



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización fisicoquímica de la enzima Triosafosfato
Isomerasa en el dominio Proteobacteria.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

BRYAN EDUARDO MARTÍNEZ PASTOR



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme una formación académica de calidad durante mis estudios de Licenciatura y brindarme un lugar para desarrollarme plenamente como persona.

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

A los miembros de mi jurado por sus comentarios, sugerencias y consejos:

- Dra. Georgina Regina Garza-Ramos Martínez
- Dra. Laura Kawasaki Watanabe
- Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
- Dr. Miguel Antonio Costas Basín
- Dr. Alejandro Sosa Peinado

Al Dr. Sergio Romero Romero por su asesoría durante la realización y culminación de este trabajo.

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 del trabajo.

Agradecimientos personales

A mi madre Araceli Pastor por haber estado siempre conmigo apoyándome incluso en los momentos más oscuros por lo que hemos pasado. Gracias por haberme apoyado desde pequeño con mi educación y curiosidad, por jugar conmigo y por sobre todo esperar las mejores cosas de mí y enseñarme que la culminación de un camino es el inicio de otro mejor.

A mi abuela Char, por haber dedicado gran parte de tu tiempo ayudándome y queriéndome. Por esas conversaciones tan largas y a veces filosóficas. Enseñarme el lado tranquilo de las cosas y fomentar en mí el querer ser mejor persona para todos, no solo para mí.

A mi tía Edith, mi segunda madre pero sobre todo amiga. Gracias por esos tiempos de diversión y risas, por entenderme aun cuando nadie lo hacía. Por confiar en mí y ser tu sobrino favorito para jugar en esas tardes después de la escuela.

A mi prima Jacqueline, por haber sido un bastión sentimental y de apoyo en ocasiones en las que más lo necesitaba. Me enseñaste el verdadero lado de la camaradería y travesura, a pesar de los casuales conflictos, siempre sabía que estarías aquí.

A mi tía Reyna y a mis tíos Rafael y Oswaldo, por siempre haberme apoyado desde pequeño para alcanzar cosas mejores; por su interés y pláticas sobre decisiones que no siempre me resultaron fáciles. Gracias por todo el apoyo, sé que siempre cuento con ustedes.

A mis primos Oswaldo, Emilio y Diego, por brindarme sonrisas y juegos cuando a veces no tenía cabeza para pensar. Espero devolverles el favor con la edad.

A Gerardo Sauri por su apoyo y frescura intelectual, siempre encontré fascinante tu amor por la gente, algo que me ha hecho más humilde y ver las cosas en mejor perspectiva.

A Héctor Martínez por la paciencia y apoyo en mi educación a lo largo de mi vida. Incentivar mi científico interno y estar dispuesto a apoyarme con todo por eso.

A Luis, Alice, Angie y Madi, por haber sido una revelación inesperada de lo que puedo llamar como mis mejores amigos de la carrera. Por las discusiones científicas, filosóficas, sociales y bichosas. Siempre cuento con ustedes como un faro de sabiduría sobre los temas más místicos de la biología.

A Katya y Ana por su compañía, amistad y coraje cuando estaba en momentos solitarios, me llenaron de risas y conocimientos culturales de los cuales desconocía.

A Ali y Manu, por su amistad llena de corazón y sentimiento social, muy casual, pero muy apreciada cuando me encuentro con ustedes.

A Cristina, por su larga historia en vivencia conmigo, enseñarme el lado sensible de las cosas y sin variar el lado divertido y controversial.

A Zoom y Erika, por su amistad conmigo basada en pura convencia y sin ataduras, ser los dueños de mis mejores risas y momentos de experiencia.

A Fernanda, por su insaciable sentido del humor y apoyo. Esperando seguir con la historia.

A Dominic por regalarme mi primera gran experiencia laboral y darme rinda suelta para poder probarme a mí mismo.

A Jaz, Ale, Clau y George, por permitirme la corrupción del ambiente laboral para divertirme y enseñarme el lado Godínez de la vida.

A Guillermo, por haber estado conmigo por un tiempo lleno de cambios, aguantarme y enseñarme sobre el valor de los sentimientos y la mente.

A Mony, Jaso y Ulises, por haber cambiado las perspectiva de las cosas y haberme brindado la amistad en tiempo difíciles. La separación y decir adiós fue algo que aprendí no fue fácil, pero siempre quedará la amistad.

A Lau, Karla y Jules, por tantos juegos de cartas, risas y competencias científicas. Sin su apoyo en el laboratorio, la experiencia no hubiera estado completa.

