



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Producción y caracterización fisicoquímica comparativa de
la triosafosfato isomerasa de tres arqueas del orden
Methanococcales

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RICARDO MUÑIZ TREJO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

*Nadie que enciende una luz la cubre con una vasija, ni la pone debajo de la cama,
sino que la pone en un candelero para que los que entran vean la luz*
Lucas 8:16

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Ciencias, por ofrecerme un lugar al que considero legítimamente como mi segunda casa, y por la asombrosa formación, tanto académica como personal, que recibí en sus recintos durante mi carrera.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade, por el apoyo económico brindado desde mi ingreso al bachillerato hasta el final de mi formación académica. Gracias también por recibirme con los brazos abiertos y ofrecerme su muy valiosa amistad.

Al M. en C. Sergio Romero Romero, por la brillante asesoría ofrecida para el avance de mi proyecto de tesis.

A los miembros de mi jurado por sus muy apreciables comentarios, sugerencias y consejos, que a continuación nombro:

- Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
- Dra. Georgina Regina Garza-Ramos Martínez
- Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
- Dr. Miguel Antonio Costas Basín
- Dr. Enrique García Hernández

A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz y al Dr. Mauricio Trujillo Roldán del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por la asesoría y el préstamo de sus instalaciones y equipo para la expresión en frío de las proteínas evaluadas en este proyecto.

Al Dr. Miguel Antonio Costas Basín del Laboratorio de Biofísicoquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por el préstamo del equipo MicroCal VP-Capillary DSC.

A las técnicas académicas del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), Dra. Isabel Velázquez y M. en C. Laura Álvarez, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

El desarrollo de este proyecto fue financiado por la Facultad de Medicina de la UNAM y por los proyectos PAPIIT IN219913 e IN220516, y CONACYT 254514. Recibí beca para la realización de tesis de los proyectos IN219913 e IN220516.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre, **Edith Trejo**, porque tu asertividad, honestidad y excelente sentido del humor siempre han sido una excelente guía de cómo enfrentarse al mundo. Gracias sobretodo porque si tengo algún problema cuya solución me es elusiva, sé que siempre puedo recurrir a tus consejos, experiencia y acciones para encontrar una respuesta.

A mi hermano, **Eduardo Muñiz Trejo**, porque el lazo que nos une va más allá de la sangre. Charlar contigo es para mí sinónimo de aprender cosas nuevas y crecer como persona en el proceso. De ti aprendí que en la vida se debe ser pragmático, pero que las decisiones tomadas siempre deben estar encaminadas a reducir la injusticia en el planeta.

A mi padre, **Eduardo Muñiz**, por la constancia y el apoyo brindado para que siempre tuviera una buena educación.

Las personas solitarias viven en una búsqueda constante de algo, y aunque no siempre saben qué es, yo encontré justo eso en la amistad de **Alejandro Fábregas**. Chico, gracias por nunca rendirte conmigo, por siempre mirarme a los ojos pese a mis momentos más oscuros; gracias por mostrarme que la vida, la mía, es algo por lo que vale la pena esforzarse.

A mi “hermanito”, **Mario Morales**, porque la convivencia contigo no sólo me ha dejado un sinnúmero de alegrías, también me ha dado lecciones muy valiosas sobre la amistad y las relaciones interpersonales, y me recuerda constantemente el tipo de persona que quiero llegar a ser.

A **Parsifal Islas**, el Cru', porque ya sean paliques o cosas serias, sé bien que contigo siempre voy a aprender algo nuevo y, de paso, reírme como loco. Pero en particular te agradezco por enseñarme que *hace falta un postrecito, ¡Cru'!*

A mi muy querida colega, **Karen Galván**, por los muchos litros de café compartidos, las risas y las extensas pláticas. Los momentos que comparto contigo son de mis recuerdos más preciados.

A **Eugenio Contreras**, porque los derroteros de nuestras conversaciones usualmente derivan en varias de las discusiones más nutridas que tengo. Gracias también porque en esta etapa nueva de mi vida, es grandioso tenerte como camarada y confidente.

A Cecilia Gómez, Aldo Meizoso, Fabiola Duarte, Diego Pérez, Rodrigo Ibarra, Nisa Cuevas y Alexander Pommer, mis apreciados **biomédicos de la generación 2013**, porque su amistad me ha llevado a buscar ser persona y explorar nuevos horizontes. Pero en especial agradezco a **Rodrigo Moreno**, porque no sólo eres de las personas más piantadas que conozco, también eres uno de mis amigos más entrañables. Aquello de ser biomédico honorario no estoy seguro, pero lo que sí sé es que el verdadero honor para mí es conocerlos a todos ustedes.

A mi jefe, **Alejandro Fernández**, por demostrarme que para dedicar una vida a la ciencia no se requiere de un ego endeble e inflado, como lo tienen muchos otros investigadores de nuestra Universidad. Desde que me integré formalmente a su equipo de trabajo me dijo “Esto se trata de aprender juntos” y es algo que se ha cumplido hasta la fecha, muchas gracias por eso.

A **Sergio Romero**, mi madre académica, por tu infinita paciencia al enseñarme a cómo trabajar con proteínas, por resolver mis dudas sobre las cosas que no entendía y, principalmente, por ser de los amigos más confiables con los que cuento.

A **Susana Vázquez** y **Bryan Martínez**, porque no pude tener mejor equipo a mi lado para aprender y hacer experimentos en el laboratorio. Crecer con ustedes como científico ha sido maravilloso. Sin ustedes, no me cabe duda, nada de esto hubiera sido posible.

A mis **amigos y compañeros del LFQIP**, con especial mención a Julio Quintana, Karla Zepeda, Dana Díaz, Diego Granados, Laura Pérez y Sergio Aguirre, por ser parte del mejor lugar de trabajo en el que he estado.

A mis estimados amigos y camaradas de la carrera, que no podría numerar a todos aquí, pero de los cuales escojo nombrar a **Nictée Vitorín** y **Fernando Pedraza**, con los que compartí momentos muy especiales a lo largo de una carrera que volvería a cursar sin dudarlo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	9
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
La vida en condiciones extremas.....	12
Mecanismos de termoestabilidad en proteínas.....	13
La evolución en la resolución de problemas de la bioquímica.....	14
ANTECEDENTES.....	15
El modelo de estudio: la triosafosfato isomerasa.....	15
La TIM y la temperatura.....	17
Problemas de interpretación en la evolución molecular.....	20
¿Cómo estudiar adaptaciones?.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Análisis filogenético de las TIMs del dominio Archaea.....	28
Subclonación de los genes seleccionados en vector de expresión.....	28
Pruebas de sobre-expresión.....	29
Purificación en condiciones desnaturalizantes.....	30
Sobre-expresión a bajas temperaturas y purificación.....	32
Purificación de MjTIM.....	33
Determinación de parámetros catalíticos.....	33
Caracterización espectroscópica de las proteínas.....	34
Determinación del estado oligomérico.....	34
Desnaturalización por temperatura.....	35
Desnaturalización por agentes químicos.....	35
Tratamiento de los datos.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Elección de las proteínas a estudiar.....	38
Parte I: TIMs mesófilas.....	44

Subclonación y primeras pruebas de sobre-expresión	44
Expresión de MaTIM y MmaTIM en cuerpos de inclusión	45
Purificación en condiciones desnaturalizantes	47
Caracterización fisicoquímica de las TIMs recuperadas de cuerpos de inclusión	49
Sobre-expresión a bajas temperaturas y purificación.	51
Consideraciones sobre la expresión heteróloga de proteínas	53
Parte II: TIM hipertermófila.....	57
Pruebas de expresión y purificación.....	57
Parámetros catalíticos y caracterización espectroscópica de MjTIM.....	59
Desnaturalización por temperatura.....	65
Desnaturalización por agentes químicos.....	70
Consideraciones finales acerca del trabajo realizado	74
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS	78
REFERENCIAS	79
ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Tabla	Título	Página
1		La topología de barril TIM	15
2		La triosafosfato isomerasa	16
3		Alineamiento de TIMs de los tres dominios de la vida	18
	1	TIMs de arqueas estudiadas hasta la fecha (21 de febrero de 2017)	19
4		Estructura cristalográfica de la TIM de <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	20
5		Circularidad en las hipótesis adaptacionistas	22
6		Mecanismo acoplado para medir actividad de la TIM	33
7		Hipótesis sobre la clasificación de la vida	39
8		Árboles filogenéticos de la TIM de arqueas	40
9		Árbol filogenético de Methanococcales	42
10		Alineamiento de las secuencias elegidas	43
	2	Porcentaje de identidad de las secuencias elegidas	43
	3	Propiedades importantes de las secuencias a caracterizar	43
11		Digestiones de los plásmidos	44
12		Pruebas de sobre-expresión a 37°C	45
13		Pruebas de sobre-expresión en distintas cepas a 37°C	46
14		Purificación en condiciones desnaturalizantes de MaTIM	48
15		Cinéticas enzimáticas de MaTIM y MmaTIM	49
	4	Parámetros catalíticos de las TIMs de mesófilos	50
16		Espectro de dicroísmo circular de MaTIM y MmaTIM	50
	5	Deconvolución de los espectros de DC de las TIMs de mesófilos	51
17		Producción de las TIMs mesófilas a bajas temperaturas	52
18		Purificación de MmaTIM expresada a bajas temperaturas	53
	6	Purificación de otras TIMs de arqueas	56
19		Sobre-expresión de MjTIM en distintas cepas de <i>E. coli</i>	57
20		Purificación de MjTIM no optimizada	58
21		Modelo de MjTIM con etiqueta de histidinas	59
22		Cinética de MjTIM a 25°C	60
23		Cinéticas de MjTIM a diferentes temperaturas	60
24		Gráfico de Arrhenius de la actividad catalítica de MjTIM	61
	7	Parámetros catalíticos de MjTIM y otras TIMs de arqueas	61
25		Espectro de DC de MjTIM	63
	8	Deconvolución de los espectros de DC de MjTIM	63
26		Cromatografía de exclusión molecular analítica de MjTIM	64
	9	Determinación del estado oligomérico de la MjTIM purificada	64
27		Curva de desnaturalización térmica de MjTIM	65
28		Desnaturalización térmica de MjTIM a distintas velocidades de barrido	66
	10	Parámetros promedio del ajuste de las trazas calorimétricas a un modelo de dos estados irreversible	66
29		Procedimientos utilizados para calcular la energía de activación	68
	11	Energía de activación calculada con distintos métodos	69
30		Desnaturalización de MjTIM con cloruro de guanidinio	70
31		Desnaturalización de MjTIM con urea	71
	12	Valores de C_m para diferentes TIMs	72
	13	Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
BCA	Ácido bicinconínico
C_m	Concentración media de desnaturalización aparente
C_p^{exc}	Capacidad calorífica en exceso
D.O.	Densidad óptica
Da	Daltons
DC	Dicroísmo circular
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DSB	Buffer de solución desnaturalizante
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	1,4-Ditiotreitol
E_A	Energía de activación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G3P	D-gliceraldehido-3-fosfato
GdmHCl	Hidrocloreuro de guanidinio
GoTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Gemmata obscuriglobus</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
k_{cat}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LEW	Buffer de lisis-equilibrio-lavado
LmTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>
MaTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Methanococcus aeolicus</i>
MjTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
MmaTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Methanococcus maripaludis</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NpTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Nostoc punctiforme</i>
PDB	Protein Data Bank
PfTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Plasmodium falciparum</i>
PfuTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
R	Constante de los gases ideales
rpm	Revoluciones por minuto
T.O.	Temperatura óptima de crecimiento
TbTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TED	Buffer de trietanolamina, EDTA y DTT
TIM	Triosafofosfato isomerasa
T_m	Temperatura media de desnaturalización
TmTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Thermotoga maritima</i>
TonTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Thermococcus onnurineus</i>
T_s	Temperatura de máxima estabilidad
TtxTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Thermoproteus tenax</i>
v	Velocidad de barrido
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima
α -GDH	α -Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
ΔC_p	Cambio en la capacidad calorífica a presión constante
ΔH	Cambio en entalpía

RESUMEN

Los seres vivos se enfrentan continuamente a una serie de retos a su supervivencia, para lo cual han desarrollado diversas estrategias adaptativas. En el caso de los seres que viven en temperaturas extremas, la naturaleza de sus proteínas ha tenido que cambiar con el propósito de que puedan desempeñar su actividad biológica cabalmente sin perder su estructura nativa. Los mecanismos físicos por los cuales esto ocurre son poco claros y se necesita generar más información sobre el proceso de adquisición de la termoestabilidad en estas macromoléculas. Para resolver esta pregunta se eligió trabajar con la enzima triosafosfato isomerasa (TIM), que por su ubiquidad y robustez mutacional es un excelente modelo para estudiar la evolución en proteínas. Específicamente se trabajó con la TIM de arqueas, ya que en este grupo se encuentran los organismos que viven en temperaturas más elevadas. En aras de hacer un estudio evolutivo adecuado, se optó por utilizar el método filogenético comparativo para corroborar y definir la existencia de adaptaciones en las TIMs termoestables.

A través del análisis filogenético de 242 secuencias de TIMs de arqueas se seleccionaron tres TIMs de las siguientes especies del orden Methanococcales: los mesófilos *Methanococcus aeolicus* (MaTIM) y *Methanococcus maripaludis* (MmaTIM), y el hipertermófilo *Methanocaldococcus jannaschii* (MjTIM). MaTIM y MmaTIM no se pudieron expresar de manera soluble a 37°C en células de *E. coli*, por lo que se establecieron protocolos de purificación en condiciones desnaturalizantes y a bajas temperaturas, cuyos rendimientos no permitieron una caracterización fisicoquímica de estas secuencias. MjTIM se expresó solublemente y se obtuvieron datos sobre su actividad catalítica, estado oligomérico, desnaturalización térmica y química. Esta enzima tetramérica tiene los valores de temperatura media de desnaturalización (111.8°C) y energía de activación (971.63 kJ mol⁻¹) más altos reportados para una TIM, además de tener una eficiencia catalítica elevada a 25°C (1.4 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹).

La alta termoestabilidad y actividad catalítica de MjTIM plantean algunas dudas sobre el proceso evolutivo de estos parámetros con respecto a sus parientes mesófilos, especialmente si se considera que el ancestro de todos los Methanococcales probablemente era un organismo termófilo, lo que vuelve relevante evaluar las fuerzas evolutivas implicadas en la estabilidad a altas temperaturas de las proteínas.

INTRODUCCIÓN

La vida en condiciones extremas

Desde la cima de la montaña más alta hasta el rincón más recóndito en el océano, existe una diversidad enorme de seres vivos que crecen y se reproducen continuamente desde hace miles de millones de años. En esta distribución geográfica tan grande es común ver que la vida florece aun en condiciones que, desde nuestra perspectiva, parecen extremas. Estos extremos pueden ser en temperatura, radiación, presión, salinidad, pH, desecación, etc. Al conjunto de organismos que viven en este tipo de condiciones se les llama *extremófilos*, y hablar de ellos es sinónimo de muchos microorganismos procariontes, los cuales, a pesar de su diferenciación morfológica tan limitada, cuentan con una serie de mecanismos estructurales y químicos que les permiten habitar prácticamente en todos los ambientes. Los extremófilos rara vez pueden sobrevivir en condiciones menos intensas, esto se debe principalmente a que sus adaptaciones para la vida en esas condiciones les hacen ser sumamente especializados y no les permiten vivir de otra manera (Schlegel & Jannasch, 2006).

La forma más fácil de sobrellevar los ambientes extremos es mantener esos ambientes “fuera” de la célula. Para la radiación y el daño oxidativo, se producen diversos antioxidantes, pigmentos y sistemas específicos para la reparación del daño. En condiciones de alta salinidad o desecación, los organismos regulan la cantidad de osmolitos en el medio intracelular para mantener la cantidad de agua necesaria para el funcionamiento adecuado de sus macromoléculas. Aquellos organismos que viven en ambientes de pH extremos mantienen un pH interno muy similar al de los organismos que viven con condiciones más neutras, lo que se logra a través de distintos mecanismos como la sobre-expresión de distintas bombas de protones o a su capacidad de amortiguamiento químico interno (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Sin embargo, existen condiciones ambientales que son imposibles de mantener apartadas del medio celular, la temperatura es un buen ejemplo. Según su temperatura óptima de crecimiento (T.O.), los organismos se clasifican en: *psicrófilos*, por debajo de 15°C; *mesófilos*, entre 15 y 60 °C; *termófilos*, entre 60 y 80°C; e *hipertermófilos*, por arriba de los 80°C. Termófilos e hipertermófilos tienen que lidiar contra la fluidez incrementada de sus membranas a altas temperaturas, y con la desnaturalización y descomposición

química de sus ácidos nucleicos y proteínas. Para mantener la integridad celular, estos organismos cambian la composición lipídica de sus membranas con respecto a sus parientes mesófilos, favoreciendo el uso de ácidos grasos saturados, por ejemplo (Rothschild & Mancinelli, 2001). El incremento en la concentración de sales divalentes protege al DNA de la depurinación y la hidrólisis, y una proporción de guaninas y citosinas incrementan la estabilidad térmica, o *termoestabilidad*, de los ácidos nucleicos (Rothschild & Mancinelli, 2001). Para lípidos y ácidos nucleicos, las estrategias adaptativas utilizadas por los termófilos e hipertermófilos son relativamente las mismas, pero en el caso de las adaptaciones de las proteínas a la temperatura los mecanismos implicados son distintos.

Mecanismos de termoestabilidad en proteínas

Las proteínas de organismos termófilos muestran una estabilidad térmica intrínseca elevada, pero sus estructuras son muy similares con sus homólogos mesófilos. Su termoestabilidad ha sido sujeta a múltiples estudios teóricos y experimentales, pese a ello no se reconoce ninguna estrategia adaptativa general por la cual las proteínas termófilas adquieran una termoestabilidad tan elevada (Jaenicke & Sterner, 2013; Sadeghi et al, 2006). La razón principal de esto es que, al parecer, la estabilidad a la temperatura es una característica que surge de una miríada de modificaciones estructurales en la proteína, y estas modificaciones no se presentan de manera consistente entre las distintas familias, e incluso llegan a ser diferentes entre los miembros de una misma familia (Szilágyi & Závodszy, 2000). La termoestabilidad se ha atribuido, entre otras cosas, a cambios en la composición de aminoácidos de la secuencia, particularmente en el incremento en el contenido de aminoácidos cargados e hidrofóbicos y al decremento de residuos polares sin carga; al incremento en el número de prolinas en asas, mejor empaquetamiento de los átomos, acortamiento de asas, menor número de cavidades, cavidades más pequeñas, incremento en la superficie de área oculta por oligomerización, incremento en el contenido de hélices, incrementos en el área de superficie polar, incremento en el número de puentes de hidrógeno y puentes salinos, entre otros (Razvi & Scholtz, 2006; Sadeghi et al., 2006; Kumar & Nussinov, 2001; Szilágyi & Závodszy, 2000).

La evolución en la resolución de problemas de la bioquímica

Uno de los objetivos más importantes en la bioquímica es comprender cómo la secuencia de una proteína determina sus propiedades y función. Una pregunta derivada sería *¿cuáles son las bases fisicoquímicas de la termoestabilidad en las proteínas?* Una manera de acercarse a la respuesta es explorando experimentalmente sobre el espacio de secuencias de proteínas; sin embargo, el espacio posible de secuencias es tan vasto que es imposible analizar más que una muy pequeña porción del mismo. El análisis evolutivo resulta una herramienta complementaria muy potente para acercarse a una posible respuesta. A diferencia de lo que podemos aspirar a lograr en un laboratorio, la evolución de proteínas puede verse como un “experimento” masivo sobre la diversificación y optimización de la estructura y función de una secuencia polipeptídica que se ha llevado de manera paralela en el curso de miles de millones de años. Sus resultados persisten en los patrones de conservación y variación en las secuencias encontradas hoy en día. El estudio bioquímico, desde una perspectiva evolutiva, evalúa el papel de las fuerzas evolutivas sobre una propiedad física y responde cómo los cambios en la secuencia de aminoácidos durante la evolución moldearon una función o una propiedad específica de una proteína (Harms & Thornton, 2013). En este trabajo se busca hacer un análisis evolutivo de la termostabilidad utilizando como modelo de estudio la enzima triosafosfato isomerasa.

ANTECEDENTES

El modelo de estudio: la triosafosfato isomerasa

Dentro de las diferentes conformaciones tridimensionales que pueden tomar las secuencias polipeptídicas, el barril TIM es el tipo de plegamiento que parece ser el más recurrente en la naturaleza, ya que se encuentra en cerca del 10% de las proteínas reportadas en el Protein Data Bank. El plegamiento tipo barril TIM (también llamado barril $(\beta/\alpha)_8$) consiste en un motivo β -asa- α -asa repetido ocho veces (ver Figura 1), con las ocho hebras β paralelas al interior del barril, cubiertas por ocho hélices α en el exterior (Anantharaman, Aravind, & Koonin, 2003; Höcker, Schmidt, & Sterner, 2002; Wierenga, 2001). La mayoría de los barriles TIM funcionan como enzimas y esta topología se encuentra en cinco de las seis familias definidas por la *Enzyme Commission* (Nagano, Orengo, & Thornton, 2002). Los barriles TIM, sin importar el tipo de reacción que catalicen, siempre presentan su sitio activo en la cara C-terminal, y en muchos de ellos se ha observado un motivo de unión a fosfato en la hebra β_7 , lo anterior sugiere que este plegamiento tiene un origen monofilético (Copley & Bork, 2000). Debido a su enorme variedad en funciones, su origen evolutivo común y a su ubicuidad en distintos tipos de proteínas, el barril TIM representa un tipo de plegamiento de gran interés evolutivo y biotecnológico.

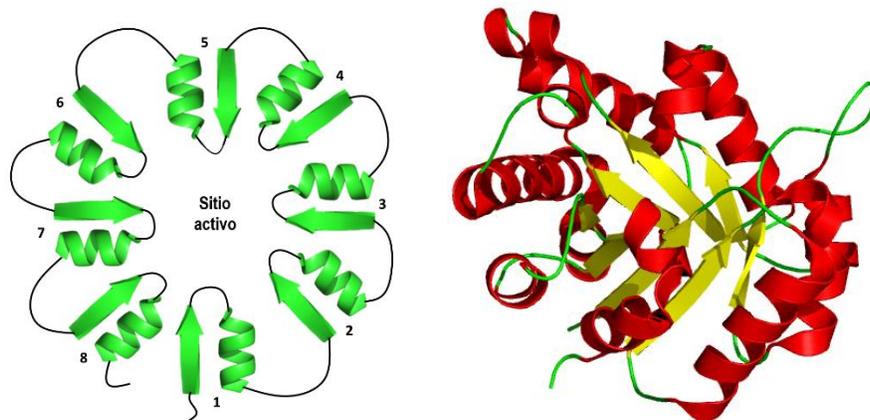


Figura 1. La topología de barril TIM. a) Representación esquemática de la estructura secundaria de un barril TIM. b) Representación tridimensional de un barril TIM. En rojo y rodeando la estructura se encuentran las hélices α , en amarillo y al interior de encuentran las hebras β , en verde las asas que conectan la estructura (PDB: 4Y90 cadena A)

El plegamiento de barril TIM fue nombrado así por la primera enzima en la que se observó: la triosafosfato isomerasa (TIM, EC 5.3.1.1). La TIM es una enzima importante en la glucólisis, gluconeogénesis, síntesis de triglicéridos y en el ciclo de Calvin. Cataliza la interconversión reversible del D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y es considerada, de manera histórica, una enzima catalíticamente perfecta (Peimbert *et al.*, 2008). En la naturaleza, la TIM siempre se encuentra en una forma oligomérica, principalmente como un *homodímero*, conformado por monómeros de 250 residuos de longitud en promedio (Figura 2). Por su participación en la vía glicolítica, esta enzima se encuentra conservada en la gran mayoría de los seres vivos, aunque los porcentajes de identidad entre las secuencias de distintas especies pueden ser tan elevados como 98.4% entre la TIM de humano y de conejo, o tan bajos como 12% entre la TIM de *Plasmodium falciparum* y la de la arquea *Pyrococcus furiosus* (Peimbert *et al.*, 2008).

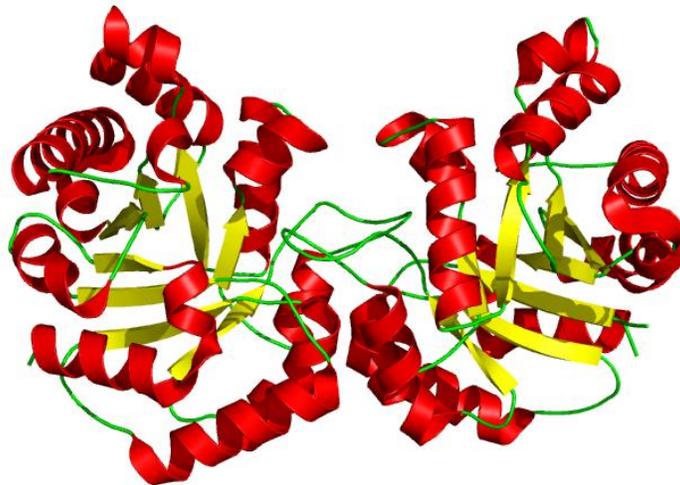


Figura 2. La triosafosfato isomerasa. Estructura tridimensional de una triosafosfato isomerasa dimérica arquetípica. Hélices α en rojo, hebras β en amarillo, loops en verde (PDB: 4Y90)

Se dice que el fenotipo de un organismo es robusto cuando no cambia pese a que haya perturbaciones. Las perturbaciones pueden ser de tipo ambiental, como un incremento en la temperatura o en la disponibilidad de nutrientes; o por mutaciones, que se dan a nivel de genotipo. Estudiar el efecto de las mutaciones a través de la herencia es relativamente sencillo, por lo que son de gran interés en una gran parte de las investigaciones en biología evolutiva. Mientras más robusta es una molécula, es más probable que las mutaciones que en ella sucedan sean neutras, y por lo tanto no cambien

su estructura o función. La robustez, en consecuencia, se podría interpretar como un factor que afecta la capacidad de divergencia de un fenotipo; sin embargo, la evidencia empírica sugiere un fenómeno completamente opuesto. La capacidad de un fenotipo de explorar de manera neutral su red genotípica permite que las poblaciones de organismos tengan una gran variedad de fondos genéticos y por lo tanto un potencial adaptativo (o *evolucionabilidad*) superior (Siegal & Leu, 2014; Wagner, 2012). Podemos ver a la TIM como un ejemplo claro de esta *robustez mutacional*. Además del gran número de secuencias que conducen a la síntesis de esta proteína en distintas especies, Silverman y colaboradores (2001) demostraron que al mutar la TIM de levadura en 182 posiciones distintas, 142 mutantes exhibían una actividad catalítica similar a la nativa. Por estas razones, el estudio evolutivo de esta enzima puede darnos mucha información sobre la naturaleza de algunos procesos adaptativos.

