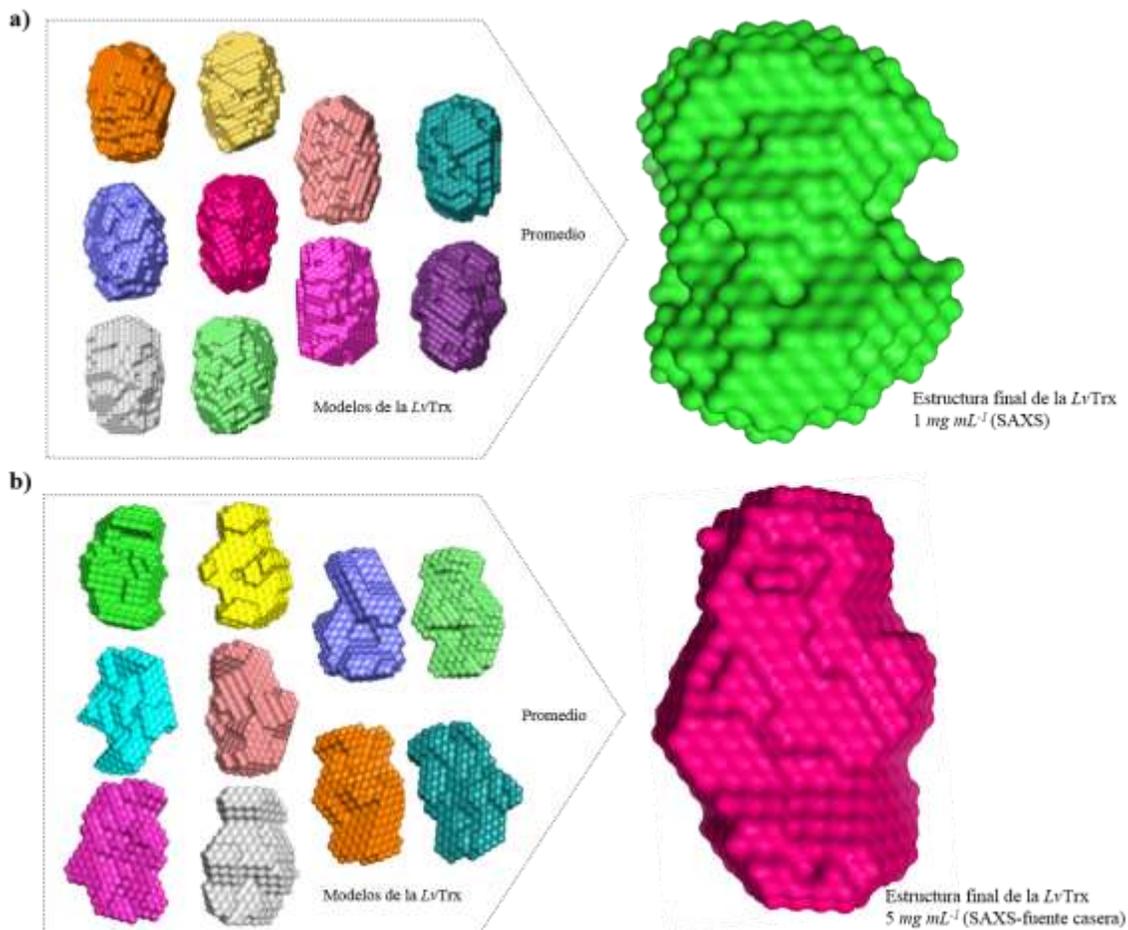


Figura 18. Determinación del modelo tridimensional de la $LvTrx_{wt}$ a baja resolución obtenido *de novo* a partir de los datos de SAXS. Para llegar a la obtención de la estructura final de $LvTrx_{wt}$ se requirió del cálculo y promedio de múltiples modelos resultantes del programa DAMMIN mediante el programa DAMAVER. **a)** Se muestra la estructura de SAXS obtenida en el sincrotrón SOLEIL con una línea que tiene acoplado un HPLC (SAXS-COACH); en **b)** Se muestra la estructura de SAXS obtenida en una fuente casera sin un HPLC; sin embargo, para ambos experimentos se obtuvieron resultados similares.

El alineamiento de los modelos generados fue realizado por el programa DAMSUP. Posteriormente, mediante el programa DAMAVER, se generó una estructura final, la cual contiene el arreglo más típico del promedio de todos esos modelos obtenidos por DAMMIN.

Una vez obtenida la estructura final por SAXS, se sobrepuso con una de las estructuras cristalográficas de la $LvTrx_{wt}$ reportadas en el PDB, mostrando que la estructura empalma de manera casi perfecta a la envoltura obtenida por SAXS. En la **Figura 19a**, se muestra la estructura obtenida por SAXS tomando solamente la fracción dimerica de la $LvTrx_{wt}$ (1 mg mL^{-1}) y utilizando un HPLC acoplado a la línea. En la **Figura 19b**, se muestra la estructura obtenida por SAXS tomando las fracciones de la $LvTrx_{wt}$ (dímero y monómero en conjunto, 5 mg mL^{-1}), mostrando un comportamiento dimerico. La ausencia de la población monomérica en este experimento, podría deberse a que la dispersión del monómero en comparación con la dispersión del dímero fue mucho menor. Sin embargo, existe una contribución en la señal del monómero, de ahí que el promedio de

las estructuras no es tan preciso en comparación con la obtenida, tomando en cuenta solamente la dispersión de la fracción dimérica.

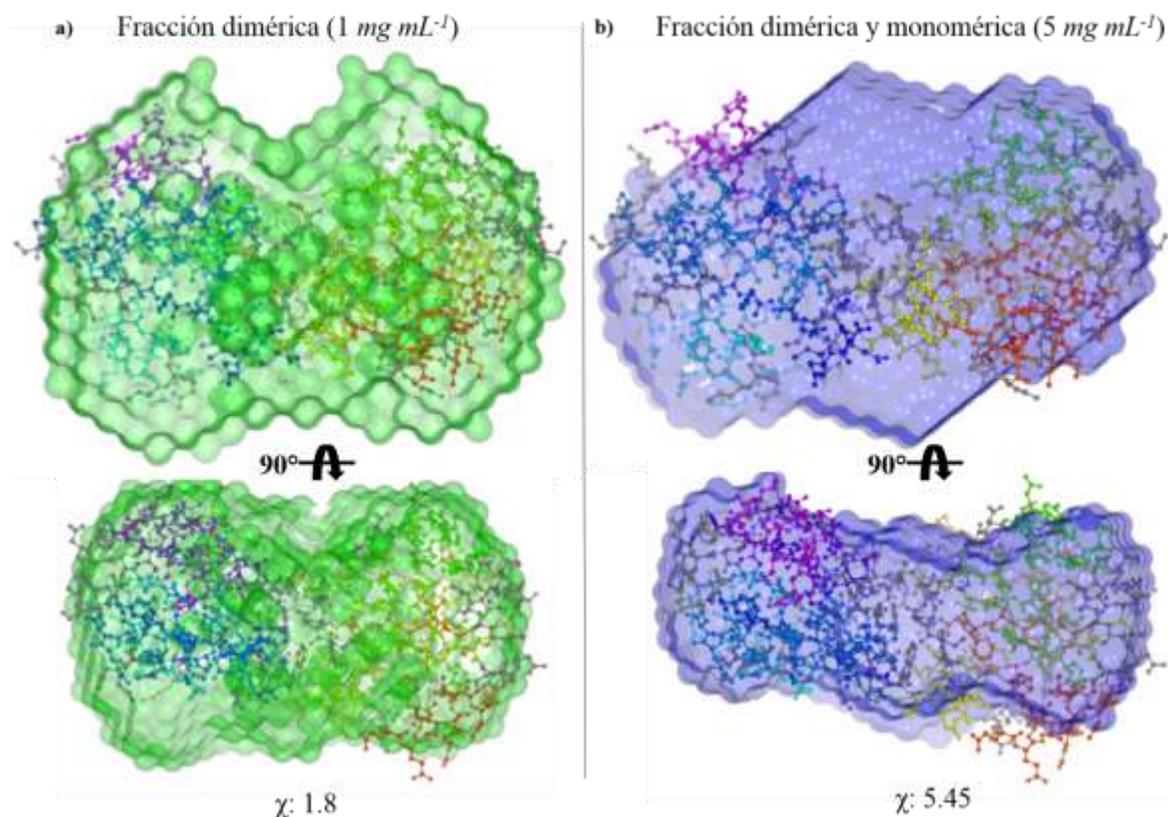


Figura 19. Empalme entre la estructura obtenida a partir de los datos de SAXS de la *LvTrx_{wf}* a distintas concentraciones a) 1 mg mL^{-1} , b) 5 mg mL^{-1} y con la estructura cristalográfica de la *LvTrx_{wf}*.

Posteriormente, se estableció una colaboración con el Dr. Javier Pérez (responsable de la línea SWING SOLEIL, en Francia), con el objetivo de poder obtener los modelos *ab-initio* de la población dimérica y monomérica de la *LvTrx_{wf}*, así como también de las mutantes propuestas en este proyecto. Es importante mencionar nuevamente que la línea sincrotrón SWING-SOLEIL tiene acoplado un HPLC, por lo que por primera vez se obtuvieron datos de cada una de las poblaciones existentes en la muestra total (dímero-monómero), a una concentración de 2 mg mL^{-1} . El R_g y D_{max} para el dímero fueron muy similares a las otras dos muestras ($20 \pm 0.01 \text{ \AA}$ and 67.89 \AA , respectivamente). El monómero presentó un $R_g = 15 \pm 1.6 \text{ \AA}$, con una distribución $P(r)$ esférica y una D_{max} de 44.36 \AA . Todos estos datos fueron obtenidos utilizando la suite ATSAS (Konarev et al., 2006). En el perfil de elución para la *LvTrx_{wf}* se obtuvieron dos picos: el primero de ellos con una cobertura del 74% (dímero) del total de la muestra y un 26% el otro pico de elución (monómero). Este perfil de elución es el que normalmente se obtiene si se purifica y cristaliza en ausencia de agente reductor. El radio de giro, R_g , para la población dimérica fue de $\sim 20 \text{ \AA}$, valor similar si se compara con los datos obtenidos analizando solamente la fracción dimérica de SAXS ($\sim 19 \text{ \AA}$), mostrando un ajuste entre la estructura obtenida

por SAXS y la estructura cristalográfica de χ^2 : 1.72; mientras que el radio de giro para la población monomérica fue de ~ 15 Å y el ajuste entre las estructuras fue de χ^2 : 1.00 (**Figura 20**).

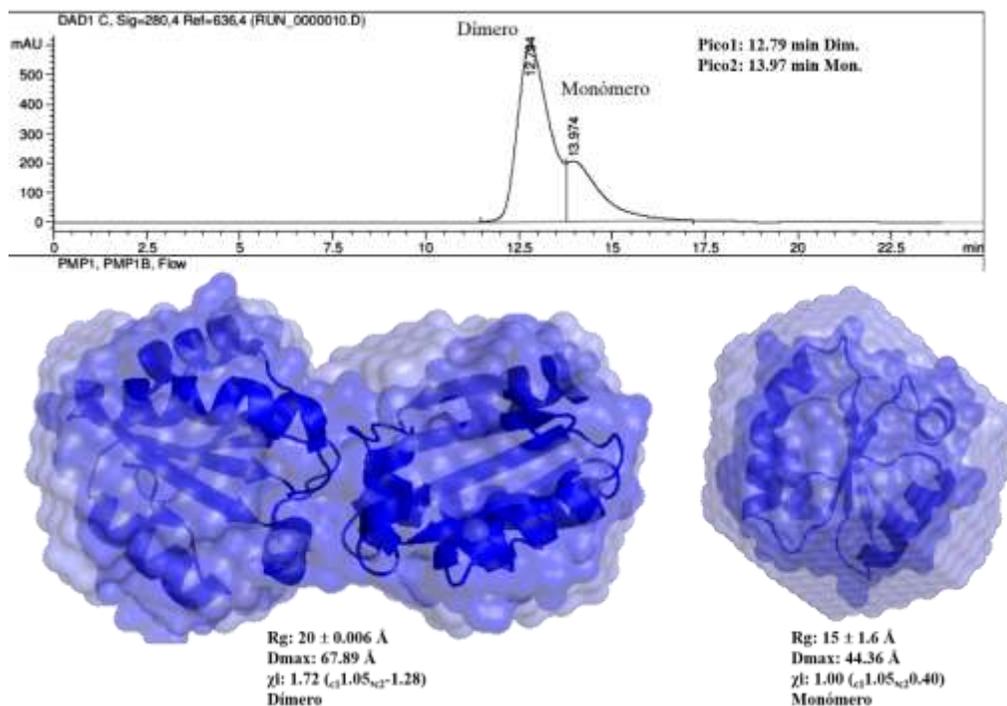


Figura 20. Perfil de elución de la *LvTrx_{wT}* acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra a la población dimérica y monomérica, así como sus estructuras a baja resolución, obtenidas a partir de los experimentos de SAXS.

Finalmente, se midió la actividad de la *LvTrx_{wT}* utilizando a la TrxR para tratar de obtener datos más cercanos a lo que estaría pasando normalmente con el sistema TRX. La TrxR de rata fue utilizada para este ensayo debido a que los residuos de la interfaz de la *hTrx* son muy similares a los de la interfaz de la *LvTrx_{wT}*, y a su fácil obtención de esta TrxR. La *LvTrx_{wT}* muestra actividad para el sistema TRX al igual que lo hace la Trx de *E. coli*; sin embargo, para esta última Trx, la reducción de la insulina requiere de más tiempo (**Figura 21**). Una de las posibles causas del retardo en la reducción de la Trx de *E. coli* puede deberse a la diferencia que existe entre los residuos de la interfaz lo que hace que la interacción con la TrxR sea más lenta.

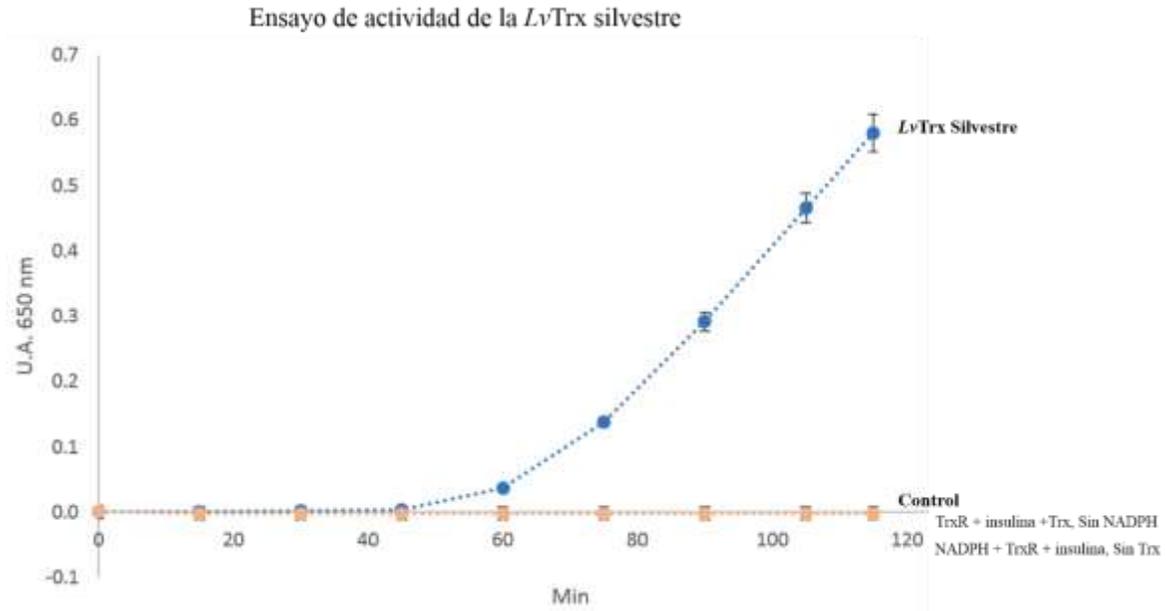


Figura 21. Ensayo de actividad de la *LvTrx_{wt}* utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. Los controles para este ensayo fueron tanto la ausencia de NADPH como la ausencia de Trx.

La elección de los cambios para la generación de las variantes descritas a continuación, fue tomada en base a la baja variabilidad de estos residuos en la zona de la interfaz, teniendo como referencia 500 secuencias representativas de Trx's de diferentes especies (**Figura 22**). Los residuos seleccionados fueron Trp-31-Ala, Asp-60-Ser, Ala-66-Arg, Cys-73-Ser, Met-74-Glu.

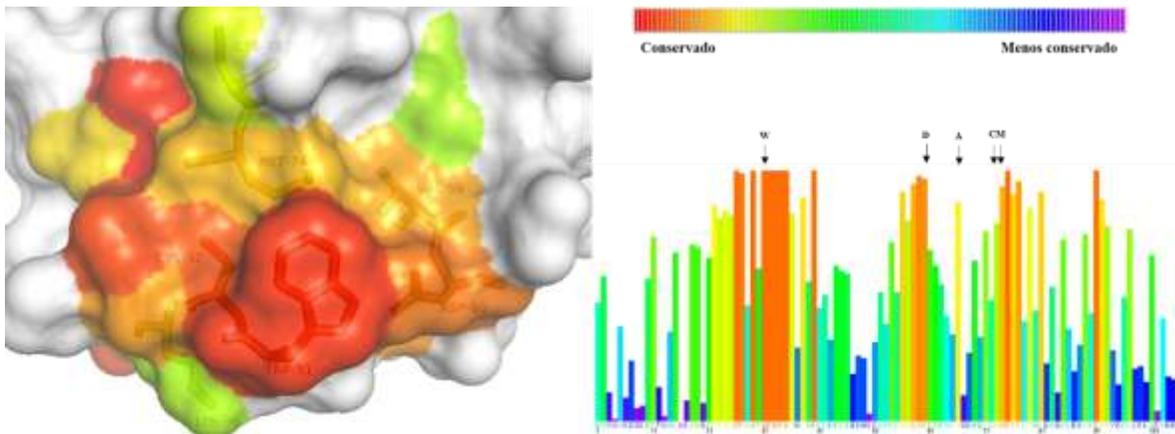


Figura 22. Análisis de variabilidad de residuos en la zona de la interfaz en las Trx's, tomando como referencia 500 secuencias de Trx's de diferentes especies. Los residuos que no presentan variabilidad se muestran en una escala que va del color rojo (conservado), hasta llegar al color azul (no conservados). Los residuos Trp-31, Asp-60, Ala-66, Cys-73 y Met-74, fueron los residuos elegidos para ser mutados y analizados en esta tesis.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de las mutantes de la interfaz generadas en este trabajo; el orden en el cual serán descritos estos resultados, es en base a su numeración de la secuencia de aminoácidos de la *LvTrx_{wt}*. Es importante mencionar que durante el análisis de estas mutantes se

hará una comparación con la *LvTrx_{wr}*. Además, para todos los experimentos se utilizó como control a la Trx de *E. coli*, la cual se ha reportado como una Trx monomérica (ver Anexo III).

4.2 Mutante Trp-31-Ala de la *LvTrx*

El residuo Trp-31, representa el residuo más voluminoso de la interfaz en la *LvTrx_{wr}*. El área accesible al solvente (ASA, por sus siglas en inglés) para este residuo es de 178 Å² y la superficie aportada del Trp-31 a la interfaz es de 169 Å² (94%), siendo el residuo que contribuye con más superficie a la zona de la interfaz. Este residuo se encuentra conservado en todas las Trx-1, por lo tanto, la sustitución de este residuo por el residuo de alanina podría comprometer la actividad de la Trx, sobre todo debido a la cercanía que tiene con la Cys-32 (cisteína catalítica); sin embargo, la sustitución de este residuo por alanina, podría desestabilizar la interacción entre monómeros.

Esta variante fue evaluada por el método de filtración en gel para analizar el estado de oligomerización de la mutante Trp-31-Ala. El comportamiento observado para la mutante Trp-31-Ala en este ensayo (realizado en las condiciones descritas), muestra dos poblaciones: una población dimérica en menor proporción con respecto a la fracción monomérica. A pesar de que este comportamiento es similar al observado para la *LvTrx_{wr}*, esta variante muestra una disminución en el tiempo de retención (**Figura 23**).

Ensayo de filtración en gel de la *LvTrx* mutante Trp-31-Ala

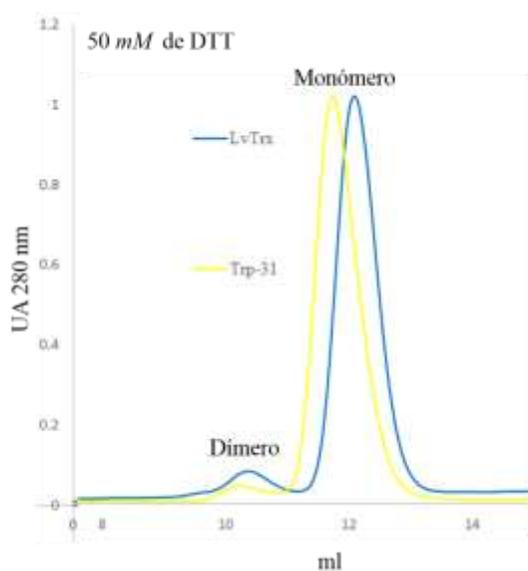


Figura 23. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Trp-31-Ala (color amarillo), bajo condiciones reductoras a una concentración de 50 mM de DTT. Como control se muestra la *LvTrx_{wr}* (color azul). La mutante Trp-31-Ala muestra dos poblaciones (dímero-monómero), de la cual, la población monomérica es predominante bajo las condiciones en que se realizaron estos experimentos (condiciones reductoras).

Posteriormente se realizaron experimentos de DLS en presencia de 10 mM de DTT. Los resultados obtenidos, mostraron un comportamiento similar al de la $LvTrx_{wt}$, donde bajo condiciones reductoras la única población obtenida fue monomérica (R_H : 1.55 nm); mientras que en ausencia de DTT la población que se obtuvo fue dimérica (R_H : 2.4 nm), (Figura 24).