A mi jefe, Alejandro Fernández por permitirme expresarme libremente en ideas y supuestos. Por las grandes convivencias y recuerdos compartidos. Por la gran sabiduría y objetividad ante las cosas, pero siempre acompañadas de una gran sonrisa. Gracias por demostrarme un ejemplo de unificación del ser humano, con el ser un científico.

A Susy y Rickettsia gracias por ser los mejores amigos del mundo. Realmente no me imagino haber pasado esta fase de mi vida sin ustedes a mi lado. Compartiré siempre los recuerdos más sagrados con ustedes, con alegría y nostalgia de aquellos lugares y rutinas que se volvieron nuestras y que permitieron una amistad sin pelos en la lengua.

A Sergio por la enseñanza y la muy querida amistad. Por ayudarme repitiendo las cosas mil veces y demostrarnos el lado divertido de la ciencia, al igual que el lado de la dedicación con la noches en vela haciendo experimentos. Por la franqueza y alegría que nos compartiste a lo largo del tiempo en el laboratorio.

A Ale por estar a mi lado, a pesar del camino turbulento. Me has permitido seguir adelante siempre apoyándome en mis sueños y no solo con ilusiones. Gracias por ayudarme a mantener mis pies en la tierra pero mi cabeza en el universo. Por las locuras y cambios de humor, pero siempre viendo hacia adelante juntos.

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	10
1.1	Plegamiento de proteínas.....	11
1.2	Barriles TIM	14
1.3	La Triosafosfato Isomerasa	16
1.3.1	Estructura y Plegamiento de la TIM.....	18
1.4	El árbol de la vida y la clasificación bacteriana	19
1.5	Proteobacterias.....	23
2	Justificación.....	25
3	Objetivos	25
3.1	Objetivo general.....	25
3.2	Objetivos particulares	25
4	Materiales y Métodos.....	26
4.1	Selección de especies por análisis filogenético	26
4.2	Subclonación	26
4.3	Sobreexpresión y Purificación de las proteínas	27
4.4	Determinación concentración de proteína.....	28
4.5	Parámetros catalíticos	28
4.6	Determinación del estado de oligomerización	29
4.7	Propiedades espectroscópicas.....	29
4.7.1	Dicroísmo Circular	29
4.7.2	Fluorescencia Intrínseca.....	30
4.8	Desnaturalización Térmica.....	30
4.8.1	Dicroísmo Circular	30
4.8.2	Calorimetría Diferencial de Barrido	31
4.9	Desnaturalización química	32
5	Resultados y Discusión.....	33
5.1	Selección de especies.....	33
5.2	Análisis de las secuencias y estructuras.....	36
5.3	Subclonación de los genes	38
5.4	Pruebas de sobreexpresión.....	40
5.5	Purificación de las enzimas	40

5.6	Parámetros cinéticos	44
5.7	Propiedades espectroscópicas.....	46
5.7.1	Fluorescencia intrínseca.....	46
5.7.2	Dicroísmo circular	47
5.8	Determinación estado oligomérico	48
5.9	Desplegamiento térmico.....	49
5.9.1	Dicroísmo circular	49
5.9.2	Calorimetría Diferencial de Barrido	53
5.10	Desnaturalización química.....	60
5.10.1	Urea.....	60
6	Conclusiones	66
7	Perspectivas	66
8	Bibliografía	67
9	Anexo	71

1 INTRODUCCIÓN

La vida puede ser definida como la interacción de proteínas. Todas las formas de vida, desde los virus hasta las células de los mamíferos más complejos están formados de proteínas hechas de los mismos aminoácidos, mostrando la relación evolutiva de todos los seres vivos de este planeta. En 1944 el físico Erwin Schrödinger se hizo la pregunta “¿Qué es la vida?” en un intento por entender las propiedades de las células vivas. Schrödinger sugirió que los sistemas vivos obedecían todas las leyes físicas y no debían verse como excepcionales, sino como un reflejo natural estadístico de estas leyes.

Las proteínas son sistemas moleculares a una escala nanométrica, donde la función biológica es ejecutada, por lo tanto, son las bases de construcción de las células de las formas de vida de este planeta. Poseen un papel en todas las funciones críticas de los procesos biológicos. Éstas pueden catalizar, transportar, almacenar ciertas moléculas como el oxígeno, proveer soporte mecánico, protección inmune, generar movimiento celular, transmitir impulsos nerviosos, controlar el crecimiento y diferenciación celular.

Los aminoácidos, son pequeñas moléculas orgánicas que forman a las proteínas mediante la formación de enlaces peptídicos entre un grupo carboxilo y otro amino. La secuencia de esta cadena determina lo que se conoce como estructura primaria de una proteína. Esta estructura dirige el plegamiento y unión intramolecular de la cadena de aminoácidos que dará paso finalmente a la estructura tridimensional. Este proceso de plegamiento se ve estabilizado por la interacción de cientos de enlaces no covalentes entre los aminoácidos, y por el ambiente citoplasmático donde se encuentran.