La TIM y la temperatura

La TIM es buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares por los cuales las proteínas se adaptan a temperaturas elevadas. Existen algunos estudios al respecto. La TIM de la bacteria termófila *Bacillus stearothermophilus* (T.O.: 55°C) es termoestable, y presenta las siguientes características respecto a otras TIMs mesófilas: número incrementado de prolinas, reducción en área y número de sus cavidades; e incremento en la superficie expuesta al solvente que se oculta por la dimerización de los monómeros (Delboni *et al.*, 1995). La TIM de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* (T.O.: 80°C), por su parte, presenta otros mecanismos para alcanzar la estabilidad térmica. Esta enzima se encuentra fusionada por su extremo N-terminal con el extremo C-terminal de otra enzima. La fusión parece incrementar la estabilidad intrínseca del complejo, pero la contribución más importante a su termoestabilidad está dada por cambio en su estructura cuaternaria, ya que esta TIM se asocia como un *homotetrámero*, lo que incrementa la superficie oculta durante el proceso de oligomerización (Maes *et al.*, 1999).

La extremofilia se relaciona frecuentemente con especies del dominio Archaea. Una de las razones es que los organismos que soportan las temperaturas más elevadas pertenecen a este clado (Battistuzzi & Hedges, 2009). Las TIMs provenientes de arqueas presentan la particularidad de ser secuencias más cortas por casi 20 aminoácidos en dos regiones definidas cuando se hacen alineamientos múltiples con las TIMs de bacterias y eucariontes (Bräsen *et al.*, 2014), como se observa en la figura 3. Esta característica hace

que las TIMs de arqueas se separen en un grupo monofilético bien definido (Ronimus & Morgan, 2003).

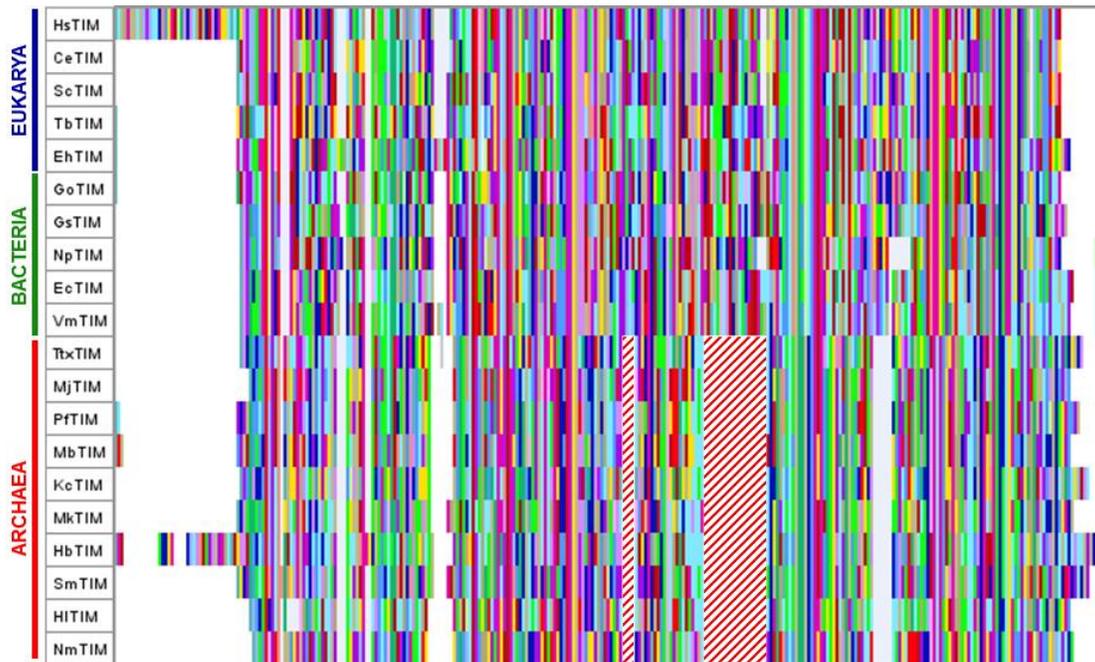


Figura 3. Alineamiento de TIMs de los tres dominios de la vida. El alineamiento se realizó con MAFFT (Kato & Standley, 2013). Se indica de cuál dominio de la vida proviene cada secuencia. Con líneas rojas diagonales se indican las regiones del alineamiento donde las secuencias de arqueas no presentan aminoácidos respecto a Bacteria y Eukarya. Visualización con Mesquite (Maddison & Maddison, 2017).

Los estudios de caracterización de TIMs de arqueas son relativamente escasos y se tiene información sobre ocho especies (ver tabla 1). La arquea mesófila *Methanobacterium bryantii* (Kohlhoff, Dahm, & Hensel, 1996) y el psicrófilo *Methanococcoides burtonii* (Dhaunta *et al.*, 2013) tienen TIMs homodiméricas; sin embargo, las TIMs de la mayoría de las arqueas termófilas o hipertermófilas se asocian en *homotetrámeros* a partir de la dimerización de dímeros (Figura 4). Este incremento en el número del estado oligomérico se ha sugerido como el mecanismo adaptativo por el cual las TIMs de arqueas se mantienen estables a temperaturas elevadas (Walden *et al.*, 2001, 2004).

Tabla 1. TIMs de arqueas estudiadas hasta la fecha (21 de febrero de 2017)

Especie	Hábitat	Estructura tridimensional (Código PDB)*	Estado oligomérico	Parámetros catalíticos	Vías de plegamiento †	Referencias
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Hipertermófilo	2H6R	Tetrámero	Sí	No	Gayathri et al., 2007
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Hipertermófilo	1HG3	Tetrámero	Sí	No	Sharma & Guptasarma, 2015 Walden et al., 2001
<i>Methanococcoides burtonii</i>	Psicrófilo	No	Dímero	No	No	Dhaunta et al., 2013
<i>Methanobacterium bryantii</i>	Mesófilo	No	Dímero	No	No	Kohlhoff et al., 1996
<i>Methanothermus fervidus</i>	Termófilo	No	Tetrámero	Sí	No	Kohlhoff et al., 1996
<i>Thermococcus onnurineus</i>	Termófilo	No	Tetrámero	Sí	No	Sharma & Guptasarma, 2015
<i>Thermoproteus tenax</i>	Termófilo	1W0M	Dímero-Tetrámero	Sí	No	Walden et al., 2004
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Termófilo	5CSR 5CSS	Dímero	Sí	No	Park et al., 2016

*Si la proteína tiene estructura tridimensional depositada en el Protein Data Bank (PDB) se indica el código con el que se encuentran.

†Se observa que para ninguna TIM de arqueas se tienen vías de plegamiento descritas.

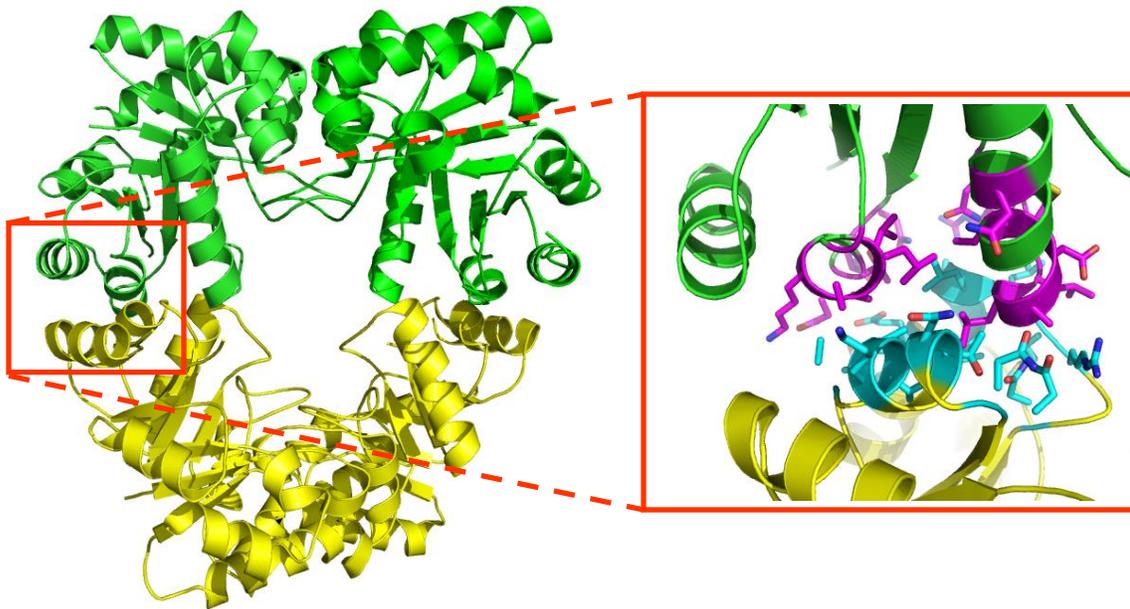


Figura 4. Estructura cristalográfica de la TIM de *Methanocaldococcus jannaschii*. Los tetrámeros de la TIM de arqueas se asocian formando un dímero de dímeros, mostrados en la figura mediante distintos colores. Se hace un acercamiento a la superficie de tetramerización, donde la asociación entre subunidades está dada por puentes de hidrógeno y enlaces de Van der Waals (PDB: 2H6R).

Problemas de interpretación en la evolución molecular

La adquisición de la termoestabilidad es un proceso regido por la selección natural, ya que la temperatura ejerce una presión de selección fuerte sobre los organismos. Lo anterior se comprueba con la correlación positiva que existe entre la temperatura media de desnaturalización (T_m) de una proteína y el hábito de vida del organismo del que proviene (Hart *et al.*, 2014). Los estudios de termoestabilidad suelen hacer comparaciones detalladas de las diferencias biofísicas y de secuencia entre proteínas mesófilas y termófilas. Dichas diferencias se suelen interpretar como productos de la selección durante el proceso de adaptación a ambientes de altas temperaturas. No obstante, explicaciones de esta naturaleza corresponden a un pensamiento *adaptacionista* (Gould & Lewontin, 1979). Un argumento adaptacionista interpreta a la selección natural como el agente causal más importante en toda forma, función o comportamiento orgánico, y le resta importancia a las limitaciones explicativas de esta fuerza evolutiva. Las hipótesis evolutivas propuestas desde una postura adaptacionista carecen de fundamento científico, ya que no reflejan lo que se sabe acerca del proceso evolutivo y de las diversas fuerzas que lo moldean, como lo son la deriva génica, el flujo

génico y los estreñimientos ontogenéticos (para más información ver material anexo). Así, las diferencias entre proteínas termófilas y mesófilas se pueden deber a otros procesos evolutivos además de la selección natural (Hart *et al.*, 2014; Gould & Lewontin, 1979).

Una de las principales críticas que Gould y Lewontin (1979) hacen de los escenarios adaptacionistas generan narrativas que caen en falacias *ad hoc* (las llamadas *just-so stories* en inglés); en otras palabras, dan explicaciones “elegantes” que no se pueden falsificar y son aceptadas no por su evidencia, sino porque parecen plausibles (Olson & Arroyo-Santos, 2015; Gould & Lewontin, 1979). Este tipo de narrativas se critican porque son argumentos circulares y tienen la libertad de aplicarse a cualquier situación. La circularidad en un argumento adaptacionista se refiere a que la presencia de cierto carácter en un organismo se utiliza como única evidencia para inferir variación heredable en una población ancestral y un régimen selectivo que favoreció algunas variantes sobre otras, este escenario selectivo hipotético explica la presencia del carácter observado, y la única evidencia para dicho escenario es la presencia del carácter. Un buen ejemplo se encuentra en el caso del cuello largo de las jirafas. La historia consiste en que la selección favoreció variantes con los cuellos más largos en una población ancestral de jirafas de cuellos relativamente cortos como resultado de su capacidad de acceder mejor al alimento. Los cuellos de las jirafas actuales son largos como resultado de esta selección natural inobservada aplicada sobre la variación heredable ancestral de la longitud del cuello, y esta selección debió ocurrir porque los cuellos de las jirafas actuales son largos y les ayudan a comer de las hojas de los árboles altos (Olson & Arroyo-Santos, 2015; ver figura 5).

Otro de los problemas que Gould y Lewontin denuncian en su artículo seminal de las pechinas de la capilla de San Marcos (1979) es la “atomización del fenotipo”. Eso hace referencia al acto de dividir a un organismo en un sinnúmero de caracteres, y esos caracteres sean explicados como estructuras óptimamente diseñados por la selección natural por sus funciones; sin embargo, los organismos son unidades integradas, no colecciones de objetos discretos. Definir qué es y qué no es un carácter biológico no es un tema trivial, pero de manera general, la atomización del fenotipo se hace de maneras muy inapropiadas. Lewontin (1978) mencionaba el ejemplo de la barbilla humana. La evolución morfológica humana se puede describir generalmente como un proceso de

progresión neoténica; es decir, los adultos e infantes humanos asemejan más a las formas fetales y jóvenes de los chimpancés que a sus formas adultas. La excepción a esta regla de neotenia humana es la barbilla, que crece relativamente más grande en seres humanos, mientras que los chimpancés permanecen sin ella. ¿Cuál es la ventaja adaptativa de tener una barbilla pronunciada? La respuesta es ninguna. La barbilla es un subproducto de la interacción de los procesos del desarrollo que dan origen a la mandíbula y a los dientes, por lo que la barbilla como carácter es una construcción mental más que una unidad real de la evolución, así que no es necesario asignarle un valor adaptativo.

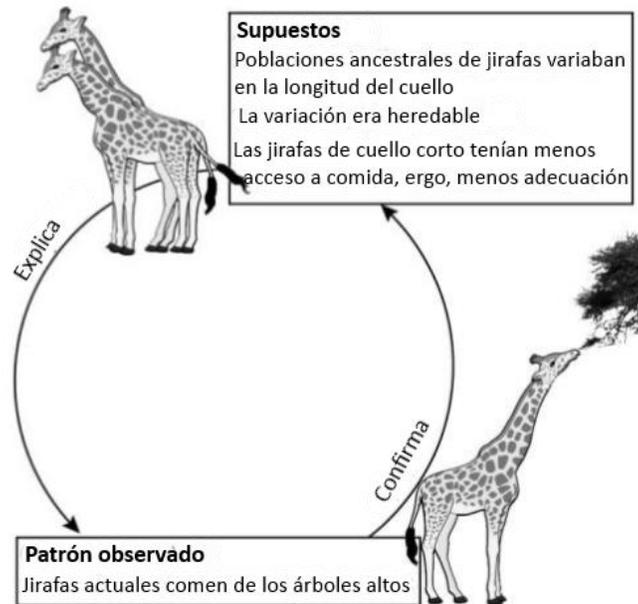


Figura 5. Circularidad en las hipótesis adaptacionistas. (Modificado de Olson & Arroyo-Santos, 2015).

En el caso de la TIM de arqueas se asume que la tetramerización es la adaptación por la cual se adquiere termoestabilidad, pero este supuesto es precipitado. Como prueba de ello se sabe que la TIM de *Thermoproteus tenax* no es un homotetrámero estricto, sino que se encuentra en un equilibrio dímero inactivo - tetrámero activo, siendo ambas formas estables a altas temperaturas (Walden *et al.*, 2004). La TIM de *Thermoplasma acidophilum*, por otro lado, es un dímero que no tetrameriza y su estabilidad parece estar dada por una estructura compacta con asas reducidas (Park *et al.*, 2016). Como se mencionó, la TIM es una enzima con gran robustez mutacional, eso implica que los cambios neutros en su secuencia son comunes y su potencial adaptativo es elevado, por

lo que hacen faltan estudios con una interpretación evolutiva adecuada que permitan corroborar cuáles cambios se dieron como consecuencia de la adaptación a la vida a altas temperaturas.

Las hipótesis adaptacionistas, como se mencionó antes, consideran que la selección natural es la fuerza evolutiva más importante y resta poca importancia a otras fuerzas evolutivas. Esa forma de pensamiento pertenece a una corriente de pensamiento llamada adaptacionismo empírico, y es la forma en cuestión que Gould y Lewontin (1979) criticaban. El adaptacionismo metodológico propone ver a la adaptación no como la explicación de un carácter biológico, sino como la forma de hacer investigación al respecto de ello. Esta corriente genera hipótesis que sugieren que un carácter *X* es una adaptación para *Y* condición y somete a prueba estas hipótesis para corroborar su veracidad. Así, asumiendo que todos los caracteres son producto de selección natural y estudiándolos como tal podemos reconocer aquellos que son genuinas adaptaciones y descubrir el verdadero estatus e historia de aquellos que no lo son, cualquiera que éste sea (Lewens, 2009). En aras de entender e identificar los procesos evolutivos implicados en la evolución de la termoestabilidad en la TIM de arqueas (o de cualquier otra proteína o fenómeno de interés evolutivo), este trabajo propone evaluar las propiedades fisicoquímicas de estas proteínas desde la perspectiva del adaptacionismo metodológico. Para lograrlo es importante conocer cuáles son las metodologías que existen para comprobar el estatus de un carácter como una adaptación.

¿Cómo estudiar adaptaciones?

El estudio de la adaptación busca entender la adecuación entre la forma y función de un organismo en su entorno. Existen tres maneras de estudiar la adaptación (Olson & Arroyo-Santos, 2015; Olson & Rosell, 2015):

1. El *método poblacional* estudia la adecuación de manera directa a través de las diferencias asociadas con la variación heredable entre los caracteres de una especie. Un ejemplo de este tipo de estudios lo podemos encontrar en las flores del género *Impatiens*, donde se supone que los espolones que generan el néctar floral tienen rol evolutivo importante en la diversidad floral y la coadaptación planta-polinizador. Un estudio examinó la variación en el grado de curvatura de los espolones de dos especies diferentes del género *Impatiens* para determinar si esta

característica se podría explicar adaptativamente. El estudio demostró que mientras más curvos eran los espolones, mayor era el contacto del polen con los colibríes que visitaban las flores, incrementando la adecuación de la planta (Travers, Temeles & Pan, 2003).

2. El *método de optimalidad* hace predicciones sobre la configuración de máxima adecuación de un carácter dados ciertos criterios biofísicos establecidos por el autor, y se evalúa la concordancia entre el modelo y lo observado. Kacelnik *et al.*, (1986) generaron un modelo matemático para predecir la recolecta de néctar de abejas considerando la maximización de la relación entre la energía que se aporta al panal y la energía gastada por la abeja obrera individual, encontrando una correlación entre la capacidad observada de carga de néctar y la capacidad de carga generada por la simulación.
3. El *método de la convergencia* analiza la homoplasia de caracteres en un contexto selectivo parecido entre organismos lejanamente emparentado. Un ejemplo de esto se encuentra en los peces tropicales de la familia Pieridae y Heliconidae, que desarrollaron coloración de manera independiente, y esta coloración depende de su hábitos de vida, por ejemplo, los peces rojos de estas familias son predominantemente nocturnos, y los grises son de actividad diurna (Longley, 1916).

El método de la convergencia tiene otra expresión llamada *método comparativo filogenético*, el cual analiza la convergencia de manera cuantitativa a través de métodos estadísticos. A diferencia del anterior, este método sí incorpora información acerca del parentesco de las especies al estimar la asociación estadística en el valor adaptativo de una característica en un grupo de organismos que no necesariamente comparten el mismo ambiente. Este método también nos habla de convergencia, ya que nos dice si la presencia de una característica en una especie dada en ciertas condiciones se da *independientemente* de sus relaciones de parentesco (Olson & Arroyo-Santos, 2015; Olson & Rosell, 2015).

El análisis de la convergencia es el método más utilizado para evaluar si un carácter tiene valor adaptativo. Su uso puede brindarnos información importante sobre los

orígenes evolutivos de la estabilidad de las proteínas a altas temperaturas. Un antecedente importante sobre el uso del método comparativo filogenético en el estudio de la termoestabilidad lo encontramos en el trabajo de Hart y colaboradores (2014). En este artículo los autores evaluaron la termoestabilidad en la ribonucleasa H1 de bacterias mesófilas y termófilas, utilizando el método comparativo filogenético. En él descubrieron que si bien existe una correlación estadística entre el incremento en la T_m y los ambientes de alta temperatura, los parámetros fisicoquímicos que determinan la T_m , como lo son el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p), la temperatura de máxima estabilidad (T_s) y el cambio en entalpía del proceso de desplegamiento (ΔH), no correlacionan estadísticamente con el hábito de vida del organismo para estas proteínas, por lo que los mecanismos de estabilización no fueron moldeados por la selección natural, sino, probablemente, por cambios neutrales.

Este trabajo busca utilizar el método comparativo filogenético con una caracterización fisicoquímica de la TIM de arqueas de hábitats distintos, en un contexto filogenéticamente relevante, con el propósito de tratar de entender mejor la termoestabilidad desde una perspectiva evolutiva en esta familia tan importante de proteínas.

JUSTIFICACIÓN

Con el advenimiento de la biología molecular y la promesa de que esta disciplina era suficiente para explicar la complejidad de los sistemas vivos, la biología se fragmentó, no sólo en lo disciplinario, sino también en lo institucional, entre la biología evolutiva, que busca dar explicaciones de carácter histórico, y la bioquímica, que interpreta la vida en términos de sus causas físicas. Esta división ha afectado el análisis de muchos fenómenos biológicos, ya que los bioquímicos suelen tener una noción errónea de algunos conceptos evolutivos básicos, y los biólogos evolutivos no son capaces de entender a las moléculas como partículas funcionales cuyo comportamiento se entiende a través de sus propiedades físicas. Con el tiempo, nuevas estrategias experimentales que buscan superar este cisma han surgido, e incorporan información de ambas escuelas para la resolución de distintos problemas (Harms & Thornton, 2013).

Este trabajo busca comprender las bases moleculares de la termoestabilidad de las proteínas desde un punto de vista evolutivo. La intención de utilizar este enfoque es tratar de abarcar la gran complejidad histórica y físicoquímica propia del fenómeno de adquisición de la estabilidad a la temperatura en proteínas, el cual permite la supervivencia de una serie de organismos que se desarrollan en condiciones extremas.

HIPÓTESIS

La caracterización fisicoquímica comparativa filogenética de la triosafosfato isomerasa de arqueas que habitan en diferentes temperaturas nos puede ayudar a reconocer las estrategias evolutivas que moldearon la adquisición de estabilidad a altas temperaturas en esta familia de proteínas.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Hacer un estudio comparativo sobre las propiedades fisicoquímicas de la triosafosfato isomerasa de tres arqueas cercanamente emparentadas

Objetivos particulares

- Analizar filogenéticamente la TIM de arqueas para la selección de especies en un contexto filogenéticamente relevante
- Expresar y purificar las enzimas elegidas para el estudio
- Medir los parámetros catalíticos de las enzimas
- Determinar su estado oligomérico
- Estudiar su desnaturalización por temperatura y por agentes químicos

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos mencionados en el siguiente trabajo se compraron en Sigma-Aldrich (©), salvo aquellos donde se especifique lo contrario.