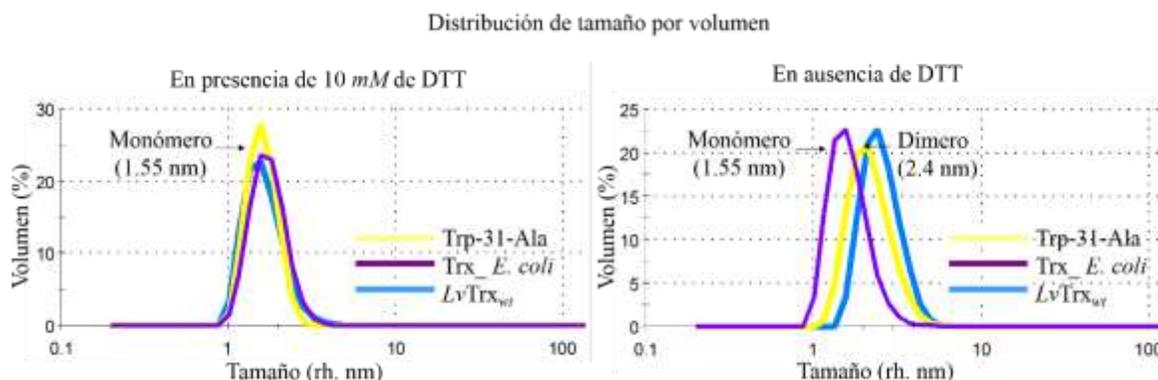


Figura 24. Radios hidrodinámicos por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Trp-31-Ala (mostrada en color amarillo). También se muestra una comparación con los perfiles de la $LvTrx_{wt}$ (en color azul) y de la Trx de *E. coli* (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia de DTT para la mutante Trp-31-Ala fue de 1.55 nm, que corresponde a una población monomérica; mientras que en ausencia de DTT, es evidente el desplazamiento del equilibrio de la mutante Trp-31-Ala hacia la población dimérica. El comportamiento de la mutante Trp-31-Ala fue muy similar al comportamiento de la $LvTrx_{wt}$. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la mutante Trp-31-Ala fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de *E. coli*, bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que se observó en presencia de DTT.

El análisis de la mutante Trp-31-Ala por medio de estas dos técnicas en solución (filtración en gel y DLS), muestra la existencia de un equilibrio monómero-dímero, comportamiento similar a la $LvTrx_{wt}$ en ausencia y presencia de DTT. Sin embargo, al perder superficie de interacción en la zona de la interfaz con su contraparte monomérica, provocado por la sustitución del Trp-31 por la Ala-31, hace pensar que el arreglo dimérico no debería ser el mismo, a pesar de la similitud en comportamiento con la $LvTrx_{wt}$ en solución. El hecho de no poder definir mediante estas técnicas la pérdida o la formación de nuevos contactos en la zona de la interfaz, hace que la obtención de la estructura sea indispensable para definir y complementar el análisis de su comportamiento. Por lo tanto, se procedió a la cristalización de esta mutante y la determinación de su estructura cristalográfica, en una condición distinta a la reportada para la $LvTrx_{wt}$. Esta estructura presentó un dímero en la unidad asimétrica, teniendo como grupo espacial $P 2_1 2_1 2_1$, con parámetros de celda unidad de $a = 33.16$, $b = 62.67$, $c = 99.33$; $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$. El coeficiente de Matthews sugiere la presencia de dos copias en la unidad asimétrica a una resolución de 1.88 Å. Este cristal fue difractado en un equipo de ánodo rotatorio en el LANEM. Los datos estadísticos de esta estructura cristalográfica se presentan en la **Tabla 2**.

La estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala presenta un dímero en la unidad asimétrica. Como se mencionó anteriormente, la localización que tiene el residuo Trp-31 en la estructura de la $LvTrx_{wt}$ es de gran importancia, debido a que se encuentra ubicado al lado de la cisteína catalítica (Cys-32). Al analizar la estructura de la mutante Trp-31-Ala, y compararla con el dímero de la $LvTrx_{wt}$, es evidente la formación de un arreglo homo-dimérico distinto al encontrado en la matriz cristalina de la $LvTrx_{wt}$, el cual no compromete el puente disulfuro-intermolecular. Este nuevo arreglo dimérico muestra una rotación de 55° cuando se sobrepone con la

estructura cristalográfica de la $LvTrx_{wt}$. Es importante mencionar que el puente disulfuro-intermolecular, muestra una ocupación parcial entre un estado oxidado y otro reducido del 50% en términos de ocupación, por lo tanto, en solución deberían de existir estados monoméricos y dímicos (**Figura 25**).

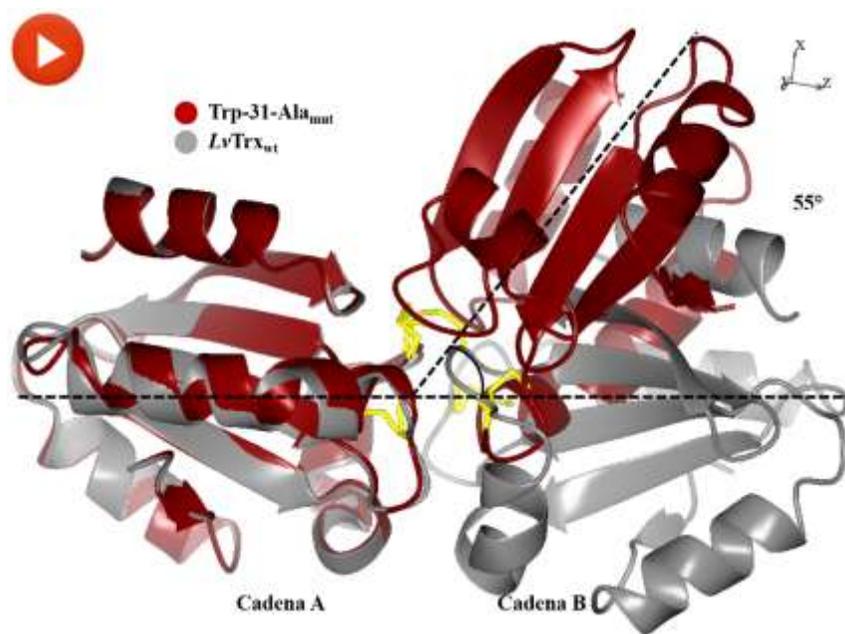


Figura 25. Sobreposición de la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala y la estructura de la $LvTrx_{wt}$, en la cual, la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala muestra la eliminación de la zona de la interfaz establecida para la formación del dímero en la $LvTrx_{wt}$, debido a una rotación de 55° de uno de los monómeros.

El arreglo homo-dimérico de la mutante Trp-31-Ala da lugar a la formación de nuevas interacciones: Ala-92 (N) y Ala-72' (O) a 2.9 Å, Ala-72 (O) y Ala-92' (N) a 2.8 Å que no están presentes en el dímero cristalográfico de la $LvTrx_{wt}$. Sin embargo, el servidor PISA no considera que esta interacción homo-dimérica sea significativa para considerarse una interacción estable en solución, obteniendo un valor de CSS (*Complex Formation Significance Score*) de 0. Sustentando lo anterior, en la estructura cristalográfica existen 7 moléculas de agua (etiquetadas en este trabajo como S, por su significado en inglés *Solvent*), en la zona de la interfaz descrita para la $LvTrx_{wt}$. Las moléculas de agua localizadas en esta zona son: S-1, S-2, S-11, S-17, S-34, S-59 y S-76, de acuerdo a la numeración de la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala (**Figura 26**).

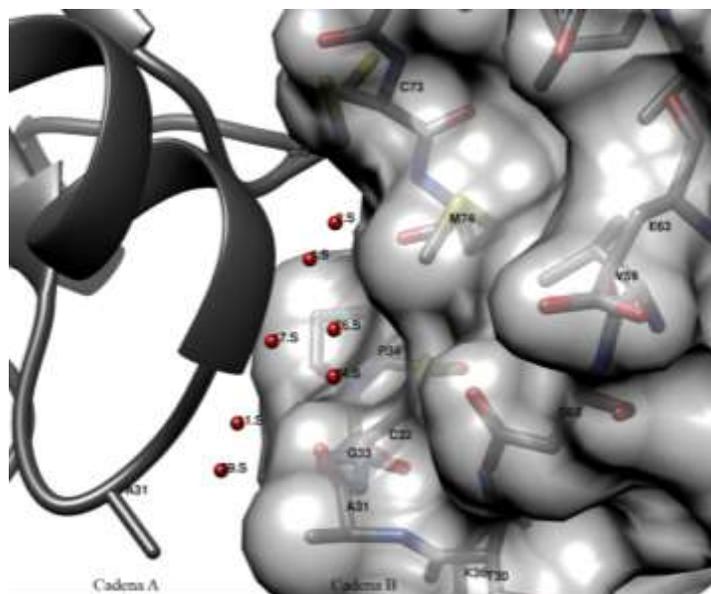


Figura 26. Estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala, en la cual se localizan 7 moléculas de agua (S-1, S-2, S-11, S-17, S-34, S-59 Y S-76) en la zona de la interfaz reportada para la *LvTrx_{wr}*. Las moléculas de agua se muestran como esferas en color rojo.

Es importante mencionar la permanencia y estabilidad que presenta el puente disulfuro-intermolecular, a pesar de la ausencia de las interacciones que participan en la estabilidad del homo-dímero en la *LvTrx_{wr}*. En la estructura de la mutante Trp-31-Ala existe una doble conformación en una de las cisteínas involucradas en la formación del puente disulfuro-intermolecular, teniendo una ocupación parcial del 50% en cada una de las copias, siendo una con la cisteína en estado oxidado y otra con estado reducido. En el caso del puente disulfuro catalítico de la cadena A, el 61%, muestra un estado oxidado, mientras que el 39% está reducido. Para las cisteínas que componen el sitio catalítico de la cadena B, ambas se mantienen en estado reducido. Por lo tanto, el residuo Trp-31 es fundamental para establecer una interacción estable entre monómeros, ya que su ausencia elimina las interacciones de la interfaz observadas en la *LvTrx_{wr}*. Sin embargo, la ausencia del residuo Trp-31, no es suficiente para desplazar el equilibrio a una población absolutamente monomérica. Este análisis estructural, confirma los datos descritos en solución (ver página 48).

Para complementar estos estudios, se utilizó la técnica de SAXS, para conocer la estructura tridimensional de la mutante Trp-31-Ala en solución. El comportamiento observado en el cromatograma para la mutante Trp-31-Ala, mostró dos picos de elución (dímero-monómero) en proporciones iguales. La estructura obtenida a partir del perfil experimental de SAXS del pico 1, muestra un $R_g = 20 \pm 1.5 \text{ \AA}$, la distribución $P(r)$ es bimodal con una D_{max} de 72.32 \AA . Al sobreponer la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala y el perfil experimental de SAXS se obtiene un ajuste χ^2 1.34; lo cual permite concluir que el dímero encontrado en la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala, es una de las poblaciones que está presente en solución. Para la fracción monomérica, la estructura de SAXS presento un $R_g = 15 \pm 1.6 \text{ \AA}$, con una distribución $P(r)$ esférica y una D_{max} de 44.36 \AA . (**Figura 27**).

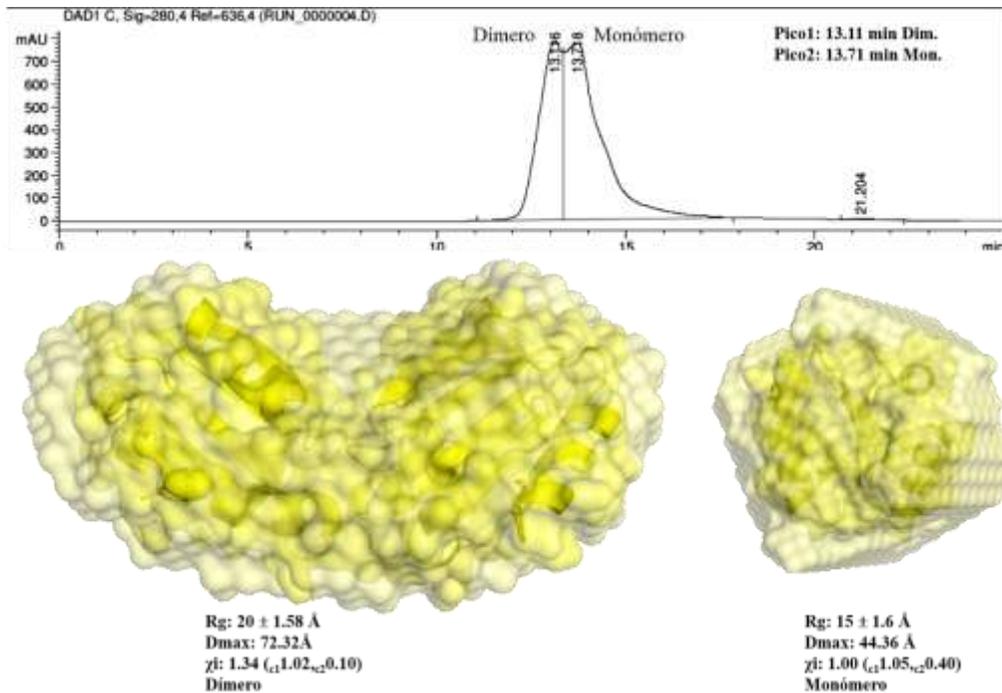


Figura 27. Perfil de elución de HPLC de la mutante Trp-31-Ala acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra aproximadamente el 50% de la población, perteneciente al pico 1 (dimérica) y otro 50% correspondiente a dos poblaciones: una de ellas (pico 2) corresponde a una población monomérica. Sobreposición de las estructuras obtenidas por SAXS y las estructuras cristalográficas muestran un buen ajuste entre modelos (χ^2 1.34 y χ^2 1.00, respectivamente).

La actividad para la mutante Trp-31-Ala se ve comprometida, mostrando un mayor retardo en la reducción de las cadenas de la insulina si se compara con la *LvTrx_{wr}* e incluso con la Trx de *E. coli* (**Figura 28**). La causa más probable por la cual esta variante no presenta la misma actividad que la *LvTrx_{wr}*, spuede ser que la falta del residuo Trp-31, debilite la interacción con la TrxR retardando así la regeneración de la cisteína catalítica (Cys-32). Es importante mencionar que el residuo triptófano es uno de los pocos residuos que se encuentran totalmente conservados en las Trx's.

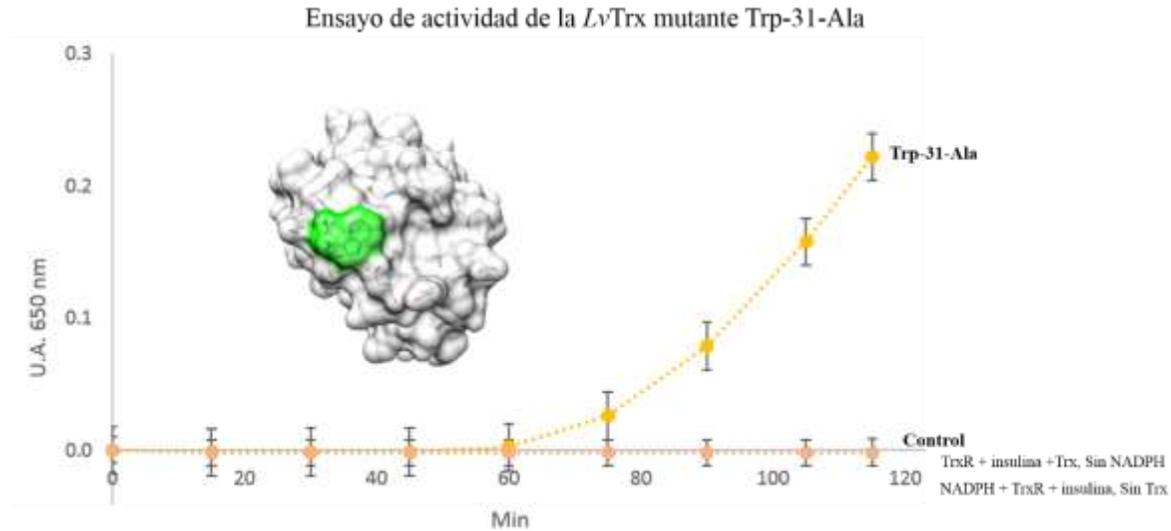


Figura 28. Ensayo de actividad de la mutante Trp-31-Ala utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. Esta mutante presenta actividad, sin embargo, se ve comprometida debido a la ausencia del triptófano que se ha descrito que es importante para interaccionar con la TrxR, esto se confirma con el hecho de que la mutante Trp-31-Ala presenta una menor actividad que la *Lv*Trx_{wr} y la Trx de *E. coli*.

4.3 Mutante Asp-60-Ser de la *Lv*Trx

En esta mutante, el residuo Asp-60 fue sustituido por un residuo de serina. El residuo Asp-60, como se describió anteriormente, se encuentra localizado en un extremo de la interfaz de la *Lv*Trx_{wr}, formando un puente de hidrógeno con el residuo Asp-60' del otro monómero. Por lo tanto, inicialmente se pensó que esta mutante, al eliminar este puente de hidrógeno, podría ocasionar la entrada de moléculas de agua en la interfaz, desestabilizándola, como ocurrió en la mutante Trp-31-Ala. Sin embargo, el ensayo de filtración en gel muestra lo contrario, en donde se observa mayoritariamente un pico correspondiente a la población dimérica, y en mucho menor proporción, una población monomérica sin importar la concentración de DTT adicionada (**Figura 29**). Mientras que en ausencia de DTT, sólo se observa una población dimérica.

Ensayo de filtración en gel de la *LvTrx* mutante Asp-60-Ser

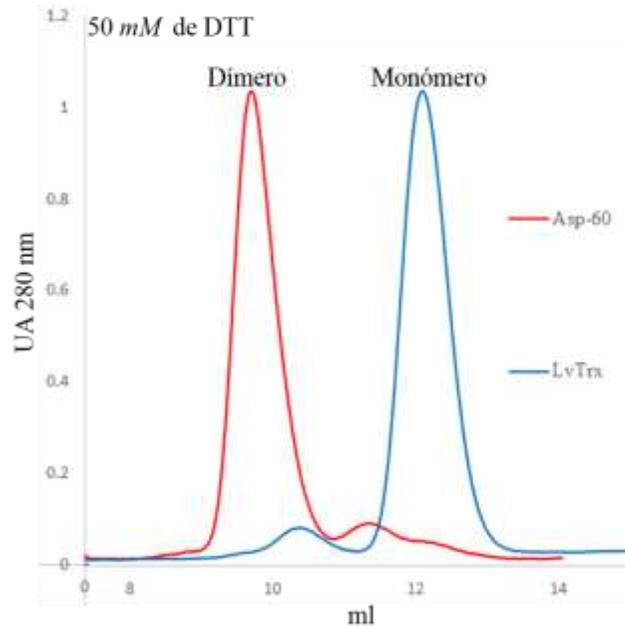


Figura 29. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Asp-60-Ser (color rojo), bajo condiciones reductoras a una concentración de 50 mM de DTT. Como control se muestra la *LvTrx_{wt}* (color azul). La mutante Asp-60-Ser muestra dos poblaciones (dímero-monómero), de la cual, la población dimérica es predominante bajo condiciones reductoras.

Para corroborar el estado dimérico de la mutante Asp-60-Ser se realizó un ensayo de DLS, en el cual sin importar la presencia o ausencia de DTT, la mutante Asp-60-Ser mostró un radio hidrodinámico (R_H) de 2.4 nm, correspondiente a una población dimérica (**Figura 30**). A diferencia de la *LvTrx_{wt}* y la mutante Trp-31-Ala, la mutante Asp-60-Ser durante todos los experimentos en solución, mostró un comportamiento dimérico, incluso a concentraciones de 50 mM de DTT. Estos experimentos indican que el dímero formado por la mutante Asp-60-Ser es más estable, probablemente producto de la formación de nuevas interacciones en la zona de la interfaz descrita en la *LvTrx_{wt}*.

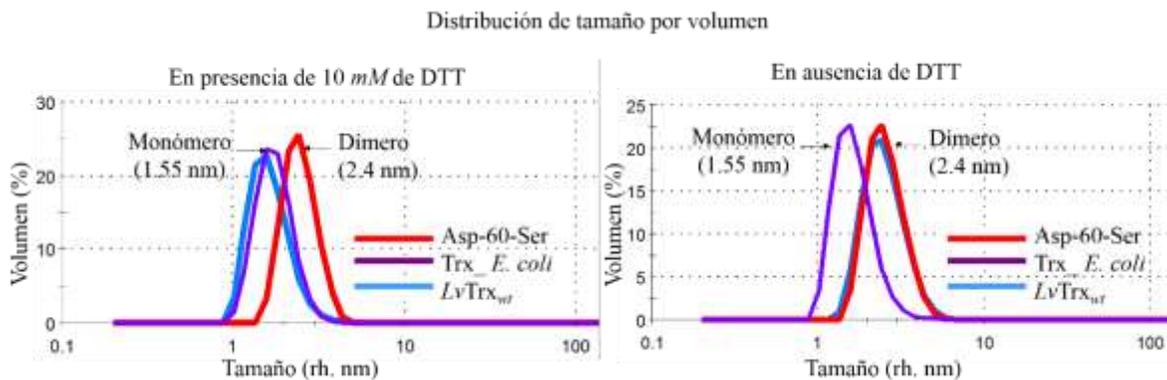


Figura 30. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Asp-60-Ser (mostrada en color rojo). También se muestra una comparación con los perfiles de la *LvTrx_{wr}* (en color azul) y de Trx de *E. coli* (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Asp-60-Ser fue de 2.4 nm, que corresponde a una población dimerica. El comportamiento mostrado por la mutante Asp-60-Ser presenta un dímero más estable, que podría ser producto de más interacciones en la zona de la interfaz. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la *LvTrx_{wr}* fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de *E. coli*, bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presentó en presencia de DTT.

Posteriormente se obtuvieron cristales de la mutante Asp-60-Ser en diferentes condiciones a las encontradas para la *LvTrx_{wr}* y para la mutante Trp-31-Ala. La estructura de la mutante Asp-60-Ser presenta un grupo espacial C 1 2 1 con parámetros de celda unidad de $a = 58.40$, $b = 82.70$, $c = 82.20$; $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 102.50^\circ$ $\gamma = 90^\circ$. El coeficiente de Matthews sugiere la presencia de cuatro copias en la unidad asimétrica (dos dímeros), a una resolución de 2.0 Å. El análisis de la estructura cristalográfica de la mutante Asp-60-Ser, mostró la presencia de los dímeros casi idénticos a los encontrados en la estructura de la *LvTrx_{wr}*. Este cristal fue difractado en la línea 19ID, del sincrotrón de Chicago (APS). Los datos estadísticos de estas estructuras cristalográficas se encuentran en la **Tabla 2**.

Como se demostró tanto en experimentos en solución como cristalográficos, la formación de un dímero estable para la mutante Asp-60-Ser es producto de interacciones nuevas en adición de las interacciones establecidas en la zona de la interfaz de la *LvTrx_{wr}*. La interfaz de la mutante Asp-60-Ser está conformada por 7 puentes de hidrógeno: Thr-30 (O γ 1) y Glu-63 (O ϵ 1) a 2.6 Å, Lys-36 (N ζ) y Gln-67 (O ϵ 1) a 3.1 Å, Ser-60 (O γ) y Glu-63 (O ϵ 2) a 3.8 Å, Met-74 (N) y Ala-72 (O) a 2.7 Å, Glu-63 (O ϵ 1) y Thr-30 (O γ 1) a 2.4 Å, Gln-67 (O ϵ 1) y Lys-36 (N ζ) a 2.7 Å, por último Ala-72 (O) y Met-74 (N) a 2.8 Å, cuatro de ellos también están presentes en la interfaz de la *LvTrx_{wr}*. Sin embargo, la distancia de estas interacciones es menor, provocando un mayor acercamiento entre monómeros, así como la pérdida de una carga en la zona de la interfaz, puede también estar facilitando la interacción entre monómeros. Los otros puentes de hidrógeno son establecidos con diferentes aminoácidos de la interfaz y se mantiene la formación del puente disulfuro-intermolecular entre las Cys-73 y la Cys-73' (**Figura 31**).