Un rol central de las proteínas es actuar como enzimas, catalizadores que incrementan la velocidad de todas las reacciones químicas dentro de las células. A pesar de que el ARN es capaz de catalizar algunas reacciones, las reacciones biológicas centrales son delegadas a las proteínas. En ausencia de catálisis enzimática, las reacciones bioquímicas serían tan lentas que no ocurrirían en las condiciones de temperatura y presión compatibles con la vida.

Este tipo de reacciones se pueden ilustrar teniendo a [S] como el sustrato de la reacción bioquímica, y a [P] como el resultado de esta. El equilibrio químico entre [S] y [P] es determinado por leyes termodinámicas y representan la tasa de la reacción en ambos sentidos. En presencia de una enzima apropiada, la conversión de $S \rightarrow P$ es acelerada, pero su equilibrio permanece inalterado.

El efecto de la enzima en la reacción se puede ver mejor utilizando los cambios de energía que deben ocurrir para que se lleve a cabo la conversión de S a P. Para que la reacción se lleve a cabo se debe convertir el sustrato en una forma de alto estado energético llamado estado de transición. La energía requerida para alcanzar el estado de transición debe ser mayor a la barrera energética, que es la que limita la velocidad de reacción. Las enzimas actúan reduciendo la barrera energética, y por tanto aumentando la velocidad de la reacción bioquímica.

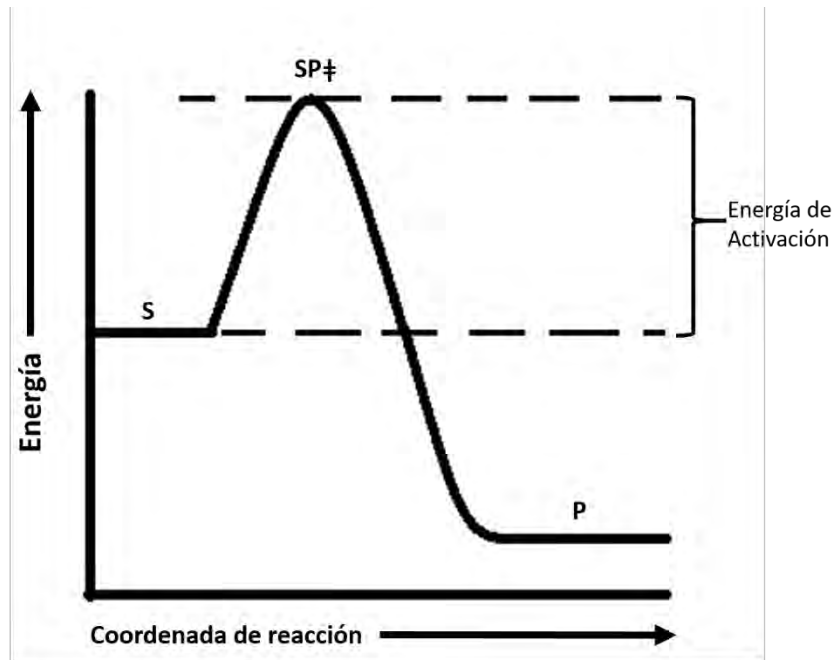


Figura 1. Perfil energético de una reacción catalizada por una enzima.

1.1 PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Generalmente la estructura nativa tridimensional de una proteína es necesaria para su función biológica; y el reconocimiento molecular es el fundamento principal de todos los procesos biológicos, por tanto conocer los mecanismos del plegamiento y unión de proteínas es fundamental para la descripción de la vida a nivel molecular (Perozzo, Folkers, and Scapozza 2004).

El proceso del plegamiento es en sí es el proceso de transformación de información codificada en la secuencia de aminoácidos hacia una estructura funcional tridimensional. Este es un proceso fisicoquímico del cual aún se desconoce de forma completa su mecanismo, determinado por tres problemas(Dill et al.,2007): 1) la pregunta termodinámica de “cómo la estructura nativa resulta de las fuerzas interatómicas actuando sobre la secuencia de aminoácidos (código de plegamiento)” ; 2) el problema cinético de “cómo la estructura nativa puede plegarse tan rápido (tasa de plegamiento)” ; 3) el problema computacional de cómo podemos predecir la estructura nativa a partir de su secuencia de aminoácidos (problema de predicción de estructura).