Análisis filogenético de las TIMs del dominio Archaea

Para hacer la elección de las secuencias a trabajar se hizo una base de datos de las secuencias de proteínas reportadas en el NCBI para la triosafosfato isomerasa del dominio Archaea. Los genes fueron elegidos uno a uno para evitar tener secuencias repetidas o mal anotadas en el NCBI. Las secuencias descargadas fueron alineadas con el servidor PROMALS3D, que puede construir alineamientos múltiples de secuencias utilizando información de la estructura tridimensional a partir de archivos de coordenadas (Pei, Kim & Grishin, 2008). El alineamiento se afinó con las estructuras reportadas en el Protein Data Bank (PDB) de TIMs de arqueas. El modelo de sustitución de aminoácidos de las secuencias alineadas se eligió con ayuda del programa PartitionFinderProtein v 1.1.0 (<http://www.robertlanfear.com/partitionfinder/>), el cual compara de manera estadística el ajuste de distintos esquemas de partición y modelos de sustitución para mejorar la reconstrucción filogenética. Las secuencias fueron procesadas utilizando una matriz de sustitución de aminoácidos LG+CAT (Stamatakis, 2014; Le & Gascuel, 2008). Se construyeron árboles filogenéticos con los alineamientos múltiples de secuencias obtenidos con la ayuda del servidor CIPRES (Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010), utilizando la herramienta para inferencia filogenética de máxima verosimilitud RAXML (Stamatakis, 2014), y se obtuvo el árbol de máxima verosimilitud encontrado heurísticamente. Los árboles generados se visualizaron y editaron con el programa FigTree v 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Subclonación de los genes seleccionados en vector de expresión

A partir de las secuencias de aminoácidos seleccionados, se extrajeron del NCBI las respectivas secuencias de nucleótidos. Las secuencias elegidas fueron flanqueadas con sitios de restricción para *NdeI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3', en aras de facilitar la subclonación a otros vectores. Los genes de las TIMs de *Methanococcus aeolicus* (MaTIM) y *Methanococcus maripaludis* (MmaTIM) fueron optimizados para el uso preferencial de codones de *Escherichia coli* con el algoritmo OptimumGene™ (GenScript

®) y se mandaron a sintetizar en la empresa GenScript ®. Los genes se solicitaron en un vector de almacenamiento pUC57 (GenScript ®), que cuenta con un cassette de resistencia a ampicilina. Los plásmidos se transformaron en células quimicompetentes DH5- α (Agilent Technologies ©) mediante choque térmico. Las células se cultivaron a 37°C por toda la noche en medio LB líquido con ampicilina. Los plásmidos se purificaron por la técnica de fenol-cloroformo. Haciendo uso de las enzimas de restricción *NdeI* (10 U) y *XhoI* (10 U) durante dos horas a 37°C, se recuperó el gen del plásmido de almacenamiento. A partir del gel de agarosa 1% resultante de la digestión se recuperó la banda que corresponde al gen cortado y se purificó utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen ©). Los genes purificados se subclonaron en un vector de expresión pET-28b(+) (Novagen ®) digerido con *NdeI* (10 U) y *XhoI* (10 U), con la ligasa de DNA T4 (Novagen ®) a 16 °C por 48 h, con una razón de ligación vector-inserto de 1:5. El vector pET28b-(+) responde a la regulación por *lacI*, y se puede inducir por un análogo de la alo-lactosa, el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Este vector introduce una etiqueta de seis histidinas en la región N-terminal de la proteína expresada con una secuencia de reconocimiento para la proteasa trombina, permitiendo la remoción de la etiqueta (aunque las secuencias quedan con tres aminoácidos extra), confiriendo de resistencia a la kanamicina. Se pidieron genes no optimizados de MaTIM y de la TIM de *Methanocaldococcus jannaschii* (MjTIM) en la empresa Epoch Life Science, Inc. directamente en el vector de sobre-expresión pET28b(+) (Novagen ®) con etiqueta de seis histidinas, y se siguió la misma metodología para su transformación en *E. coli*.

Pruebas de sobre-expresión

Se realizaron pruebas de sobre-expresión en volúmenes pequeños de cultivo para comprobar la producción de las proteínas. Se hicieron pre-inóculos de las cepas en tubos de ensayo con 10mL de medio LB con kanamicina (30 mg mL⁻¹) a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. Se transfirieron 100 μ L de las células cultivadas a medio Luria-Bertani (LB) con kanamicina (30 mg mL⁻¹), las cuales se cultivaron a 37°C, 250 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 0.6 y 0.8. En ese punto se les agregó IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se dejaron induciendo bajo las mismas condiciones durante 4 h. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 14,549 x g por 3 minutos, y se resuspendieron en 400 μ L de buffer para sonicación Tris 100mM, KCl 150mM, EDTA 1mM, pH 7.7. Las células se lisaron por sonicación en frío con 4 ciclos de 10 segundos con 10 segundos de descanso. Ulteriormente, los lisados se centrifugaron por 6 minutos a 14,549 x g a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el mismo de buffer de sonicación empleado. Sobrenadante y pellet fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%, que se tiñieron con azul de Coomasie, para corroborar la producción de proteína y si ésta se encontraba o no soluble.

Las pruebas de sobre-expresión se realizaron en las siguientes cepas quimiocompetentes de *E. coli*:

1. *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Codifica para la RNA polimerasa T7 bajo el control de un promotor *lac* UV5. Además, codifica para la lisozima de T7 para controlar la expresión basal de la proteína recombinante por T7 (Invitrogen, 2010b).
2. *E. coli* BL21-Gold(DE3)pLysS. Control basal de la expresión de T7. Carente de las proteasas Lon y OmpT. Alta eficiencia de transformación (Agilent Technologies, 2010).
3. *E. coli* ER 2566. RNA polimerasa T7 insertada en el gen *lacZ*, sin control basal. Deficiente de *lon* y *ompT* (New England Biolabs, 2017).
4. *E. coli* LMG194. Cepa de lento crecimiento (Invitrogen, 2010c).
5. *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. Control basal de T7. Cuenta con tRNAs para codones de uso infrecuente en *E. coli* (Merck Millipore, 2017).
6. *E. coli* BL21-A1. RNA polimerasa T7 en el locus *araB* del operón *araBAD*, regulando la expresión de T7 por arabinosa. Carente de las proteasas Lon y OmpT (Invitrogen, 2010a).

Purificación en condiciones desnaturalizantes

Se hicieron cultivos en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con las proteínas de interés en tubos de ensayo con 10 mL de LB con kanamicina (30 mg mL^{-1}) a 37°C , 250 rpm por toda la noche. Se inoculó 1 mL del cultivo resultante en matraces bafleados de plástico con 1 L de LB con kanamicina (30 mg mL^{-1}) y se dejó creciendo hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ entre 0.6 y 0.8, y se agregó IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Los cultivos se dejaron induciendo por 16 h a 37°C , 250 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación a $15,250 \times g$ por 15 minutos, se resuspendieron en buffer NaH_2PO_4 35mM, NaCl 300mM, Imidazol 5 mM, PMSF 20mM, pH 8.0. Las células se lisaron por presión en una prensa de French con cuatro ciclos de 2,000 psi. Los lisados se centrifugaron a $26,890 \times g$ a 4°C por 15 minutos, descartando el sobrenadante y congelando los pellets.

Se ejecutó el protocolo para aislamiento de cuerpos de inclusión, para lo cual, se derritieron los pellets en hielo y se suspendieron en 20 mL de buffer LEW (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0) con lisozima 1 mg mL^{-1} y se dejaron agitando en hielo por 30 minutos. Se sonicaron en frío en ciclos de 15s x 15s durante 15 minutos. Se centrifugó a 15,000 rpm a 4°C por 30 minutos y se descartó el sobrenadante. Se hizo un lavado del pellet en buffer LEW, se centrifugó a 26,890 x g a 4°C por 30 minutos, descartando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en buffer DSB (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 8 M urea, pH 8.0) y se sonicó en frío en ciclos de 15 s x 15 s hasta observar la disolución completa del pellet. Las soluciones se dejaron agitando en frío a 5 rpm hasta el momento de su uso.

Los cuerpos de inclusión resuspendidos se centrifugaron a 26,890 x g a 20°C por 30 minutos, recuperando el sobrenadante. Se preparó una columna de afinidad a níquel Protino Ni-TED (Machery-Nagel ©) por gravedad, equilibrada con buffer DSB, y se inyectó la proteína, previamente filtrada. Se lavó la columna con DSB y posteriormente se eluyó la proteína en un gradiente con buffer DSB con 250 mM de imidazol. Se recuperaron fracciones de 14 mL para el posterior análisis de la presencia de la proteína en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%.

Se hicieron diálisis en membranas tubulares de celulosa con un corte de 12 kDa para eliminar la urea del medio, primero en buffer LEW con 4 M urea y posteriormente en buffer LEW sin urea. Para dializar, se colocaban las membranas con la proteína al interior en vasos de precipitado llenos con el buffer por el que se requería cambiar, para *todos los* casos se hicieron dos cambios con 3 horas de diferencia y un cambio de 8 horas, todo en frío y con agitación suave.

La proteína sin urea se dializó en buffer Tris 50 mM, pH 8.0 para realizar el corte de la etiqueta de histidinas, utilizando el kit Thrombin CleanCleave de Sigma Aldrich®, por cuatro horas. La proteína cortada recuperada se dializó en buffer NaH_2PO_4 35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 8.0 (fosfatos) para inyectarla en una columna de afinidad a níquel Protino Ni-TED (Machery-Nagel ©) acoplada a un sistema FPLC (GE ©), en aras de eliminar cualquier contaminante inespecífico y proteína no cortada.

La proteína sin cola de histidinas se dializó en buffer Trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 8.0 (TED 10:1:1), y se inyectó en una columna de intercambio aniónico Mono Q (Pharmacia Biotech®) acoplada a un sistema FPLC (GE ©). La elución

se hizo con TED 10:1:1 con un gradiente de 1 M de NaCl. Las fracciones se colectaron y se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

Sobre-expresión a bajas temperaturas y purificación.

La formación de cuerpos de inclusión en *E. coli* generalmente se debe a altos niveles de expresión heteróloga, que produce agregados de la proteína producida en exceso (Singh *et al*, 2015). Aunque las proteínas en cuerpos de inclusión generalmente pueden replegarse, el rendimiento es muy variable. Una técnica que ayuda a incrementar la solubilidad de las proteínas recombinantes que tienden a agregarse es expresar el polipéptido deseado a bajas temperaturas, lo que además limita su degradación por proteasas de choque térmico (Vasina & Baneyx, 1996). En colaboración con la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz y el Dr. Mauricio Trujillo Roldán del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas se cultivaron células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con los plásmidos de interés en tubos de 10 mL con LB por toda la noche a 37°C. Se inoculó 1 mL de dichos cultivos en matraces bafleados de vidrio con 250 mL de LB que se cultivaron a 12°C hasta alcanzar 1 D.O._{600nm} para aclimatizar a las células para soportar las bajas temperaturas. Se hicieron pruebas de sobre-expresión a 12°C por 72 h con las células aclimatizadas en 250 mL de LB con kanamicina (30 mg mL⁻¹) hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 1-1.5, se agregó IPTG hasta una concentración final de 1mM. Las células se lisaron las células por sonicación y se corroboró la solubilidad de la proteína en geles de poliacrilamida al 12%.

Después de las pruebas se escalaron los cultivos a 1 L de LB con kanamicina (30 mg mL⁻¹) en fermentadores de tanque agitado a 15°C con 0.5 mM de IPTG, manteniendo, por velocidad de agitación, una saturación de oxígeno ~30% por 62 h. Las células recuperadas se lisaron por presión en las condiciones anteriormente descritas. El sobrenadante se inyectó en una columna de afinidad a níquel HisTrap (GE©) acoplada a un sistema FPLC (GE ©), se eluyó con un gradiente de imidazol y se recuperaron las fracciones con la proteína. Se eliminó la etiqueta de histidinas utilizando el kit Thrombin CleanCleave de Sigma Aldrich ®, y se inyectó nuevamente la proteína en la columna HisTrap (GE©). Finalmente se inyectó la proteína dializada en TED 10:1:1 en una columna de intercambio aniónico Mono Q (Pharmacia Biotech ®). Se recuperaron las fracciones y se concentró la proteína resultante.

Purificación de MjTIM

Se hicieron cultivos en células de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS transformadas con la proteína deseada en matraces bafleados de plástico con 1L de LB hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 1-1.5, donde se indujo con IPTG 1mM por 16 h a 37°C. Las células recuperadas se lisaron por presión en las condiciones descritas. Dada la naturaleza hipertermófila de la proteína, el sobrenadante del lisado se calentó en un baño con agua a 70°C por 15 minutos para eliminar impurezas, y se centrifugó a 26,890 x g a 4°C por 15 minutos, recuperándose el nuevo sobrenadante. Se inyectó la proteína filtrada en una columna de afinidad a níquel HisTrap (GE©) acoplada a un sistema FPLC (GE©). La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol y se recuperaron las fracciones. Finalmente se dializó la proteína en buffer NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0.

Determinación de parámetros catalíticos

Se determinaron los parámetros catalíticos para corroborar la identidad de la proteína purificada, así como su correcto plegamiento. La actividad de la triosafosfato isomerasa se mide a través de un ensayo acoplado a partir de la conversión de G3P a DHAP. El DHAP se reduce a glicerol-3-fosfato por medio de la enzima α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH, Roche ©), que oxida una molécula de NADH hacia NAD⁺. El NADH absorbe a 340 nm, mientras que el NAD⁺ no, así el decremento en la absorbancia a una D.O._{340nm} se utiliza para medir la actividad de la TIM (Gómez-Puyou *et al.*, 1995; figura 6). Con el valor de la pendiente, la cantidad de proteína en la celda de reacción y el coeficiente de absortividad molar del NADH a 340 nm (6,220 M⁻¹ cm⁻¹) se obtiene la actividad específica en μ moles de DHAP formados por minuto por miligramo de proteína.

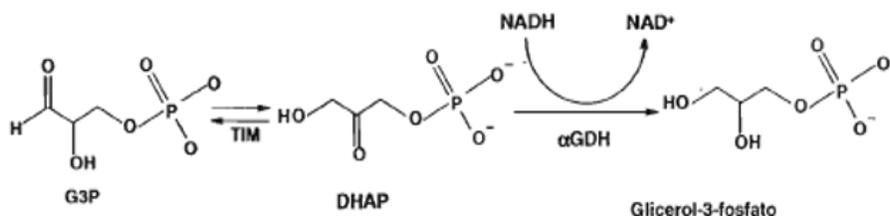


Figura 6. Mecanismo acoplado para medir actividad de la TIM. La reacción se lleva en sentido G3P a DHAP. Se monitorea el decaimiento en la absorbancia del NADH (tomada de (Romero-Romero, 2011)).

La reacción se hizo en buffer TED 100:10:1, variando la concentración de G3P de 0.025 a 3 mM, 0.2 mM de NADH, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de α -GDH y 10 ng mL^{-1} de proteína. La actividad se monitoreo espectrofotométricamente a 25°C con un espectrofotómetro Beckman DU7500 termoregulado (Beckman Coulter ©). Para MjTIM se hicieron ensayos cinéticos adicionales a 15, 35 y 45°C.

Caracterización espectroscópica de las proteínas

El dicroísmo circular (DC) es una técnica para la caracterización estructural de moléculas que nos puede dar indicios sobre los cambios en la estructura de las proteínas. La luz polarizada plana está hecha de dos componentes polarizados circularmente de la misma magnitud, uno rotando en contra de las manecillas del reloj y otro a favor. El DC se refiere a la absorción diferencial de estos componentes, que resulta en una radiación polarizada elípticamente. La señal de DC se da por la presencia de cromóforos quirales. En proteínas, la señal de DC debajo de 240 nm (o UV lejano) se debe al ambiente asimétrico que la configuración tridimensional adopta y genera una señal característica para cada elemento de estructura secundaria (Greenfield, 2007; Kelly & Price, 1997). Los ensayos de DC de MaTIM y MmaTIM se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-715. Los ensayos de MjTIM se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para el control de la temperatura. En todos los casos se siguió la señal de DC de 180 a 260 nm de la proteína a 0.1 mg mL^{-1} en buffer NaH_2PO_4 10mM, pH 8.0 a 25°C en una celda de cuarzo de 1 mm de ancho.

Se analizó la composición de estructura secundaria a partir de los espectros de DC con el algoritmo de deconvolución K2D3 (Louis-Jeune, Andrade-Navarro, & Perez-Iratxeta, 2012).

Determinación del estado oligomérico

Se corroboró el estado oligomérico de la proteína al incubarla por 24 h a 25°C a diferentes concentraciones (0.5, 0.1 y 0.05 mg mL^{-1}), para posteriormente aplicarla en una columna de exclusión molecular analítica Superdex 200 10/300 GL (GE ©) acoplada a un sistema FPLC (GE©). Se hizo la calibración del peso molecular y el radio de Stokes con los estándares para filtración en gel de BioRad© y se incluyó una calibración con la TIM de *Brucella mellitensis* (BmeTIM) a 0.1 mg mL^{-1} .

Desnaturalización por temperatura

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es un método calorimétrico para estudiar los procesos inducidos por cambios en la temperatura. En biología es comúnmente utilizado para estudiar las transiciones de fase de macromoléculas. Se puede utilizar para obtener información sobre procesos de plegamiento de proteínas y estabilidad térmica. En esencia, un dispositivo de DSC mide, como función de la temperatura, la diferencia en la absorción de calor entre una celda de referencia llena de solvente y una celda de muestra con la proteína de interés en un solvente idéntico (Johnson, 2013). Los experimentos de DSC se realizaron en colaboración con el Dr. Miguel Costas Basín del Laboratorio de Biofísicoquímica de la Facultad de Química, con el calorímetro capilar VP-Capillary DSC (Microcal ©). Para determinar la reversibilidad en el desplegamiento térmico se calentaron 0.4 mg mL^{-1} de la proteína en amortiguador NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0 a 90 K h^{-1} , en un rango de 10 a 125°C . Al llegar a la temperatura más elevada, la muestra se lleva a la temperatura inicial y se colectan dos trazas más. Para evaluar el efecto de la velocidad de barrido en la T_m se hicieron experimentos en las mismas condiciones a 60, 120 y 150 K h^{-1} . Con los datos obtenidos calculamos la energía de activación involucrada en el proceso de desplegamiento por temperatura tal como se indica en el *tratamiento de los datos*.

Desnaturalización por agentes químicos

La desnaturalización química se evaluó a través de los cambios en la señal de DC a 222 nm de la proteína a 0.1 mg mL^{-1} en buffer de NaH_2PO_4 10mM, pH 8.0 en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics ©).

Para establecer el tiempo de equilibrio en la desnaturalización con hidrocloreto de guanidinio (GdmHCl) se incubó la proteína a 25°C en concentraciones diferentes del desnaturalizante en un rango de 0 a 7.5 M, midiendo la señal de DC a 222 nm a las 24, 48 y 144 horas de incubación. Se evaluó la reversibilidad del proceso haciendo diluciones a partir de un stock de proteína con 7.25 M de GdmHCl hasta 0.75 M del desnaturalizante incubando 36 horas. Se adquirieron espectros de DC en 0 y 7.5 M para el desplegamiento y 0.75 M para el desplegamiento. Adicionalmente se midió la actividad catalítica de los puntos de desplegamiento con 10 ng mL^{-1} de la proteína disueltos en buffer TED 100:10:1 y 2 mM de G3P. Se consideró al 100% como la actividad total para la proteína sin desnaturalizante.

Para la desnaturalización con urea se incubó la proteína a 25°C en distintas concentraciones del desnaturalizante en un rango de 0 a 8 M y se midió la señal de DC a 222 nm por 24 y 144 h después de poner a incubar. Se tomaron espectros en el UV lejano de 0 y 8M de urea, y se midió la actividad catalítica a una concentración de proteína de 10 ng mL⁻¹.

La concentración de los stocks de GdmHCl y de urea se midió en un refractómetro Atago Nar-3T (Atago U.S.A. Inc.).

Tratamiento de los datos

Los parámetros catalíticos se obtuvieron de los datos experimentales de las cinéticas con diferentes concentraciones de G3P, que se ajustaron a un modelo no lineal de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]}$$

Dado que, en solución acuosa, el G3P existe como diol y como aldehído en una relación 29:1, y que sólo la forma aldehído es catalizada por la TIM (Trentham, McMurray & Pogson, 1969), se hizo una modificación al valor de la K_M obtenida, con la cual se obtuvo el valor de la eficiencia catalítica.

De los ensayos cinéticos a diferentes temperaturas se graficó el logaritmo natural de la velocidad máxima contra el recíproco de la temperatura absoluta en la que se realizó el ensayo para obtener el gráfico de Arrhenius, del cual se extrapolaron los parámetros catalíticos a 85°C con una regresión lineal.

Las trazas de desnaturalización térmica por DSC se corrigieron al tiempo de respuesta del calorímetro y se normalizaron con respecto a la concentración de proteína. También se les restó la línea base química para obtener la capacidad calorífica en exceso (C_p^{exc}). Ulteriormente se hizo un ajuste de los datos a un modelo de dos estados irreversible Lumry-Eyring:



donde N es el estado nativo que, en un solo paso, alcanza un estado final (F) de cual es incapaz de regresar, por lo que dicha conversión cinética está descrita por una constante de primer orden dependiente de la temperatura (k).

El cálculo de la energía de activación (E_A) se hizo con tres métodos distintos según Costas *et al.*, 2009:

- 1) Del valor de E_A obtenido para cada uno de los ajustes al modelo de Lumry-Eyring para cada velocidad de barrido se hizo un promedio
- 2) Se analizó el efecto de que tiene la velocidad de barrido (v) sobre la T_m , el cual está, en el modelo de Lumry-Eyring, está dado por:

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

Se hizo el gráfico de $\ln(v/T_m^2)$ contra $1/T_m$, donde la pendiente por la constante R nos da el valor de E_A .

- 3) Dado que la conversión entre N y F está dada por una constante de primer orden (k) que depende de la temperatura, el proceso se puede analizar de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

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

donde T^* es la temperatura en la cual $k = 1\text{min}^{-1}$ y T es la temperatura en la cual se evalúa dicha magnitud. Con el gráfico $1/T$ contra $\ln k$ para todas las velocidades de barrido, se multiplica el valor de la pendiente por R y se obtiene el valor de la E_A .

Todos los cálculos de E_A se hicieron utilizando el peso del monómero de MjTIM para su comparación con otras TIMs.

Los datos de desnaturalización química con GdnHCl fueron normalizados y ajustados a la ecuación sigmoideal de Boltzman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elección de las proteínas a estudiar

Se obtuvieron 242 secuencias de aminoácidos de TIMs de arqueas del NCBI, con las cuales se procedió a hacer el análisis filogenético de máxima verosimilitud. El alineamiento se afinó con las estructuras cristalográficas de *Thermoplasma acidophilium* (PDB: 5CSR), *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB: 2H6R), *Thermoproteus tenax* (PDB: 1W0M) y *Pyrococcus woesei* (PDB: 1HG3).

Como se mencionó, las TIMs de arqueas difieren en dos regiones conservadas tanto en eucariontes como en bacterias. Esta diferencia consistente entre las secuencias nos permite definir a las TIMs de arqueas como un linaje con una historia evolutiva común, pero no independiente de las TIMs de los otros dominios. Por ello, para colocar la raíz del árbol se revisaron las hipótesis acerca de las relaciones filogenéticas entre los tres dominios de la vida. En 1977, Carl Woese y George Fox propusieron dividir a los procariontes en dos grupos: Eubacteria, que comprendía a todas las bacterias “típicas”; y Archaeobacteria, que estaba compuesta por todas las bacterias metanogénicas (Woese & Fox, 1977). Para 1990, el grupo de Woese y colaboradores propusieron una nueva clasificación para la vida en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (figura 7A); respaldados con las secuencias de la subunidad pequeña del ribosoma (Woese, Kandler, & Wheelis, 1990). Esta clasificación fue reforzada por otros estudios con secuencias relacionadas con los componentes de la maquinaria transcripcional y traduccional. En ella se mostraba que, pese a la naturaleza quimérica de los genomas eucariontes, Eukarya y Archaea eran clados monofiléticos que compartían un ancestro común independiente de Bacteria (Cox *et al.*, 2008).

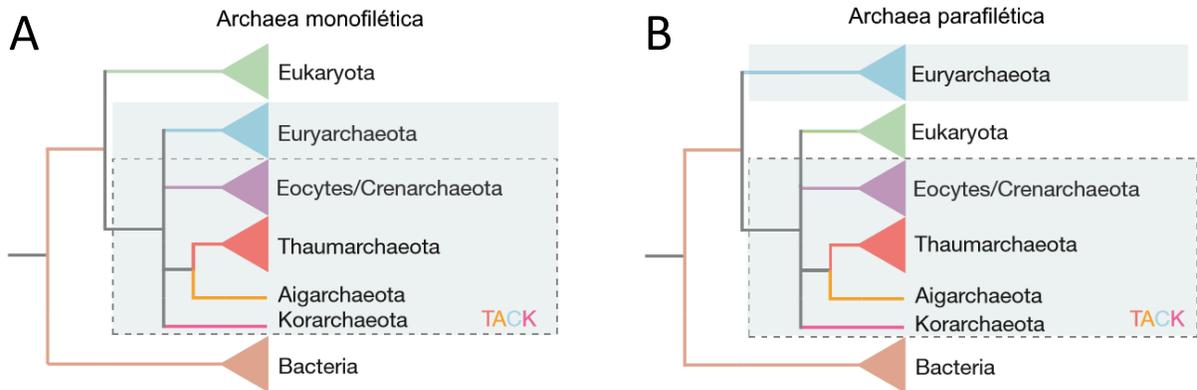


Figura 7. Hipótesis sobre la clasificación de la vida. a) Hipótesis del árbol universal de la vida de Woese. Eukarya y Archaea representan linajes monofiléticos con un ancestro común. b) Escenario tipo *eocites*, donde Archaea es un clado parafilético, pues Eukarya es grupo hermano de Crenarchaeota. Modificada de Williams *et al.*, 2013.

Sin embargo, otros estudios utilizando secuencias de factores de elongación de la traducción, así como la comparación de las características estructurales de los ribosomas, contaban otra historia. En ella, los eucariontes resultaban ser el grupo hermano del *phylum* de Archaea 'Crenarchaeota', también denominados eocitos (Cox *et al.*, 2008; Lake *et al.*, 1984). Esta hipótesis (llamada también escenario tipo eocitos) propone que Archaea es en realidad un linaje parafilético, de donde ramifica Eukarya (figura 7B). Con el advenimiento de la era genómica y el mejoramiento de los modelos de sustitución se ha acumulado una gran cantidad de evidencia que vincula evolutivamente a Eukarya con Archaea a través del superphylum TACK, compuesto por los *phyla* Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Korarchaeota y Crenarchaeota (Guy & Ettema, 2011), específicamente con el recién propuesto *phylum* Lokiarchaeota (Spang *et al.*, 2015).