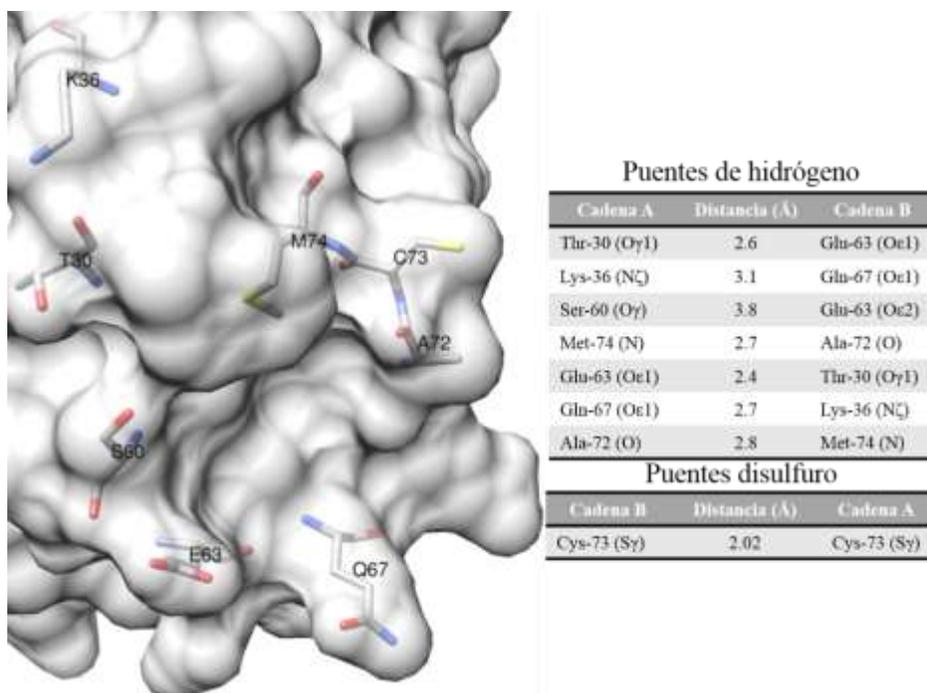


Figura 31. Zona de la interfaz de la mutante Asp-60-Ser. Contactos establecidos entre los residuos: Thr-30 (Oγ1) y Glu-63 (Oε1) a 2.6 Å, Lys-36 (Nζ) y Gln-67 (Oε1) a 3.1 Å, Ser-60 (Oγ) y Glu-63 (Oε2) a 3.8 Å, Met-74 (N) y Ala-72 (O) a 2.7 Å, Glu-63 (Oε1) y Thr-30 (Oγ1) a 2.4 Å, Gln-67 (Oε1) y Lys-36 (Nζ) a 2.7 Å, por ultimo Ala-72 (O) y Met-74 (N) a 2.8 Å.

La zona de la interfaz de la mutante Asp-60-Ser está conformada por 16 aminoácidos por monómero (Thr-30, Trp-31, Cys-32, Gly-33, Pro-34, Lys-36, Val-59, ser-60, Glu-63, Ala-66, Gln-67, Ile-71, Ala-72, Cys-73, Met-74 y Ser-90), y con una superficie de 1,187 Å², la cual representa un 20% del área total de la superficie dimérica. El valor *PV* (valor P hidrofóbico), se define como la especificidad de la interfaz; valores por debajo de 0.5 indican que existe una alta especificidad, valores por arriba de 0.5 sugieren que esta interacción es artificial provocada por el empaquetamiento de las copias en la red cristalina. La energía de solvatación para la interfaz de esta mutante es de -12.8 kcal/mol, con un valor *PV* de 0.26. Existe otro valor por el cual se puede definir si la interfaz es relevante para la formación del complejo o no; este valor se define como CSS, que va de un rango de 0 a 1. Valores cercanos a 1 se traducen en que es muy probable la formación del complejo biológico, para el caso de la *LvTrx_{wr}* el CSS es de 0.781 y el valor de CSS para la mutante Asp-60-Ser es de 1.0.

Al comparar la extensión de la interfaz entre la mutante Asp-60-Ser (1,187 Å²) y la *LvTrx_{wr}* (1,294 Å²), la interfaz de esta mutante es menor. Esta disminución es provocada por la entrada de moléculas de agua a la zona de la interfaz en la zona donde se encuentra la mutación, caso contrario a lo que sucede en la *LvTrx_{wr}*, donde el residuo Asp-60 bloquea el acceso a las moléculas de agua. Sin embargo, estas moléculas de agua (S-7, S-12, S-21 y S-37) generan una red de interacciones entre los residuos de Trp-31, Asp-58 y Asp-60 de cada monómero, haciendo aún más estable la interfaz dimérica (**Figura 32**).

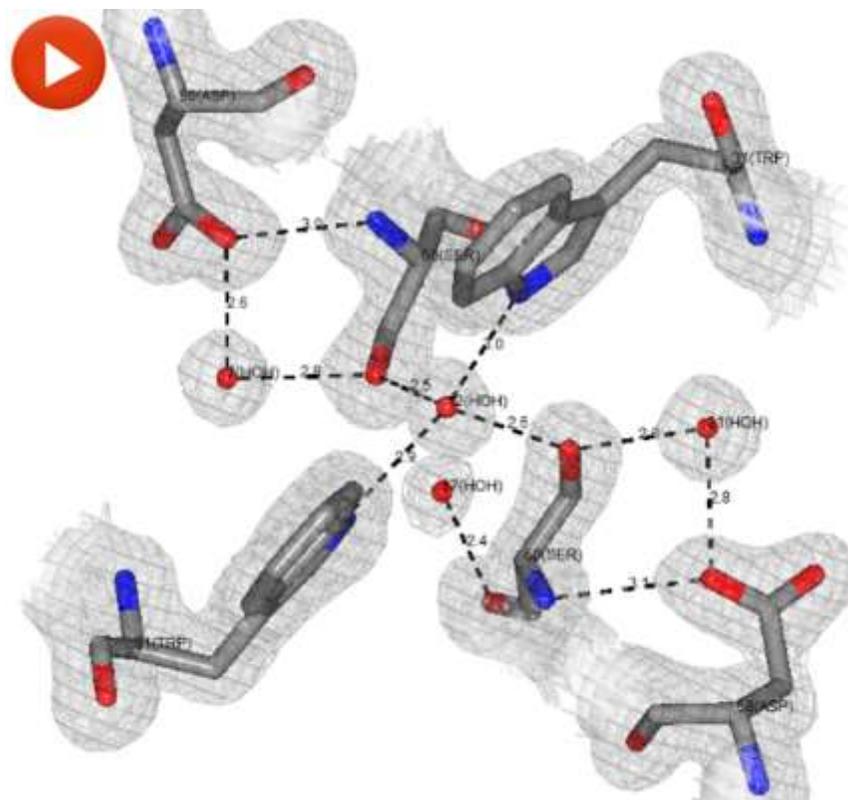


Figura 32. Zona de la interfaz de la mutante Asp-60-Ser. La sustitución del residuo aspártico por serina, provoca la entrada de moléculas de agua en la zona de la interfaz, representadas como esferas en color rojo.

En el experimento de SAXS para la mutante Asp-60-Ser se obtuvo un pico de elución, el cual mostró una población dimérica. Al obtener la estructura por SAXS, se comprobó que tanto el perfil de elución, como el arreglo que tiene esta mutante en el estado cristalino es igual al presente en solución. La estructura de SAXS de esta mutante presenta una distribución $P(r)$ bimodal con un D_{\max} de 66.68 Å y el valor experimental determinado de $R_g = 20 \pm 0.1$ Å, que coincide con el R_g calculado con la estructura cristalográfica de la $LvTrx_{wt}$. El ajuste entre el modelo obtenido por SAXS y el obtenido por cristalografía de rayos-X fue de χ^2 1.76 (**Figura 33**).

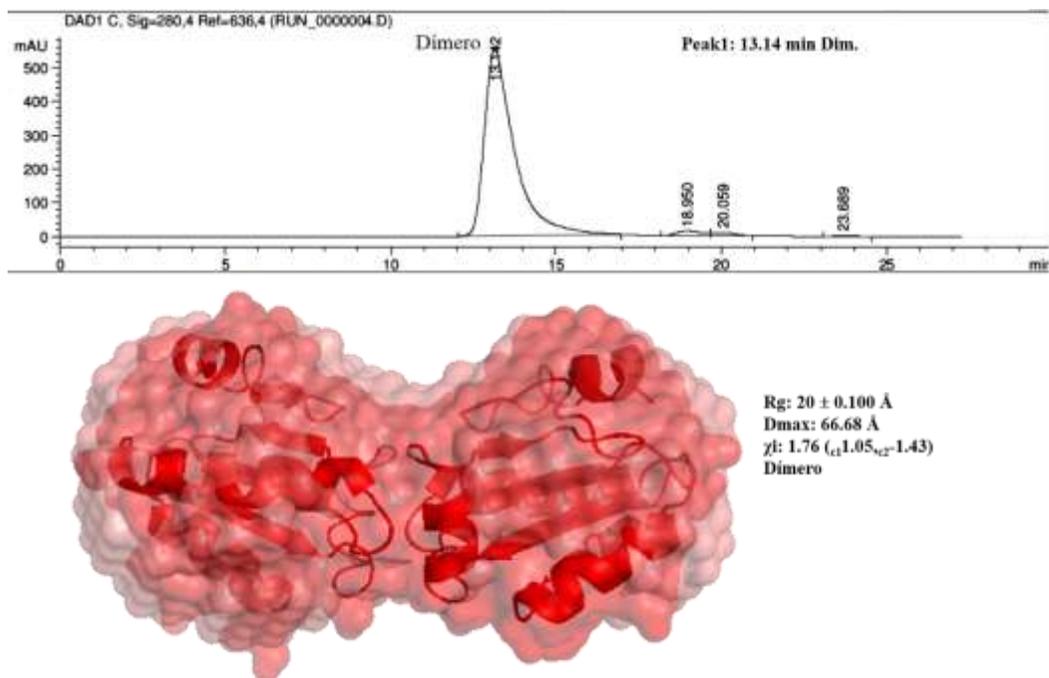


Figura 33. Perfil de elución de la mutante Asp-60-Ser acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra una población dimérica, así como su estructura a baja resolución.

La mutante Asp-60-Ser presenta una menor actividad en comparación con la *LvTrx_{WT}* y con la Trx de *E. coli*. La causa por la cual se ve afectada su actividad es debida al arreglo dimérico que presenta esta mutante sin importar el ambiente ya sea reductor u oxidante en el que se encuentre; sin embargo, la actividad que presenta la mutante Asp-60-Ser no se compromete tanto como lo observado para la mutante Trp-31-Ala (**Figura 34**).

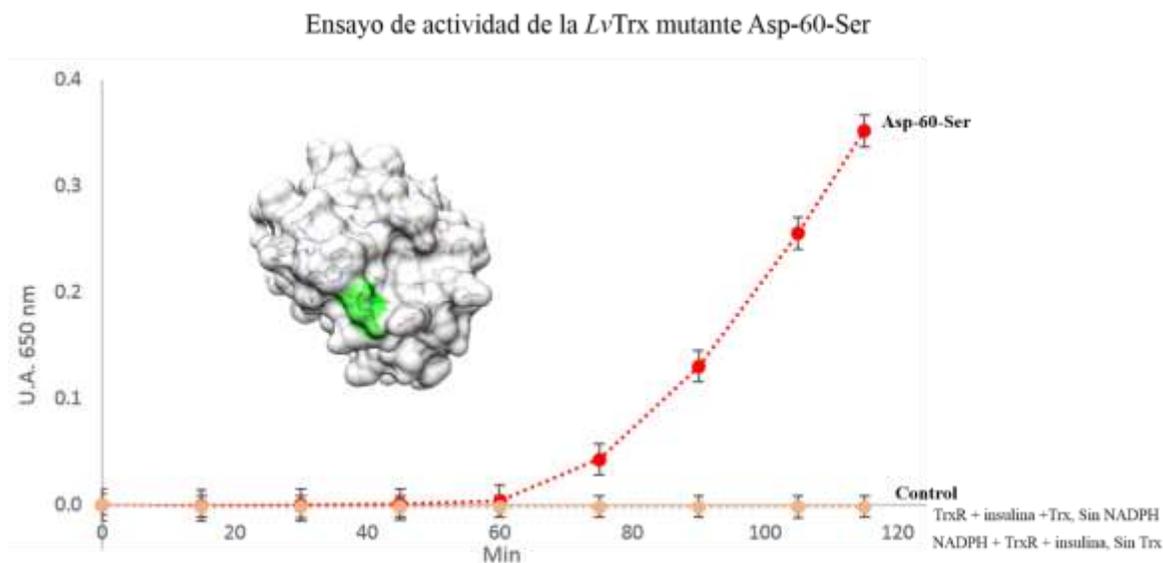


Figura 34. Ensayo de actividad de la mutante Asp-60-Ser utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. Esta mutante presenta actividad; observando una disminución en su capacidad reductora en comparación a la *LvTrx_{WT}*; sin embargo, su capacidad reductora no se ve comprometida como en la mutante Trp-31-Ala. Una posible explicación de su actividad puede ser atribuida al arreglo dimérico que presenta esta mutante sin importar el ambiente en el que se encuentre (reductor u oxidante).

4.4 Mutante Ala-66-Arg de la LvTrx

El residuo de Ala-66 está altamente conservado en las Trx's de diferentes especies (vertebrados, crustáceos y en *E. coli*). Este residuo forma parte de *patch* hidrofóbico en la zona de la interfaz, por lo tanto, este residuo está completamente embebido en el dímero cristalográfico de la LvTrx_{wt}. Para el caso de la mutante Ala-66-Arg no existe un cambio con respecto a los resultados mostrados para la LvTrx_{wt}: en el experimento de filtración en gel, la mutante Ala-66-Arg presentó una población mayoritariamente monomérica y una población dimérica en menor proporción bajo condiciones reductoras (**Figura 35**).

Ensayo de filtración en gel de la LvTrx mutante Ala-66-Arg

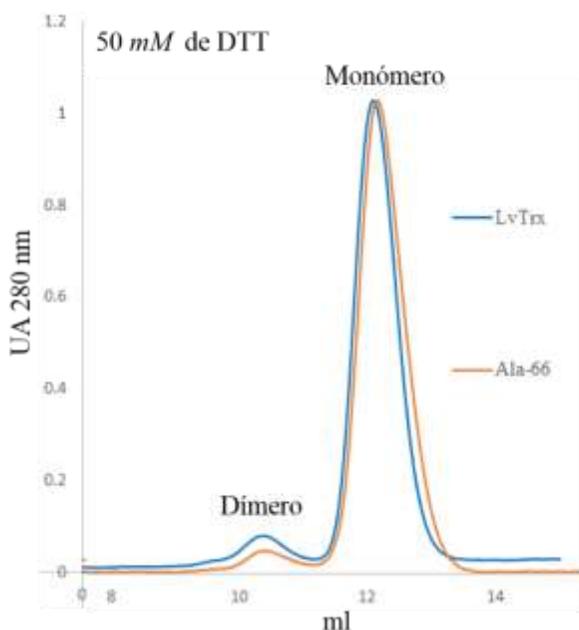


Figura 35. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Ala-66-Arg (color anaranjado), bajo condiciones reductoras a una concentración de 50 mM de DTT. Como control se muestra la LvTrx_{wt} (color azul). La mutante Ala-66-Arg muestra dos poblaciones (dímero-monómero), de la cual, la población monomérica es predominante bajo condiciones reductoras.

Posteriormente al realizar el experimento por DLS para la mutante Ala-66-Arg, la dispersión de esta muestra mostró un pico que corresponde a un radio hidrodinámico (R_H) de 1.55 nm; el cual corresponde a una proteína de peso aproximado de 12 kDa. En estos experimentos no se observó la presencia de ninguna población dimérica, como se presentó durante los experimentos de filtración gel en presencia de DTT. Por otro lado, al realizar el mismo experimento de DLS en ausencia de DTT es evidente la presencia de la población dimérica con un R_H de 2.4 nm, con ausencia de la población monomérica (**Figura 36**).

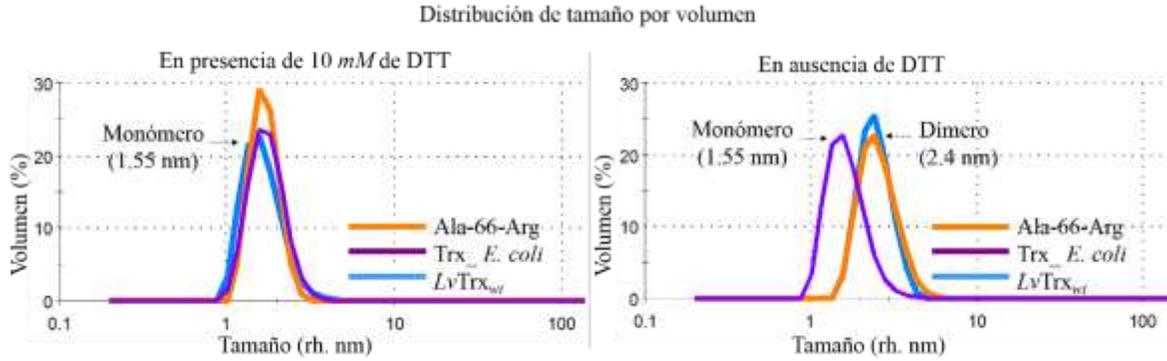


Figura 36. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Ala-66-Arg (mostrada en color anaranjado). También se muestra una comparación con los perfiles de la *LvTrx_{wt}* (en color azul) y de la Trx de *E. coli* (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Ala-66-Arg fue de 2.4 nm, que corresponde a una población dimerica. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la *LvTrx_{wt}* fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de *E. coli*, bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presentó en presencia de DTT.

Por lo tanto, a partir de estos resultados y comparándolos con los resultados obtenidos de la *LvTrx_{wt}*, la sustitución de la Ala-66 por un residuo de arginina, no fue suficiente para poder desestabilizar la formación dimerica. Para esta la mutante, se probaron distintas condiciones de cristalización; sin embargo, no se han encontrado condiciones óptimas para el crecimiento de cristales de esta proteína. Al no contar con la estructura cristalográfica se obtuvo la estructura a baja resolución por medio de SAXS; el perfil de elución utilizado para obtener la estructura en solución fue poco resolutivo (considerando que la muestra fue enviada de Cuernavaca a Francia en solución y manteniendo, en la medida de lo posible, la temperatura de la muestra a 4°C.), mostrando 4 picos de elución con baja resolución entre ellos (no fue posible separar los picos de manera independiente). Sin embargo, al tomar el pico de mayor absorbancia (pico 2), se logró obtener una estructura con un volumen similar al dimerico cristalográfico de la *LvTrx_{wt}*, con una distribución $P(r)$ bimodal no tan definida, un D_{max} 72.55 Å y un R_g de 20 ± 0.2 Å; mostrando a partir de estos parámetros un ajuste χ^2 de 3.56 con la estructura cristalográfica (**Figura 37**).

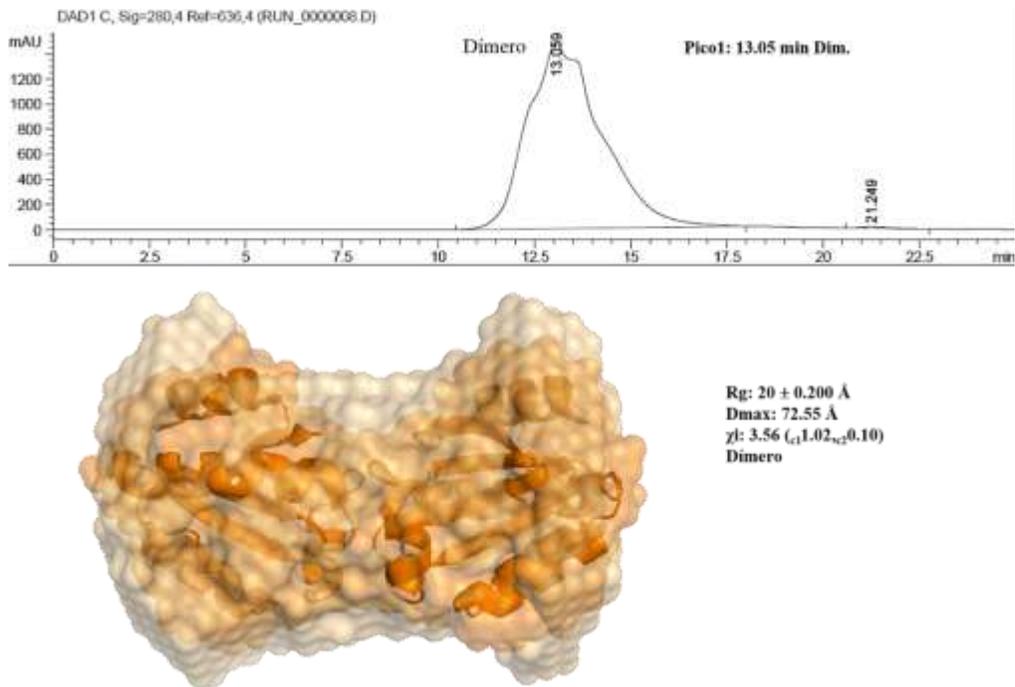


Figura 37. Perfil de elución de la mutante Ala-66-Arg acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución no muestra de forma clara una buena resolución de la muestra, sin embargo, al obtener la estructura del pico de mayor absorbancia (pico 2), se logró obtener una estructura a baja resolución, la cual presenta un volumen similar al dímero de la *LvTrx_{wt}*.

La actividad de la mutante Ala-66-Arg es la primera variante que tiene un comportamiento similar a la observada en la *LvTrx_{wt}* (**Figura 38**), teniendo relación con todos los resultados previamente descritos (filtración en gel, DLS, SAXS).