La conformación tridimensional de las proteínas resulta de la interacción entre los residuos de los aminoácidos, y es donde la energía libre de Gibbs del sistema completo suele ser la más baja. El principio clásico del plegamiento de proteínas es que toda la información requerida para que una proteína adquiera su conformación correcta se encuentra en la secuencia de los aminoácidos. Este dogma fue inicialmente establecido por lo experimentos de Christian Anfinsen en 1973, demostrando que una RNAsa

desnaturalizada se puede desplegar espontáneamente. Por lo tanto el plegamiento de las proteínas parece ser un proceso de auto ensamblado, sólo dependiendo de las secuencia de aminoácidos y de las condiciones en la que se encuentre inmersa la proteína (solvente, pH, fuerza iónica, presencia de componentes metálicos, la temperatura, etc). Dos conclusiones pueden ser deducidas por el trabajo realizado por Anfinsen. Primero, permitió una larga búsqueda en el estudio de las proteínas *in vitro*, lo cual ha llevado a entender las estructuras nativas por medio de experimentos en tubos de ensayo. Segundo, el principio de Anfinsen, que implica una especie de división: La evolución puede actuar para cambiar una secuencia de aminoácidos, pero el equilibrio y la cinética del plegamiento de una determinada secuencia son temas fisicoquímicos” (Dill et al. 2008).

El problema del plegamiento de proteínas es la pregunta de cómo la secuencia de aminoácidos que conforman la estructura primaria, dictan la estructura atómica tridimensional. Esta noción del “problema” de plegamiento surgió alrededor de 1960, con el inicio de la resolución atómica de las estructuras de las proteínas (Dill et al. 2008).

Poco después de los experimentos de Anfinsen, Levinthal reconoció que las proteínas tienen un espacio conformacional demasiado vasto y diverso como para permitir una búsqueda a través de todo este dentro de un tiempo biológicamente relevante. Esta paradoja, conocida como la “Paradoja de Levinthal”, pone como concepto esencial el problema de una búsqueda aleatoria. Ejemplificando, una cadena conformada por 100 residuos, que puede tener un posible de 10^{70} distintas configuraciones diferentes, y para “probar” una de estas distintas conformaciones se lleva un tiempo de 10^{-11} segundos. Realizando los cálculos le llevaría a la proteína un aproximado de 10^{52} años probar cada una de las conformaciones posibles hasta alcanzar su estructura terciaria correcta. Pero, de forma natural a las proteínas les toma un tiempo aproximado de milisegundos en llegar a su estado nativo. La solución propuesta por Levinthal para resolver esta paradoja, es la existencia de una ruta de plegamiento por medio del cual las proteínas buscan y convergen de forma rápida hasta sus estados nativos, por lo que el plegamiento de la proteína está guiado (Karplus 1997; Zwanzig, Szabo, and Bagchi 1992).

A lo largo de la historia se han propuesto muchos modelos para comprender el mecanismo de plegamiento de proteínas; sin embargo, hoy en día el modelo de “embudo de plegamiento” propuesto por Leopold et al., 1992, es el más ampliamente aceptado. El modelo se basa en paisajes conformacionales de energía libre. Este se puede imaginar como un embudo en el que se tiene que atravesar un paisaje energético a través de rutas paralelas y con múltiples bloqueos hasta llegar al fondo del embudo. El paisaje energético provee las bases para sintetizar y explicar los mecanismos del plegamiento de las proteínas. Bajo este esquema los procesos de plegamiento y unión son procesos esencialmente controlados por la termodinámica y que incluyen varias fuerzas, como la contribución entálpica de la formación de enlaces no covalentes, efectos entrópicos así como la liberación y atracción de moléculas de solvente; el enterramiento de las partes no polares de la proteína, la restricción de los grados de libertad de la proteína y el ligando; y la pérdida de la libertad rotacional y traslacional de moléculas que pueden interactuar con la proteína (Perozzo, Folkers, and Scapozza 2004).

En los paisajes conformacionales de las proteínas, los ejes verticales representan la energía libre, y los ejes horizontales representan los grados conformacionales o la libertad de la cadena polipeptídica (entropía conformacional). Heteropolímeros aleatorios pueden tener un paisaje conformacional rugoso con demasiados mínimos locales, o un paisaje demasiado plano. Sistemas como estos pueden quedar atrapados fácilmente en un mínimo local o nunca encontrar un mínimo a lo largo de su plegamiento en una superficie prácticamente plana, y usualmente carecer de un único y bien definido estado conformacional. Sin embargo, las proteínas han ido evolucionado para contener secuencias mejor optimizadas que les permiten a algunas plegarse de manera rápida y eficiente en su estado conformacional estable. En otros casos, los organismos han encontrado maneras diferentes para guiar a las proteínas a lograr su correcto plegamiento mediante el uso de otras proteínas como las chaperonas.