Siguiendo ambas hipótesis, se construyeron árboles de la TIM de arqueas utilizando como raíz secuencias provenientes de bacterias (figura 8A) y secuencias provenientes de eucariontes (figura 8B). En ambos casos, y de manera general, las TIMs se agruparon de acuerdo a la clasificación taxonómica vigente a nivel de orden en el dominio Archaea (Forte, 2015; ver material anexo).

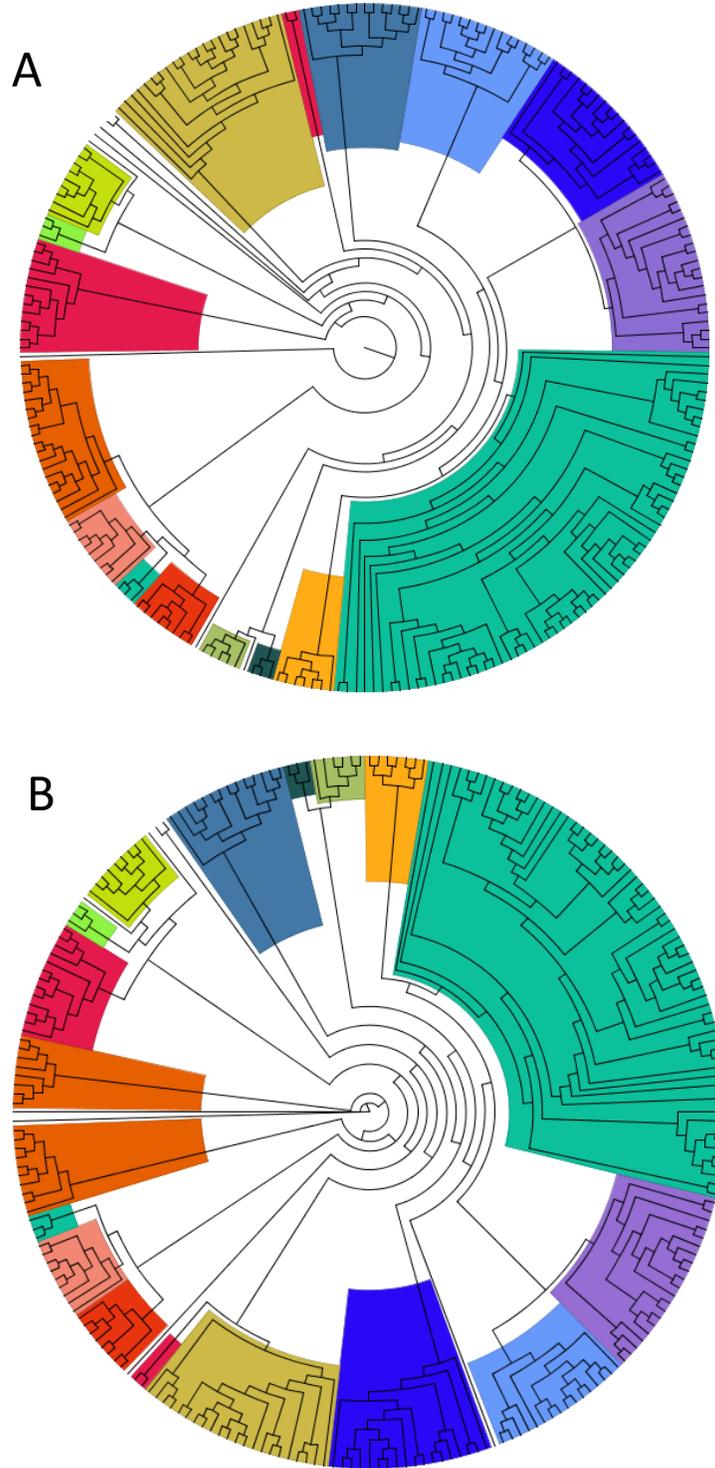


Figura 8. Árboles filogenéticos de la TIM de arqueas. Para facilitar la visualización se igualaron las longitudes de las ramas y se eliminaron los nombres de las especies. Cada color representa un orden distinto del dominio Archaea (ver código de colores en el material anexo). A. Árbol enraizado con secuencias TIM de bacterias. B. Árbol enraizado con secuencias de TIM de eucariontes.

Todos los estudios filogenéticos tienen por objetivo revelar las relaciones históricas existentes entre distintos taxa, no obstante, la elección de caracteres poco informativos puede llevar a una pobre resolución filogenética. Un carácter informativo es aquel que nos permite revelar relaciones evolutivas en una escala temporal acotada, y el priorizar su uso en el muestreo de caracteres ha probado mejorar la resolución de conflictos en el diseño experimental filogenético (López-Giráldez, Moeller, & Townsend, 2013; Townsend, 2007). Lo anterior sugiere que las secuencias de aminoácidos de las TIMs de arqueas pueden ser caracteres con información para ayudar a recuperar la historia evolutiva en el periodo en que diversificaron los órdenes de Archaea, si bien se tiene que corroborar en estudios específicos. Esta consonancia entre la historia evolutiva de la TIM de arqueas con el proceso evolutivo del dominio en ese nivel taxonómico facilitaron la elección de especies con las cuales se hizo el trabajo, ya que no sólo indicaba el contexto filogenético relevante que se buscaba para realizar el estudio, sino que favorece la aplicación de la filogenia obtenida para la reconstrucción de secuencias ancestrales en trabajos posteriores sobre este grupo de enzimas.

A partir de la filogenia se eligió al orden Methanococcales como objeto de estudio. Methanococcales comprende a un grupo de arqueas marinas, anaerobias obligadas y productoras de metano que requieren sales de mar para su óptimo crecimiento y utilizan dióxido de carbono como aceptor de electrones (Whitman & Jeanthon, 2006). La razón principal por la que se eligió este clado para trabajar es que está dividido en dos familias, de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento: la familia Methanocaldococaceae está compuesta por géneros de arqueas hipertermófilas; mientras que la familia Methanococcaceae tiene asignados géneros tanto mesófilos como termófilos moderados (Whitman & Jeanthon, 2006; Figura 9). Con base en ese criterio, fue posible elegir especies que crecen a temperaturas diferentes. Adicionalmente, se conoce la estructura cristalográfica de la TIM tetramérica de la arquea hipertermófila *Methanocaldococcus jannaschii* (Gayathri *et al.*, 2007, c. fr. Figura 4), perteneciente de este grupo, por lo que resultaba sencillo hacer comparaciones con un tetrámero conocido, pero poco caracterizado.

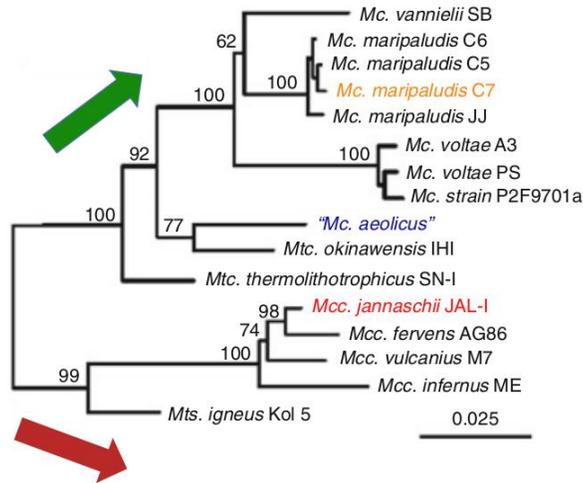


Figura 9. Árbol filogenético de Methanococcales. La flecha verde representa al linaje mesófilo de Methanococcaceae y la flecha roja al linaje hipertermófilo de Methanocaldococcaceae. Las especies en color (rojo, azul y naranja) fueron las elegidas para este trabajo. (Modificado de Whitman & Jeanthon, 2006).

Las secuencias de aminoácidos disponibles para el orden Methanococcales fueron procesadas utilizando el software ProtParam, el cual, entre otros parámetros, ofrece una medida teórica del índice de inestabilidad *in vivo* para una proteína (Gasteiger *et al.*, 2005). Todas las secuencias que se predecían como inestables (índice de inestabilidad >40) fueron descartadas para este estudio. Se eligieron las secuencias de los siguientes organismos:

- *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (**MjTIM**). Esta arquea hipertermófila puede crecer en un rango de temperatura de 50 a 86°C, con **crecimiento óptimo cerca de 85°C**, y un pH óptimo de 6.0. (Jones *et al.*, 1983).
- *Methanococcus aeolicus* Nankai-3 (**MaTIM**). Esta arquea mesófila crece en un rango de temperatura entre 20 y 55°C, con **crecimiento óptimo a los 46°C** y pH entre 5.5 y 7.5 (Kendall *et al.*, 2006).
- *Methanococcus maripaludis* C7 (**MmaTIM**). Es una arquea mesófila que crece entre los 18 y 47°C con un **crecimiento óptimo cerca de los 38°C**, y un rango de pH entre 6.8 y 7.2 (Jones, Paynter & Gupta, 1983).

Las secuencias elegidas se alinearon (Figura 10) y se obtuvo el porcentaje de identidad entre ellas, como se observa en la tabla 2. Las secuencias elegidas están conservadas, siendo que sólo difieren entre 35 y 25%. En esta diferencia tan pequeña de

identidad vale la pena resaltar que la robustez mutacional de la TIM es alta, por lo que la mayoría de estas diferencias pueden ser resultado de procesos neutrales en la secuencia.

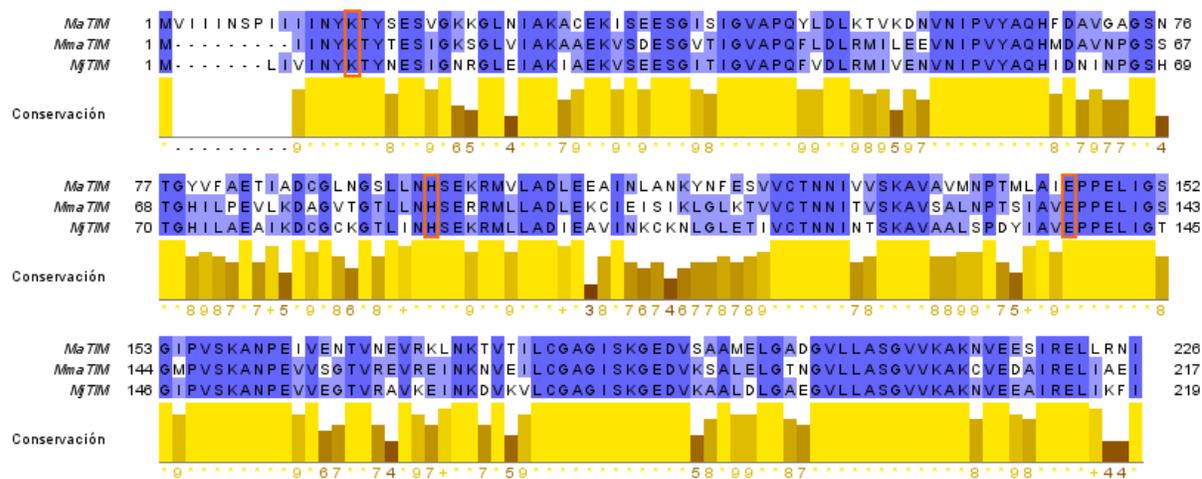


Figura 10. Alineamiento de las secuencias elegidas. Se muestra el nivel de conservación entre las secuencias. El gradiente azul está relacionado con el porcentaje de identidad de los aminoácidos. Los aminoácidos catalíticos se resaltan en recuadros naranjas. Visualización hecha con el programa JalView (Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009).

Tabla 2. Porcentaje de identidad de las secuencias elegidas.

MaTIM	---		
MmaTIM	64.6%	---	
MjTIM	64.15%	74.77%	---
	MaTIM	MmaTIM	MjTIM

Adicionalmente se hizo un análisis computacional de algunas de sus propiedades fisicoquímicas utilizando el software ProtParam. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades importantes de las secuencias a caracterizar.

TIM	No. de aa	Peso molecular del monómero (Da)	pl teórico	No. de Trp	No. de Tyr	No. de Cys	No. de Pro
MaTIM	226	24001.69	5.08	0	6	4	8
MmaTIM	217	22885.58	5.21	0	3	4	9
MjTIM	219	23319.08	5.48	0	4	5	8

Entre las TIMs de mesófilos y la de MjTIM no hay una diferencia importante en el número de prolinas y cisteínas, residuos que se han implicado en la adquisición de la termoestabilidad en algunas proteínas.

Cabe resaltar que la ausencia de residuos de triptófanos en las secuencias elegidas hace que el cálculo teórico del coeficiente de absorción molar tenga un margen de error importante, por lo que calcular la concentración de proteína a partir de la absorción a 280 nm no es del todo confiable, aunque la presencia de tirosinas confiere señal a esa longitud de onda, por lo que se recurrió a la cuantificación de proteína por el método del ácido bicinónico (BCA) para todos los casos.

PARTE I: TIMS MESÓFILAS

Subclonación y primeras pruebas de sobre-expresión

Se pidieron secuencias de nucleótidos optimizadas para el uso de codones en *E. coli* de MaTIM y MmaTIM. Las secuencias se recibieron en un vector de almacenamiento pUC57, por lo que se liberó el gen mediante la digestión con las enzimas de digestión *NdeI* y *XhoI*, y se subclonaron los genes en un vector de expresión pET-28b(+).

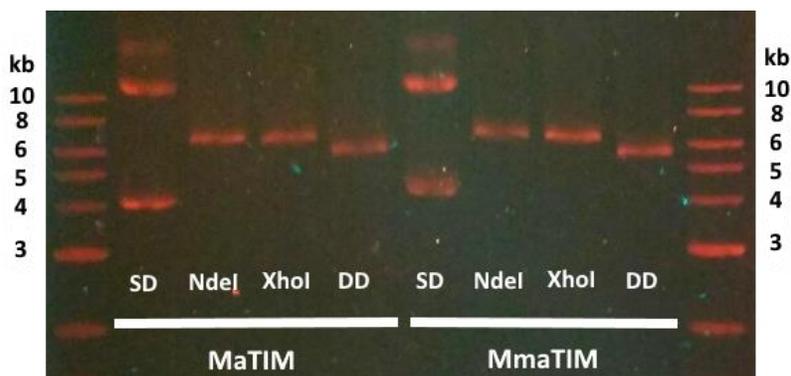


Figura 11. Digestiones de los plásmidos. pET 28b(+) digerido de los genes solicitados.. SD: Plásmido sin digerir. NdeI: Plásmido linearizado con NdeI, XhoI: Plásmido linearizado con XhoI, DD: Doble digestión con NdeI y XhoI.

Se observó una diferencia en el tamaño de las dobles digestiones del pET28b(+) con los genes subclonados (Figura 11), y aunque no se alcanza a observar con claridad la posición del inserto (~664 pares de bases), la diferencia de peso indica que la ligación fue exitosa.

Se realizaron pruebas de sobre-expresión en tubos de ensayo con 10 mL de medio LB como se describe en la metodología. Los resultados se analizaron en geles de poliacrilamida al 12%, como se observa en la figura 12.

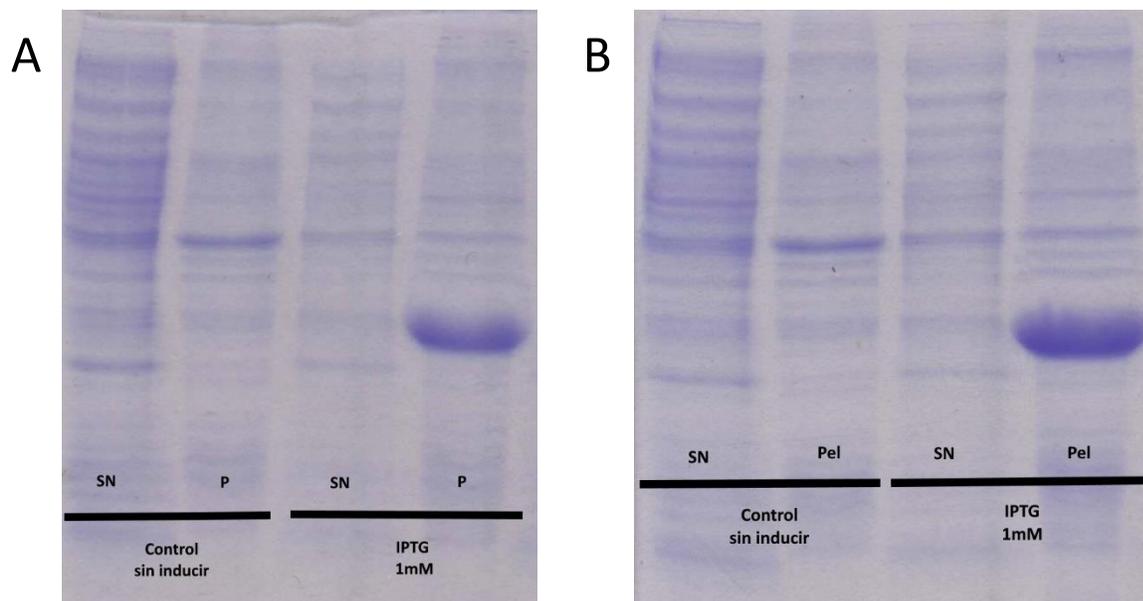


Figura 12. Pruebas de sobre-expresión a 37°C. Lisados celulares teñidos con azul de Coomassie en geles de poliacrilamida. A. Prueba de MaTIM. B. Prueba de MmaTIM. SN: sobrenadante, P: Pellet del lisado.

Se colocaron tanto el sobrenadante como el pellet para analizar la ubicación de la proteína sobre-expresada. Se observó que, si bien hubo sobre-expresión de ambas proteínas, ninguna se expresó de forma soluble, ambas se presentan en el pellet del lisado celular.

Expresión de MaTIM y MmaTIM en cuerpos de inclusión

Para descartar que la falta de solubilidad estuviera relacionada con la expresión en la cepa utilizada, se probó transformar el plásmido en otras cepas quimiocompetentes disponibles. Adicionalmente, se incluyeron otros cosolventes en el buffer de lisis para corroborar que la agregación observada no estuviera vinculada con la pérdida del ambiente intracelular.

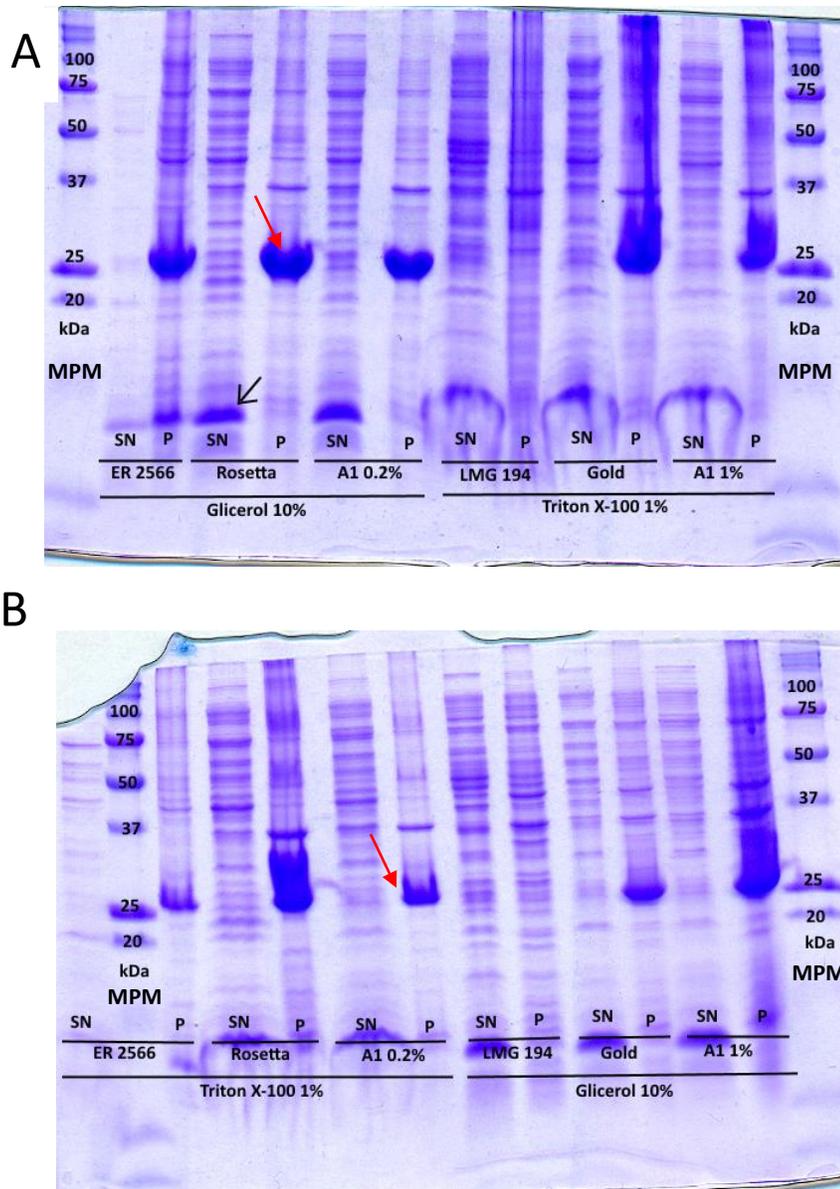


Figura 13. Pruebas de sobre-expresión en distintas cepas a 37°C. Lisados celulares de la sobre-expresión, se indica la cepa utilizada y el cosolvente en el buffer de lisis. En el caso de la cepa a A1 se especifica el porcentaje de arabinosa utilizado. La flecha negra indica la banda de lisozima, la flecha roja indica la proteína de interés. Los geles se cargaron por volumen. A. MaTIM. B. MmaTIM. SN: sobrenadante, P: Pellet del lisado. MPM: Marcador de Peso Molecular.

Los resultados de las pruebas de expresión por 4 horas en tubos de ensayo con 10 mL de LB están resumidos en la figura 13. Para todos los casos donde hubo sobre-expresión se aprecia que la proteína era insoluble.

E. coli es el organismo más utilizado en la expresión heteróloga de proteínas recombinantes que no requieren modificaciones postraduccionales. Sin embargo, sus altos niveles de expresión pueden ser contraproducentes, ya que la proteína expresada puede agregarse insolublemente *in vivo* a través de cuerpos de inclusión, como observamos en nuestros resultados. Los cuerpos de inclusión son reservorios dinámicos de proteínas recombinantes y endógenas en una mezcla de configuraciones cuasi-nativas, parcialmente plegadas o desplegadas que se forman en el citoplasma o en el área periplasmática. La producción de estas estructuras puede estar ligada a varios factores, como la temperatura de expresión, la concentración del inductor o al sistema promotor asociado. La sobre-expresión reduce los sistemas de control de calidad bacterianos, lo que acaece en la generación de proteínas mal plegadas. Algunos cuerpos de inclusión no presentan actividad biológica, por lo que se requieren iniciar procedimientos para solubilizar y replegar las proteínas contenidas en ellos (Singh *et al.*, 2015; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Singh & Panda, 2005; Tsumoto *et al.*, 2003). El uso de algunos cosolventes puede ayudar a mejorar la estabilidad de las proteínas, ya que incrementa la capacidad de generar estados más compactos y ordenados de la proteína. El glicerol induce la compactación de la proteína, reduce su flexibilidad, estabiliza algunos tipos de intermediarios y mejora la solubilidad de las proteínas (Vagenende, Yap, & Trout, 2009). El Tritón X-100, como muchos detergentes, se utiliza como agente para estabilizar las proteínas, solubilizar proteínas de membrana y permeabilizar la pared celular (Koley & Bard, 2010). En nuestro caso, tanto el glicerol como el Triton X-100, no ayudaron en la solubilización durante la lisis celular. Por lo anterior se decidió proceder a tratar de recuperar la proteína de cuerpos de inclusión.

Purificación en condiciones desnaturalizantes

A partir de los cuerpos de inclusión se puede recuperar proteína activa, para lo cual necesitan solubilizarse y replegarse en una conformación adecuada. La solubilización debe de reducir las interacciones no nativas intra e intermoleculares, eso se puede lograr utilizando agentes desnaturalizantes como urea, cloruro de guanidinio o detergentes. El replegamiento se obtiene, típicamente, al disminuir la concentración del agente desnaturalizante utilizado en la solubilización (Tsumoto *et al.*, 2003). Para recuperar MaTIM y MmaTIM en su conformación biológica se utilizó un protocolo de purificación en condiciones denaturalizantes incubando en 8 M de urea, tal como se describe en la metodología. Después del aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión se

buscó un protocolo de replegamiento. El paso directo de 8 a 0 M de urea provocaba agregación visible en la disolución. En consecuencia, se utilizó un paso intermedio a 4 M de urea, el cual no manifestaba agregación conspicua.

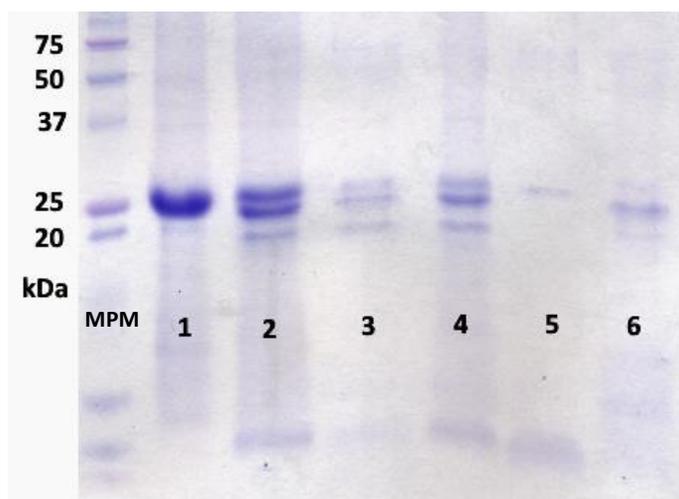


Figura 14. Purificación en condiciones desnaturalizantes de MaTIM. La proteína expresada a 37°C fue inyectada a una columna afinidad a níquel Protino Ni-TED con urea. Se muestran los pasos secuenciales de purificación empleados. MaTIM: 1) Sin urea, después de la primera columna de afinidad; 2) Después de cortar con trombina por 4 horas, 3) Después de pasar por segunda ocasión en una columna Protino Ni-TED, 4) Concentrada, antes de pasar por MonoQ, 5 y 6) En fracciones de la MonoQ. La expresión se hizo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. MPM: Marcador de peso molecular.