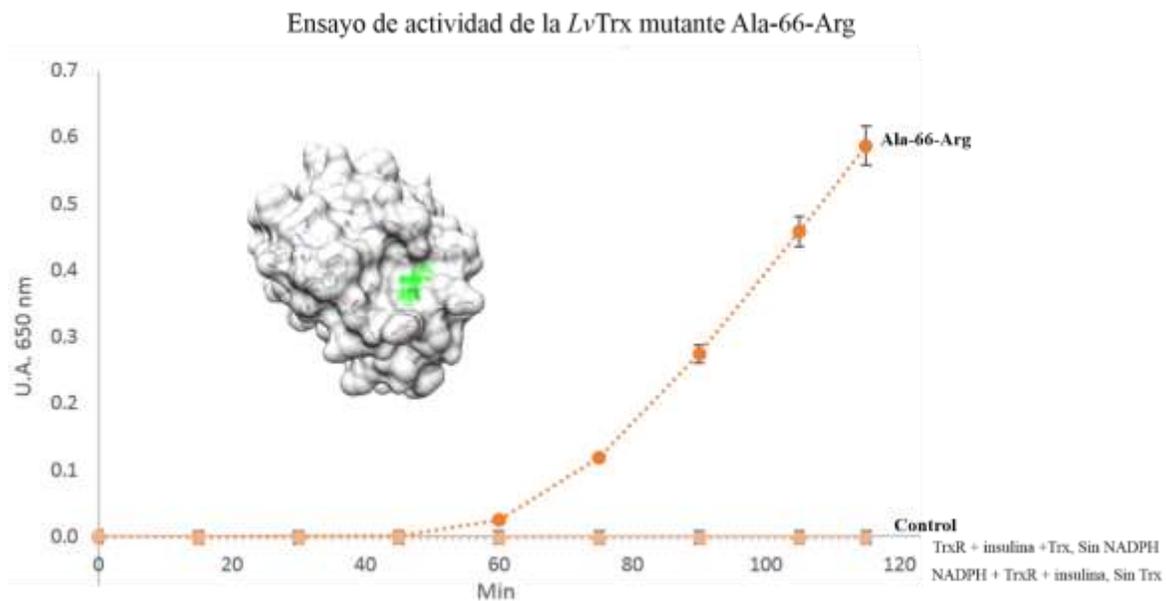


Figura 38. Ensayo de actividad de la mutante Ala-66-Arg utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. La actividad de esta mutante es similar a la observada en la *LvTrx_{wt}*.

4.5 Mutante Cys-73-Ser de la *LvTrx*

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por la *hTrx* se concluía que la mayor contribución de esta interacción provenía de las otras interacciones de la interfaz. Sin embargo, para la *LvTrx_{wt}* el puente disulfuro-intermolecular mediado por el residuo Cys-73 parece ser muy estable bajo condiciones reductoras. Por lo tanto, este residuo fue sustituido por el residuo serina con la intención de preservar un ambiente hidrofílico y definir el papel que tiene la Cys-73 en la formación del dímero. En el experimento de filtración en gel, la mutante Cys-73-Ser, presenta un comportamiento monomérico sin la existencia de alguna población dimérica minoritaria (**Figura 39**).

Ensayo de filtración en gel de la *LvTrx* mutante Cys-73-Ser

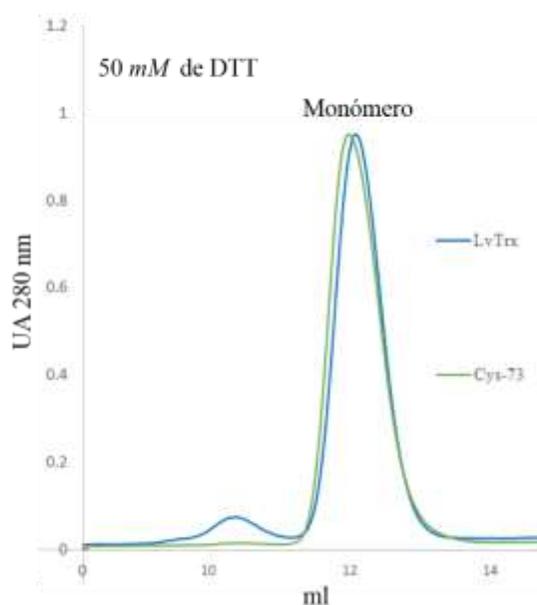


Figura 39. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Cys-73-Ser (color verde), bajo condiciones reductoras a una concentración de 50 mM de DTT. Como control se muestra la *LvTrx_{wt}* (color azul). La mutante Cys-73-Ser muestra una población correspondiente al monómero.

Al realizar el experimento por DLS para la mutante Cys-73-Ser, se observó un pico de dispersión con un R_H de 1.5 nm que correspondería a una proteína con un peso aproximado de 12 kDa. Este resultado fue sustentado por la dispersión que mostró la Trx de *E. coli* (Trx monomérica), con un radio hidrodinámico similar al de la mutante Cys-73-Ser. Ambos experimentos apuntan a que el residuo Cys-73 es responsable de la dimerización de la *LvTrx_{wt}*. (**Figura 40**).

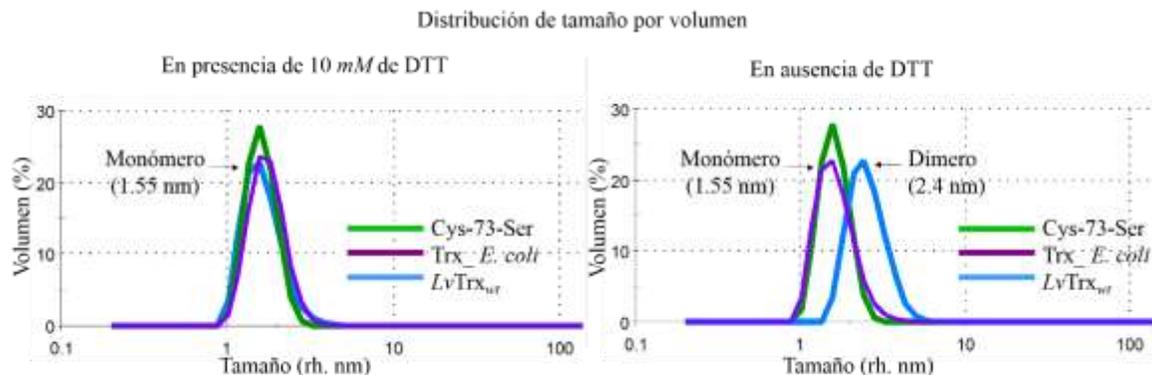


Figura 40. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Cys-73-Ser (mostrada en color verde). También se muestra una comparación con los perfiles de la *LvTrx_{wt}* (en color azul) y de la Trx de *E. coli* (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_{H}), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Cys-73-Ser fue de 1.6 nm, que corresponde a una población monomérica, comprobado por el perfil de dispersión de la Trx de *E. coli*, en la cual se mantuvo el mismo radio hidrodinámico en ausencia y en presencia de DTT.

La estructura cristalográfica de la mutante Cys-73-Ser; presenta un grupo espacial $P 4_2 2_1 2$ con parámetros de celda unidad de $a = 63.17$, $b = 63.17$, $c = 56.03$; $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$. El coeficiente de Matthews sugiere la presencia de una copia en la unidad asimétrica, a una resolución de 2.0 Å. Este cristal fue difractado en la línea 19ID, del sincrotrón de Chicago (APS).

Al analizar la estructura cristalográfica de esta mutante, por primera vez en todas las estructuras cristalográficas descritas en esta tesis, se muestra que la unidad asimétrica está constituida por una sola copia y no hay alguna posible interacción entre sus vecinos cristalográficos para dar lugar a la formación del dímero. Este monómero mantiene interacciones entre sus propios residuos y no con otro monómero vecino: Met-74 (N) y Ala-72 (O) a 2.6 Å y finalmente Ala-72 (O) y Met-74 (N) a 2.6 Å. La energía de solvatación para la interfaz de esta mutante es de -6.6 kcal/mol, con un valor PV de 0.30. Sin embargo, al analizar la interfaz que se forma con el vecino cristalográfico, el servidor PISA arroja un valor CSS de 0.10, validando la nula posibilidad de una posible interacción dimérica en solución. Por lo tanto, el cambio Cys-73-Ser, resulta ser clave para establecer una conformación monomérica, sin comprometer su actividad como Trx, lo anterior comprobado por ensayos de actividad, ensayos de filtración en gel, DLS y por estudios cristalográficos. Si bien, es importante mencionar que las estructuras cristalográficas de la *LvTrx_{wt}* y de la mutante Cys-73-Ser, muestran un arreglo cristalino casi idéntico, en el cual la distancia en la zona de la interfaz en la mutante Cys-73-Ser aumentó con respecto a la *LvTrx_{wt}* como se observa en la **Figura 41**. Por lo anterior, un estudio de SAXS es fundamental para confirmar el comportamiento monomérica o dimérico de esta mutante.

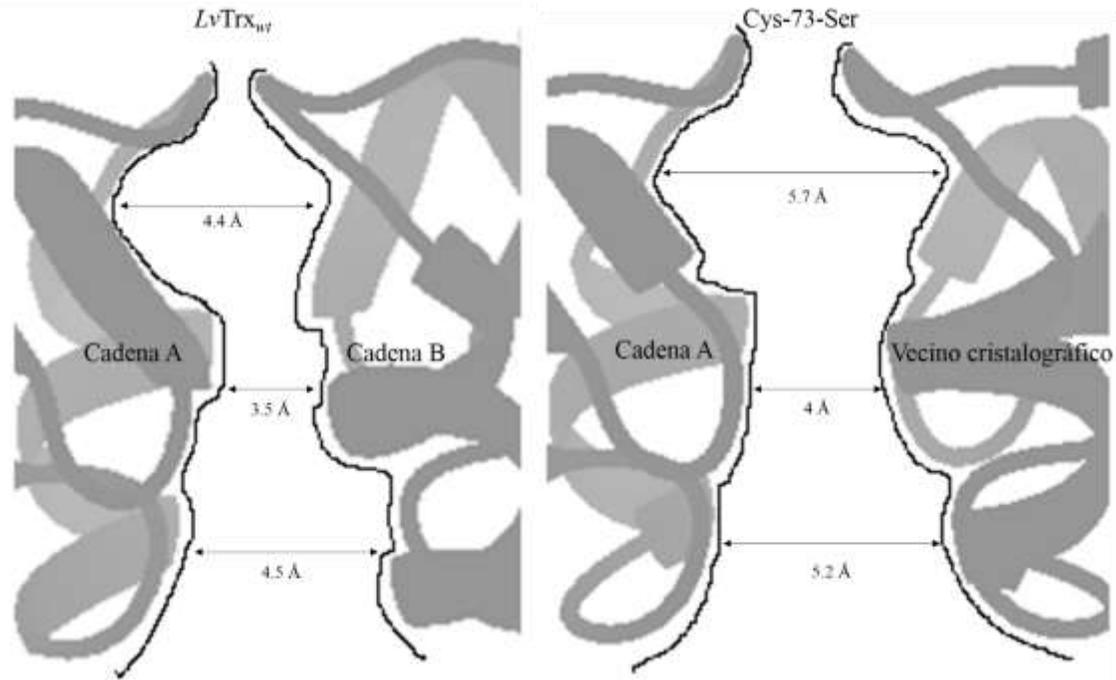


Figura 41. Diferencia en distancia entra la interfaz de la *LvTrx_{wt}* y la interfaz de la mutante Cys-73-Ser de la mutante, mostrando tener esta última interfaz mayor distancia con su vecino cristalográfico (una distancia mayor a 4 Å).

También se observó que los vecinos cristalográficos del monómero de la mutante Cys-73-Ser, se encuentran arreglados de tal manera que pueden generar un dímero parecido a la *LvTrx_{wt}*; sin embargo, la distancia entre el vecino cristalográfico y el monómero de la mutante Cys-73-Ser es mayor y el residuo Ser-73 no tiene ningún contacto con su contraparte monomérica.

Con el fin de determinar el modelo *ab-initio* de la mutante Cys-73-Ser, se obtuvo su curva experimental mediante SAXS. El perfil de elución observado mostró un pico de elución, el cual corresponde a la población monomérica, caso contrario a lo ocurrido con la mutante Asp-60-Ser. La distribución $P(r)$ es esférica con un D_{\max} of 43.86 Å y un $R_g = 14 \pm 1.4$ Å. Al sobreponer el monómero de la estructura cristalográfica de la mutante Cys-73-Ser con la estructura obtenida a partir del perfil de dispersión de SAXS, se observa el mismo volumen obteniendo un ajuste entre los dos modelos de χ^2 de 1.0 (**Figura 42**). De hecho, si se compara el ajuste obtenido entre los modelos por SAXS y las estructuras cristalográficas correspondientes a las mutantes Trp-31-Ala, Asp-60-Ser y la *LvTrx_{wt}*, la mutante Cys-73-Ser tiene el mejor ajuste entre los modelos de SAXS y el modelo cristalográfico.

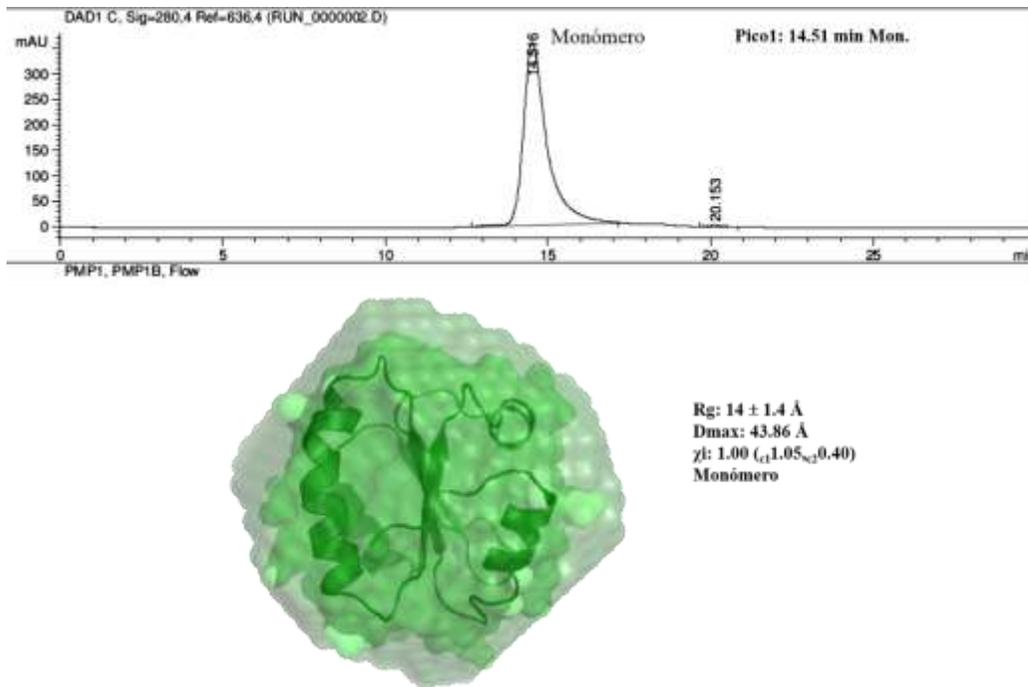


Figura 42. Perfil de elución de la mutante Cys-73-Ser acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra una población monomérica, así como su estructura a baja resolución.

La actividad que presenta la mutante Cys-73-Ser es similar a la *LvTrx_{WT}* y a la mutante Ala-66-Arg (**Figura 43**); de hecho, al ser la única mutante que presenta solo la conformación monomérica, la reducción de las cadenas de la insulina ocurre en un periodo de tiempo ligeramente más rápido que la mutante Ala-66-Arg.

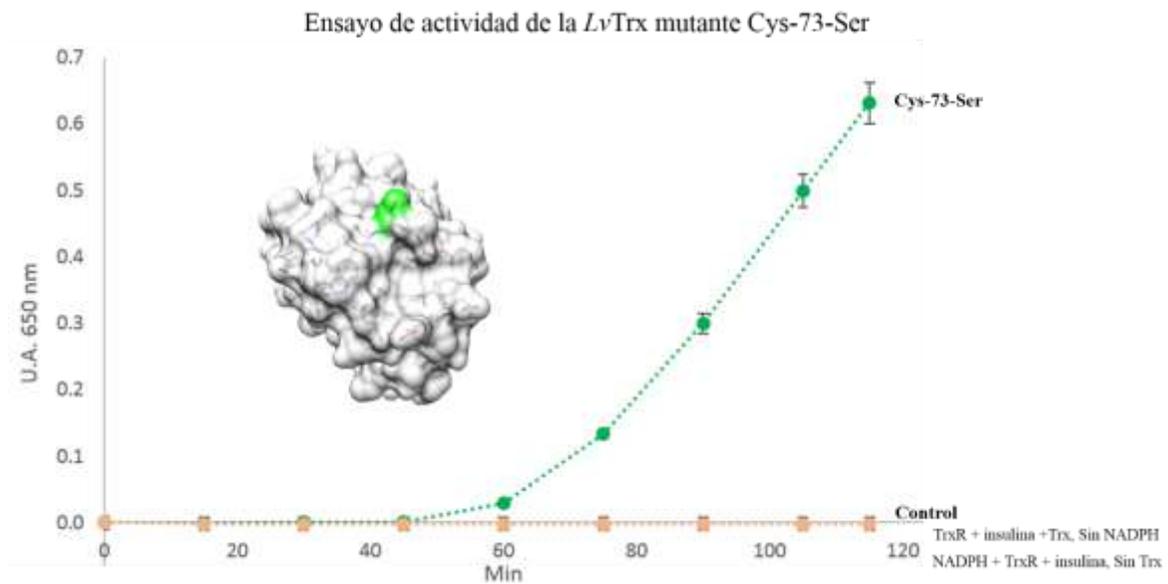


Figura 43. Ensayo de actividad de la mutante Cys-73-Ser utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. La actividad de esta mutante es similar a la observada en la *LvTrx_{WT}* y a la mutante Ala-66-Arg.

4.6 Mutante Met-74-Glu de la *LvTrx*

Otro de los residuos potenciales para desestabilizar la interfaz en la *LvTrx_{wr}* es el residuo de Met-74, ya que al igual que el residuo de Ala-66, la Met-74 se encuentra embebida en la zona de la interfaz en la parte del *Core* y que además interacciona con el residuo Ala-72 para dar lugar a la formación de dos puentes de hidrógeno en esta zona. Posterior a su expresión y purificación, se realizó el ensayo de filtración en gel para la mutante Met-74-Glu, en el cual se observaron dos poblaciones (dímero-monómero), comportamiento similar a la *LvTrx_{wr}*, a la mutante Ala-66-Arg y a la mutante Trp-31-Ala (**Figura 44**).

Ensayo de filtración en gel de la *LvTrx* mutante Met-74-Glu

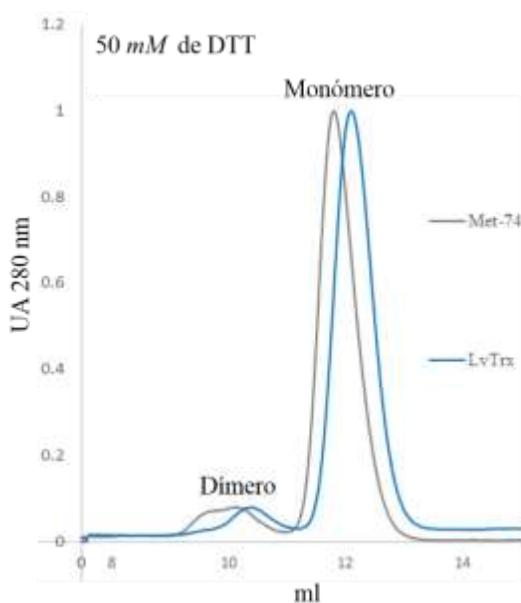


Figura 44. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Met-74-Glu (color gris), bajo condiciones reductoras a una concentración de 50 mM de DTT. Como control se muestra la *LvTrx_{wr}* (color azul). La mutante Met-74-Glu muestra al menos dos poblaciones, de las cuales, la población monomérica es predominante bajo condiciones reductoras.

En el ensayo de DLS para la mutante Met-74-Ser, se observa una dispersión correspondiente a un pico de radio hidrodinámico (R_H) de 1.55 nm que correspondería a una proteína de peso aproximado de 12 kDa. En estas muestras no se observó la presencia de alguna población dimérica, como se presentó durante los experimentos de filtración gel. En ausencia de DTT, el pico de dispersión correspondía a una población dimérica similar a lo observado en la *LvTrx_{wr}* y en las mutantes, Ala-66-Arg y Trp-31-Ala (**Figura 45**).

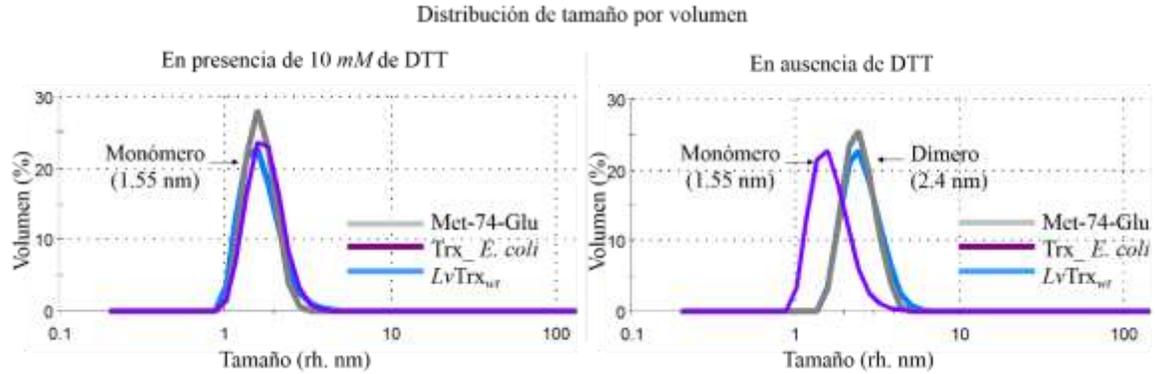


Figura 45. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Met-74-Glu (mostrada en color gris). También se muestra una comparación con los perfiles de la LvTrx_{wt} (en color azul) y de la Trx de *E. coli* (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Met-74-Glu fue de 1.55 nm y 2.4 nm, respectivamente. El comportamiento mostrado por la mutante Met-74-Glu en ausencia de DTT presenta un dímero y en presencia de DTT presenta un monómero. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la LvTrx_{wt} fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de *E. coli*, bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presentó en presencia de DTT.

Al igual que la mutante Ala-66-Arg, no se ha podido obtener una condición de cristalización para la mutante Met-74-Glu. Sin embargo, se obtuvieron las estructuras por SAXS para dos poblaciones de la mutante Met-74-Glu (dimérica y monomérica). Para la población dimérica (primer pico), que representa el 10% del total de la muestra y un 90% el otro pico de elución (monómero). El $P(r)$ que presentó el dímero fue una distribución bimodal y para el monómero fue una distribución esférica; el D_{max} fue de 75.46 Å, 47.9 Å y el $R_g = 20 \pm 0.1$ Å y 15 ± 1.6 Å, respectivamente. Llama la atención el hecho de que las proporciones en la fracción monomérica se ve mayormente favorecida que la dimérica, caso contrario a lo sucedido con la LvTrx_{wt} (**Figura 46**).