La teoría de los paisajes energéticos sugiere que hay varios escenarios para la cinética del plegamiento, diversidad que ha sido observada gracias a múltiples simulaciones. Para algunos escenarios de plegamiento las etapas cinéticas realmente importantes ocurren cuando hay una gran densidad de configuraciones. Tradicionalmente, la cinética del plegamiento se centra en eventos temporales del plegamiento que son más grandes que algunos milisegundos. Se sugiere que la lentitud de algunos procesos se deben al estancamiento en mínimos locales y son extremadamente sensibles a las características individuales de los residuos como el carácter hidrofóbico de algún residuo ubicado en la superficie de la proteína (Onuchic et al. 1996). El colapso hidrofóbico guiado por la entropía del solvente acuoso lleva a conformaciones compactas y a la reducción de las conformaciones de la cadena peptídica teniendo como resultado el estrechamiento del paisaje conformacional. El ensamble de las conformaciones es posteriormente reducido por la contribución entálpica, como el aislamiento de cadenas electrostáticamente cargadas, residuos polares en la superficie de la proteína y, la neutralización de iones dentro de la proteína, así estrechando aún más el paisaje conformacional. El paso final, que se encuentra poco antes del fondo del paisaje conformacional es la reconfiguración de un pequeño grupo de conformaciones cuasi nativas a través de la formación cooperativa y ajustes mutuos de interacciones terciarias, se obtiene una conformación nativa única localizada en la parte más estrecha del paisaje conformacional. Por lo tanto, la reducción progresiva del espacio conformacional accesible hace que el paisaje del plegamiento de la proteína se asemeje a un embudo, es decir, que muchas conformaciones presentan una gran energía libre y pocas una baja energía libre. Un gran número de estados desnaturalizados se ubican en la superficie más externa o superior del funnel y presentan una alta entropía conformacional, mientras que poco estados semi nativos y nativos se encuentran en la parte en la parte más baja del embudo y por tanto presentan una entropía conformacional muy baja (Liu et al. 2009). Esta descripción implica que los paisajes son relativamente lisos y que las barreras energéticas son pequeñas por lo que el plegamiento es un proceso bastante rápido.

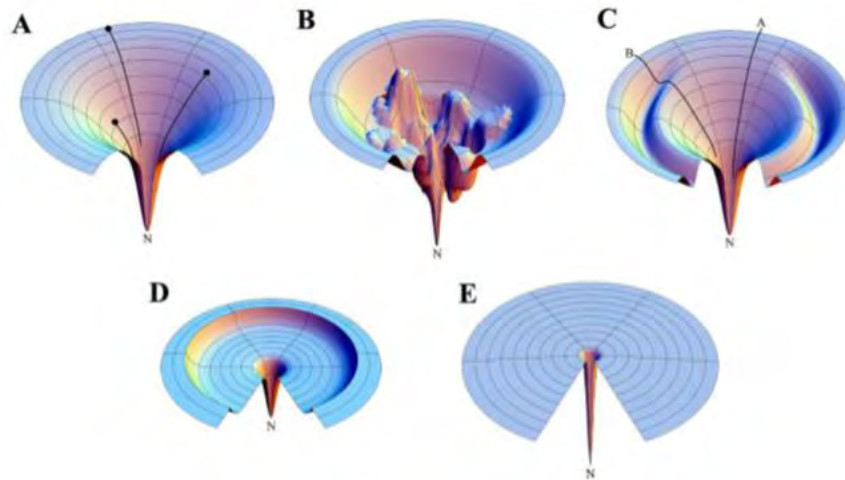


Figura 2. Diferentes escenarios de paisajes de energía libre del plegamiento de proteínas. A) Funel idealizado con una superficie lisa de un proceso de dos estados. B) Funel accidentado con trampas energéticas. C) Funel que muestra dos vías probables, una rápida y una lenta con un mínimo energético. D) Funel “copa de champaña” donde muestra como la entropía conformacional. E) Funel “hoyo de golf” de Levinthal que muestra como una búsqueda aleatoria no podría encontrar el estado nativo. (Modificado de Liu et al. 2009).

1.2 BARRILES TIM

Con la gran cantidad de información disponible de las secuencias genómicas de organismos y las estructuras de las proteínas que éstas codifican, se ha hecho evidente que a pesar del gran espacio secuencia que existe, el espacio estructural es bastante limitado (Grant, Lee, and Orengo 2004). Se ha considerado que solamente unos cientos de tipos diferentes de plegamientos son necesarios para abarcar todo el espacio proteómico. Este pequeño número de plegamientos ha sido explicado como el resultado de la optimización del empaquetamiento del esqueleto de las proteínas. Un análisis del espacio de plegamiento mostró que la red de interacción atómica del núcleo hidrofóbico de las proteínas presenta un plegamiento de tipo conservado y que esta red es distinguible a través de diferentes tipos de plegamiento, dado una firma distintiva al estado nativo (Soundararajan et al. 2010).