La purificación de ambas proteínas dio resultados muy similares, por lo cual sólo se ilustra el gel de purificación de MaTIM en la figura 14. La solubilización con urea permitió obtener las proteínas puras con etiquetas de histidinas (figura 14, carril 1); sin embargo, después del corte con trombina se observan otras bandas afines a la columna de níquel (Figura 14, carriles 2-4), posiblemente resultado de proteólisis o contaminación. Se buscó en las secuencias de aminoácidos si la trombina podría cortar en otros sitios de las proteínas, pero no se encontró ningún otro sitio de reconocimiento, por lo que, de haber proteólisis, no se origina por el corte con trombina. Estas bandas pudieron separarse en distintas fracciones por la columna de intercambio aniónico. A dichas fracciones se les evaluó la actividad catalítica para determinar a cuál correspondía a la proteína activa. La

cantidad de proteína producida y recuperada fue de 1.54 mg L⁻¹ de cultivo de MaTIM y 2.02 mg L⁻¹ de cultivo para MmaTIM.

Caracterización fisicoquímica de las TIMs recuperadas de cuerpos de inclusión

Después de recuperar la proteína de los cuerpos de inclusión y replegarla por diálisis, se procedió a medir los parámetros catalíticos de ambas proteínas cuando convierten el G3P a DHAP. Los datos se ajustaron adecuadamente a un modelo de Michaelis-Menten, tal y como se ha observado en todas las TIMs estudiadas hasta ahora (Figura 15).

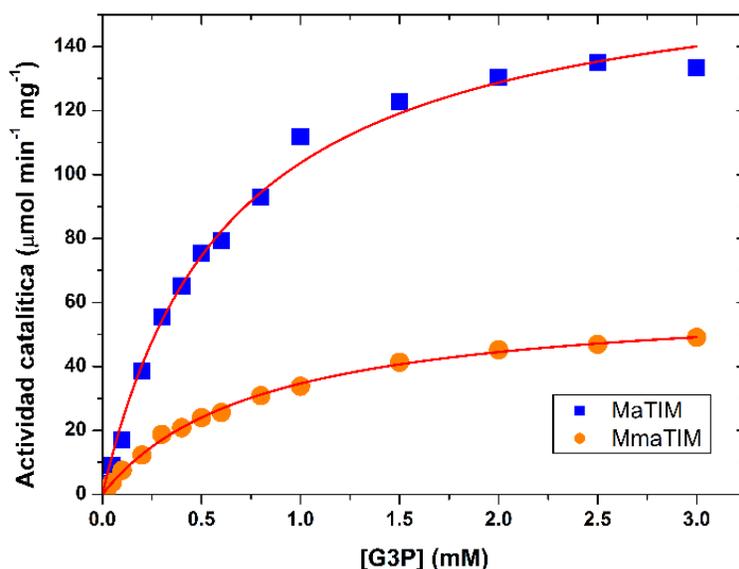


Figura 15. Cinéticas enzimáticas de MaTIM y MmaTIM. Se obtuvo la actividad catalítica específica a 25°C, pH 8.0. Los datos se ajustaron a una regresión no lineal de Michaelis-Menten.

Los parámetros catalíticos asociados (Tabla 4), por otro lado, muestran un comportamiento poco común para la TIM, ya que la eficiencia catalítica está alejada del límite de difusión por cinco órdenes de magnitud. La eficiencia catalítica tan elevada de la TIM obliga a que los ensayos de actividad se suelen hacer con 5 a 10 ng de proteína para poder realizar mediciones; sin embargo, estos ensayos se hicieron con 100 ng de proteína, pues no se observaba una caída en la señal del NADH. Cabe aclarar que los valores obtenidos no implican que las proteínas no son activas, pero resulta llamativo que nuestros datos se acerquen al valor promedio de eficiencia catalítica reportado para todas las enzimas, que es de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Bar-Even *et al.*, 2011). Sin embargo, hay que

considerar que si hubo proteólisis durante la purificación, la pérdida en eficiencia catalítica se explica debido a este fenómeno.

Tabla 4. Parámetros catalíticos de las TIMs de mesófilos.

TIM	V _{máx} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K _M (mM)	k _{cat} (min ⁻¹)	Eficiencia catalítica (M ⁻¹ s ⁻¹)
MaTIM	169.9 ± 4.8	0.6 ± 0.04	4356.4 ± 119.6	2.3x10 ⁶ ± 3.3x10 ⁵
MmaTIM	62.1 ± 1.0	0.8 ± 0.03	1625 ± 26.6	9.9x10 ⁵ ± 5.7x10 ⁴
MjTIM*	2132.87 ± 33	0.19 ± 0.01	(5.36 ± 0.09) x10 ⁴	(1.4 ± 0.9) x10 ⁸

*Los datos de MjTIM se agregaron para la comparación, los datos completos se observan en la tabla 7

Después de hacer ensayos de la actividad catalítica se procedió a realizar una caracterización espectroscópica de las enzimas por DC (Figura 16).

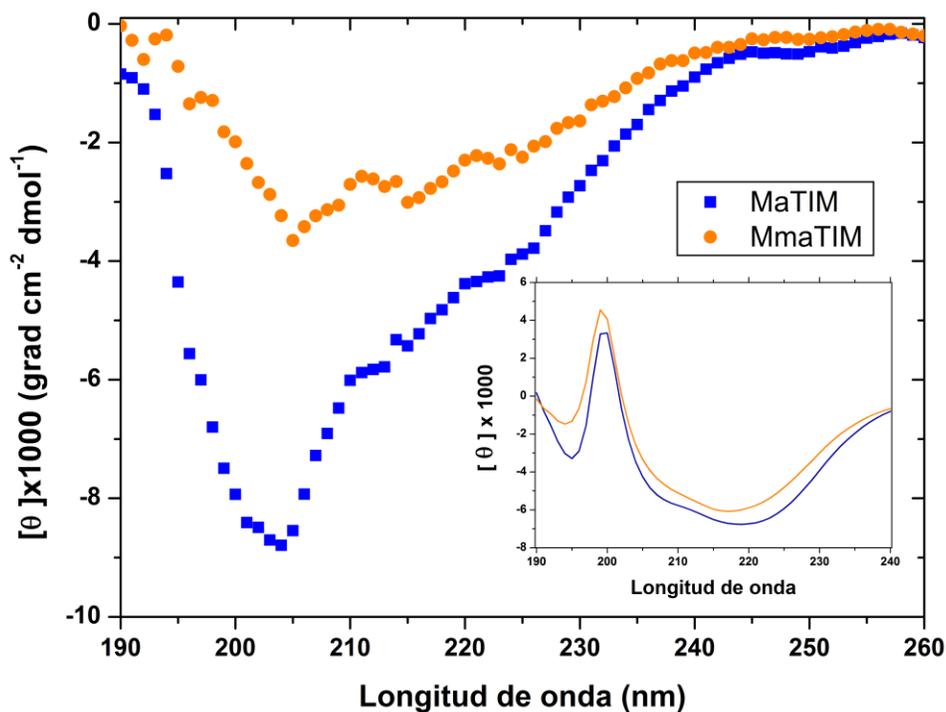


Figura 16. Espectro de dicroísmo circular de MaTIM y MmaTIM. Los ensayos de DC se realizaron con 0.1 mg mL⁻¹ de proteína en celdas de cuarzo de 1 mm a 25 °C. Las enzimas se encontraban en buffer de fosfatos NaH₂PO₄, pH 8.0. Se muestran los ajustes de la deconvolución realizados por el software K2D3.

Tabla 5. Deconvolución de los espectros de DC de las TIMs de mesófilos.

Estructura secundaria	MaTIM	MmaTIM
Hélices α	4.48%	3.1%
Hojas β	35.12%	38.04%
Estructura al azar	60.4%	58.86%

La señal de los espectros de DC depende de la concentración de proteína utilizada. Los distintos elementos estructurales de las proteínas tienen espectros muy característicos. Las proteínas con α -hélices bien definidas, como la TIM, tienen bandas negativas a 222 y 208 nm, y una banda positiva a 193nm (Greenfield, 2007, 1996; un ejemplo de un espectro de una TIM bien plegada se observa en la figura 25). No obstante, como se observa en la figura 16, ninguna de las proteínas evaluadas presenta un espectro de DC de esta naturaleza. El ajuste de la deconvolución, como se observa en la tabla 5 y en el gráfico de los ajustes en la figura 16, no se resolvió adecuadamente, por lo que no conocemos con precisión la composición de estructura secundaria de ambas proteínas. Lo anterior nos indica que las enzimas no se replegaron exitosamente después del protocolo de purificación en condiciones desnaturalizantes, ya que carecen de la estructura de barril TIM. Pese a ello, los resultados de actividad sugieren la presencia de dos poblaciones, una mal plegada e inactiva, y una que sí recuperó estructura y actividad, pero la proporción de esta última es tan pequeña que el DC no la detecta. Si consideramos el valor de la k_{cat} de MjTIM a 25°C como referencia, podríamos decir que MaTIM y MmaTIM recuperaron, en el mejor de los casos, el ~8% de su estructura (aunque la actividad de MjTIM no está en su máximo a esa temperatura), eso nos ayuda a explicar por qué se tuvo que incrementar la cantidad de enzima en los ensayos cinéticos. Dadas esas condiciones, proseguir con la caracterización estructural y funcional para propósitos del trabajo era inviable.

Sobre-expresión a bajas temperaturas y purificación.

Una alternativa a recuperar la proteína de cuerpos de inclusión es tratar de obtener una mayor proporción de proteína soluble desde su producción. Una manera de lograrlo es disminuir la temperatura de sobre-expresión. La velocidad de la maquinaria de transcripción y traducción disminuye con la temperatura, por lo que las proteínas tienen

más tiempo para plegarse en sus estructuras nativas mientras el RNA mensajero es traducido, lo que reduce la concentración de intermediarios parcialmente plegados, disminuyendo la agregación y la formación de cuerpos de inclusión (Burgess, 2009; Vera *et al.*, 2007). En colaboración con la Dra. Adriana Valdez y el Dr. Mauricio Trujillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas se crecieron células de *E. coli* a 12°C y se hicieron pruebas de expresión que resultaron en producción de proteína soluble. Posteriormente, se procedió a montar sendos biorreactores para producir las enzimas de interés (figura 17).

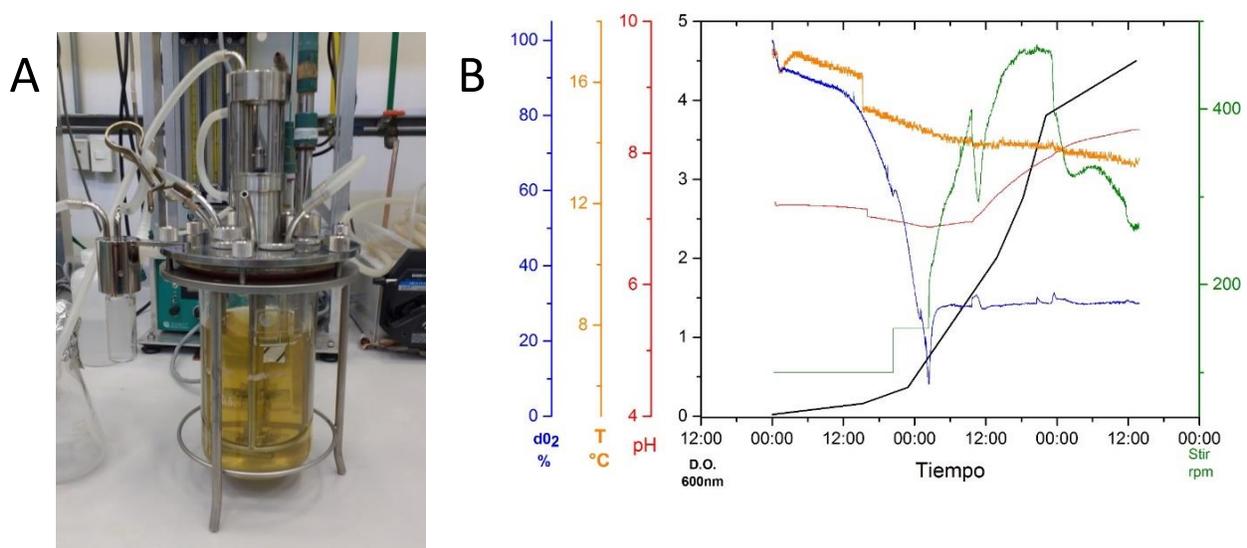


Figura 17. Producción de las TIMs mesófilas a bajas temperaturas. A. Se montaron biorreactores de tanque agitado a 15°C para la expresión de las proteínas. B. Se monitoreó el pH, temperatura (T), agitación y presión parcial de oxígeno (dO₂), así como la D. O. durante las 62 horas del experimento.

La purificación de la proteína expresada a bajas temperaturas se observa en la figura 18. El rendimiento final para MaTIM fue de 0.2 mg L⁻¹ de cultivo y para MmaTIM fue de 0.1mg L⁻¹ de cultivo. Si bien la baja temperatura ayuda a incrementar la proporción de proteína soluble al disminuir el metabolismo de la célula, también se corre el riesgo de que el lento crecimiento y tasa de síntesis reducida den como resultado bajos rendimientos, como acontece en este. La baja producción de las proteínas y el tiempo necesario para producirlas (aproximadamente dos semanas y media desde la preparación del preinóculo hasta el paso por la columna MonoQ) representaron un problema para la

caracterización fisicoquímica de las TIMs de mesófilos, pues no se produjo proteína suficiente para su caracterización.

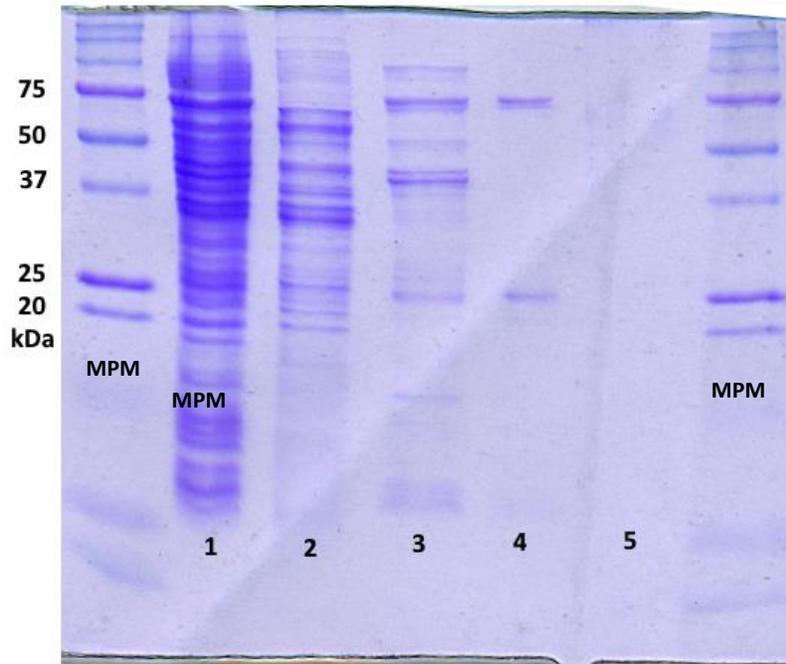


Figura 18. Purificación de MmaTIM expresada a bajas temperaturas. Estado de la proteína de acuerdo a los pasos secuenciales de purificación empleados. 1) Lisado celular, 2) Después de la primer paso por la HisTrap, 3) Después de cortar la cola de histidinas, 4) Después de segundo paso por la HisTrap y 6) Después de pasar por la MonoQ. La expresión se hizo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. MPM: Marcador de peso molecular

Consideraciones sobre la expresión heteróloga de proteínas

La producción de proteínas recombinantes en sistemas microbianos es una alternativa económica y amigable con el ambiente. A pesar de ello, su producción puede tener muchos problemas en la práctica, como la formación de cuerpos de inclusión, y su resolución implica probar distintas variables que afectan cómo se produce la proteína de interés.

Diseñar un protocolo de purificación para una proteína recombinante puede ser un extenso proceso de prueba y error. El proceso empieza con elegir un organismo donde llevar a cabo la sobre-expresión. Si bien *E. coli* es uno de los microorganismos más utilizados, también existen una miríada de alternativas en otras especies de bacterias, levaduras, hongos filamentosos, algas unicelulares y otras células eucariontes. Una vez

elegida la especie que se va a transformar, se tiene que considerar su microambiente citoplasmático, el cual suele ser diferente de aquel donde se produce naturalmente el péptido que se quiere sobre-expresar, y que esos cambios en pH, osmolaridad, potencial redox o presencia de cofactores pueden incrementar la inestabilidad (Rosano & Ceccarelli, 2014). Además de ello, se requiere seleccionar el plásmido y promotor más adecuados, ya que por lo regular la sobre-expresión de proteínas no endógenas ejerce una presión metabólica fuerte en la bacteria, lo que conduce a un desabasto de chaperonas que canalicen el plegamiento adecuado de los péptidos producidos (Gustafsson, Govindarajan, & Minshull, 2004; Rosano & Ceccarelli, 2014).

Para incrementar la solubilidad de MaTIM y MmaTIM hay una serie de aproximaciones metodológicas que se pueden implementar. Para sacar provecho de la disminución de la temperatura de sobre-expresión existen plásmidos y cepas de *E. coli* que compensan el problema de la tasa metabólica reducida (Rosano & Ceccarelli, 2014). Emplear proteínas fusionadas que incrementan la solubilidad es otra opción que ha dado resultados positivos en otras proteínas, principalmente cuando se colocan en el extremo N-terminal, donde auxilian al ribosoma para que el inicio de la traducción sea exitoso (Basu, Li, & Leong, 2011; Waugh, 2005). También se puede intentar utilizar cepas que co-expresen chaperonas endógenas de *E. coli* como DnaK, DnaJ, GrpE o el sistema GroEL-GroES (Gustafsson *et al.*, 2004). Aunque esas estrategias han servido para solubilizar proteínas, no existe un protocolo universal para solucionar el problema de los cuerpos de inclusión.

Otras aproximaciones que se pueden explorar están relacionadas con recuperar proteína nativa a partir de proteína agregada. Utilizar concentraciones elevadas de agentes desnaturizantes es la metodología más común, pero en muchas ocasiones esto conduce a la agregación de proteínas durante el proceso de replegamiento. Como respuesta, han surgido otros métodos que utilizan procesos de solubilización más moderados para solubilizar proteínas parcialmente plegadas, por ejemplo, usar pH alcalino, detergentes, solventes orgánicos, bajas concentraciones de agentes caotrópicos y alta presión. Para el replegamiento se pueden ocupar diversos métodos además de la diálisis, como el replegamiento en columna, la dilución pulsátil y el replegamiento mediado por urea (Singh *et al.*, 2015).

Para ayudar a diseñar un protocolo de expresión se recuperaron los protocolos utilizados para purificar la TIM de otras arqueas (ver tabla 6). En la mayoría de los casos la sobre-expresión se ha hecho a 37°C en *E. coli* y se ha utilizado una etiqueta de

histidinas para facilitar la purificación. De manera general, ninguna TIM de este clado ha necesitado recuperarse de cuerpos de inclusión. La diferencia más conspicua que encontramos es que los genes utilizados de MaTIM y MmaTIM tienen su secuencia optimizada para el uso preferencial de codones de *E. coli*.

Según la literatura, la optimización de codones puede ayudar a incrementar la producción de proteínas heterólogas, ya que se evitan limitaciones en la traducción del gen recombinante por desabastecimiento de tRNAs disponibles; sin embargo, el hacerlo también puede ser contraproducente. Las cadenas polipeptídicas nacientes pasan por un proceso de plegamiento co-traducciona, dicho proceso está vinculado con la cinética de reconocimiento del ribosoma con los tRNAs correspondientes. Cuando un codón de baja frecuencia para el organismo se presenta, la traducción se detiene brevemente, lo que provee del tiempo necesario para que la secuencia de aminoácidos encuentre el cófórmero adecuado. En ese sentido, la optimización, al afectar la eficiencia de la traducción, también altera la estructura y función de la proteína, sin olvidar que también incrementa la producción, lo que coadyuva al proceso de agregación *in vivo* (Yu *et al.*, 2016; Angov, Legler & Mease, 2011; Gustafsson *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha observado que la optimización ayuda a incrementar la vida media de los transcritos, lo que, además de impactar la tasa de enlongación traducciona, mantiene elevados los niveles de expresión (Presnyak *et al.*, 2016).

Con esa información en mente se decidió interrumpir el trabajo con los genes solicitados de MaTIM y MmaTIM, y se solicitó la secuencia sin optimizar de MaTIM en un vector pET28b(+) para corroborar nuestra hipótesis. Sin embargo, ninguna de las cepas transformadas con esta construcción presentó expresión alguna de la proteína, probablemente por algún problema en el marco de lectura del gen o en las condiciones de expresión.

Debido a las dificultades presentadas en obtención de cantidades adecuadas de proteína soluble de las TIMs mesófilas, el trabajo con éstas se suspendió en aras de continuar con el trabajo de caracterización de la TIM de *Methanocaldococcus jannaschii*, como se describe en la parte II de este trabajo. Quedó pendiente evaluar otras estrategias para la obtención de proteínas con las secuencias optimizadas, y mandar a secuenciar la secuencia nativa de MaTIM, para delimitar las razones por las cuales no hubo expresión en esta construcción.

Tabla 6. Purificación de otras TIMs de arqueas.

Especie	Organismo donde se expresó	Purificación desnaturalizante	Optimización de la secuencia	HisTag	Temperatura de sobre-expresión (°C)	Referencia
<i>P. furiosus</i>	<i>E. coli</i> B834(DE3)	No	No	N-terminal	37	Walden <i>et al.</i> , 2001
	<i>E. coli</i> XL1-Blue	No	No	No	37	Mukherjee & Guptasarma, 2005
	<i>E. coli</i> M-15	Sí	No	N-terminal	37	Mukherjee <i>et al.</i> , 2005
<i>T. tenax</i>	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	No	No	N-terminal	NR	Walden <i>et al.</i> , 2004
<i>M. fervidus</i>	Sp. de origen	No	No	No	83	Schramm <i>et al.</i> , 2001
<i>M. bryantii</i>	Sp. de origen	No	No	No	NR	Kohlhoff <i>et al.</i> , 1996
<i>M. jannaschii</i>	<i>E. coli</i> AA200	No	No	No	37	Gayathri <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)pLysS	No	No	C-terminal	20	Park <i>et al.</i> , 2016
<i>T. onnurineus</i>	<i>E. coli</i> XL1-Blue	No	No	N-terminal	37	Sharma & Guptasarma, 2015
<i>T. acidophilum</i>	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)pLysS	No	No	C-terminal	20	Park <i>et al.</i> , 2016

NR. No reportado

PARTE II: TIM HIPERTERMÓFILA

Pruebas de expresión y purificación

La TIM de *M. jannaschii* se ha expresado anteriormente sin optimización de codones (c. fr. tabla 6), por lo que teníamos la certeza de que se podía obtener proteína soluble utilizando los nucleótidos sin modificar, así que solicitamos la síntesis de dicho gen en un vector de sobre-expresión pET28b(+).

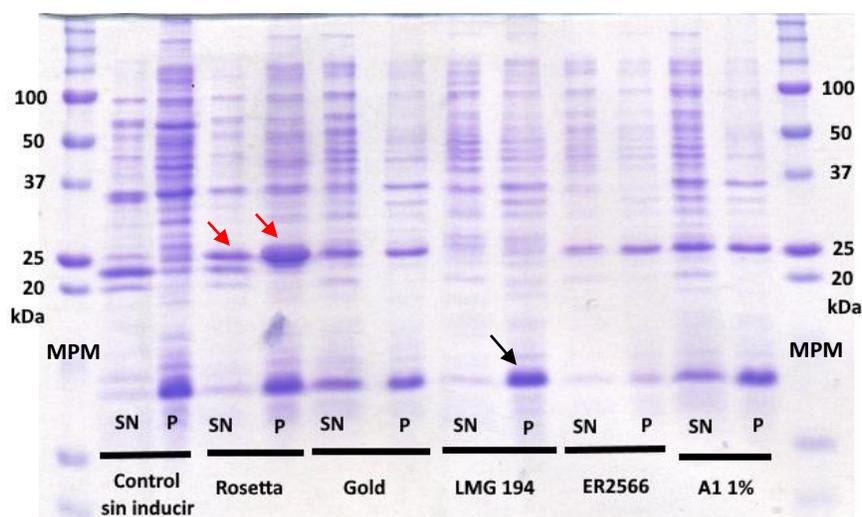


Figura 19. Sobre-expresión de MjTIM en distintas cepas de *E. coli*. Las células se sonicaron después de una incubación previa con lisozima (banda más gruesa por debajo de los 20 kDa). Para la cepa A1 se utilizó 1% de arabinosa. La flecha negra indica la banda de lisozima, las flechas rojas indican la MjTIM tanto en el pellet como en el sobrenadante. SN: sobrenadante, P: Pellet del lisado, MPM: Marcador de peso molecular

Como se aprecia en la figura 19, la sobre-expresión de MjTIM fue exitosa en la mayoría de los casos, particularmente en la cepa *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, por lo que se decidió usar esa cepa para la expresión. Cabe destacar que, si bien parece que la mayor parte de la proteína se encuentra en cuerpos de inclusión, las células no se rompieron adecuadamente durante esta prueba.