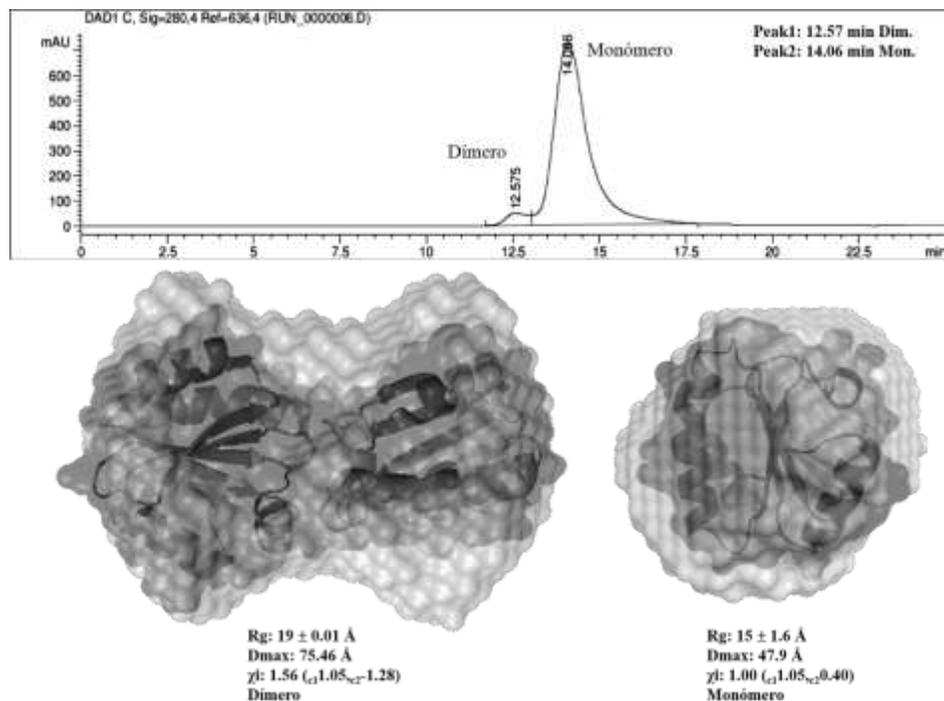


Figura 46. Perfil de elución de la mutante Met-74-Glu acoplada a una línea de SAXS-COACH. El perfil de elución muestra a la población dimerica y monomérica, así como sus estructuras a baja resolución.

La actividad que presenta la mutante Met-74-Glu es muy similar a la observada para la mutante Trp-31-Ala (**Figura 47**), lo cual parece indicar que al adicionar una carga negativa en la zona del *Core* en la zona de la interfaz hace que la interacción con la TrxR no sea tan directa provocando una disminución o un retardo al reducir los puentes disulfuro de la insulina.

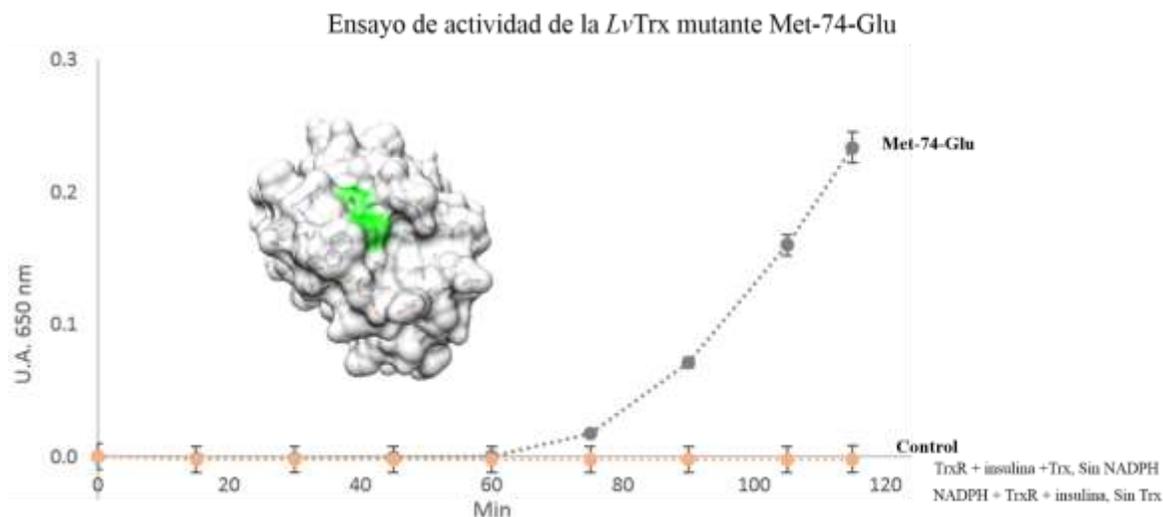


Figura 47. Ensayo de actividad de la mutante Met-74-Glu utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. La actividad de esta mutante se ve comprometida de manera similar a la observada en la mutante Trp-31-Ala.

Los datos estadísticos de la integración y afinamiento de las estructuras cristalográficas de las mutantes trp-31-Ala, Asp-60-Ser y Cys-73-Ser, se encuentran en la **Tabla 2**.

Finalmente, en el anexo III, se muestra la función de correlación de todas las mutantes, así como de la *LvTrx* silvestre obtenidos por la técnica de DLS y SAXS.

Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos-X de las mutantes Trp-31-Ala, Cys-73-Ser y Asp-60-Ser.

Parámetros	Trp-31-Ala	Cys-73-Ser	Asp-60-Ser
Código PDB	5g2z	5g31	5g30
Estadística (colecta de datos)			
Fuente de rayos-X	Ánodo rotatorio RAXIS-IV++ image plate	APS <i>beamline</i> 19ID	APS <i>beamline</i> 19ID
Longitud de onda (Å)	1.5418	0.9791	0.9791
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 4 ₂ 2 ₁ 2	C 1 2 1
Dimensiones (celda unitaria)	33.15, 62.67, 99.33	63.17, 63.17, 56.03	58.40, 82.70, 82.20
a, b, c (Å)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 102.5, 90.0
α , β , γ ángulos (°)			
Rango de resolución (Å)	23.43–1.88	44.86–2.0	19.46–1.65
No. De reflexiones	69277	95631	119281
No. De reflexiones únicas	17415	8227	45126
Integridad (%)	99.4 (100)	100 (100)	98.4 (97.2)
R _{merge} (%)	3.9 (20.6)	4.6 (33.6)	4.0 (25.4)
CC (1/2)	0.999 (0.954)	0.994 (0.983)	0.996 (0.891)
I/ σ (I)	17.6 (4.6)	31.7 (7.6)	15 (3.3)
Redundancia	4.0 (3.9)	11.6 (11.9)	2.6 (2.7)
Unidad asimétrica	Dímero	Monómero	2 Dímeros
Coefficiente de Matthews	2.15 (42.78)	2.33 (47.19)	2.02 (39.07)
Å ³ /Da (Vs % solvente)			
Estadística (afinamiento)			
R _{work} /R _{free} (%)	18.95/23.64	20.81/23.93	16.53/20.08
No. de átomos			
Proteína	1668	866	3456
Ion/ligando	0	1	26
Agua	140	54	391
Valor-B (Å ²)			
Proteína	28.26	35.66	19.79
Ion/ligando	0	60.29	36.39
Agua	35.02	40.67	32.60
Wilson plot (Å ²)	23.21	25.8	13.27
Rmsd estereoquímica ideal			
Longitud de uniones (Å)	0.007	0.008	0.006
Longitud de ángulos (°)	0.838	0.908	0.855
Error de coordinación (<i>maximum-likelihood base</i>)	0.20	0.18	0.18
<i>Ramachandran plot</i> (%)			
Regiones más favorecidas	96.65	97.22	97.21
Regiones adicionales permitidas	3.35	2.78	2.79
Regiones no permitidas	0	0	0

4.7 Análisis cristalográfico del puente disulfuro-intermolecular a distintas dosis de energía

Con el fin de analizar la tolerancia del puente disulfuro Cys-73—Cys-73', frente a la reducción química causada por la dosis depositada en experimentos de cristalografía, dos cristales de $LvTrx_{wt}$ fueron difractados bajo diferentes flujos de rayos-X (cambios en transmisión). Como se describió en la metodología, los cristales fueron nombrados como $LvTrx_{wt}$ -1x (8% de transmisión, flujo de $1.33 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$) y $LvTrx_{wt}$ -3x (27% de la transmisión, flujo de $4.14 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$). Diez *datasets* fueron colectados para cada cristal, con el propósito de analizar el aumento secuencial de la dosis depositada por el cristal. Específicamente, se observaron cambios en la densidad electrónica correspondiente a la región de puente disulfuro-intermolecular (Cys73-Cys73') y entre el puente disulfuro del sitio catalítico (Cys-32-Cys-35) de cada monómero. El deterioro de la densidad electrónica es dependiente del incremento de la dosis depositada. El cálculo de la dosis depositada se realizó con el programa, RADDOSE (Murray et al., 2004; Paithankar et al., 2009; Paithankar & Garman, 2010).

Para el caso del cristal $LvTrx_{wt}$ -1x, el puente disulfuro-intermolecular (Cys-73--Cys-73') se mantuvo estable, incluso alcanzando una dosis depositada de 34 MGy². Sin embargo, a una dosis de 3.4 MGy, este puente disulfuro muestra la aparición de dobles conformaciones en los átomos S γ de los residuos Cys-73--Cys-73', pero no se compromete del todo la formación del puente disulfuro-intermolecular el cual mantiene al menos una ocupación del 60%. En el caso del puente disulfuro del sitio catalítico (Cys-32--Cys-35) de cada monómero, la dosis a la que este enlace fue totalmente reducido fue de aproximadamente 34 MGy (**Figura 48a-h**). Al comparar la dosis depositada necesaria para reducir puentes disulfuro de otras proteínas (anexo III) hace evidente la gran tolerancia que tienen los puentes disulfuro de la $LvTrx_{wt}$ frente a los daños por radiación.

En la literatura, se ha publicado que la mayoría que los puentes disulfuro son completamente reducidos a una dosis absorbida de ~ 13 MGy o menos. En cristales de lisozima de clara de huevo (CEWL, por sus siglas en inglés), todos los puentes disulfuro fueron totalmente reducidos a ~ 1 MGy (Cys-6--Cys-127; Cys-30--Cys-115; Cys-64--Cys-80; Cys-76--Cys-94) (Sutton et al., 2013); en cristales de proteína de la TcAChE (*Torpedo californica*, acetilcolinesterasa), sólo uno de los tres puentes disulfuro fue totalmente reducido a una dosis absorbida de ~ 6 MGy (Cys-265--Cys-254) (Weik et al., 2000); en cristales de proteínas de tripsina, sólo uno de seis puentes disulfuro fue reducido a ~ 7 MGy (Cys-191--Cys-220) (Leiros et al., 2001). Por último, en cristales de elastasa, todos los puentes disulfuro fueron totalmente reducidos a ~ 13 MGy (Cys-58--Cys-42; Cys-182--Cys-168; Cys-220--Cys-191; Cys-136--Cys-201) (Petrova et al., 2010). No se reportó hasta que dosis depositada fueron rotos los puentes disulfuro restantes de cada una de las proteínas; sin embargo, mencionan la

² MGy: Los Grays son las unidades del Sistema internacional que cuantifican la dosis absorbida y se definen como 1 joule de energía por cada kilogramo de material.

aparición de conformaciones alternativas conforme aumenta la dosis depositada en el cristal, provocando una disminución en la ocupación para la formación del puente disulfuro.

Por lo tanto, la dosis absorbida determinada necesaria para provocar la disrupción del puente disulfuro del sitio catalítico en la $LvTrx_{wt}$, 34 MGy parece alto, sobre todo considerando que el sitio catalítico de todas las Trx's es muy reactivo y dinámico (Holmgren, 1981), y más aun considerando que el pH de la condición de cristalización de la $LvTrx_{wt}$, fue de 4.6, lo que debería favorecer más su reducción. Para el cristal $LvTrx_{wt}-1x$, la dosis absorbida calculada, se encuentra en el límite de dosis estimado para comprometer la información biológica en cristales de proteína de 30 MGy (límite de Garman; Owen et al., 2006). Por lo tanto, una posible explicación de la tolerancia del puente disulfuro del sitio catalítico a una alta dosis depositada, sea debido al arreglo y localización del sitio catalítico de cada monómero de la $LvTrx_{wt}$ en la red cristalina. Es decir, el puente disulfuro del sitio catalítico de cada monómero se encuentra embebido en el área de interfaz dimérica, lo que provoca una tolerancia al daño por radiación. Este argumento se basa en que el área de superficie accesible al solvente (ASA) de las cisteínas catalíticas que es de ACys-32: 0 \AA^2 , ACys-35: 0.2 \AA^2 y BCys-32: 0 \AA^2 , BCys-35: 4.2 \AA^2 , datos calculados por el programa AREAIMOL (Lee & Richards, 1971; Winn et al., 2011), que demuestra que estas cisteínas no están tan expuestas al solvente. Al analizar los puentes disulfuro más afectados por la dosis de radiación depositada (ver anexo III), de manera general los más expuestos al solvente son los más susceptibles a la radiación. En el caso del cristal $LvTrx_{wt}-3x$, el análisis de las estructuras cristalográficas mostró que el puente disulfuro del sitio catalítico de cada monómero, fue reducido a una dosis de 32 MGy. Estos datos son similares a los reportados para el cristal $LvTrx_{wt}-1x$, en donde el puente disulfuro del sitio catalítico es reducido a 34 MGy. A pesar del hecho de que el puente disulfuro-intermolecular exhibe una doble conformación en los primeros siete *datasets*, este puente disulfuro se mantuvo estable en el estado oxidado con una ocupación de al menos 40% hasta una dosis de 85 MGy, en el que la reducción de este enlace fue completa (**Figura 49a-h**).

La tolerancia que presenta el puente disulfuro-intermolecular al daño por radiación es inusual, porque este puente disulfuro es el que se encuentra más expuesto al solvente con un ASA de $\sim 50 \text{ \AA}^2$. Este resultado sugiere que el mantenimiento de esta interacción covalente podría depender de los residuos que participan en la interfaz del dímero de la $LvTrx_{wt}$, u otros residuos contiguos que modifiquen el microambiente de las cisteínas involucradas, sin embargo, la exposición al solvente parece no ser un factor que comprometa la estabilidad del puente disulfuro-intermolecular. El resumen del deterioro secuencial de los puentes disulfuro del sitio catalítico y del puente disulfuro-intermolecular puede ser visto en un vídeo en los materiales suplementarios. Los datos estadísticos de estas estructuras cristalográficas se encuentran resumidas en la **Tabla 3 y 4**.

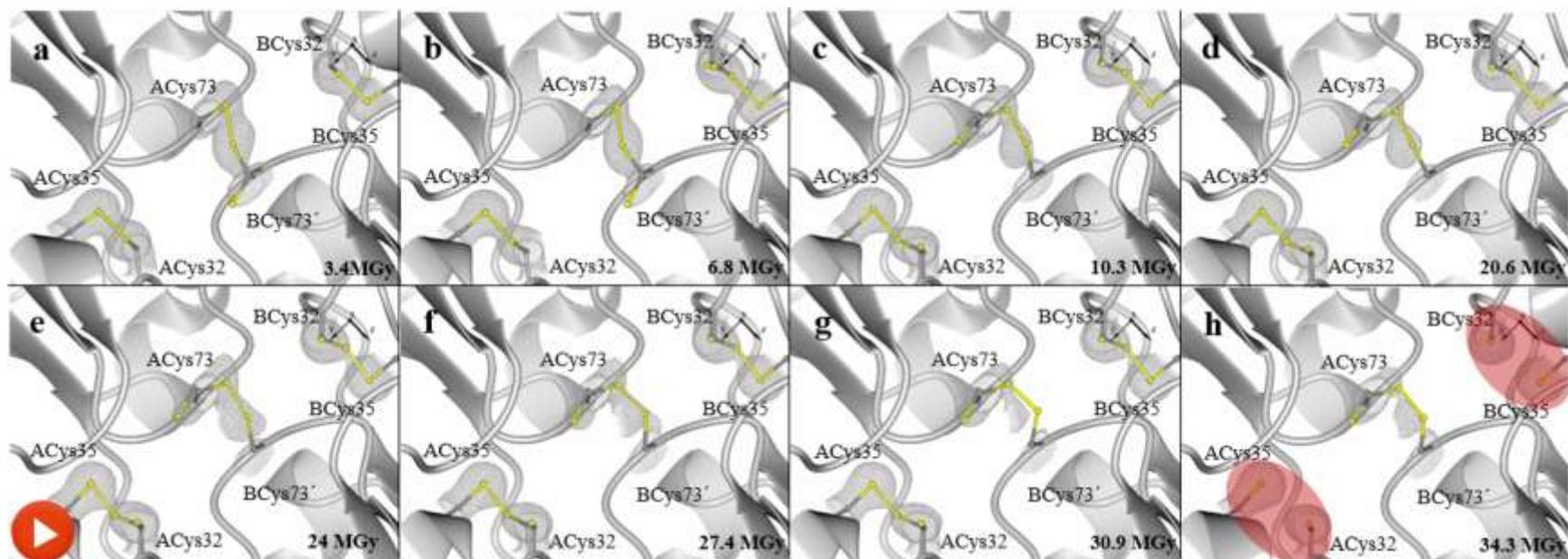


Figura 48. Estructuras cristalográficas de *LvTrx_v-1x* que muestran el deterioro de los puentes disulfuro (ACys-32--ACys-35, ACys-73--BCys-73' y BCys-32--BCys-35) causado por el daño por radiación en una colección de datos secuencial de 10 *datasets* con el 8% de transmisión, $1.33 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$. Densidad electrónica del mapa 2Fo-Fc mostrado en color gris a 1.0σ . (a) Primer estructura colectada a 3.4 MGy; (b) Segunda estructura colectada a 6,8 MGy; (c) tercera estructura colectada a 10.3 MGy; (d) Sexta estructura colectada a 20.6 MGy; (e) Septima estructura colectada a 24 MGy; (f) Octava estructura colectada a 27.4 MGy; (g) Novena estructura colectada a 30.9 MGy; (h) Decima estructura colectada a 34.3 MGy, demostrando que hasta esta dosis, el puente disulfuro del sitio catalítico de las cadenas A y B se reduce completamente (resaltado en óvalos rojos), mientras que el puente disulfuro-intermolecular se mantiene estable con una ocupación del 60% formando el puente disulfuro y con una ocupación del 40% como cisteínas libres. Para fines prácticos, la cuarta y quinta estructura no se mostraron, ya que estos datos no proporcionaron más información. La dosis calculada para estas estructuras fue de 13.7 MGy y 17.1 MGy, respectivamente.

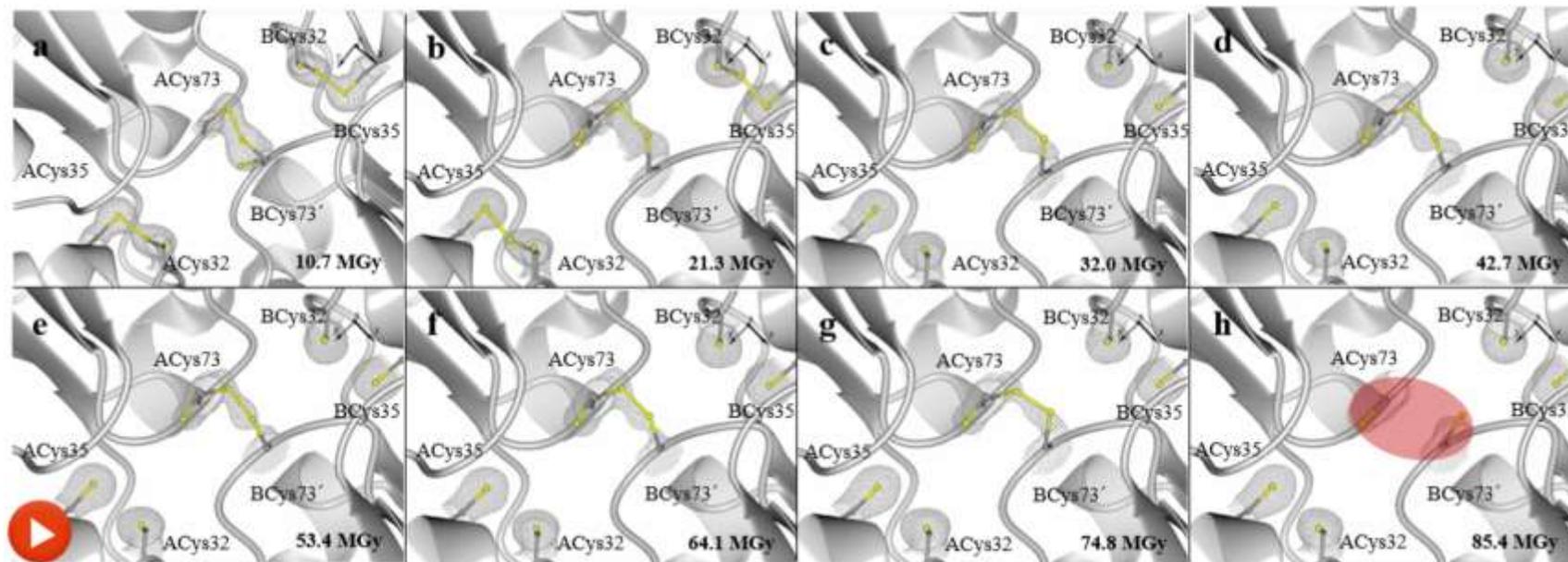


Figura 49. Estructuras cristalográficas de *LvTrx_{wt}-3x* que muestran el deterioro del puente disulfuro de cada sitio catalítico (ACys-32--ACys-35 and BCys-32--BCys-35) y del puente disulfuro-intermolecular (Cys-73--Cys-73') causada por daño por radiación. El flujo con el que se difractó el cristal *LvTrx_{wt}-3x* fue de tres veces más alto que en el cristal de la *LvTrx_{wt}-1x*, esto es 27% de transmisión, 4.14×10^{11} *ph s⁻¹*. (A) Primera estructura colectada a 10.7 MGy; (B) Segunda estructura colectada a 21.3 MGy; (C) Tercera estructura colectada a 32 MGy, una dosis a la que el puente disulfuro del sitio catalítico fue completamente reducido, similar a lo que se obtuvo en el cristal de la *LvTrx_{wt}-1x*; (D) Cuarta estructura colectada a 42.7 MGy; (E) Quinta estructura colectada a 53,4 MGy; (F) Sexta estructura colectada a 64.1 MGy; (G) Séptima estructura colectada a 74.8 MGy; (H) Octava estructura colectada a 85.4 MGy, demostrando que a esta dosis, el puente disulfuro de la interfaz está completamente reducido (Resaltado con un óvalo rojo). La novena y décima estructura no se muestran, debido no mostraron diferencia con relación al dataset 8. Densidad electrónica del mapa 2Fo-Fc mostrado en color gris a 1.0 σ .