Como regla común, las secuencias homólogas generalmente producen plegamientos similares y las secuencias divergentes están concomitantemente acompañadas por variaciones estructurales. Aunque las variaciones funcionales están relacionadas a variaciones estructurales, se ha establecido que las proteínas con estructuras dispares pueden retener su función durante el curso de su evolución siempre y cuando la geometría del sitio activo se mantenga intacto (Chothia and Lesk 1986).

El Barril TIM es uno de los plegamientos más antiguos y es el plegamiento más común presentándose con una considerable diversidad de secuencia. También es uno de los plegamientos más recurrentes para enzimas de una gran variedad de reacciones, catalizando cinco de los seis tipos de reacciones bioquímicas: liasas, hidrogenasas, transferasas, oxidoreductasas e isomerasas (Nagano, Orengo, and Thornton 2002) (Wierenga 2001).

El plegamiento tipo barril TIM, $(\beta/\alpha)^8$ comprende tres regiones estructurales mayores: un barril central de hebras β , la interfaz de hebras β y las hélices α , y una interfaz formada por las hélices α . La parte central del barril β está formado por hebras β paralelas formando el núcleo de la estructura. La interfaz α/β rodea el barril y está conformado por el motivo α -X- β , donde X puede ser cualquier estructura secundaria como asas o giros β e incluso motivos separados. Las hélices interactúan una con otra para formar la interfaz α/α que se encuentra en la cara exterior. Se ha encontrado que la cara con el C terminal y las asas adyacentes contienen el sitio activo (Vijayabaskar and Vishveshwara 2012).

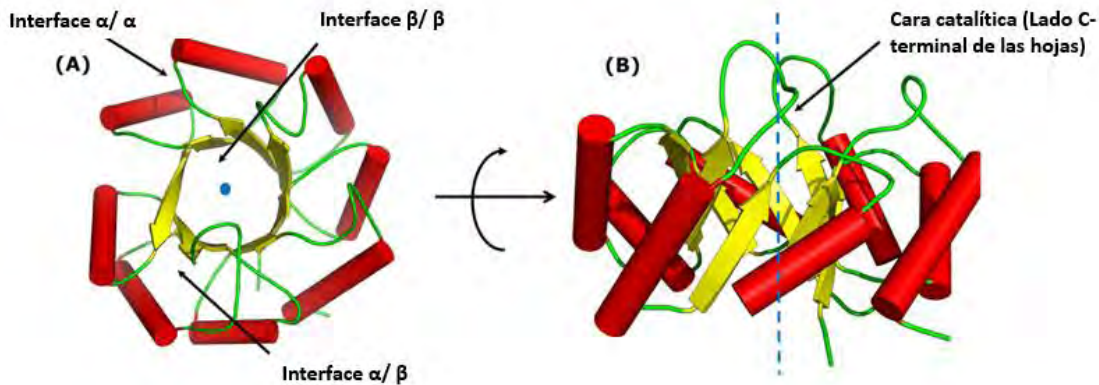


Figura 3. Plegamiento de barril TIM. A) Vista superior del barril mostrando las tres interfaces que lo componen. B) Vista lateral del barril mostrando la zona catalítica del barril. (Modificado de Vijayabaskar & Vishveshwara, 2012).

El número de residuos que componen a un barril TIM pueden contar con un promedio de 300 residuos, siendo la causa de esta variación la longitud de las asas del extremo C-terminal y el extremo N-terminal (Wierenga, Kapetaniou, and Venkatesan 2010). Estudios evolutivos, han demostrado que este tipo de plegamiento evolucionó a partir de dos medios barriles. Actualmente, los barriles TIM se estudian mediante evolución dirigida y diseño computacional ya que se ha encontrado que el barril TIM es un excelente modelo para el diseño de enzimas artificiales (Höcker et al. 2001).

1.3 LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

La glucólisis es la ruta bioquímica por el cuál una molécula de glucosa es convertida a piruvato con lo cual se generan moléculas de ATP, necesarias para la demanda energética de las células. La Triosafosfato Isomerasa (EC 5.3.1.1), es una enzima glucolítica homodimérica que cataliza la isomerización reversible entre el gliceraldehído 3-fosfato (D-GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), esto es una isomerización, en la quinta reacción de la glucólisis. Durante la glucólisis estos dos productos son necesarios para la formación de piruvato; y en la gluconeogénesis, la aldolasa es la que requiere este sustrato. La reacción de isomerización es catalizada con una gran eficiencia y es un proceso difusivo, limitado únicamente por la velocidad en la que el GAP o el DHAP llegan al sitio activo de la TIM (Zárate-Pérez, Chánez-Cárdenas, and Vázquez-Contreras 2008).