Dado que MjTIM es una enzima proveniente de un organismo hipertermófilo, posterior al lisado celular por presión, se dio un tratamiento térmico a 70°C por 10 minutos, lo que ayudó a eliminar impurezas de la muestra, además de restos de DNA endógeno. Después de pasar por la HisTrap, la proteína se obtenía pura (figura 20).

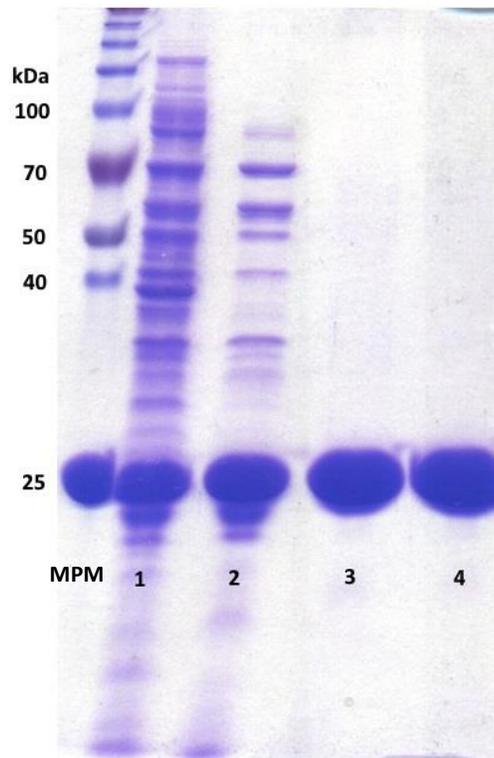


Figura 20. Purificación de MjTIM no optimizada. Pasos del protocolo de purificación de MjTIM. 1) Lisado celular. 2) Sobrenadante después del tratamiento a 70°C por 10 minutos. 3 y 4) Fracciones de la HisTrap. La expresión se hizo en la cepa de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. MPM: Marcador de peso molecular

Se purificaron cuatro lotes a partir de cultivos de 1 L en matraces bafleados de la proteína con un rendimiento promedio de 36 mg L⁻¹ de cultivo. Un lote de MjTIM purificada se puede obtener en tres días a partir de que se inoculan las células en el medio LB.

Durante la purificación se detectó que la cola de histidinas no era eliminada por el tratamiento con trombina, probablemente debido a algún impedimento estérico del sitio de corte. Para corroborar esta información, se generó un modelo preliminar de la estructura tridimensional de un monómero de MjTIM con la etiqueta de histidinas en el software I-TASSER (Yang *et al.*, 2015; Figura 21). Se observa que la posición de la etiqueta de histidinas no interfiere con las superficies de oligomerización y queda en el lado opuesto del sitio catalítico del barril. También se observa que la etiqueta queda expuesta hacia el exterior del barril, pero el sitio de reconocimiento se encuentra encerrado entre el barril y

la etiqueta, por lo es probable que la trombina no pueda interactuar con el sitio y por ello no realice el corte exitosamente.

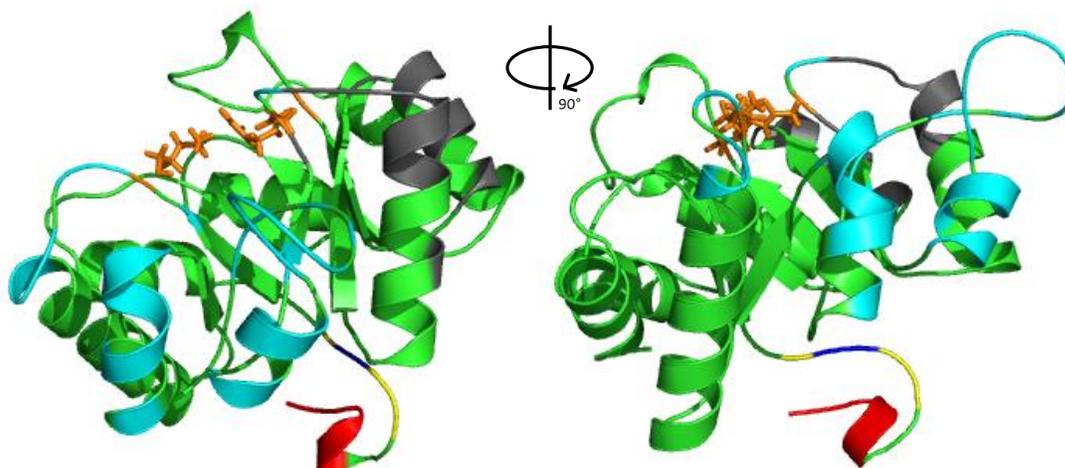


Figura 21. Modelo de MjTIM con etiqueta de histidinas. Predicción de la estructura generada con I-TASSER. En cian la superficie de dimerización, en gris la superficie de tetramerización. Se indican con naranja los residuos catalíticos. En rojo se indican las seis histidinas y en amarillo el sitio de reconocimiento de la trombina, en azul los residuos que se escinden.

Debido a que la etiqueta no parece interferir con las superficies de oligomerización, ni con la catálisis, y además se tiene una purificación con un rendimiento satisfactorio para los propósitos de este trabajo, se decidió hacer la caracterización de MjTIM con etiqueta de histidinas.

Parámetros catalíticos y caracterización espectroscópica de MjTIM

Para probar que la proteína era funcional se ensayó la actividad a 25°C de los cuatro lotes (Figura 22). Adicionalmente se ensayaron cinéticas a 15, 35 y 45°C (Figura 23), y se obtuvieron los parámetros catalíticos para cada caso (Tabla 7). Con los valores de la $V_{m\acute{a}x}$ a diferentes temperaturas se obtuvo un gráfico de Arrhenius con el que pudimos extrapolar valores cinéticos a 85°C (Figura 24).

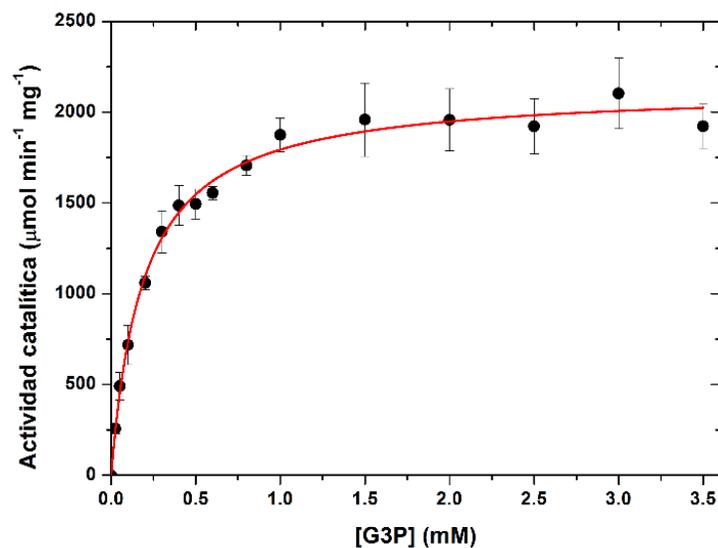


Figura 22. Cinética de MjTIM a 25°C. Se midió la actividad catalítica a distintas concentraciones de G3P de los cuatro lotes purificados de MjTIM y se promediaron. Los datos promedio se ajustaron a un modelo de Michaelis-Menten. Los ensayos se hicieron en buffer TED 100:10:1, pH 8.0 con 10ng totales de proteína.

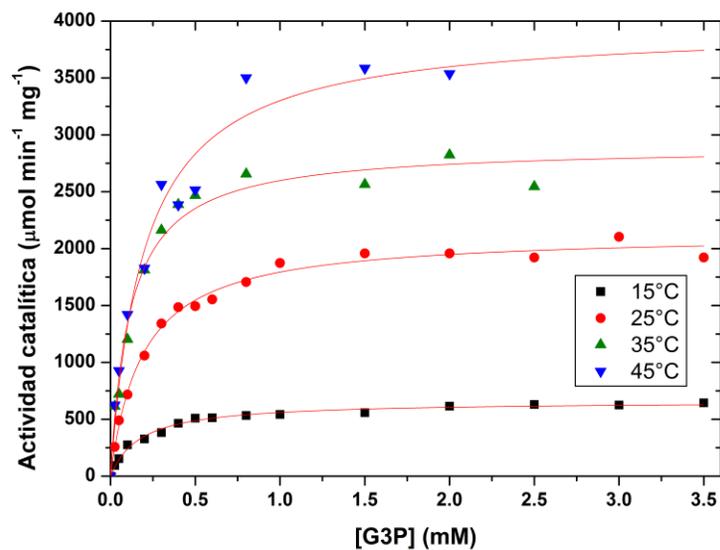


Figura 23. Cinéticas de MjTIM a diferentes temperaturas. Se seleccionó el lote de mayor actividad específica y se hicieron ensayos de su actividad a 15, 35 y 45°C. Los ensayos se hicieron en buffer TED 100:10:1, pH 8.0 con 10 ng totales de proteína.

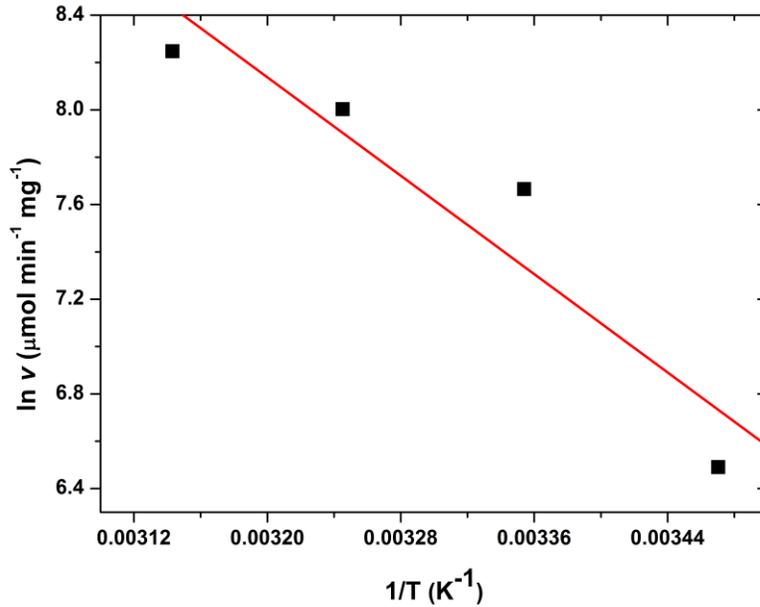


Figura 24. Gráfico de Arrhenius de la actividad catalítica de MjTIM. .

Tabla 7. Parámetros catalíticos de MjTIM y otras TIMs de arqueas.

Enzima	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	Eficiencia catalítica ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Referencias
MjTIM 15°C	$(1.65 \pm 0.03) \times 10^4$	0.17 ± 0.01	$(4.7 \pm 0.3) \times 10^7$	Este trabajo
MjTIM 25°C	$(5.36 \pm 0.09) \times 10^4$	0.19 ± 0.01	$(1.4 \pm 0.9) \times 10^8$	Este trabajo
MjTIM 35°C	$(7.51 \pm 0.28) \times 10^4$	0.12 ± 0.02	$(3.0 \pm 0.6) \times 10^8$	Este trabajo
MjTIM 45°C	$(9.59 \pm 0.5) \times 10^4$	0.18 ± 0.03	$(2.6 \pm 0.6) \times 10^8$	Este trabajo
MjTIM 85°C*	7.16×10^5	0.18	1.92×10^9	Este trabajo
PfuTIM 25°C	9.29×10^7	1.22 ± 0.14	1.27×10^9	Sharma & Guptasarma, 2015
TonTIM 25°C	8.58×10^7	1.67 ± 0.2	0.86×10^9	Sharma & Guptasarma, 2015
TtxTIM 70°C	1.44×10^5	0.2	2.12×10^8	Walden <i>et al.</i> , 2004

PfuTIM, *Pyrococcus furiosus*. TonTIM. *Thermococcus onnurineus*, TtxTIM. *Thermoproteus tenax*.

*Datos obtenidos de la extrapolación del gráfico de Arrhenius.

Debido a que la α -GDH que se utiliza en el ensayo proviene de un organismo mesófilo, no se pudieron ensayar temperaturas más cercanas a la temperatura de crecimiento óptimo de *M. jannaschii*.

Como se observa en la tabla 7, los valores de k_{cat} incrementan con la temperatura, mientras que la K_M permanece casi sin cambios, mientras que su eficiencia catalítica se

encuentra cercana al límite de difusión en las temperaturas evaluadas en el rango evaluado. Con el gráfico de Arrhenius se extrapoló el dato de k_{cat} a 85°C y suponiendo que el valor de K_M no se modifica con el incremento de temperatura (aunque desconocemos el comportamiento de este parámetro a temperaturas más elevadas), estimamos, de manera sumamente preliminar, que a esa temperatura la eficiencia catalítica sí está limitada por difusión. Los parámetros se comparan con los valores reportados en la literatura a 25°C de la TIM de *Pyrococcus furiosus* y de *Thermococcus onnurineus*, ambas tetraméricas provenientes de otras arqueas. PfuTIM y TonTIM son menos afines al substrato, pero su valor de k_{cat} es tres órdenes de magnitud mayor que el de MjTIM, por lo que éstas tienen una eficiencia catalítica superior, dentro del límite de difusión. Los valores de k_{cat} y una K_m de la TIM de *Thermoproteus tenax* (TtxTIM) a 70°C coinciden con los de la MjTIM a 25°C.

Se evaluó por dicroísmo circular la estructura secundaria a 25 y 80°C de la proteína (figura 25) y se hizo la deconvolución de los datos. Los resultados se compararon con los porcentajes de estructura secundaria indicados por la estructura cristalográfica de MjTIM (PDB: 2H6R), como se observa en la tabla 8.

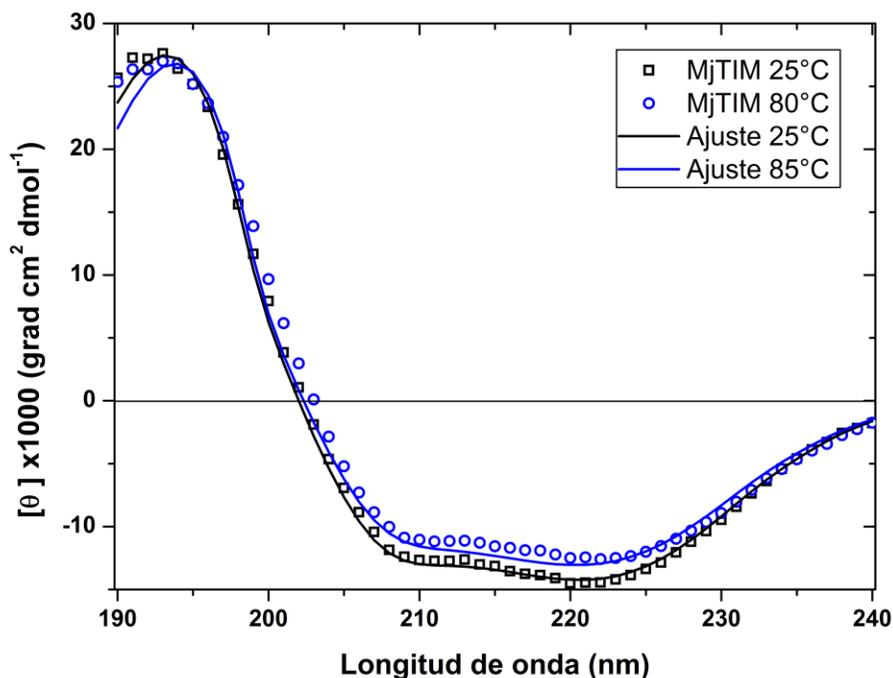


Figura 25. Espectro de DC de MjTIM. Se siguió la señal de DC de MjTIM a una concentración de 0.2 mg ml⁻¹ en buffer NaH₂PO₄ 10 mM, pH 8.0. En líneas se muestran los ajustes de la deconvolución realizada por el software K2D3.

Tabla 8. Deconvolución de los espectros de DC de MjTIM.

Estructura secundaria	MjTIM (por estructura cristalográfica)	MjTIM 25°C	MjTIM 80°C
Hélices α	36%	33.75%	30.05%
Hojas β	17%	19.66%	22.37%
Estructura al azar	47%	46.59%	47.58%

En los espectros de DC se encontraron los mínimos esperados a 222 y 208 nm, así como el máximo a 195 nm, lo que indica que la proteína se encuentra bien plegada. La diferencia en los valores de deconvolución de los espectros es insignificante, por lo que no podemos concluir que hubo diferencias importantes en la estructura secundaria de la proteína con el incremento de la temperatura. Pese a que la TIM purificada tiene etiqueta de histidinas, los porcentajes de estructura secundaria obtenidos por la estructura cristalográfica no son muy distintos a los encontrados por el algoritmo de deconvolución.

El estado oligomérico se corroboró por cromatografía de exclusión molecular analítica (figura 26). Se realizó la calibración de la columna y se obtuvo que la MjTIM purificada corresponde, por su peso molecular experimental y su radio de Stokes, a un tetrámero (tabla 9).

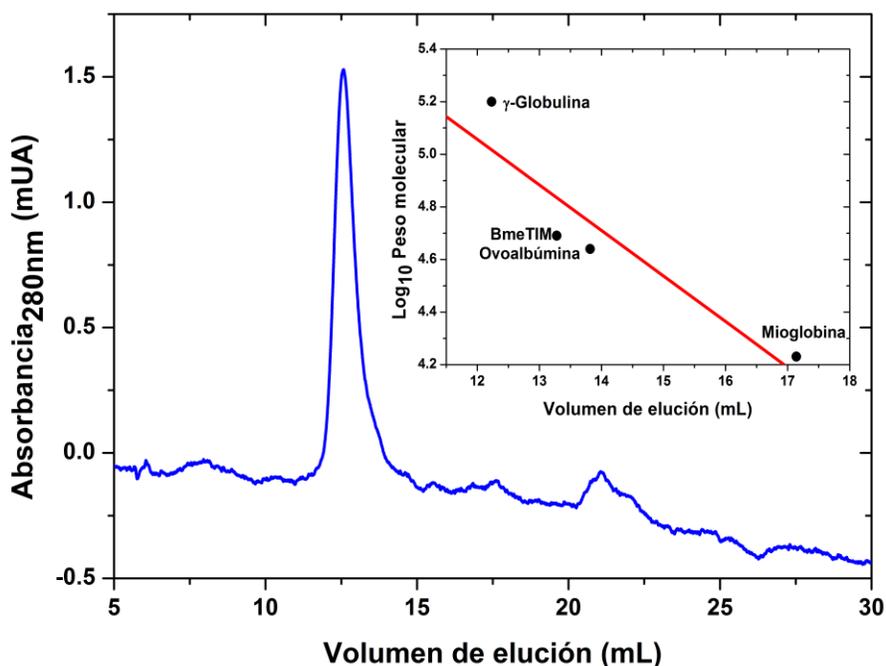


Figura 26. Cromatografía de exclusión molecular analítica de MjTIM. Se determinó el estado oligomérico de MjTIM en una columna Superdex 200 10/300 (GL ©). Para la calibración se utilizaron los estándares de filtración de BioRad ©. Se muestra el cromatograma hecho con 0.5 mg mL^{-1} de MjTIM en buffer NaH_2PO_4 10 mM, pH 8.0.

Tabla 9. Determinación del estado oligomérico de la MjTIM purificada.

TIM	Peso molecular teórico del monómero (Da)	Volumen de elución (mL)	Radio de Stokes (Å)	Peso molecular experimental (Da)	Estado oligomérico
MjTIM	25120	12.58	43.96	105545.81	Tetrámero (4.2)

Se obtuvo el cromatograma de MjTIM a 0.1 y 0.05 mg mL^{-1} de proteína, pero la absorbancia observada a 280 nm, por la ausencia de triptófanos, era muy baja y el ruido demasiado, por lo que esos datos no se analizaron.

Desnaturalización por temperatura

A través de DSC se evaluó el desplegamiento térmico. El experimento consistió en un primer ciclo de calentamiento de la muestra se observa una transición endotérmica, pero en el segundo ciclo ya no se observa dicha transición (figura 27). Esto indica que no existe reversibilidad en la desnaturalización térmica de MjTIM. En general, las proteínas hipertermófilas con desplegamiento reversible son inusuales, esto responde principalmente a las modificaciones químicas que se dan a altas temperaturas, como la desamidación de los residuos de asparagina y glutamina, la hidrólisis de los enlaces peptídicos y la oxidación de las cisteínas; las cuales imposibilitan la renaturalización de la cadena polipeptídica hacia el estado nativo (Vieille & Zeikus, 2001). La caída en señal de C_p^{exc} después de la transición corresponde a un proceso de agregación de la muestra.

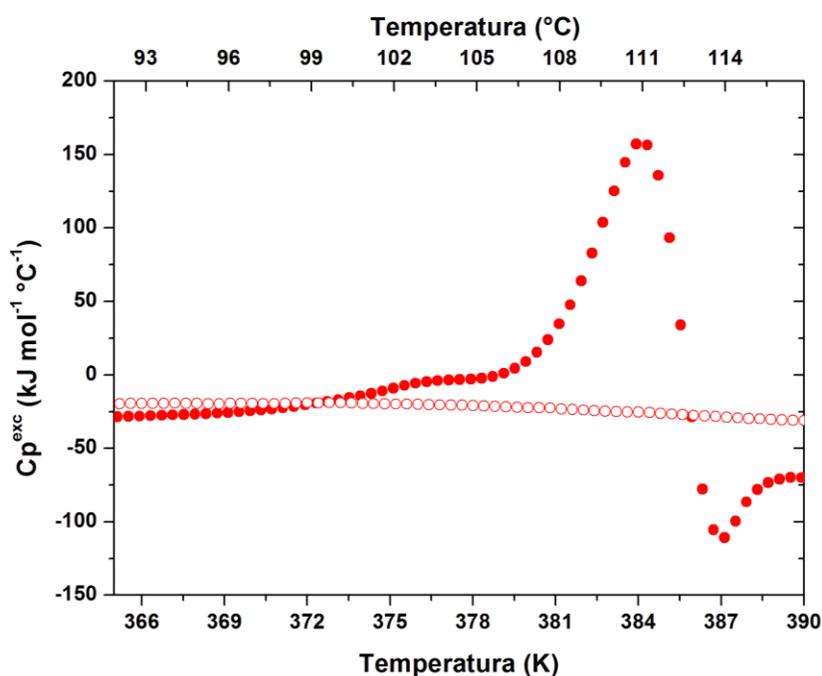


Figura 27. Curva de desnaturalización térmica de MjTIM. Se evaluó la reversibilidad del proceso de desnaturalización por DSC. Los símbolos llenos muestran el primer barrido, los vacíos muestran el segundo barrido. Se utilizó una concentración de 0.4 mg mL⁻¹ de proteína en buffer NaH₂PO₄ 10mM, pH 8.0 con una velocidad de barrido de 90 K h⁻¹.

Posteriormente, se estudió el cambio del valor de T_m con respecto a la velocidad de barrido para evaluar la existencia de control cinético en el desplegamiento. Para ello se evaluaron cuatro velocidades de barrido (figura 28). Entre las velocidades de barrido más lejanas (60 y 150 K h⁻¹) se obtuvo una diferencia de ~1 K, lo que indica que existe un control cinético en nuestra proteína.

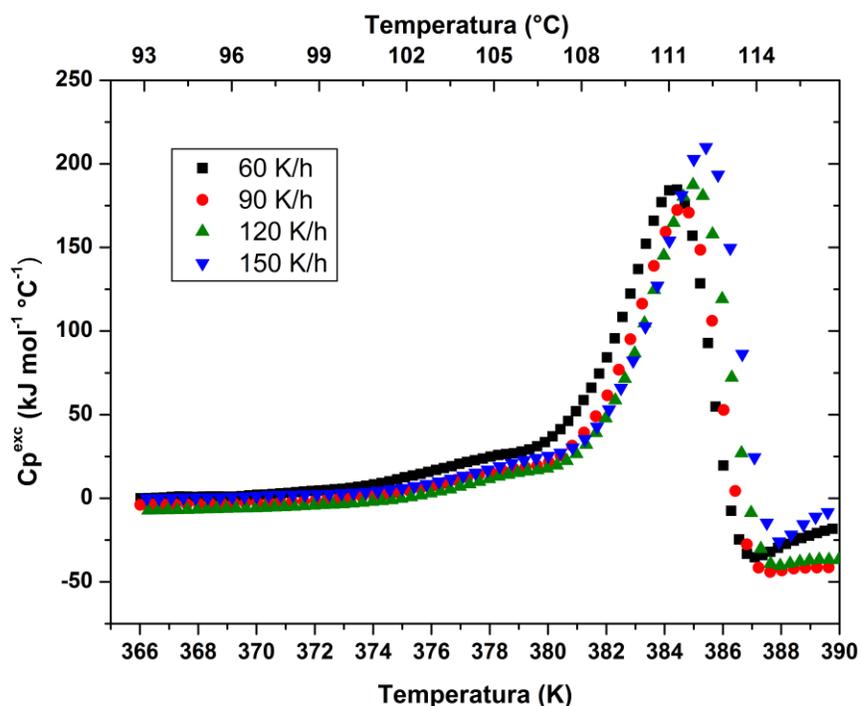


Figura 28. Desnaturalización térmica de MjTIM a distintas velocidades de barrido. Para todos los ensayos se utilizó una concentración de proteína de 0.4mg mL⁻¹ en buffer NaH₂PO₄, pH 8.0.