Tabla 3. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos-X del cristal $LvTrx_{10}-1x$

Parámetros	$LvTrx-1x$ (1)	$LvTrx-1x$ (2)	$LvTrx-1x$ (3)	$LvTrx-1x$ (6)	$LvTrx-1x$ (7)	$LvTrx-1x$ (8)	$LvTrx-1x$ (9)	$LvTrx-1x$ (10)
Estadística								
Fuente de rayos-X	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24
Longitud de onda (Å)	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686
Grupo espacial	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$
Dosis absorbida (MGy)	3.4	6.8	10.3	20.6	24.0	27.4	30.9	34.3
Dimensiones de la celda unitaria a, b, c (Å) α, β, γ ángulos (°)	57.18, 57.18, 117.62	57.21, 57.21, 117.75,	57.24, 57.24, 117.85	57.44, 57.44, 117.90,	57.41, 57.41, 117.85	57.36, 57.36, 117.85,	57.46, 57.46, 117.90,	57.21, 57.21, 117.95
	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Rango de resolución (Å)	28.59–1.65	28.60-1.71	28.61-1.65	45.83-1.72	45.80-1.74	45.75-1.76	45.85-1.80	27.80-1.84
No. de reflexiones	86984	76685	84052	63098	61524	61048	61404	61761
No. of reflexiones únicas	26586	23647	25952	23101	22342	21661	20239	18958
Integridad (%)	99.9 (99.8)	98.0 (91.6)	98.2 (92.8)	96.7 (95.5)	97.0 (96.1)	97.3 (95.7)	96.6 (96.4)	97.3 (90.7)
R_{sym} (%)	3.8 (43.9)	3.4 (34.3)	3.7 (50.5)	6.9 (39.1)	6.9 (39.6)	7.6 (40)	5.2 (40.4)	4.8 (42.4)

$I/\sigma(I)$	15.9 (2.4)	18.0 (2.9)	15.0 (2.0)	7.5 (2.0)	7.7 (2.0)	7.3 (2.0)	7.2 (1.36)	13.0 (2.8)
Multiplicidad	3.3 (3.3)	3.2 (3.0)	3.2 (3.0)	2.7 (2.5)	2.8 (2.6)	2.8 (2.6)	2.5 (2.2)	3.3 (3.2)
Unidad Asimétrica	Dímero							
Afinamiento								
R_{work}/R_{free} (%)	18.87/22.33	18.39/23.41	19.22/23.15	18.77/22.98	18.76/23.72	18.66/23.93	18.66/23.37	18.45/21.72
B-value (Å^2)								
Proteína	25.2	26.8	30.4	25.53	26.31	25.05	25.64	28.52
Ion/Ligando	32.21	35.63	38.31	32.69	34.35	35.97	35.47	51.61
Agua	37.69	38.98	41.64	37.68	37.46	36.74	36.75	39.21
Global (Átomos)	31.63	33.80	36.78	31.96	32.70	32.58	32.62	39.78
Wilson plot B-value (Å^2)	24.97	25.8	26.46	25.93	26.67	27.21	27.90	30.01
RMSD								
Longitud de enlaces (Å)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.005
Longitud de ángulos ($^\circ$)	0.924	0.899	0.921	0.940	0.932	0.816	0.867	0.885
Coordinate error (Maximum-Likelihood Base) (Å)	0.19	0.23	0.20	0.26	0.25	0.26	0.24	0.21
Ramachandran plot (%)								
Regiones más favorecidas	97.75	97.78	97.32	97.32	97.77	97.32	97.31	97.75
Regiones permitidas	2.25	2.22	2.68	2.68	2.23	2.68	2.69	2.25

Regiones no permitidas	0	0	0	0	0	0	0	0
------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 4. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos-X del cristal $LvTrx_{nr-3x}$

Parámetros	$LvTrx-3x$ (1)	$LvTrx-3x$ (2)	$LvTrx-3x$ (3)	$LvTrx-3x$ (4)	$LvTrx-3x$ (5)	$LvTrx-3x$ (6)	$LvTrx-3x$ (7)	$LvTrx-3x$ (8)
Estadística								
Fuente de rayos-X	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24	DLS Beamline I24
Longitud de onda (Å)	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686	0.9686
Grupo espacial	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$	$P3_212$
Dosis absorbida (MGy)	10.7	21.3	32.0	42.7	53.4	64.1	74.8	85.4
Dimensiones de la celda unitaria a, b, c (Å) α, β, γ ángulos (°)	57.49, 57.49, 117.92	57.55, 57.55, 118.02,	57.61, 57.61, 118.05	57.65, 57.65, 118.06,	57.68, 57.68, 118.05	57.70, 57.70, 118.05,	57.69, 57.69, 118.02,	57.70, 57.70, 118.02
	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Rango de resolución (Å)	28.75-1.46	27.95-1.60	28.80-1.70	25.90-1.80	28.01-1.88	28.02-1.96	28.02-2.05	28.85-2.15
No. de reflexiones	108975	97790	81543	69057	60539	53701	46718	40484
No. of reflexiones únicas	38937	29741	24912	21055	18546	16387	14356	12470

Integridad (%)	99.6 (99.4)	99.6 (99.4)	99.6 (99.6)	99.8 (99.6)	99.8 (99.6)	99.9 (99.6)	99.6 (99.7)	99.6 (99.6)
R_{sym} (%)	2.5 (38.4)	2.7 (39.9)	2.9 (44.0)	3.3 (40.5)	3.9 (42.1)	4.5 (45)	4.8 (42.6)	5.0 (36.7)
$I/\sigma(I)$	21.8 (3.2)	21.5 (3.1)	21.1 (2.8)	19.2 (3.1)	16.7 (2.9)	14.9 (2.9)	14.4 (3.0)	14.1 (3.5)
Multiplicidad	3.3 (3.2)	3.3 (3.3)	3.3 (3.2)	3.3 (3.3)	3.3 (3.2)	3.3 (3.2)	3.3 (3.3)	3.2 (3.2)
Unidad Asimétrica	Dimer							
Afinamiento								
R_{work}/R_{free} (%)	19.95/22.02	18.67/23.36	18.71/20.67	18.58/22.65	18.23/22.63	17.78/21.72	18.66/23.37	18.03/24.63
B-value (\AA^2)								
Proteína	24.83	23.88	28.13	29.22	31.2	34.54	34.29	36.59
Ion/Ligando	47.50	42.28	52.88	51.69	55.57	61.46	52.27	64.22
Agua	38.0	36.65	40.39	41.02	41.61	43.77	42.05	44.55
Global (Átomos)	36.77	34.27	40.46	40.64	42.79	46.65	42.87	48.45
Wilson plot B-value (\AA^2)	20.55	23.61	26.69	29.43	31.99	34.28	36.30	37.78
RMSD								
Longitud de enlaces (\AA)	0.004	0.006	0.004	0.004	0.005	0.004	0.004	0.006
Longitud de ángulos ($^\circ$)	0.861	1.027	0.824	0.826	0.932	0.842	0.756	0.938
Coordinate error (Maximum-Likelihood Base) (\AA)	0.18	0.18	0.17	0.21	0.23	0.19	0.24	0.25
Ramachandran plot (%)								

Regiones más favorecidas	97.77	97.32	97.75	97.30	98.20	97.75	98.19	97.75
Regiones permitidas	2.23	2.68	2.25	2.70	1.80	2.25	1.81	2.25
Regiones no permitidas	0	0	0	0	0	0	0	0

Capítulo 5

5.1 Discusión

Se demostró que la *LvTrx_{wf}* tiene la característica de formar dímeros, tanto en solución como en estado cristalino, lo anterior comprobado mediante estudios bioquímicos y estructurales. Además, la *LvTrx_{wf}* mostró ser activa en conjunto con la TrxR de rata (en un sistema heterólogo TRX).

En los experimentos realizados en esta tesis se determinó que la estabilización del dímero esta mediado por un puente disulfuro-intermolecular, conformado por el residuo Cys-73 de cada unidad monomérica. Además del puente disulfuro (Cys-73—Cys-73'), los residuos: Trp-31, Val-59, Ala-66, Ile-71, Met-74, Thr-30, Cys-32, Gly-33, Pro-34, Lys-36, Asp-60, Glu-63, Gln-67, Gln-70, Ala-72, están involucrados en la interacción dimérica, formando alrededor de 85 contactos que se encuentran a menos de 4 Å entre sí, más la formación de 7 puentes de hidrógeno. Entre todos estos residuos y sus interacciones, la extensión de la zona de la interfaz es de 1,294 Å².

El puente disulfuro-intermolecular fue resistente a altas concentraciones de DTT (hasta 50 mM). Por lo tanto, es posible que la TrxR o incluso otra proteína o molécula (por ejemplo, glutatión) podría estar reduciendo al puente disulfuro-intermolecular como primera acción, dando lugar a una estructura monomérica de *LvTrx_{wf}* con un sitio activo más expuesto, para que posteriormente otra TrxR, reduzca el puente del sitio catalítico de la Trx. Es importante señalar que esto solo es una hipótesis de lo que podría estar ocurriendo en condiciones fisiológicas y sería necesario realizar más estudios para comprobar esta hipótesis. Además, los resultados obtenidos por DLS y SAXS evidencian la existencia de la dimerización de la *LvTrx_{wf}* en solución, obteniendo una población constante, con un R_H de 2.4 nm, correspondiente a un peso de 24 kDa en ausencia de DTT (por DLS) y dos estructuras por SAXS (dímero y monómero), con un ajuste χ^2 de 1.72 y 1.0 comparándola con el dímero cristalográfico y el monómero del mismo, respectivamente. Todos estos resultados nos permiten sustentar la existencia del dímero de la *LvTrx_{wf}* en solución, resultando en casi todos los casos, a excepción de la mutante Cys-73-Ser, dos poblaciones (dímero–monómero), siendo ésta última, la población más favorecida bajo condiciones reductoras. A pesar de no poder explicar de manera contundente las implicaciones funcionales de la formación del dímero, mediante los resultados obtenidos de la mutante Cys-73-Ser es posible definir que el monómero de la *LvTrx_{wf}* pudiera ser responsable de la actividad y que el dímero esté involucrado en una función estructural. Además, la mutante Asp-60-Ser evidenció la importancia que tiene el residuo Asp-60 para el mantenimiento de la fracción monomérica, debido a que en ausencia de este residuo la *LvTrx_{wf}* tendería a la formación de dímeros más estables que pudieran comprometer por completo la actividad reductora en la *LvTrx_{wf}*.

La importancia de este trabajo, se centra en que de las Trx's depositadas en el PDB y reportadas a la fecha (262 estructuras depositadas en el PDB), solo la *hTrx* y la *LvTrx_{wf}*, muestran una estructura dimérica mediada por un puente disulfuro. Al inicio de este trabajo consideramos que, para eliminar la dimerización de la *LvTrx_{wf}*, los residuos Cys-73, Met-74, Trp-31, Asp-60 y Ala-66, debían ser mutados. Mediante la reducción de los puentes disulfuro de la insulina, se comprobó que las mutantes Cys-73-Ser, Asp-60-Ser y Ala-66-Arg de la *LvTrx* son activas, mientras que las mutantes Met-74-Glu, Trp-31-Ala, muestran una disminución en su capacidad reductora, sin embargo y de manera sorprendente ninguna de estas mutantes deja de ser activa (ver sección de resultados). Al obtener un modelo tridimensional a baja resolución mediante la técnica de SAXS, se pudo establecer que el dímero cristalográfico es compatible, con las diferencias debidas a las resoluciones entre las técnicas, al dímero existente en solución. Por último, la mutante Cys-73-Ser, elimina completamente la dimerización sin comprometer su capacidad reductora, lo anterior comprobado por datos cristalográficos, DLS, filtración en gel, SAXS, sugiriendo que la formación del dímero, si bien es resultado de varias interacciones principalmente hidrofóbicas, es dependiente principalmente de la formación del puente disulfuro de la interfaz.

El análisis de los resultados de nuestros experimentos con dos cristales de *LvTrx_{wf}* muestra un daño específico a la radiación depositada, primero afecta al puente disulfuro del sitio catalítico y posteriormente afecta al puente disulfuro-intermolecular, y de manera sorprendente, y a una dosis depositada mayor a 85 MGy, ningún otro residuo parece ser afectado por la dosis depositada. Este análisis muestra que el puente disulfuro del sitio catalítico es menos tolerante a la dosis depositada que el puente disulfuro situado en la interfaz dimérica con una dosis de absorción calculada de 32 MGy y 85 MGy, respectivamente. En el caso del puente disulfuro del sitio catalítico, la reducción de este puente disulfuro es por lo menos dos veces más tolerante en comparación con los experimentos anteriores de daño por radiación enfocados en puentes disulfuro (32 MGy vs ~13 MGy) (Owen et al., 2006; Petrova et al., 2010). La tolerancia a altas dosis de radiación por parte del puente disulfuro del sitio catalítico en *LvTrx_{wf}* puede deberse a su inaccesibilidad al solvente, como resultado del arreglo dimérico de la *LvTrx_{wf}* en el estado cristalino. En el caso del puente disulfuro de la interfaz, este puente disulfuro es el que se encuentra más expuesto al solvente, lo cual teóricamente lo haría más susceptible al daño por radiación. Sin embargo, el puente disulfuro-intermolecular se mantuvo intacto a alta dosis de energía depositada. La interacción que mantienen la interfaz del dímero no sólo dependen de un enlace covalente, sino también de otros residuos con carácter fundamentalmente hidrofóbico. Los experimentos de esta tesis como otros realizados en este campo, mostraron que conforme avanzaba la colecta de datos de difracción de rayos-X, la resolución se ve comprometida (ver tabla 3 y tabla 4, en específico la resolución máxima).

Aunque no existe una propuesta del papel biológico del dímero en la *LvTrx_{wf}*, es posible que su formación resulte en la inactivación de la proteína, dando lugar a un mecanismo de regulación para la *LvTrx_{wf}*. Otra posible explicación es que la dimerización podría estar involucrada en la protección de los sitios catalíticos al ser llevada a la Trx a un ambiente extracelular bajo condiciones fisiológicas. Por otra parte, los residuos localizados en la interfaz dimérica se encuentran en su mayoría conservados en todas las tiorredoxinas, sugiriendo que la dimerización de alguna forma podría jugar un papel importante y aún está por determinarse su función biológica en el sistema TRX, si es que existe.

5.2 Conclusiones

- La *LvTrx_{wr}*, presenta dos poblaciones dímero-monómero, en donde por primera vez se tiene evidencia estructural de la existencia de la población dimérica en solución.
- La presencia de la población dimérica de la *LvTrx_{wr}* en condiciones reductoras es marginal predominando la población monomérica; sin embargo, bajo condiciones oxidantes este equilibrio se invierte, siendo ahora la población dimérica predominante.
- A excepción de la mutante Cys-73-Ser, las mutantes Trp-31-Ala, Asp-60-Ser, Ala-66-Arg y Met-74-Glu no desestabilizan la interacción dimérica por completo, lo anterior bajo condiciones reductoras.
- La *LvTrx_{wr}* tiene actividad utilizando un sistema heterólogo TRX (*LvTrx_{wr}* y TrxR de rata).
- En la mutante Trp-31-Ala a pesar de que este residuo es el que contribuye con más superficie hidrofóbica a la zona de la interfaz, no fue posible desestabilizar esta interacción debido a la presencia del puente disulfuro-intermolecular. Además, no se abate por completo su actividad por lo que el residuo Trp-31 podría estar involucrado en el establecimiento de la interacción con la TrxR.
- En la mutante Asp-60-Ser es preferentemente dimérica bajo condiciones reductoras, presentando de manera marginal una población monomérica. Por lo tanto, la presencia del residuo Asp-60 puede ser importante para evitar la rápida formación dimérica de la *LvTrx* en condiciones fisiológicas.
- El residuo Cys-73 es el principal residuo responsable de la formación del dímero de la *LvTrx_{wr}*, debido a que la mutante Cys-73-Ser presenta un comportamiento monomérico sin importar el ambiente, reductor u oxidante, en el que se encuentre. Finalmente, esta mutante tiene una actividad reductora similar a la que presenta la *LvTrx_{wr}*, siendo esta una evidencia indirecta de que el monómero de la *LvTrx* es activo.
- Al realizar los ensayos de daños por radiación, enfocados a los puentes disulfuro del sitio catalítico y del puente disulfuro-intermolecular, es evidente la tolerancia de éstos frente a este fenómeno de reducción ionizante. Los puentes disulfuro catalíticos de cada monómero toleran una dosis de hasta 35 MGy; mientras que el puente disulfuro-intermolecular tolera hasta una dosis de 85 MGy antes de su reducción. Esta tolerancia al daño por radiación es debida a la perfecta orientación y al conjunto de interacciones de los residuos involucrados en la interfaz para su mantenimiento en la matriz cristalina.

5.3 Perspectivas

- Al establecer que el residuo de Cys-73 es determinante para la dimerización de la *LvTrx_{wt}*, sería de gran interés trabajar con la Trx de *E. coli* que es una Trx monomérica, y mutar el residuo Arg-73 por cisteína para construir una posible versión dimérica de la Trx de *E. coli*. De existir esta versión, se podría estudiar si presenta actividad.
- Generar una mutante en el residuo Cys-35 para poder generar un complejo estable entre la *LvTrx_{wt}* y la TrxR (ya sea de rata o de camarón) y posteriormente estudiar estructuralmente la formación del complejo TRX.

5.4 Referencias

- Adams, P. D., Afonine, P. V, Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (2010). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.
- Andersen, J. F., Sanders, D. a, Gasdaska, J. R., Weichsel, A., Powis, G., & Montfort, W. R. (1997). *Biochemistry.* **36**, 13979–13988.
- Bai, J., Nakamura, H., Kwon, Y.-W., Hattori, I., Yamaguchi, Y., Kim, Y.-C., Kondo, N., Oka, S., Ueda, S., Masutani, H., et al. (2003). *J. Neurosci.* **23**, 503–509.
- Banumathi, S., Zwart, P. H., Ramagopal, U. a, Dauter, M., & Dauter, Z. (2004). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 1085–1093.
- Barker, A. I., Southworth-Davies, R. J., Paithankar, K. S., Carmichael, I., & Garman, E. F. (2009). *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 205–216.
- Berndt, C., Lillig, C. H., & Holmgren, A. (2008). *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 641–650.
- Besse, I. & Buchanan, B. B. (1997). *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 1–11.
- Borek, D., Ginell, S. L., Cymborowski, M., Minor, W., & Otwinowski, Z. (2007). *J. Synchrotron Radiat.* **14**, 24–33.
- Burmeister, W. P. (2000). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **56**, 328–341.
- Campos-Acevedo, A. a, Garcia-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R., & Rudiño-Piñera, E. (2013). *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **69**, 488–493.
- Campos-Acevedo, A. & Rudiño-Piñera, E. (2014). *Molecules.* **19**, 21113–21126.
- Chakrabarti, P. & Janin, J. (2002). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **47**, 334–343.
- Cho, K. Il, Lee, K., Lee, K. H., Kim, D., & Lee, D. (2006). *Proteins.* **65**, 593–606.
- Collet, J.-F. & Messens, J. (2010). *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1205–1216.
- Lo Conte, L., Chothia, C., & Janin, J. (1999). *J Mol Biol.* **285**, 2177–2198.

- David, G. & Pérez, J. (2009). *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 892–900.
- Dyson, H. J., Tennant, L. L., & Holmgren, a (1991). *Biochemistry.* **30**, 4262–4268.
- Eklund, H., Gleason, F. K., & Holmgren, a (1991). *Proteins.* **11**, 13–28.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501.
- Evans, P. (2006). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82.
- Feng, J. N., Model, P., & Russel, M. (1999). *Mol. Microbiol.* **34**, 745–755.
- Fritz-Wolf, K., Kehr, S., Stumpf, M., Rahlfs, S., & Becker, K. (2011). *Nat. Commun.* **2**, 383.
- Gan, Z. R., Sardana, M. K., Jacobs, J. W., & Polokoff, M. a (1990). *Arch. Biochem. Biophys.* **282**, 110–115.
- Gasdaska, J. R., Kirkpatrick, I. L., Montfort, W., Kuperus, M., Hill, S. R., Berggren, M., & Powis, G. (1996). *Biochem Pharmacol.* **52**, 1741–1747.
- Gonzalez, a & Nave, C. (1994). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **50**, 874–877.
- Gronenborn, a M., Clore, G. M., Louis, J. M., & Wingfield, P. T. (1999). *Protein Sci.* **8**, 426–429.
- Halliwell, B. (2001). *Encycl. Life Sci.* 1–7.
- Hashemy, S. I. & Holmgren, A. (2008). *J. Biol. Chem.* **283**, 21890–21898.
- Hedman, B., Hodgson, K. O., Helliwell, J. R., Liddington, R., & Papiz, M. Z. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7604–7607.
- Hellerman, L., Klyne, W., & Slater, E. C. (1966). *J. Biol. Chem.* **241**, 527–533.
- Herrmann, E. C. & Moore, E. C. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 1219–1223.
- Holmgren, A. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632.
- Holmgren, A. (1981). *Trends Biochem. Sci.* **6**, 26–29.
- Holmgren, A. (1985). *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237–271.
- Holmgren, A. (1989). *Biochemistry.* **264**, 13963–13966.
- Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H., & Brändén, C. I. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 2305–2309.
- Horton, N. & Lewis, M. (1992). *Protein Sci.* **1**, 169–181.
- Janin, J. & Chothia, C. (1990). **265**, 16027–16030.
- Jeffrey, G. A. (1997). *Oxford Univ. Press.* 303.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1995). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 31–65.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13–20.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.
- Katti, S. K., LeMaster, D. M., & Eklund, H. (1990). *J. Mol. Biol.* **212**, 167–184.
- Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., Volkov, V. V., & Svergun, D. I. (2006). *J. Appl. Crystallogr.* **39**, 277–286.
- de Lamotte-Guéry, F., Pruvost, C., Minard, P., Delsuc, M. a, Miginiac-Maslow, M., Schmitter, J. M., Stein, M., & Decottignies, P. (1997). *Protein Eng.* **10**, 1425–1432.