En la ruta glucolítica, la TIM se presenta después de la fructosa bisfosfato aldolasa que genera DHAP y D-GAP, el D-GAP es posteriormente metabolizado por enzimas subsecuentes glucolíticas y la TIM se encarga de que el DHAP producido por la aldolasa también pueda ser metabolizado. La actividad de la TIM presenta suma importancia para el correcto funcionamiento de la célula, ya que se han encontrado enfermedades graves relacionadas con la mutación puntual de la TIM que provoca el descenso de su actividad. Los síntomas de la enfermedad posiblemente estén relacionados con la toxicidad del DHAP (Orosz, Oláh, and Ovádi 2009).

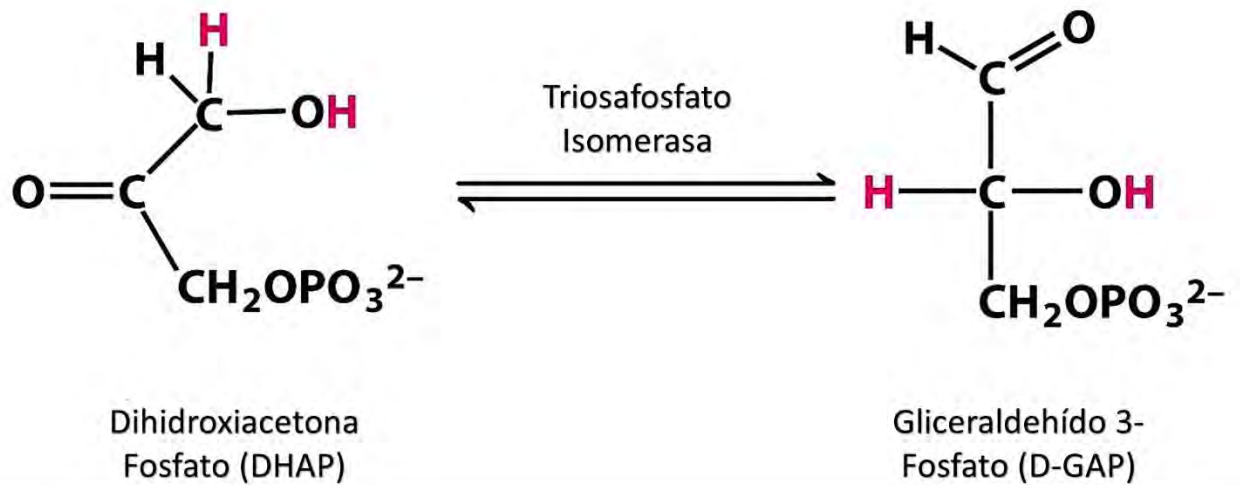


Figura 4. Reacción de isomerización catalizada por la Triosafosfato Isomerasa de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a Gliceraldehído 3-fosfato (D-GAP).

La reacción catalítica es iniciada por la deprotonación de un átomo de carbono adyacente al grupo carbonilo, la desprotonación puede realizarse por un aldehído (cuando el sustrato es D-GAP) o por una cetona (cuando el sustrato es DHAP); en cualquiera de los dos casos, se llega a un intermediario cis-enediolato (Rieder and Rose 1959), estabilizado por una asa catalítica y que actúa como una compuerta con el fin de aislar la reacción (Mukherjee et al. 2012) (Wierenga, Kapetaniou, and Venkatesan 2010).

Gracias a los estudios realizados por Knowles y Albery en 1977 se sabe que la TIM no sólo es una enzima muy rápida, sino que también es muy eficiente teniendo una velocidad catalítica limitada únicamente por difusión, es decir, que la k_{cat}/K_m está cercana al máximo valor posible de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Blacklow et al. 1988). Knowles y Albery mostraron que los siguientes factores promueven la alta eficacia: 1) la presencia de un grupo carboxilato en el sitio activo de la proteína que es responsable por el intercambio de protones entre los centros de carbono; 2) el intermediario enediol se encuentra en conformación cis; y 3) la existencia de un catalizador electrofílico que polariza el grupo carbonil del sustrato (Knowles and Albery 1977).