Las trazas obtenidas a diferentes velocidades de barrido se ajustaron a un modelo de dos estados irreversible y se obtuvieron valores de E_A y T_m (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros promedio del ajuste de las trazas calorimétricas a un modelo de dos estados irreversible. Los errores están dados por el ajuste de la ecuación.

TIM	Energía de activación (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	T_m (°C)	Referencia
MjTIM	973.34 ± 5.5	739.46 ± 3.45	111.8 ± 0.01	Este trabajo
TmTIM	--	--	102	Alvarez <i>et al.</i> , 1999

El valor de la T_m de MjTIM es el más alto reportado para cualquier trifosfato isomerasa hasta el momento, superando el valor de la TIM de *Thermotoga maritima* (Alvarez *et al.*, 1999)

La estabilidad térmica de las proteínas está compuesta por su estabilidad termodinámica y su estabilidad cinética. La estabilidad termodinámica se obtiene de la diferencia en la energía libre de desplegamiento entre el estado nativo y el estado desplegado. Para estimar el valor de esta energía se requiere que el proceso de desplegamiento sea reversible. Por otra parte, la estabilidad cinética se determina a través de la energía de activación del desplegamiento (Duy & Fitter, 2005). La estabilidad cinética puede estar dada cuando la proteína es termodinámicamente estable con respecto a los estados no funcionales, pero dichos estados pasan por alteraciones irreversibles (v. gr. agregación, proteólisis, etc.) que conducen a un estado final incapaz de regresar al estado nativo. Debido a que la constante de velocidad del paso del estado no funcional al estado final es muy elevada, este escenario se evalúa según el modelo de dos estados de Lumry-Eyring:



donde N es el estado nativo y F es la forma final. Dado que la proteína eventualmente terminará en el estado final, su función biológica se debe llevar a cabo en una escala de tiempo fisiológicamente relevante para desempeñar su función biológica (Sánchez-Ruiz, 2010; Lumry & Eyring, 1954). La determinación de la E_A de MjTIM fue evaluada por tres métodos diferentes (figura 29), tal como se describe en la metodología. Los resultados se resumen en la tabla 11.

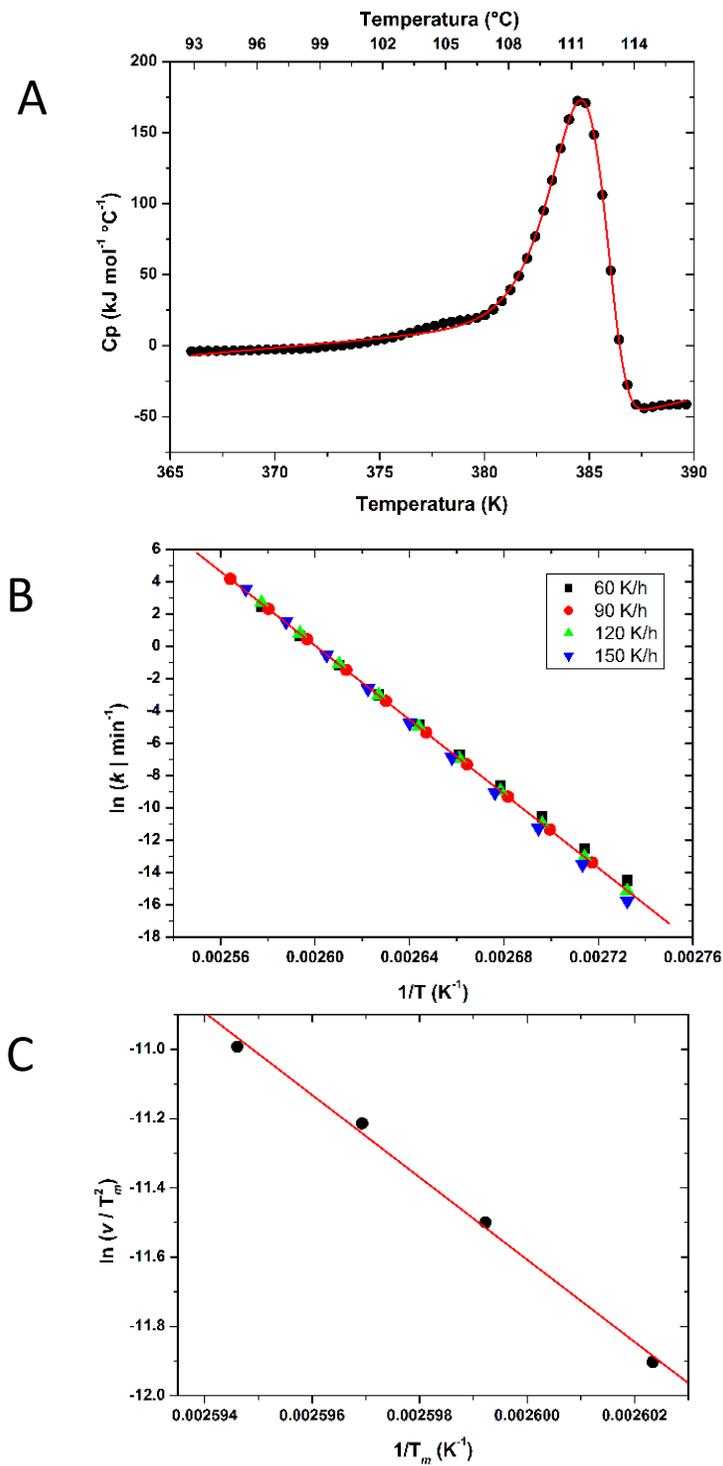


Figura 29. Procedimientos utilizados para calcular la energía de activación. La energía de activación de MjTIM se evaluó con 3 métodos distintos. A. Ajuste de las trazas a diferentes velocidades de barrido ajustadas a un modelo de dos estados irreversible B. Gráfico de Arrhenius para cada velocidad de barrido C. Corrimiento de la T_m según la velocidad de barrido.

Tabla 11. Energía de activación calculada con distintos métodos.

Método	MjTIM	TcTIM ¹	LmTIM ¹	GoTIM ²	NpTIM ²
Promedio de los ajustes individuales a un modelo de dos estados irreversible	973.34 ± 5.5	809.4 ± 7.0	312.3 ± 4.6	716.72 ± 63.2	367.77 ± 46.0
Gráfico de Arrhenius	953.53 ± 6.4	792.8 ± 17.6	315 ± 3.3	716.3 ± 19.2	366.1 ± 5.0
Variación de la T _m con respecto a la velocidad de barrido	988.02 ± 46.7	714.6 ± 137.3	346.6 ± 39.0	713.79 ± 89.5	343.92 ± 19.7
Promedio de los métodos	971.63 ± 19.53	772.27 ± 53.97	324.67 ± 15.63	715.6 ± 57.3	359.26 ± 23.57

TcTIM, *Trypanosoma cruzi*. LmTIM, *Leishmania mexicana*. GoTIM, *Gemmata obscuriglobus*. NpTIM, *Nostoc punctiforme*. ¹Costas et al., 2009. ²Romero-Romero et al., 2015

Pese a que el valor de la T_m no se modifica considerablemente con la velocidad de barrido, es importante resaltar que para el cálculo de la E_A el corrimiento de la T_m con la velocidad de barrido (c. fr. Figura 29-C) nos genera un valor consistente con los otros dos métodos.

No se tienen datos reportados de E_A para TIMs tetraméricas, hipertermófilas o de otras arqueas. En la tabla 11 se comparan con valores de E_A obtenidos en este trabajo dos eucariontes y dos bacterias. Previo a este trabajo el valor de E_A más elevado reportado para una TIM le pertenecía a *Trypanosoma cruzi*; sin embargo, MjTIM tiene una E_A ~200 kJ mol⁻¹ más elevada. Por lo general, las proteínas hipertermófilas presentan energías de activación superiores a las de sus contrapartes mesófilas, lo que sugiere que el paso limitante en su inactivación es el desplegamiento (Duy & Fitter, 2005; Ostendorp, Auerbach & Jaenicke, 1996; Camacho et al., 1995; Villa et al., 1993).

Desnaturalización por agentes químicos

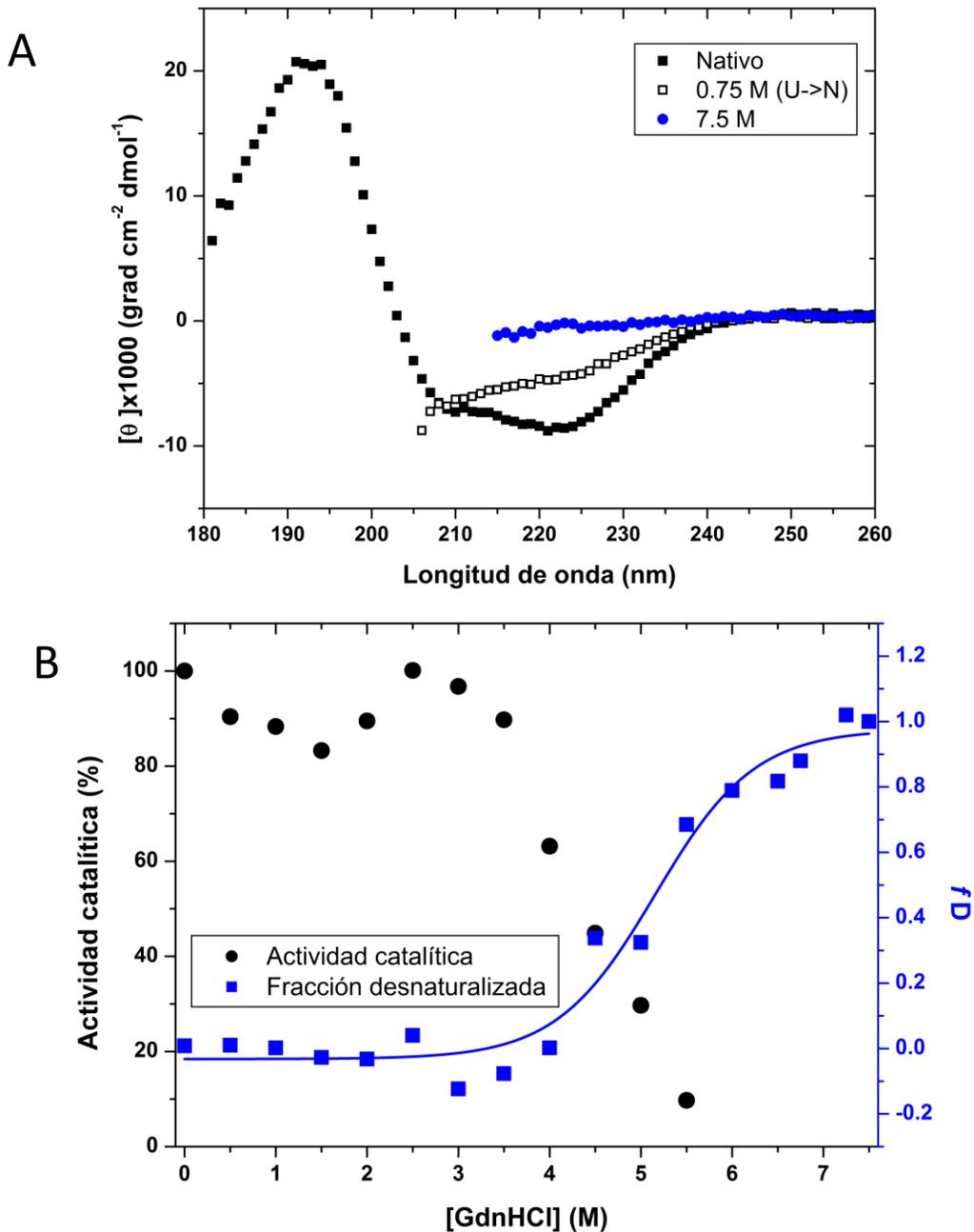


Figura 30. Desnaturalización de MjTIM con cloruro de guanidinio. A. Espectro de DC MjTIM nativo, de desnaturalización de 0 a 7.5 M y de renaturalización de 7.5 a 0.75 M de guanidinio. Los espectros se muestran hasta donde el ruido provocado por el guanidinio lo permitió. B. Cambio en la señal a 222 nm de DC y en la actividad catalítica a distintas concentraciones de cloruro de guanidinio. Se muestra el ajuste a la ecuación de Boltzmann de la fracción desnaturalizada. El tiempo de equilibrio del proceso se da después de 24 horas de iniciar la incubación a 25°C.

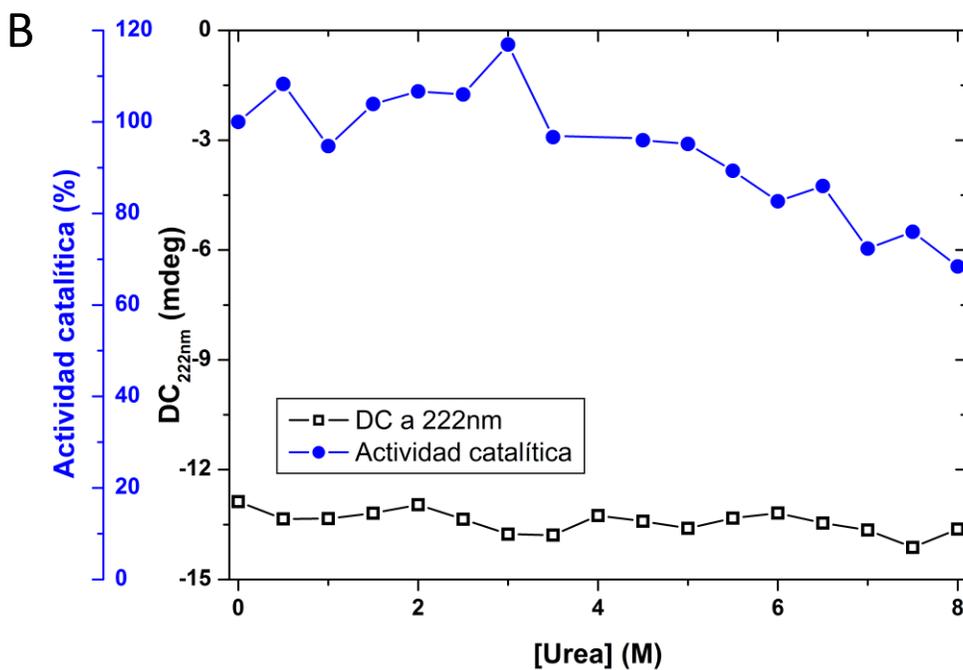
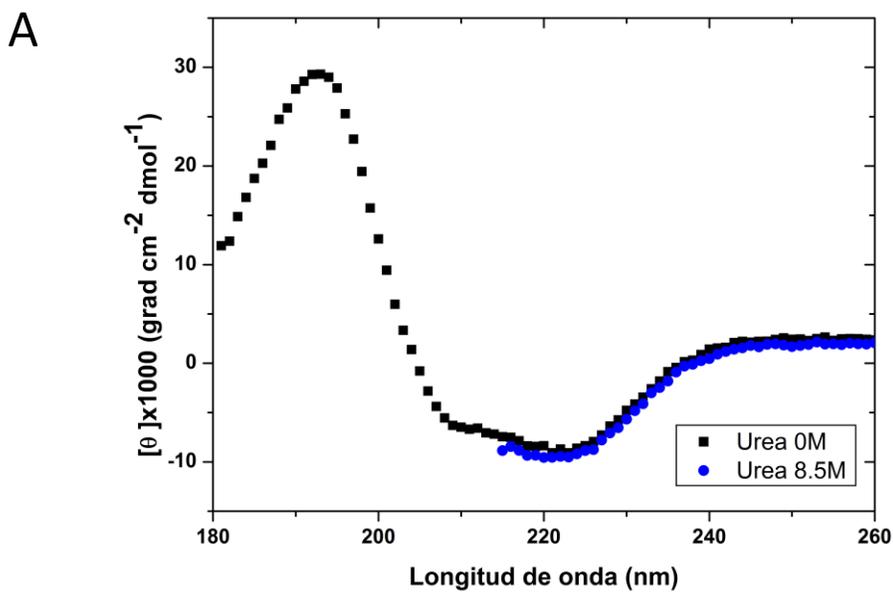


Figura 31. Desnaturalización de MjTIM en urea. Los resultados mostrados son de mediciones de DC después de 6 días de incubación a 25°C. A. Espectro de DC de MjTIM nativo e incubado con 8.5 M de urea. Los espectros se muestran hasta donde el ruido provocado por la urea lo permitió. B. Se siguió la señal de DC a 222 nm y se midió la actividad catalítica a distintas concentraciones de urea.

Se hicieron pruebas de desnaturalización con agentes químicos para MjTIM. La desnaturalización con GdmHCl resultó en un proceso irreversible (figura 30), el cual al ser ajustado a un modelo de dos estados muestra una concentración de desnaturalización (C_m) aparente de 5.2 ± 0.1 M (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de C_m para diferentes TIMs.

TIM	C_m (M)	Referencia
MjTIM	5.2	Este trabajo
PfuTIM	5.4	Chandrayan & Guptasarma, 2009
TmTIM	3.5	Beaucamp <i>et al.</i> , 1997
PfTIM	1.4	Gokhale <i>et al.</i> , 1999
TcTIM	1.1, 2.4	Chávez-Cárdenas <i>et al.</i> , 2005
TbTIM	1.1, 2.2	Chávez-Cárdenas <i>et al.</i> , 2002

TmTIM, *Thermotoga maritima*. PfTIM, *Plasmodium falciparum*. TbTIM *Trypanosoma brucei*.

Como se observa en la tabla 12, los valores de la C_m en distintas TIMs mesófilas a 25°C son relativamente bajos, incluso en aquellas donde se tiene un proceso de desplegamiento de dos estados como la TcTIM y la TbTIM. No obstante, este valor aumenta en proteínas termófilas e hipertermófilas. Para las dos TIMs de arqueas para las cuales se tiene reportado el valor de C_m encontramos que se necesita una gran cantidad del desnaturalizante (>5 M) para desnaturalizar la mitad de MjTIM.

Las pruebas con urea, por otro lado, no manifestaron algún cambio importante en la señal a 222 nm incluso a 8 M de urea incubada 144 horas (figura 31A). Las pruebas de actividad catalítica tampoco mostraron un gran cambio, siendo que la actividad disminuyó un 30% en la muestra incubada con 8 M de urea (figura 31B). Por lo que podemos concluir que la urea no desnaturalizó a la proteína.

La interacción del agua con los iones es importante en la biología porque los iones afectan la conformación y la actividad de las proteínas y ácidos nucleicos. Los iones se clasifican como cosmotrópicos (que generan estructura) o caotrópicos (que rompen estructuras), de acuerdo a su capacidad relativa de inducir la estructuración del agua y modular el efecto hidrofóbico (efecto de Hofmeister). Los iones se pueden listar en orden según qué tan fuerte modulan la hidrofobicidad de una solución. Los iones pequeños tienden a generar el efecto de *salting-out*, eso es, reducir la solubilidad hidrofóbica en el

agua; mientras que los iones grandes tienden a causar el efecto de *salting-in*, es decir, generar un incremento en la solubilidad de las partículas no polares en agua, como el benceno (Hribar *et al.*, 2002). Las proteínas, que contienen múltiples grupos cargados en su cadena lateral, dependen, entre otras cosas, de la concentración de sales y otros solutos disueltos. La relación entre la concentración de los solutos y la estabilidad de las proteínas se ha estudiado extensivamente, y se sabe que los compuestos que generan un efecto tipo *salting-out*, como el sulfato de amonio, precipitan a las proteínas; por otro lado, aquellos de efecto tipo *salting-in* incrementan la solubilidad, generando el desplegamiento de las mismas (Zhang, 2012).

La urea y el hidrocloreuro de guanidinio son agentes caotrópicos y provocan el efecto de *salting-in*, es decir, despliegan a las proteínas a través de generar un entorno estable para las estructuras desplegadas al afectar la relación de éstas con el agua. Sin embargo, no se saben con exactitud los mecanismos físicos por los cuales eso sucede. Existen dos hipótesis que buscan explicar este comportamiento. La primera postula que estos agentes modifican indirectamente las propiedades del solvente, es decir, transtocan la red de puentes de hidrógeno alrededor de las proteínas con una porción hidrofóbica e incrementan así la superficie expuesta al solvente. La segunda dice que el agente desnaturizante interactúa directamente con las cadenas polipeptídicas, compitiendo con los puentes de hidrógeno intramoleculares (Rocco *et al.*, 2017; Möglich, Krieger & Kiefhaber, 2005). El GdmHCl tiene una capacidad desnaturizante superior a la de la urea, esto se debe a que en solución se descompone en las especies iónicas Gdm^+ y Cl^- , lo que le confiere propiedades diferentes de hidratación y afecta también las interacciones electrostáticas de las proteínas (Mason *et al.*, 2017). Esa diferencia entre los agentes desnaturizantes ayuda a explicar por qué el cloruro de guanidinio sí afecta la estructura y función de MjTIM mientras que la urea no provoca cambios importantes.

La resistencia a la desnaturización por urea se ha reportado en otras proteínas altamente termoestables de la arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus* como la β -glucosidasa (Powers, Robinson, & Robinson, 2007), la aminopeptidasa, la rubredoxina, la amilasa, la argininosuccinato liasa y la misma triosafosfato isomerasa (Khan *et al.*, 2016) cuando se hacen los ensayos a 25°C, pero su acción desnaturizante se vuelve conspicua a temperaturas más elevadas.

Pese al efecto prácticamente nulo de la urea a 25°C sobre MjTIM, un experimento que se puede realizar es analizar el efecto de la concentración de desnaturizante sobre el cambio en la energía de activación seguida por DSC, mediante la obtención del valor de m cinética, lo cual nos daría información sobre los cambios en el área accesible al solvente de la proteína durante la desnaturalización irreversible (Costas *et al.*, 2009).

Consideraciones finales acerca del trabajo realizado

Debido a las complicaciones encontradas en el proceso de purificación de MaTIM y MmaTIM, no se pudieron correlacionar estadísticamente los datos de obtenidos de la caracterización fisicoquímica con la temperatura de crecimiento de los organismos de los cuales se eligieron las TIMs estudiadas para identificar adaptaciones según el método comparativo filogenético (para un resumen de los resultados de las tres proteínas, ver tabla 13). Sin embargo, los datos obtenidos de MjTIM arrojan una serie de dudas importantes sobre las fuerzas evolutivas que explican sus características particulares y cómo se relacionan éstas con las TIMs de otras arqueas emparentadas.

La relación entre la estabilidad de una proteína y su flexibilidad estática es compleja, pero se sabe que mientras más flexible es una proteína, mayor es su actividad catalítica y menor es su estabilidad (Kamerzell & Middaugh, 2017). Las enzimas hipertermófilas, cuando se evalúan a temperatura ambiente, son menos flexibles que sus homólogos mesófilos y por tanto su actividad catalítica es menor, pero cuando se llevan a la temperatura de crecimiento del organismo del que provienen la actividad catalítica se hace comparable (Vieille & Zeikus, 2001). MjTIM cumple con esas características, es una enzima muy estable cuya actividad catalítica incrementa con la temperatura y por ende su flexibilidad estática incrementa también. Recientemente, Quezada *et al.* (2017), utilizando datos de DSC y simulaciones de dinámica molecular, propusieron el concepto de flexibilidad térmica, que es una medida del incremento en el tamaño del espacio conformacional disponible para una proteína debido a un gradiente de temperatura. Estos autores encontraron que existe una correlación positiva entre la flexibilidad térmica de una proteína y su valor de E_A . Tomando eso en consideración y que MjTIM tiene una energía de activación muy elevada, no es arriesgado pensar que a 85°C quizá la actividad catalítica de MjTIM, así como muchos de sus homólogos, esté limitada por difusión. Este supuesto también se complementa con la extrapolación que se hizo de la actividad catalítica (tabla 7). Como se mencionó en los antecedentes, la TIM se considera,

históricamente, una enzima catalíticamente perfecta, ya que una gran proporción de TIMs estudiadas tienen una eficiencia catalítica limitada por difusión ($1 \times 10^8 - 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$); no obstante, también se han encontrado TIMs que se encuentran por debajo de ese criterio, por ejemplo las TIMs de *Helicobacter pylori* (Chu *et al.*, 2008), *Moritella marina* (Alvarez *et al.*, 1998), *Sus scrofa*, *Taenia solium* (Jiménez *et al.*, 2003), etc. La explicación más sencilla para explicar por qué algunas TIMs son más eficientes que otras sería que hay una presión de selección que las obliga a mantenerse limitadas por difusión; sin embargo, como se mencionó, el pensamiento adaptacionista no es el mejor para reflejar la complejidad de los procesos biológicos, especialmente si no conocemos con claridad qué tan importante es la actividad de la TIM en la adecuación de los organismos (la cual puede ser muy variable entre distintas especies).