- Laurent, C. T., Colleen, M. E., & Peter, R. (1964). *J. Biol. Chem.* **239**, 3436–3444.
- Lee, B. & Richards, F. M. (1971). *J. Mol. Biol.* **55**, 379–400.
- Leiros, H.-K. S., McSweeney, S. M., & Smalås, A. O. (2001). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **57**, 488–497.
- Lindley, H. (1960). *Biochem J.* **74**, 577–584.
- Martin, J. L. (1995). *Structure.* **3**, 245–250.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J.-P. (2009). *Annu. Rev. Genet.* **43**, 335–367.
- Moreira, I. S., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2007). *Proteins.* **68**, 803–812.
- Murray, J. W., Garman, E. F., & Ravelli, R. B. G. (2004). *J. Appl. Crystallogr.* **37**, 513–522.
- Murray, J. W., Rudiño-Piñera, E., Owen, R. L., Grininger, M., Ravelli, R. B. G., & Garman, E. F. (2005). *J. Synchrotron Radiat.* **12**, 268–275.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. a., Pannu, N. S., Steiner, R. a., Nicholls, R. a., Winn, M. D., Long, F., & Vagin, A. a. (2011). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367.
- Murshudov, G. N., Vagin, a a, & Dodson, E. J. (1997). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riekel, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). *Nature.* **435**, 773–778.
- Nishiyama, A., Ohno, T., Iwata, S., Matsui, M., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., & Yodoi, J. (1999). *Immunol. Lett.* **68**, 155–159.
- Ofran, Y. & Rost, B. (2003). *J. Mol. Biol.* **325**, 377–387.
- Owen, R. L., Rudiño-Piñera, E., & Garman, E. F. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4912–4917.
- Paithankar, K. S. & Garman, E. F. (2010). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 381–388.
- Paithankar, K. S., Owen, R. L., & Garman, E. F. (2009). *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 152–162.
- Pekkari, K., Gurunath, R., Arner, E. S., & Holmgren, a (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 37474–37480.
- Petrova, T., Ginell, S., Mitschler, A., Kim, Y., Lunin, V. Y., Joachimiak, G., Cousido-Siah, A., Hazemann, I., Podjarny, A., Lazarski, K., et al. (2010). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 1075–1091.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.
- Powis, G. & Montfort, W. R. (2001). *Annu. Rev.* **41**, 261–295.
- Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., & Tainer, J. a (2007). *Q. Rev. Biophys.* **40**, 191–285.
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. M., Huth, J. R., & Gronenborn, a M. (1995). *Structure.* **3**, 289–297.
- Qin, J. G., Clore, M., Kennedy, P. W., Kuszewski, J., & Gronenborn, A. M. (1996). *Structure.* **4**, 613–620.
- Ravelli, R. B. G. & Garman, E. F. (2006). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 624–629.
- Ravelli, R. B. & McSweeney, S. M. (2000). *Structure.* **8**, 315–328.
- Redl, B., Merschak, P., Abt, B., & Wojnar, P. (1999). *FEBS Lett.* **460**, 182–186.
- Ren, G., Stephan, D., Xu, Z., Zheng, Y., Tang, D., Harrison, R. S., Kurz, M., Jarott, R., Shouldice, S. R.,

- Hiniker, A., et al. (2009). *J. Biol. Chem.* **284**, 10150–10159.
- Saha, R. P., Bahadur, R. P., Pal, A., Mandal, S., & Chakrabarti, P. (2006). *BMC Struct. Biol.* **6**, 11.
- Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, a, Chartier, Y., & Meyer, Y. (1996). *J. Mol. Evol.* **42**, 422–431.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., & Ichijo, H. (1998). *EMBO J.* **17**, 2596–2606.
- Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., & Sali, A. (2010). *Nucleic Acids Res.* **38**, 540–544.
- Shimizu, N., Hirata, K., Hasegawa, K., Ueno, G., & Yamamoto, M. (2007). *J. Synchrotron Radiat.* **14**, 4–10.
- Sutton, K. a, Black, P. J., Mercer, K. R., Garman, E. F., Owen, R. L., Snell, E. H., & Bernhard, W. a (2013). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 2381–2394.
- Svergun, D. I. (2010). *Biol. Chem.* **391**, 737–743.
- Teng, T. & Moffat, K. (2002). *J. Synchrotron Rad.* **9**, 198–201.
- Tyagi, R., Lai, R., & Duggleby, R. G. (2004). *BMC Biotechnol.* **4**, 2.
- Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., & Nikaido, T. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 35809–35815.
- Vangone, A., Spinelli, R., Scarano, V., Cavallo, L., & Oliva, R. (2011). *Bioinformatics.* **27**, 2915–2916.
- Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J. P., Chartier, Y., & Meyer, Y. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 19714–19722.
- Watson, W. H., Pohl, J., Montfort, W. R., Stuchlik, O., Reed, M. S., Powis, G., & Jones, D. P. (2003). *Biochemistry.* **278**, 33408–33415.
- Weichsel, a, Gasdaska, J. R., Powis, G., & Montfort, W. R. (1996). *Structure.* **4**, 735–751.
- Weichsel, A., Brailey, J. L., & Montfort, W. R. (2007). *Society.* 1219–1227.
- Weik, M., Ravelli, R. B. G., Kryger, G., Mcsweeney, S., Maria, L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J., Sussman, J. L., et al. (2011). *Sci. York.*
- Weik, M., Ravelli, R. B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M. L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J., & Sussman, J. L. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 623–628.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., et al. (2011). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.
- Xu, Z. & Wickner, W. (1996). *J. Cell Biol.* **132**, 787–794.
- Yan, C., Wu, F., Jernigan, R. L., & Dobbs, D. (2008). *Protein J.* **27**, 59–70.
- Zeldin, O. B., Gerstel, M., & Garman, E. F. (2013). *J. Appl. Crystallogr.* **46**, 1225–1230.

5.5 Lista de figuras

Figura 1. Alineamiento de secuencia entre varias Trx's de diversas especies. En color verde se muestra la secuencia de la LvTrx _{wt} , en color azul se muestra los residuos que se encuentran conservados en las Trx's reportadas en la base de datos UniProt. Por ultimo en color rojo se resaltan los residuos que forman parte de la zona de la interfaz en la LvTrx _{wt} , los cuales se mantienen conservados en la mayoría de la Trx's. Para la realización del alineamiento se utilizó el programa Jalview.....	13
Figura 2. Estructura cristalográfica de la LvTrx _{wt} (PDB 3zzx), conformada por una estructura secundaria β_1 , α_1 , β_2 , α_2 , β_3 , α_3 , β_4 , β_5 y α_4 . En un costado se muestra el sitio catalítico compuesto por los residuos Cys-Gly-Pro-Cys, así como las otras dos cisteínas presentes en esta Trx (Cys-73 y Cys-62). La Pro-40, se ha reportado que es importante para el mantenimiento del sitio catalítico, provocando una curvatura en la hélice- α_2	14
Figura 3. Regiones conservadas localizadas en el centro y alrededor del sitio catalítico de las Trx's. Los residuos conservados se muestran en forma de cilindros. Triptófano (naranja), residuos con carga (magenta), cisteínas (azules), glicinas (amarillas), fenilalaninas (verdes) y prolinas (rojo). Las regiones hidrofóbicas (verde) las regiones con carga (magenta) y las zonas estructurales expuestas, son indicadas con un ovalo semitransparente. Figura tomada de Collet & Messens, 2010.	15
Figura 4. Esquema de regulación de la actividad de la proteína por control tiol redox en presencia del sistema TRX (Trx-TrxR). a) mecanismo de acción de la Trx frente a una proteína blanco. b) mecanismo de acción, por el cual la Trx regenera su capacidad reductora, mediante la TrxR dependiente de NADPH. Figura modificada de Collet & Messens, 2010.	17
Figura 5. Estructura cristalográfica de la LvTrx _{wt} a 1.54 Å de resolución. En color amarillo se muestran los puentes disulfuro que componen al dímero, dos puentes disulfuro catalíticos (Cys-32—Cys-35) y un puente disulfuro intermolecular (Cys-73—Cys-73').	21
Figura 6. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1 σ ara los diferentes estados de oxidación de las cisteínas 32 y 35 de la LvTrx _{wt} . La flecha indica el tránsito del estado reducido al estado oxidado Para cada una de las estructuras se muestra el puente disulfuro del sitio catalítico de la cadena A y B, así como el puente disulfuro-intermolecular. Los códigos PDB para cada estructura se encuentran en la parte superior de la figura.	22
Figura 7. Vista frontal de un monómero que compone la interfaz dimérica. En el recuadro con líneas punteadas, muestra los principales residuos que participan en la interacción. Mapa 2Fo-Fc a 1 σ , que muestra la densidad de cada residuo. Las moléculas de agua se encuentran alrededor de esta interfaz y están representados por esferas rojas.	23
Figura 8. Esquema que describe los pasos para la realización de la técnica de megaprimer.	29
Figura 9. Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en una medición de DLS y representación esquemática de una perfecta correlación entre partículas grandes y partículas pequeñas (modificada del manual Zetasizer Nano Series).....	32
Figura 10. Estructura cristalográfica de LvTrx _{wt} , que muestra un dímero en la unidad asimétrica para todas las estructuras de LvTrx _{wt} depositadas en el PDB (3zzx, 4aj6, 4aj7, 4aj8). El mapa 2Fo-Fc se muestran en gris con un valor sigma de 1.0 σ , para los puentes disulfuro. La estructura de la LvTrx _{wt} muestra la ubicación que tiene el puente disulfuro-intermolecular (Cys-73-Cys-73'), que es el más expuesto al solvente, en comparación con el puente disulfuro del sitio catalítico de cada monómero. En el cuadro con líneas punteadas se muestra un acercamiento de los residuos que se encuentran involucrados en la interfaz de la LvTrx _{wt} . La interfaz se encuentra dividida en dos partes: el Core en color azul (residuos de la interfaz que no se encuentran en contacto con el solvente) y el Rim en color rojo (aquellos residuos que mantienen contacto con el solvente). La división de interfaz fue obtenida utilizando el programa, ProFace (Saha et al., 2006).	38
Figura 11. Monómero de la LvTrx _{wt} , mostrando los residuos que participan en la formación del dímero cristalográfico. Esta interacción está conformada por 7 puentes de hidrógeno y un puente disulfuro-intermolecular (video de la interacción entre monómeros en la sección suplementaria).	39
Figura 12. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la proteína LvTrx _{wt} (color azul) y de la Trx de E. coli (color violeta), bajo diferentes concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). En ambas condiciones la LvTrx _{wt} muestra dos poblaciones (dímero-monómero), la población monomérica es predominante bajo condiciones reductoras. La calibración de la columna puede verse en el anexo III.	41
Figura 13. Radios hidrodinámicos por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de luz de la intensidad de la LvTrx _{wt} (en color azul) y de la Trx de E. coli (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de un agente reductor. El radio hidrodinámico, (R_H), en presencia de DTT para ambas muestras fue de ~1.55 nm, que corresponde a una población monomérica; mientras que en ausencia de DTT, es evidente el desplazamiento del equilibrio de la LvTrx _{wt} hacia la población dimérica. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la LvTrx _{wt} fue de ~2.4 nm, mientras que para la Trx de E. coli, bajo la misma condición se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presente en presencia de DTT.	42
Figura 14. Perfil de elución de la LvTrx _{wt} , previo a la colecta de datos por SAXS. La muestra que fue analizada mediante SAXS corresponde a la población dimérica y está señalada con un ovalo azul.	42
Figura 15. Curva experimental del perfil SAXS y gráfica de Guinier que permitió calcular un Rg de 19 \pm 0.02 Å. Dicho valor se aproxima al valor teórico del dímero cristalino de la LvTrx _{wt}	43
Figura 16. Ajuste de los datos experimentales con los teóricos obtenidos por el programa FoXS. Comparación entre el perfil experimental obtenido por SAXS y los perfiles teóricos obtenidos a partir de las estructuras cristalográficas de la LvTrx _{wt} (pdb 3zzx, 4aj6, 4aj7, 4aj8). Gráfico de residuales obtenidos como resultado del ajuste entre los datos experimentales y teóricos (χ), teniendo la LvTrx _{wt} un radio de giro de 19 \pm 0.02 Å. La comparación entre el perfil experimental con cada uno de los monómeros, muestra un mal ajuste (χ : 22 cadena A y χ : 10 para la cadena B).	44
Figura 17. Comparación entre el perfil experimental obtenido por SAXS de la LvTrx _{wt} con los perfiles teóricos de tres Trx's, que en su sistema cristalino presentan dímeros no-covalentes. a,b) comparación del ajuste (χ) entre los datos experimentales y teóricos de la Trx de E. coli panel a y la Trx de T. vaginalis panel b y la comparación del ajuste entre los datos experimentales y el perfil teórico de la LvTrx _{wt} utilizando la orientación de los respectivos dímeros no covalentes de estas Trx's. c, d) un ejemplo más, basado en la explicación de los paneles anteriores, tomando como muestra la Trx de D. melanogaster, observando en el panel c , el ajuste con la estructura de D.	

melanogaster y en el panel d , el ajuste con la estructura de la LvTrx _{wt} , pero utilizando la orientación del dímero cristalino de <i>D. melanogaster</i>	46
Figura 18. Determinación del modelo tridimensional de la LvTrx _{wt} a baja resolución obtenido de novo a partir de los datos de SAXS. Para llegar a la obtención de la estructura final de LvTrx _{wt} se requirió del cálculo y promedio de múltiples modelos resultantes del programa DAMMIN mediante el programa DAMAVER. a) Se muestra la estructura de SAXS obtenida en el sincrotrón SOLEIL con una línea que tiene acoplado un HPLC (SAXS-COACH); en b) Se muestra la estructura de SAXS obtenida en una fuente casera sin un HPLC; sin embargo, para ambos experimentos se obtuvieron los mismos resultados.....	47
Figura 19. Empalme entre la estructura obtenida a partir de los datos de SAXS de la LvTrx _{wt} a distintas concentraciones a) 1 mg mL ⁻¹ , b) 5 mg mL ⁻¹ y con la estructura cristalográfica de la LvTrx _{wt}	48
Figura 20. Perfil de elución de la LvTrx _{wt} acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra a la población dimerica y monomérica, así como sus estructuras a baja resolución, obtenidas a partir de los experimentos de SAXS.....	49
Figura 21. Ensayo de actividad de la LvTrx _{wt} y la Trx de <i>E. coli</i> utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. En el panel de la izquierda (LvTrx _{wt}), se observa un incremento más rápido en la absorbancia provocado por la agregación de las cadenas de la insulina que la Trx de <i>E. coli</i>	50
Figura 22. Análisis de variabilidad de residuos en la zona de la interfaz en las Trx's, tomando como referencia 500 secuencias de Trx's de diferentes especies. Los residuos que no presentan variabilidad (Conservados) se muestran en color rojo, hasta llegar al color azul (no conservados). Los residuos Trp-31, Asp-60, Ala-66, Cys-73 y Met-74, fueron los residuos elegidos para ser mutados y analizados en esta tesis.....	50
Figura 23. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Trp-31-Ala (color amarillo), bajo dos concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). Como control se muestra la LvTrx _{wt} (color azul) y de la Trx de <i>E. coli</i> (color violeta). En ambas condiciones la mutante Trp-31-Ala muestra dos poblaciones (dímero-monómero), de la cual, la población monomérica es predominante bajo las condiciones en que se realizaron estos experimentos (condiciones reductoras).....	51
Figura 24. Radios hidrodinámicos por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Trp-31-Ala (mostrada en color amarillo). También se muestra una comparación con los perfiles de la LvTrx _{wt} (en color azul) y de la Trx de <i>E. coli</i> (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R _H), en presencia de DTT para la mutante Trp-31-Ala fue de 1.55 nm, que corresponde a una población monomérica; mientras que en ausencia de DTT, es evidente el desplazamiento del equilibrio de la mutante Trp-31-Ala hacia la población dimerica. El comportamiento de la mutante Trp-31-Ala fue muy similar al comportamiento de la LvTrx _{wt} . El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la mutante Trp-31-Ala fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de <i>E. coli</i> , bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que se observó en presencia de DTT.....	52
Figura 25. Sobreposición de la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala y la estructura de la LvTrx _{wt} , en la cual, la estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala muestra la eliminación de la zona de la interfaz establecida para la formación del dímero en la LvTrx _{wt} , debido a una rotación de 55° de uno de los monómeros.....	53
Figura 26. Estructura cristalográfica de la mutante Trp-31-Ala, en la cual se localizan 7 moléculas de agua (S-1, S-2, S-11, S-17, S-34, S-59 y S-76) en la zona de la interfaz reportada para la LvTrx _{wt} . Las moléculas de agua se muestran como esferas en color rojo.....	54
Figura 27. Perfil de elución de HPLC de la mutante Trp-31-Ala acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra aproximadamente el 50% de la población, perteneciente al pico 1 (dimerica) y otro 50% correspondiente a dos poblaciones: una de ellas (pico 2) corresponde a una población monomérica. Sobreposición de las estructuras obtenidas por SAXS y las estructuras cristalográficas muestran un buen ajuste entre modelos (χ^2 1.34 y χ^2 1.00, respectivamente).....	55
Figura 28. Ensayo de actividad de la mutante Trp-31-Ala utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. Esta mutante presenta actividad, sin embargo, se ve comprometida debida a la ausencia del triptófano que se ha descrito que es importante para interaccionar con la TrxR, esto se confirma con el hecho de que la mutante Trp-31-Ala presenta una menor actividad que la LvTrx _{wt} y la Trx de <i>E. coli</i>	56
Figura 29. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Asp-60-Ser (color rojo), bajo diferentes concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). Como control se muestra la LvTrx _{wt} (color azul) y de la Trx de <i>E. coli</i> (color violeta). En ambas condiciones la mutante Asp-60-Ser muestra dos poblaciones (dímero-monómero), de la cual, la población dimerica es predominante bajo condiciones reductoras.....	57
Figura 30. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Asp-60-Ser (mostrada en color rojo). También se muestra una comparación con los perfiles de la LvTrx _{wt} (en color azul) y de la Trx de <i>E. coli</i> (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R _H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Asp-60-Ser fue de 2.4 nm, que corresponde a una población dimerica. El comportamiento mostrado por la mutante Asp-60-Ser presenta un dímero más estable, que podría producto de más interacciones en la zona de la interfaz. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la LvTrx _{wt} fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de <i>E. coli</i> , bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presento en presencia de DTT.....	58
Figura 31. Zona de la interfaz de la mutante Asp-60-Ser. Contactos establecidos entre los residuos: Thr-30 (O γ 1) y Glu-63 (O ϵ 1) a 2.6 Å, Lys-36 (N ζ) y Gln-67 (O ϵ 1) a 3.1 Å, Ser-60 (O γ) y Glu-63 (O ϵ 2) a 3.8 Å, Met-74 (N) y Ala-72 (O) a 2.7 Å, Glu-63 (O ϵ 1) y Thr-30 (O γ 1) a 2.4 Å, Gln-67 (O ϵ 1) y Lys-36 (N ζ) a 2.7 Å, por ultimo Ala-72 (O) y Met-74 (N) a 2.8 Å.....	59
Figura 32. Zona de la interfaz de la mutante Asp-60-Ser. La sustitución del residuo aspártico por serina, provoca la entrada de moléculas de agua en la zona de la interfaz, representadas como esferas en color rojo.....	60
Figura 33. Perfil de elución de la mutante Asp-60-Ser acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra una población dimerica, así como su estructura a baja resolución.....	61
Figura 34. Ensayo de actividad de la mutante Asp-60-Ser utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. Esta mutante presenta actividad; observando una disminución en su capacidad reductora en comparación a la LvTrx _{wt} ; sin embargo, su capacidad reductora no se ve comprometida como en la mutante Trp-31-Ala. Una posible explicación de su actividad puede ser atribuida al arreglo dimerico que presenta esta mutante sin importar el ambiente en el que se encuentre (reductor u oxidante).....	61

Figura 35. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Ala-66-Arg (color anaranjado), bajo dos concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). Como control se muestra la LvTrx_{wt} (color azul) y de la Trx de E. coli (color violeta), En ambas condiciones la mutante Ala-66-Arg muestra dos poblaciones (dímero-monómero), de la cual, la población monomérica es predominante bajo condiciones reductoras..... 62

Figura 36. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Ala-66-Arg (mostrada en color anaranjado). También se muestra una comparación con los perfiles de la LvTrx_{wt} (en color azul) y de la Trx de E. coli (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Ala-66-Arg fue de 2.4 nm, que corresponde a una población dimerica. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la LvTrx_{wt} fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de E. coli, bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presente en presencia de DTT..... 63

Figura 37. Perfil de elución de la mutante Ala-66-Arg acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución no muestra de forma clara una buena resolución de la muestra, sin embargo, al obtener la estructura del pico de mayor absorbancia (pico 2), se logró obtener una estructura a baja resolución, la cual presenta un volumen similar al dímero de la LvTrx_{wt}..... 64

Figura 38. Ensayo de actividad de la mutante Ala-66-Arg utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. La actividad de esta mutante es similar a la observada en la LvTrx_{wt}..... 64

Figura 39. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Cys-73-Ser (color verde), bajo dos concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). Como control se muestra la LvTrx_{wt} (color azul) y de la Trx de E. coli (color violeta), En ambas condiciones la mutante Cys-73-Ser muestra una población correspondiente al monómero..... 65

Figura 40. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Cys-73-Ser (mostrada en color verde). También se muestra una comparación con los perfiles de la LvTrx_{wt} (en color azul) y de la Trx de E. coli (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Cys-73-Ser fue de 1.6 nm, que corresponde a una población monomérica, comprobado por el perfil de dispersión de la Trx de E. coli, en la cual se mantuvo el mismo radio hidrodinámico en ausencia y en presencia de DTT..... 66

Figura 41. Diferencia en distancia entra la interfaz de la LvTrx_{wt} y la interfaz de la mutante Cys-73-Ser de la mutante, mostrando tener esta última interfaz mayor distancia con su vecino cristalográfico (una distancia mayor a 4 Å)..... 67

Figura 42. Perfil de elución de la mutante Cys-73-Ser acoplada a una línea de SAXS. El perfil de elución muestra una población monomérica, así como su estructura a baja resolución..... 68

Figura 43. Ensayo de actividad de la mutante Cys-73-Ser utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. La actividad de esta mutante es similar a la observada en la LvTrx_{wt} y a la mutante Ala-66-Arg..... 68

Figura 44. Cromatogramas que muestran el perfil de elución de la mutante Met-74-Glu (color gris), bajo dos concentraciones de DTT (10 mM y 50 mM). Como control se muestra la LvTrx_{wt} (color azul) y de la Trx de E. coli (color violeta). En ambas condiciones la mutante Met-74-Glu muestra al menos dos poblaciones, de las cuales, la población monomérica es predominante bajo condiciones reductoras... 69

Figura 45. Radios hidrodinámicos representados por volumen, obtenidos a partir de las dispersiones de la intensidad de luz de la mutante Met-74-Glu (mostrada en color gris). También se muestra una comparación con los perfiles de la LvTrx_{wt} (en color azul) y de la Trx de E. coli (en color violeta), bajo la presencia de 10 mM de DTT y en ausencia de DTT. El radio hidrodinámico (R_H), en presencia y ausencia de DTT para la mutante Met-74-Glu fue de 1.55 nm y 2.4 nm, respectivamente. El comportamiento mostrado por la mutante Met-74-Glu en ausencia de DTT presenta un dímero y en presencia de DTT presenta un monómero. El radio hidrodinámico en ausencia de DTT para la LvTrx_{wt} fue de 2.4 nm, mientras que para la Trx de E. coli, bajo las mismas condiciones, se mantuvo el mismo radio hidrodinámico que presente en presencia de DTT..... 70

Figura 46. Perfil de elución de la mutante Met-74-Glu acoplada a una línea de SAXS-COACH. El perfil de elución muestra a la población dimerica y monomérica, así como sus estructuras a baja resolución..... 71

Figura 47. Ensayo de actividad de la mutante Met-74-Glu utilizando a la TrxR de rata y NADPH como agente reductor para activar a la Trx. La actividad de esta mutante se ve comprometida de manera similar a la observada en la mutante Trp-31-Ala..... 71

Figura 48. Estructuras cristalográficas de LvTrx_{wt}-1x que muestran el deterioro de los puentes disulfuro (ACys-32-ACys-35, ACys-73-BCys-73' y BCys-32-BCys-35) causado por el daño por radiación en una colección de datos secuencial de 10 datasets con el 8% de transmisión, 1.33×10^{11} ph s⁻¹. Densidad electrónica del mapa 2Fo-Fc mostrado en color gris a 1.0 σ . (a) Primer estructura colectada a 3.4 MGy; (b) Segunda estructura colectada a 6,8 MGy; (c) tercera estructura colectada a 10.3 MGy; (d) Sexta estructura colectada a 20.6 MGy; (e) Séptima estructura colectada a 24 MGy; (f) Octava estructura colectada a 27.4 MGy; (g) Novena estructura colectada a 30.9 MGy; (h) Décima estructura colectada a 34.3 MGy, demostrando que hasta esta dosis, el puente disulfuro del sitio catalítico de las cadenas A y B se reduce completamente (resaltado en óvalos rojos), mientras que el puente disulfuro-intermolecular se mantiene estable con una ocupación del 60% formando el puente disulfuro y con una ocupación del 40% como cisteínas libres. Para fines prácticos, la cuarta y quinta estructura no se mostraron, ya que estos datos no proporcionaron más información. La dosis calculada para estas estructuras fue de 13.7 MGy y 17.1 MGy, respectivamente..... 75

Figura 49. Estructuras cristalográficas de LvTrx_{wt}-3x que muestran el deterioro del puente disulfuro de cada sitio catalítico (ACys-32-ACys-35 and BCys-32-BCys-35) y del puente disulfuro-intermolecular (Cys-73-Cys-73') causada por daño por radiación. El flujo con el que se difractó el cristal LvTrx_{wt}-3x fue de tres veces más alto que en el cristal de la LvTrx_{wt}-1x, esto es 27% de transmisión, 4.14×10^{11} ph s⁻¹. (A) Primera estructura colectada a 10.7 MGy; (B) Segunda estructura colectada a 21.3 MGy; (C) Tercera estructura colectada a 32 MGy, una dosis a la que el puente disulfuro del sitio catalítico fue completamente reducido, similar a lo que se obtuvo en el cristal de la LvTrx_{wt}-1x; (D) Cuarta estructura colectada a 42.7 MGy; (E) Quinta estructura colectada a 53.4 MGy; (F) Sexta estructura colectada a 64.1 MGy; (G) Séptima estructura colectada a 74.8 MGy; (H) Octava estructura colectada a 85.4 MGy, demostrando que a esta dosis, el puente disulfuro de la interfaz está completamente reducido (Resaltado con un óvalo rojo). La novena y décima estructura no se muestran, debido no mostraron diferencia con relación al dataset 8. Densidad electrónica del mapa 2Fo-Fc mostrado en color gris a 1.0 σ 76

Figura 50. Contactos que se generan en la interfaz de la LvTrx_{wt}, a partir de la interacción entre monómeros (puentes disulfuro se muestran e color amarillo, puentes de hidrógeno se muestran con líneas azules, mientras que los contactos que se establecen a una distancia menor a 4 Å, se muestran con líneas anaranjadas)..... 97

Figura 51. Calibración de la columna Superdex 75 HR 10/30, mostrando el perfil de elución de 4 proteínas. En color rojo se muestra el perfil de elución de la mutante Asp-60-Ser con un pico mayoritario de 24 kDa y un pico de elución minoritario de 12 kDa; en color azul se muestra el perfil de elución de la LvTrx_{wt} mostrando dos picos de elución, uno de ellos en menor proporción, muestra un peso aproximado de 24 kDa y un pico mayoritario de 12 kDa; en color violeta se muestra el perfil de elución de la Trx de E. coli, con un peso aproximado de 12 kDa; por último en color dorado se muestra el perfil de elución de una variante de la proteína fluorescente GFP (por sus siglas en inglés) el cual muestra dos picos, uno ellos corresponde a un peso de 27 kDa y el otro pico corresponde a un peso de 55 kDa.98

5.6 Lista de tablas

Tabla 1. Superficie accesible al solvente (ASA, por sus siglas en inglés) y superficie aportada de cada uno de los residuos involucrados en la interfaz de la LvTrx _{wt} . Datos obtenidos mediante el programa CoCoMaps (Vangone et al., 2011).	40
Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos-X de las mutantes Trp-31-Ala, Cys-73-Ser y Asp-60-Ser.	72
Tabla 3. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos-X del cristal LvTrx _{wt} -1x	77
Tabla 4. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos-X del cristal LvTrx _{wt} -3x	79
Tabla 5. Radiación depositada en puentes disulfuro de diferentes proteínas tomada de (Campos-Acevedo & Rudiño-Piñera, 2014).	99

Anexo I

Daño por radiación en la cristalografía de rayos X

Durante un experimento de difracción de rayos X en un cristal de proteína a una energía de rayos X de 12.7 keV, aproximadamente el 98% de los fotones incidentes pasan a través del cristal sin interacción. Del 2% que tiene interacción, aproximadamente el 84% son absorbidos por efecto fotoeléctrico, mientras que 8% experimentan dispersión elástica y el 8% restante dispersión inelástica. Por lo que, en total, menos del 0.2% de los fotones incidentes son difractados por el cristal (Murray et al., 2005; Ravelli & Garman, 2006).

Varios investigadores han tratado de revelar detalles acerca del proceso de daños por radiación (Hedman et al., 1985; Gonzalez & Nave, 1994) y hasta hace poco el daño por radiación se creía que era un problema no específico. Los informes recientes han dado una mejor comprensión del problema (Teng & Moffat, 2002) y los estudios acerca del daño por radiación han descrito que el daño es altamente específico, ejemplo de esto se han realizado en la acetilcolinesterasa (AChE), en la lisozima (HEWL) de huevo de gallina, en el inhibidor de la quimotripsina (Ravelli & McSweeney, 2000; Weik et al., 2000). En estos casos se ha realizado un estudio integral, colectando datos obtenidos del cristal de proteína; entre cada conjunto de datos, los cristales quedaron sin exponer, expuesto al haz atenuado o expuesto a todo el haz monocromático (no atenuado). La comparación de los datos colectados, revelaron la existencia de un incremento en los parámetros de dispersión atómica (PDAs), un aumento en los parámetros de la celda unitaria, ligera rotación y traslación de moléculas de proteínas, ruptura de puentes disulfuro y la descarboxilación del ácido aspártico y glutámico. Se ha propuesto que estos cambios son iniciados por la formación de radicales libres durante la exposición a los rayos X, y la dosis necesaria para la formación de radicales libres se manifiesta por un desorden progresivo del cristal y por cambios químicos locales en las moléculas de proteína (Burmeister, 2000). Además, se reportó daño específico (pérdida de densidad electrónica) para los grupos hidroxilo de la tirosina y los grupos metilol de los residuos de metionina.

Podemos clasificar el daño por radiación en dos etapas; durante el daño primario, los rayos X pueden interaccionar con el cristal a través del efecto fotoeléctrico, en este fenómeno un fotón de rayos X choca con un electrón, el cual absorbe la energía del fotón y es expulsado del átomo al que se encuentra unido, generándose un catión y un electrón libre. En el efecto Compton, el electrón es expulsado del átomo, pero se genera un fotón de una mayor longitud de onda, cabe mencionar que, dependiendo de la energía original del fotón, este fenómeno puede ocurrir más de una vez. Los electrones liberados pueden provocar la ruptura de enlaces en áreas de aproximadamente 50 Å de diámetro, generando otras especies radiolíticas. Además de esto, los electrones se solvatan rápidamente ocurriendo en una escala de tiempo de femtosegundos a picosegundos. El daño que estas especies radiolíticas generan en otros sitios se considera como daño secundario y ocurre en una escala de microsegundos a milisegundos. El daño secundario puede ser mitigado, debido a que está restringido

por la difusión que se ve disminuida en gran medida a temperaturas de nitrógeno líquido. Sin embargo, el daño primario no puede ser evitado ya que es un efecto físico que depende directamente de la energía depositada en el cristal. La ruptura de enlaces S-H, O-H, N-H y C-H, así como la formación de especies reactivas tales como los electrones solvatados (e^{-aq}), $\cdot OH$ y $\cdot H$ (Gonzalez & Nave, 1994). El daño secundario es provocado por dichas especies radiolíticas altamente reactivas, cuyas concentraciones iniciales pueden alcanzar niveles molares, que se difunden a través del cristal, conduciendo a la ruptura de enlaces en la proteína y a la formación de más radicales en una escala de tiempo de microsegundos a milisegundos a temperatura ambiente.

El daño por radiación en puentes disulfuro

El rompimiento de enlaces disulfuro inducido por los rayos X, se manifiestan por sí mismo, como la desaparición gradual de la densidad electrónica en las posiciones del enlace en el mapa de densidad $2F_{obs}-F_{calc}$. Se han realizado numerosos estudios a baja resolución en diferentes estados de deterioración del cristal (Ravelli & McSweeney, 2000; Weik et al., 2011). Por ejemplo, varios investigadores han reportado la aparición de densidad electrónica positiva en el mapa de diferencia $F_{obs}-F_{calc}$ en las inmediaciones del deterioro del enlace disulfuro original. Esta nueva densidad puede ser explicada por la aparición de nuevas conformaciones de residuos de cisteína (Burmeister, 2000; Banumathi et al., 2004) o por la divergencia de los dos átomos S_{γ} , pero no observados en el modelo debido a la relativamente baja resolución. Por otro lado, se han realizado estudios en los cuales se sigue el deterioro de los enlaces disulfuro $S_{\gamma}-S_{\gamma}$ a alta resolución (Leiros et al., 2001) usando solo una colecta de datos por cada cristal, la cual no permite seguir los cambios del deterioro inducidos por los rayos X.

Estudios de difracción realizados en un sincrotrón de segunda generación bajo condiciones criogénicas en cristales de TcAChe (acetil colinesterasa de *Torpedus californicus*) y HEWL (lisozima de huevo de gallina) se demostró que se producía la ruptura de los puentes disulfuro Cys-254–Cys-265 en TcACHe y Cys-6–Cys-127 en HEWL, aunque dichas proteínas tienen más puentes disulfuro, los previamente mencionados fueron mucho más sensibles debido a que presentaban mayor accesibilidad al solvente. Además de lo anterior, cuando se analizaron variaciones en los PDAs para los distintos aminoácidos, se observó que los que mostraron un mayor incremento además de las cisteínas de los puentes disulfuro, fueron los residuos glutámicos y aspárticos. El incremento en los PDAs puede ser una consecuencia de una movilidad aumentada, o de la descarboxilación, un efecto bastante conocido de la radiación ionizante (Weik et al., 2011). Aunque los cambios estructurales que experimenta un cristal son de alguna forma dependientes de su naturaleza, el daño total causado por la radiación en los cristales proteicos criopreservados es correspondiente a la dosis acumulada recibida. En experimentos realizados con cristales de lisozima de huevo a diferentes energías de rayos X, se observaron incrementos en el daño a una mayor intensidad de los rayos X para las variaciones en los PDAs y los valores de $I/(\sigma I)$ a resoluciones constantes. Sin embargo, el experimento demostró que estos daños son dependientes de la dosis

cuando se realizó la normalización de los valores obtenidos a diferentes intensidades (Borek et al., 2007; Shimizu et al., 2007).

Como el daño primario es un efecto físico provocado por el haz de rayos X, no puede ser disminuido a menos que se disminuya la dosis depositada en el cristal. Sin embargo, el daño secundario puede disminuirse mediante la adición de sustancias que protegen a la proteína de los electrones y las especies radiolíticas producidas como consecuencia del daño primario. Dichos compuestos son llamados *scavengers* (recolectores) de electrones. En experimentos de daño por radiación realizados en lisozima de huevo de gallina a 100 K se demostró la utilidad del ascorbato, 1,4-Benzoquinona y TEMP (2,2,6,6,-tetramethyl-4-piperidone) en la protección de cisteína (S-H), cistina (S-S) y ácido α lipoico oxidado (S-S), a excepción de TEMP para el ácido α lipoico (Barker et al., 2009).

Anexo II

Ensayo de actividad por insulina

Así como el DTT debe ser preparado en fresco cada día, el *amortiguador* de reacción (fosfato de potasio 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 6.5) y el stock de la insulina (10 mg mL⁻¹) puede almacenarse a -20°C.

La preparación del *stock* de insulina es uno de los puntos en los que hay que prestar especial atención. En primer lugar, hay que asegurarse de que la insulina que se compró esté en el límite de las 30 unidades USP/mg. Posteriormente, se pesan en una balanza de precisión 50 mg de insulina. Se disuelve en un vaso de precipitado de 5 ml con 4 ml de amortiguador de TRIS-HCl 50 mM, pH 8.3 en agitación suave hasta su completa disolución.

A continuación, se introduce el electrodo del potenciómetro y se monitorea continuamente el valor de pH. Con el fin de eliminar cualquier posible micro-agregado se realizó un salto de pH del siguiente modo: Se añade gota a gota una disolución de HCl 1 M hasta llegar a un pH entre 2 y 3 (aproximadamente 150 μ l). La disolución adquiere un aspecto lechoso al pasar por pH 4 y 5 y al llegar a pH 3, se tornará nuevamente translúcida (en ocasiones hace falta aumentar la agitación a fin de conseguir el completo clarificado de la disolución). Una vez llegado a este punto hay que devolver la disolución a pH 8.3 rápidamente, para lo cual se añade gota a gota una solución de NaOH 1 M (aproximadamente 150 μ l).

Para llegar a una concentración de 10 mg mL⁻¹ se aforó a 5 ml. Con el fin de evitar pérdidas debido a restos de la disolución adheridos al electrodo y al vaso de precipitados, se lavan ambos con agua que se usó para aforar. Los 5 ml finales se dividen en alícuotas convenientemente y se congelan a -20°C (hay que tener en cuenta que por precaución una vez descongelada una alícuota ya no se vuelve a congelar).

Los principales factores tomados en cuenta para realizar el experimento fueron:

- Medir la absorbancia en un espectrofotómetro en función del tiempo a una longitud de onda de 650 nm durante 40 minutos.
- Control preciso de la temperatura a la cual se desarrolla el experimento (37°C).
- La concentración final del DTT debe ser 1 mM. Las medidas de actividad varían fuertemente con la concentración de este reactivo, dado que es el encargado de reducir en un primer momento a la Trx. Este reactivo se tiene que preparar en fresco dado que se oxida fácilmente.
- La concentración de nuestro stock de insulina debe ser 10 mg mL⁻¹. De esta concentración depende la amplitud de la cinética, y variaciones en esta amplitud afectan a la velocidad.
- El *amortiguador* de reacción es fosfato de potasio 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 7.0. Hay que tener en cuenta que los valores de actividad dependen fuertemente del pH.
- La variación de la velocidad máxima de agregación con la concentración de la Trx es solo lineal dentro de un rango. Cuando la velocidad es superior a 0.2-0.25 U.A./min se pierde la linealidad con la concentración. Por ello es mejor trabajar con muestras de proteína hasta 3 μM (0.035 mg mL⁻¹) final.

El componente no catalítico de la reacción, es decir, la reducción de los puentes disulfuro de la insulina por el DTT, se obtiene de un experimento en el que no se añade Trx. Si bien a nivel práctico resulta más apropiado obtenerlo por extrapolación de la recta patrón, dado que el tiempo de reducción no catalítico es demasiado largo y terminan apareciendo artefactos que distorsionan los resultados.

Figura 51. Calibración de la columna Superdex 75 HR 10/30, mostrando el perfil de elución de 4 proteínas. En color rojo se muestra el perfil de elución de la mutante Asp-60-Ser con un pico mayoritario de 24 kDa y un pico de elución minoritario de 12 kDa; en color azul se muestra el perfil de elución de la *LvTrx_{silv}* mostrando dos picos de elución, uno de ellos en menor proporción, muestra un peso aproximado de 24 kDa y un pico mayoritario de 12 kDa; en color violeta se muestra el perfil de elución de la Trx de *E. coli*, con un peso aproximado de 12 kDa; por último en color dorado se muestra el perfil de elución de una variante de la proteína fluorescente GFP (por sus siglas en inglés) el cual muestra dos picos, uno de ellos corresponde a un peso de 27 kDa y el otro pico corresponde a un peso de 55 kDa.

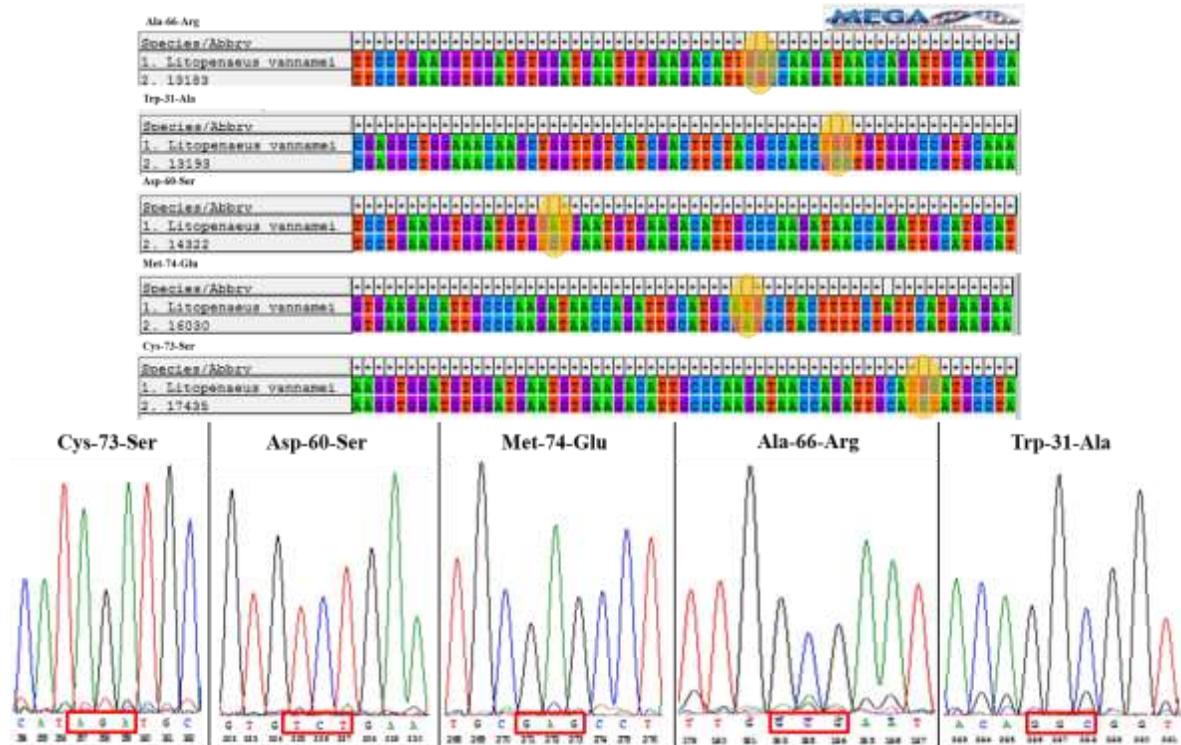


Figura 52. Alineamiento y cromatogramas de secuencia que muestra la sustitución para la generación de las cinco variantes: Cys-73-Ser, Asp-60-Ser, Met-74-Glu, Ala-66-Arg y Trp-31-Ala.

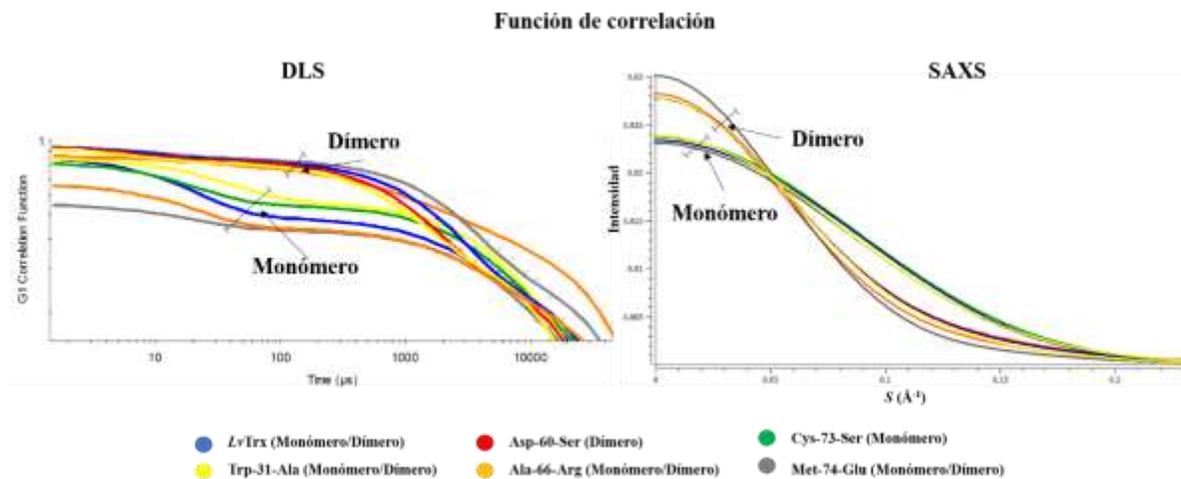


Figura 53. Función de correlación obtenida por DLS y SAXS para las 5 mutantes y la *LvTrx* silvestre.

Tabla 5. Radiación depositada en puentes disulfuro de diferentes proteínas tomada de (Campos-Acevedo & Rudiño-Piñera, 2014).

Disulfide bond	Residue	Solvent accessibility (Å ²)	Absorbed dose in MGy
Thioredoxin LvTrx Dimer			
Cys73-Cys73'	Cys73	23.3	0.013 MGy
	Cys73'	36.5	
ACys32-ACys35	ACys32	0	PDB 3zzx Catalytic site Partially reduced
	ACys35	0.2	
BCys32-BCys35	BCys32	0	
	BCys35	4.2	
Thioredoxin LvTrx Dimer			
Cys73-Cys73'	Cys73	27.9	0.51 MGy
	Cys73'	32.1	
ACys32-ACys35	ACys32	0	PDB 4aj6 Catalytic site reduced
	ACys35	5.4	
BCys32-BCys35	BCys32	0	
	BCys35	4.7	
Thioredoxin LvTrx Dimer			
Cys73-Cys73'	Cys73	20.7	0.67 MGy
	Cys73'	38.8	
ACys32-ACys35	ACys32	0	PDB 4aj7 Catalytic site oxidized
	ACys35	4.4	
BCys32-BCys35	BCys32	0	
	BCys35	3.7	
Thioredoxin LvTrx Dimer			
Cys73-Cys73'	Cys73	27.7	0.019 MGy
	Cys73'	28.3	
ACys32-ACys35	ACys32	0	PDB 4aj8 Catalytic site Partially reduced
	ACys35	0	
BCys32-BCys35	BCys32	0	
	BCys35	0	
Human thioredoxin Monomer			
Cys73	Cys73	62.2	Unkown 1ert Catalytic site reduced
	ACys32-ACys35	14.5	
	ACys35	6.9	
Human thioredoxin Monomer			
Cys73	Cys73	65.6	Unkown 1eru Catalytic site Oxidized
	ACys32-ACys35	6.3	
	ACys35	1.9	
E. coli thioredoxin Monomer			
ACys32-ACys35	ACys32	5.2	Unkown 2trx Catalytic site Oxidized
	ACys35	3.3	
D. melanogaster thioredoxin Monomer			
ACys32-ACys35	ACys32	6.9	Unkown 1xw9 Catalytic site Oxidized
	ACys35	2.8	