Estudios de inferencia de estados ancestrales indican, de manera consistente, que el ancestro común de todas las arqueas debió tener una temperatura óptima de crecimiento correspondiente a un organismo hipertermófilo, por lo que la presencia de arqueas mesófilas actuales se debe a un proceso adaptativo a temperaturas menores. En un evento de divergencia más reciente, el ancestro común de todos los Methanococcales parece ser, cuando menos, un organismo termófilo (Groussin & Gouy, 2011; Boussau *et al.*, 2008). Es en este punto donde se vuelve necesario resaltar nuevamente la importancia de hacer un estudio evolutivo adecuado. Si una enzima tan estable como MjTIM tiene una eficiencia muy cercana a difusión a 25°C, ¿qué implicaciones tiene eso en términos de estructura y función en enzimas mesófilas emparentadas como MaTIM y MmaTIM? ¿qué fuerzas evolutivas moldearon la energía de activación, la resistencia a agentes químicos, o incluso el mismo estado oligomérico de MjTIM? ¿cómo se manifiestan esas fuerzas en los miembros termófilos del orden Methanococcales? ¿cómo evolucionó la TIM del ancestro termófilo de todos los Methanococcales en sus dos linajes? Y lo más importante de todo, ¿cuáles parámetros fisicoquímicos verdaderamente representan caracteres y son sujetos fuerzas evolutivas? La respuesta a esas preguntas implica un esfuerzo más profundo y sistemático en la caracterización de las TIMs de arqueas, se requiere generar información desde otros métodos además del método comparativo filogenético. Además, se puede obtener información valiosa a través de la reconstrucción de secuencias ancestrales o del análisis de la convergencia con otras enzimas con topología de barril TIM.

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo

	MaTIM	MmaTIM	MjTIM
¿En qué cepa en la que se expresó?	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> Rosseta(DE3)pLysS
¿Se agregó en cuerpos de inclusión?	Sí	Sí	No
¿Se obtuvo proteína suficiente para caracterizar?	No	No	Sí
¿Se determinaron parámetros catalíticos?	Sí, pero la proteína no se encuentra plegada de forma nativa	Sí, pero la proteína no se encuentra plegada de forma nativa	Sí
¿Se determinó el estado oligomérico	No	No	Sí
¿Se estudió la desnaturalización por temperatura?	No	No	Sí
¿Se estudió la desnaturalización por agentes caotrópicos?	No	No	Sí

CONCLUSIONES

- Las secuencias de TIM de arqueas tienen información suficiente para hacer una buena reconstrucción de la historia evolutiva de esta proteína a nivel de orden.
- El protocolo de replegamiento implementado para recuperar las proteínas de cuerpos de inclusión no permitió obtener proteínas en su estado nativo.
- Expresar las TIMs de mesófilos a bajas temperaturas sí ayudó en la solubilización, pero la disminución de la expresión impidió obtener proteína suficiente para caracterizar.
- Los problemas inherentes con la expresión heteróloga de proteínas no permitieron obtener proteína suficiente para caracterizar fisicoquímicamente MaTIM y MmaTIM. En contraste, MjTIM se sobre-expresó y purificó eficientemente.
- Pese a la etiqueta de histidinas, MjTIM se plegó correctamente y se asocia como un tetrámero con actividad de TIM.
- MjTIM es la trifosfato isomerasa con el valor de T_m y de E_A más elevados reportados hasta la fecha respecto a otras TIMs.
- MjTIM presenta una estabilidad elevada ante la desnaturalización provocada por agentes químicos a 25°C, pero este proceso también presenta irreversibilidad.

PERSPECTIVAS

- Solicitar las secuencias de nucleótidos sin modificar de los genes de MaTIM y MmaTIM para corroborar la hipótesis de que la optimización es la causa de la agregación *in vivo*.
- En caso de que lo anterior falle, seguir explorando estrategias para evitar la formación de cuerpos de inclusión o, en su defecto, recuperar la proteína exitosamente.
- Evaluar el efecto de la urea en la energía de activación del proceso de desplegamiento.
- Generar información sobre la energética del proceso de asociación y catálisis de MjTIM.
- Explorar la posibilidad de hacer una reconstrucción de la secuencia del ancestro de la TIM de todos los Methanococcales y de todas las arqueas.

REFERENCIAS

- Alvarez, M., Wouters, J., Maes, D., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Wyns, L., ... Martial, J. A. (1999). Lys13 plays a crucial role in the functional adaptation of the thermophilic triose-phosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus* to high temperatures. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19181–7.
- Agilent Technologies (2010). BL21-Gold Competent Cells, BL21-Gold(DE3) Competent Cells, and BL21-Gold(DE3)pLysS Competent Cells. Consultada el 16 de enero de 2017 de <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/230130.pdf>
- Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., ... Maes, D. (1998). Triose-phosphate Isomerase (TIM) of the Psychrophilic Bacterium *Vibrio marinus*: KINETIC AND STRUCTURAL PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2199–2206.
- Anantharaman, V., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2003). Emergence of diverse biochemical activities in evolutionarily conserved structural scaffolds of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1), 12–20.
- Angov, E., Legler, P. M., & Mease, R. M. (2011). Adjustment of Codon Usage Frequencies by Codon Harmonization Improves Protein Expression and Folding. In T. C. Evans Jr. & M.-Q. Xu (Eds.), *Heterologous Gene Expression in E.coli: Methods and Protocols* (pp. 1–13). Totowa, NJ: Humana Press.
- Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S., & Milo, R. (2011). The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry*, 50(21), 4402–4410.
- Basu, A., Li, X., & Leong, S. S. J. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 241.
- Battistuzzi, F. U., & Hedges, S. B. (2009). Archaeobacteria. In S. B. Hedges & S. Kumar (Eds.), *The Timetree of life* (pp. 101–105). New York, NY: Oxford University Press.
- Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., & Jaenicke, R. (1997). Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science*, 6(10), 2159–2165.
- Boussau, B., Blanquart, S., Necsulea, A., Lartillot, N., & Gouy, M. (2008). Parallel adaptations to high temperatures in the Archaean eon. *Nature*, 456(7224), 942–945.
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., & Siebers, B. (2014). Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 78(1), 89–175.
- Burgess, R. R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol*, 463.
- Camacho, M. L., Brown, R. A., Bonete, M., Danson, Michael J., & Hough, D. W. (1995). Isocitrate dehydrogenases from *Haloferax volcanii* and *Sulfolobus solfataricus*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 134(1), 85–90.
- Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., Garcia-Hernandez, E., ... Valdez-Cruz, N. A. (2014). Influence of pH control in the formation of

- inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, *13*.
- Chandrayan, S. K., & Guptasarma, P. (2009). Attenuation of ionic interactions profoundly lowers the kinetic thermal stability of *Pyrococcus furiosus* triosephosphate isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1794*(6), 905–912.
- Chávez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., & Pérez-Montfort, R. (2002). Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of Intermediates and Insight into the Denaturation Pathway Using Tryptophan Mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *399*(2), 117–129.
- Chávez-Cárdenas, M. E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B. G., Costas, M., & Vázquez-Contreras, E. (2005). Reversible Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* in Guanidinium Hydrochloride Involves Stable Dimeric and Monomeric Intermediates. *Biochemistry*, *44*(32), 10883–10892.
- Chu, C.-H., Lai, Y.-J., Huang, H., & Sun, Y.-J. (2008). Kinetic and structural properties of triosephosphate isomerase from *Helicobacter pylori*. *Proteins*, *71*(1), 396–406.
- Copley, R. R., & Bork, P. (2000). Homology among ($\beta\alpha$)₈ barrels: implications for the evolution of metabolic pathways¹. *Journal of Molecular Biology*, *303*(4), 627–641.
- Costas, M., Rodríguez-Larrea, D., De Maria, L., Borchert, T. V., Gómez-Puyou, A., & Sanchez-Ruiz, J. M. (2009). Between-Species Variation in the Kinetic Stability of TIM Proteins Linked to Solvation-Barrier Free Energies. *Journal of Molecular Biology*, *385*(3), 924–937.
- Cox, C. J., Foster, P. G., Hirt, R. P., Harris, S. R., & Embley, T. M. (2008). The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(51), 20356–20361.
- Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M., ... Hol, W. G. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *4*(12), 2594–604.
- Dhaunta, N., Arora, K., Chandrayan, S. K., & Guptasarma, P. (2013). Introduction of a thermophile-sourced ion pair network in the fourth beta/alpha unit of a psychrophile-derived triosephosphate isomerase from *Methanococcoides burtonii* significantly increases its kinetic thermal stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1834*(6), 1023–1033.
- Duy, C., & Fitter, J. (2005). Thermostability of irreversible unfolding alpha-amylases analyzed by unfolding kinetics. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(45), 37360–5.
- Forster, P. (2015). The universal tree of life: an update. *Frontiers in Microbiology*.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Totowa, NJ: Humana Press.
- Gayathri, P., Banerjee, M., Vijayalakshmi, A., Azeez, S., Balaram, H., Balaram, P., & Murthy, M. R. N. (2007). Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus*

- jannaschii. *Acta Crystallographica Section D*, 63(2), 206–220.
- Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H., & Balaram, P. (1999). Unfolding of Plasmodium falciparum Triosephosphate Isomerase in Urea and Guanidinium Chloride: Evidence for a Novel Disulfide Exchange Reaction in a Covalently Cross-Linked Mutant. *Biochemistry*, 38(1), 423–431.
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A., & Pérez-Montfort, R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action — studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*, 2(12), 847–855.
- Gould, S. J., & Lewontin, R. C. (1979). The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 205(1161), 581 LP-598.
- Greenfield, N. J. (1996). Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochemistry*, 235(1), 1–10.
- Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protocols*, 1(6), 2876–2890.
- Groussin, M., & Gouy, M. (2011). Adaptation to Environmental Temperature Is a Major Determinant of Molecular Evolutionary Rates in Archaea. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), 2661–2674.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 346–353.
- Guy, L., & Ettema, T. J. G. (2011). The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 19(12), 580–587.
- Harms, M. J., & Thornton, J. W. (2013). Evolutionary biochemistry: revealing the historical and physical causes of protein properties. *Nature Reviews. Genetics*, 14(8), 559–71.
- Hart, K. M., Harms, M. J., Schmidt, B. H., Ely, C., Thornton, J. W., & Marqusee, S. (2014). Thermodynamic system drift in protein evolution. *PLoS Biology*, 12(11), e1001994.
- Höcker, B., Schmidt, S., & Sterner, R. (2002). A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds. *FEBS Letters*, 510(3), 133–135.
- Hribar, B., Southall, N. T., Vlachy, V., & Dill, K. A. (2002). How Ions Affect the Structure of Water. *Journal of the American Chemical Society*, 124(41), 12302–12311.
- Invitrogen. (2010a). BL21-AI™ One Shot® Chemically Competent E. coli. Consultada el 16 de enero de 2017 de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshot_bl21ai_man.pdf
- Invitrogen. (2010b). One Shot® BL21(DE3) One Shot® BL21(DE3)pLysS One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells. Consultada el 16 de enero de 2017 de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21_man.pdf
- Invitrogen. (2010c). pBAD Directional TOPO® Expression Kit. Consultada el 16 de enero de 2017 de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pbad_dtopo_man.pdf

- Jaenicke, R., & Sterner, R. (2013). Life at High Temperatures. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology* (pp. 337–374). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Jiménez, L., Fernández-Velasco, D. A., Willms, K., & Landa, A. (2003). A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *The Journal of Parasitology*, *89*(2), 209–14.
- Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *531*(1–2), 100–109.
- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R., & Wolfe, R. S. (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, *136*(4), 254–261.
- Jones, W. J., Paynter, M. J. B., & Gupta, R. (1983). Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Archives of Microbiology*, *135*(2), 91–97.
- Kacelnik, A., Houston, A. I., & Schmid-Hempel, P. (1986). Central-place foraging in honey bees: the effect of travel time and nectar flow on crop filling. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *19*(1), 19–24.
- Kamerzell, T. J., & Russell Middaugh, C. (2017). The Complex Inter-Relationships Between Protein Flexibility and Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*(9), 3494–3517.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780.
- Kelly, S. M., & Price, N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1338*(2), 161–185.
- Kendall, M. M., Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Stetter, K. O., Whitman, W. B., & Boone, D. R. (2006). *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(7), 1525–1529.
- Khan, J. M., Sharma, P., Arora, K., Kishor, N., Kaila, P., & Guptasarma, P. (2016). The Achilles' Heel of "Ultrastable" Hyperthermophile Proteins: Submillimolar Concentrations of SDS Stimulate Rapid Conformational Change, Aggregation, and Amyloid Formation in Proteins Carrying Overall Positive Charge. *Biochemistry*, *55*(28), 3920–3936.
- Kohlhoff, M., Dahm, A., & Hensel, R. (1996). Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters*, *383*(3), 245–250.
- Koley, D., & Bard, A. J. (2010). Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(39), 16783–16787.
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *58*(9), 1216–1233.

- Lake, J. A., Henderson, E., Oakes, M., & Clark, M. W. (1984). Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(12), 3786–3790.
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320.
- Lewens, T. (2009). Seven types of adaptationism. *Biology & Philosophy*, 24, 161–182.
- Lewontin, R. C. (1978). Adaptation. *Scientific American*, 239(3), 212–218.
- Longley, W. H. (1916). Observations upon Tropical Fishes and Inferences from their Adaptive Coloration. *PNAS*, 2(12), 733–737.
- López-Giráldez, F., Moeller, A. H., & Townsend, J. P. (2013). Evaluating phylogenetic informativeness as a predictor of phylogenetic signal for metazoan, fungal, and mammalian phylogenomic data sets. *BioMed Research International*, 2013, 7–11.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A., & Perez-Iratxeta, C. (2012). Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(2), 374–381.
- Lumry, R., & Eyring, H. (1954). Conformation Changes of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry*, 58(2), 110–120.
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2017). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.2.
- Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H. D., ... Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 37(3), 441–453.
- Mason, P. E., Brady, J. W., Neilson, G. W., & Dempsey, C. E. (2017). The Interaction of Guanidinium Ions with a Model Peptide. *Biophysical Journal*, 93(1), L04–L06.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
- Millipore, M. (2017). Rosetta™(DE3)pLysS Competent Cells - Novagen. Consultada el 17 de enero de 2017 de http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Rosetta™%28DE3%29pLysS-Competent-Cells---Novagen,EMD_BIO-70956
- Möglich, A., Krieger, F., & Kiefhaber, T. (2005). Molecular Basis for the Effect of Urea and Guanidinium Chloride on the Dynamics of Unfolded Polypeptide Chains. *Journal of Molecular Biology*, 345(1), 153–162.
- Mukherjee, S., & Guptasarma, P. (2005). Direct proteolysis-based purification of an overexpressed hyperthermophile protein from *Escherichia coli* lysate: a novel exploitation of the link between structural stability and proteolytic resistance. *Protein Expression and Purification*, 40(1), 71–76.
- Mukherjee, S., Sharma, S., Kumar, S., & Guptasarma, P. (2005). Slow irreversible unfolding of

- Pyrococcus furiosus triosephosphate isomerase: Separation and quantitation of conformers through a novel electrophoretic approach. *Analytical Biochemistry*, 347(1), 49–59.
- Nagano, N., Orengo, C. A., & Thornton, J. M. (2002). One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on their Sequences, Structures and Functions. *Journal of Molecular Biology*, 321(5), 741–765.
- New England Biolabs (2017). IMPACT™ Kit. Consultada el 17 de enero de 2017 de [https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/21A73B351DD24F94BC584FAED2A83A0F/Datacards or Manuals/manualE6901.pdf](https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/21A73B351DD24F94BC584FAED2A83A0F/Datacards%20or%20Manuals/manualE6901.pdf)
- Olson, M. E., & Arroyo-Santos, A. (2015). How to study adaptation (and why to do it that way). *The Quarterly Review of Biology*, 90(2), 167–191.
- Olson, M. E., & Rosell, J. A. (2015). Adaptación. In A. Becerra Bracho, A. Castañeda Sortibrán, & D. Piñero Dalmau (Eds.), *Evolución orgánica* (pp. 222–279). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ostendorp, R., Auerbach, G., & Jaenicke, R. (1996). Extremely thermostable L(+)-lactate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: cloning, characterization, and crystallization of the recombinant enzyme in its tetrameric and octameric state. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 5(5), 862–73.
- Park, S. H., Kim, H. S., Park, M. S., Moon, S., Song, M. K., Park, H. S., ... Han, B. W. (2016). Structure and Stability of the Dimeric Triosephosphate Isomerase from the Thermophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *PLoS ONE*, 10(12), e0145331. Retrieved from
- Pei, J., Kim, B. H., & Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2295–2300.
- Peimbert, M., Domínguez-Ramírez, L., Tellez, L. A., Blancas, L. M., & Fernández-Velasco, D. A. (2008). Triosephosphate isomerase. In E. García-Hernández & D. A. Fernández-Velasco (Eds.), *Advances in Protein Physical Chemistry* (pp. 193–217). Transworld Research Network.
- Powers, S. L., Robinson, C. R., & Robinson, A. S. (2007). Denaturation of an extremely stable hyperthermophilic protein occurs via a dimeric intermediate. *Extremophiles*, 11(1), 179–189.
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., ... Collier, J. (2016). Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability. *Cell*, 160(6), 1111–1124.
- Quezada, A. G., Díaz-Salazar, A. J., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Piñeiro, Á., & Costas, M. (2017). Interplay between Protein Thermal Flexibility and Kinetic Stability. *Structure*, 25(1), 167–179.
- Razvi, A., & Scholtz, J. M. (2006). Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 15(7), 1569–78.
- Rocco, A. G., Mollica, L., Ricchiuto, P., Baptista, A. M., Gianazza, E., & Eberini, I. (2017). Characterization of the Protein Unfolding Processes Induced by Urea and Temperature. *Biophysical Journal*, 94(6), 2241–2251.
- Romero-Romero, S. (2011). *Control cinético y termodinámico en el desplegamiento térmico de la triosafofosfato isomerasa proveniente de especies bacterianas*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

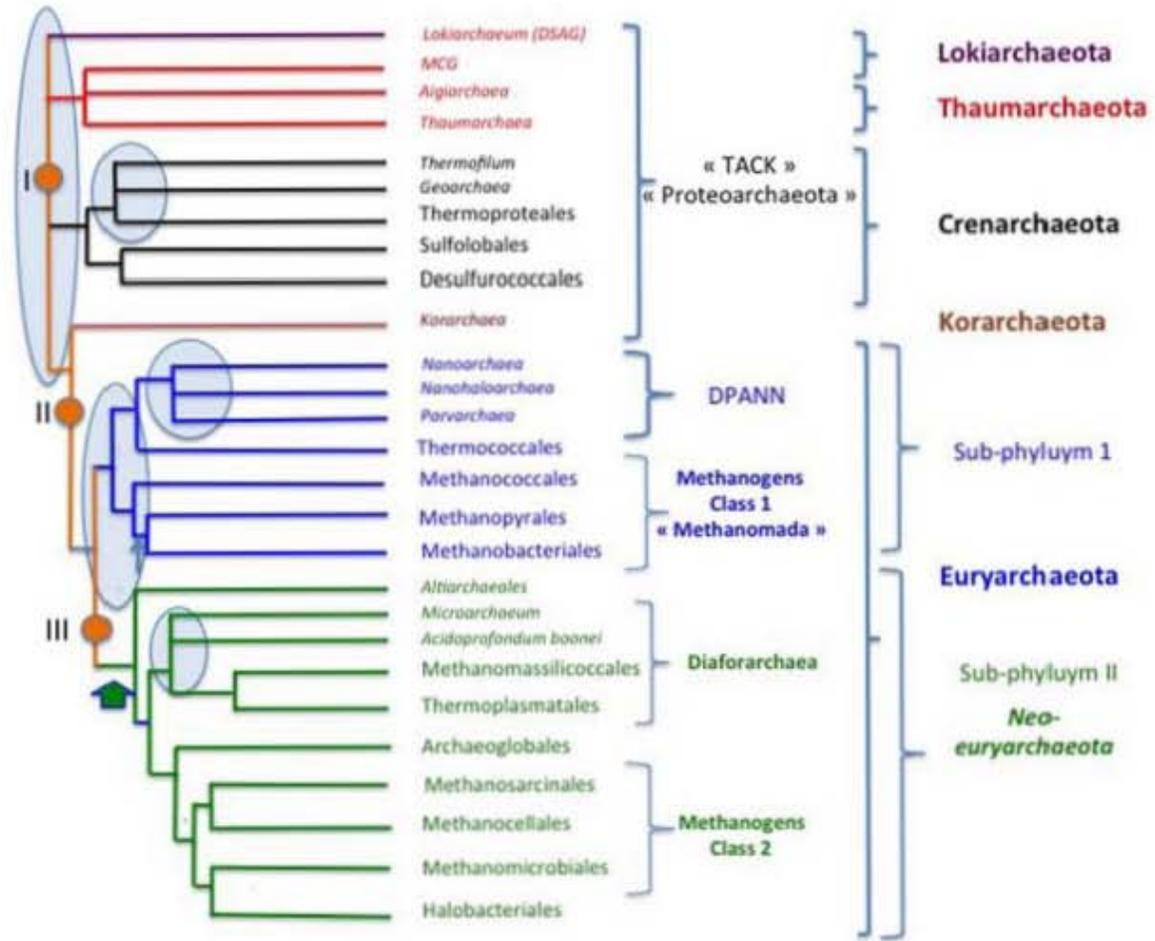
- Romero-Romero, S., Costas, M., Rodriguez-Romero, A., & Fernandez-Velasco, D. A. (2015). Reversibility and two state behaviour in the thermal unfolding of oligomeric TIM barrel proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *17*(32), 20699–20714.
- Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2003). Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea*, *1*(3), 199–221. Retrieved from
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. Retrieved from
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, *409*(6823), 1092–1101.
- Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M., & Ranjbar, B. (2006). Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry*, *119*(3), 256–270.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical Chemistry*, *148*(1), 1–15.
- Schlegel, H. G., & Jannasch, H. W. (2006). Prokaryotes and Their Habitats. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology* (pp. 137–184). New York, NY: Springer New York.
- Schramm, A., Kohlhoff, M., & Hensel, R. (2001). Triose-phosphate isomerase from *Pyrococcus woesei* and *Methanothermus fervidus*. *Methods in Enzymology*, *331*, 62–77.
- Sharma, P., & Guptasarma, P. (2015). “Super-perfect” enzymes: Structural stabilities and activities of recombinant triose phosphate isomerases from *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus onnurineus* produced in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 460).
- Siegal, M. L., & Leu, J.-Y. (2014). On the Nature and Evolutionary Impact of Phenotypic Robustness Mechanisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *45*, 1–651.
- Silverman, J. A., Balakrishnan, R., & Harbury, P. B. (2001). Reverse engineering the (β/α)₈ barrel fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(6), 3092–3097.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 41.
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *99*(4), 303–310.
- Spang, A., Saw, J. H., Jorgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., ... Ettema, T. J. G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, *521*(7551), 173–179.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312–1313.
- Szilágyi, A., & Závodszy, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive

- survey. *Structure*, 8(5), 493–504.
- Townsend, J. P. (2007). Profiling Phylogenetic Informativeness. *Systematic Biology*, 56(2), 222–231.
- Travers, S. E., Temeles, E. J., & Pan, I. (2003). The relationship between nectar spur curvature in jewelweed (*Impatiens capensis*) and pollen removal by hummingbird pollinators. *Canadian Journal of Botany*, 81(2), 164–170.
- Trentham, D. R., McMurray, C. H., & Pogson, C. I. (1969). The active chemical state of D-glyceraldehyde 3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, aldolase and triose phosphate isomerase. *Biochemical Journal*, 114(1), 19 LP-24.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1–8.
- Vagenende, V., Yap, M. G. S., & Trout, B. L. (2009). Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry*, 48(46), 11084–11096.
- Vasina, J. A., & Baneyx, F. (1996). Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *cspA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1444–1447. Retrieved from
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), 1101–6.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 65(1), 1–43.
- Villa, A., Zecca, L., Fusi, P., Colombo, S., Tedeschi, G., & Tortora, P. (1993). Structural features responsible for kinetic thermal stability of a carboxypeptidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*; *Biochemical Journal*, 295(3), 827 LP-831.
- Wagner, A. (2012). The role of robustness in phenotypic adaptation and innovation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. ., Siebers, B., Hensel, R., & Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology*, 306(4), 745–757.
- Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., ... Hensel, R. (2004). Structure and Function of a Regulated Archaeal Triosephosphate Isomerase Adapted to High Temperature. *Journal of Molecular Biology*, 342(3), 861–875.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191.
- Waugh, D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 316–320.
- Whitman, W. B., & Jeanthon, C. (2006). Methanococcales. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria:*

- Firmicutes, Actinomycetes* (pp. 257–273). New York, NY: Springer New York.
- Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*, 492(3), 193–198.
- Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J., & Embley, T. M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, 504(7479), 231–236.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Meth*, 12(1), 7–8.
- Yu, C.-H., Dang, Y., Zhou, Z., Wu, C., Zhao, F., Sachs, M. S., & Liu, Y. (2016). Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Molecular Cell*, 59(5), 744–754.
- Zhang, J. (2012). Protein-Protein Interactions in Salt Solutions. In W. Cai (Ed.), *Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools* (pp. 359–376). InTech.

ANEXOS

Filogenia de los órdenes del dominio Archaea (Tomado de Forterre, 2015)



Código de colores de los árboles filogenéticos de la TIM de arqueas

Orden de Archaea	Color hexadecimal
<i>Phyllum Crenarchaeota</i>	
Desulfurococcales	#E65F00
Sulfolobales	#F28773
Thermoproteales	#E51A4C
<i>Phyllum Euryarchaeota</i>	
Archaeoglobales	#FFAC16
Halobacteriales	#0DC09C
Methanobacteriales	#2908F5
Methanocellales	#1E5553
Methanococcales	#4277A6
Methanomassilococcales	#A7C063
Methanomicrobiales	#6799FB
Methanosarcinales	#8C6DD3
Thermococcales	#CCB948
Thermoplasmatales	#E9350F
<i>Phyllum Thaumarchaeota</i>	
Nitrosopumilales	#C4DE0F
Nitrososphaerales	#8EF343