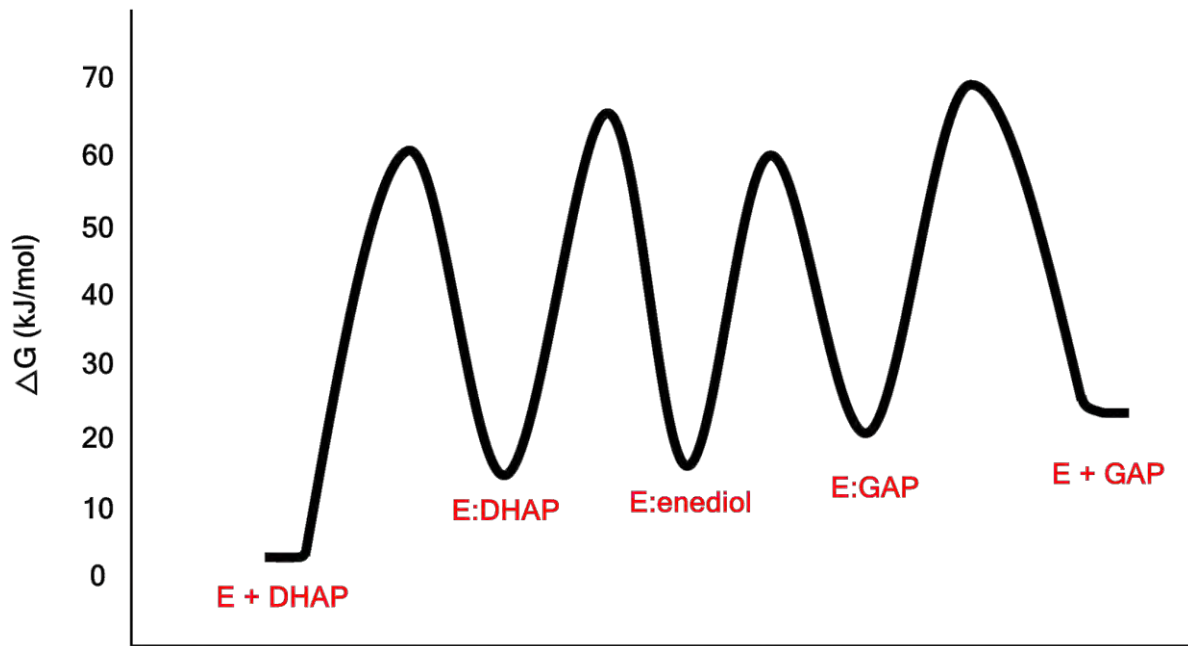


Figura 5. Perfil libre de energía de la reacción catalizada por la Triosafosfato Isomerasa. Se presenta el intermediario enediolato de la reacción de isomerización. (Tomado de Knowles & Albery, 1977).

1.3.1 Estructura y Plegamiento de la TIM

La primera estructura cristalográfica de la TIM fue reportada en el trabajo de Baner y sus colaboradores en 1975, revelando por primera vez la topología del barril TIM. La TIM solamente es activa en estado oligomérico, siendo el más recurrente entre los organismos como un dímero, sin embargo, se ha encontrado que en algunos organismos extremofilos, la TIM aparece como tetrámero conformado por un dímero de dímeros (Maes et al. 1999). La estructura de dímero sugiere que la presencia de las dos subunidades sirve para estabilizar los residuos catalíticos del sitio activo. Cada monómero contiene sus propios residuos catalíticos y las asas del carboxilo terminal del barril forman la intercara entre las subunidades.

La TIM presenta tres residuos catalíticos (Lys13, His95 y Glu165) considerados como una huella característica de esta enzima. Además se conoce que otros residuos (Asn11, Ser96, y Glu97) adoptan una orientación tridimensional que favorece la interacción con el sustrato o con otros residuos. Cuando el sustrato se une al sitio activo, la asa catalítica 6 sufre un gran cambio conformacional, cerrando la cavidad e iniciando el ciclo catalítico. En la TIM, tres de las asas son los que proveen los residuos catalíticos, siendo en el asa 1 el Asn 11 y Lys 13; en el asa 4 la His 95; y en el asa 6 el Glu 167. La geometría del sitio activo está formado por una pequeña hélice en el asa 4, una asa flexible de 11 residuos de largo, el asa 7 y el asa 8, que, junto con el asa 6, proveen una importante cadena de interacciones de enlaces de hidrógeno. Por otra parte, las asas 1, 2, 3, 4 y 8 proveen la interface del dímero. Los estudios estructurales actuales han resaltado la importancia de las dos asas flexibles para la unión del sustrato a fin de iniciar la catálisis (Zárate-Pérez, Chánez-Cárdenas, and Vázquez-Contreras 2008) (Wierenga, Kapetaniou, and Venkatesan 2010) (Mukherjee et al. 2012).

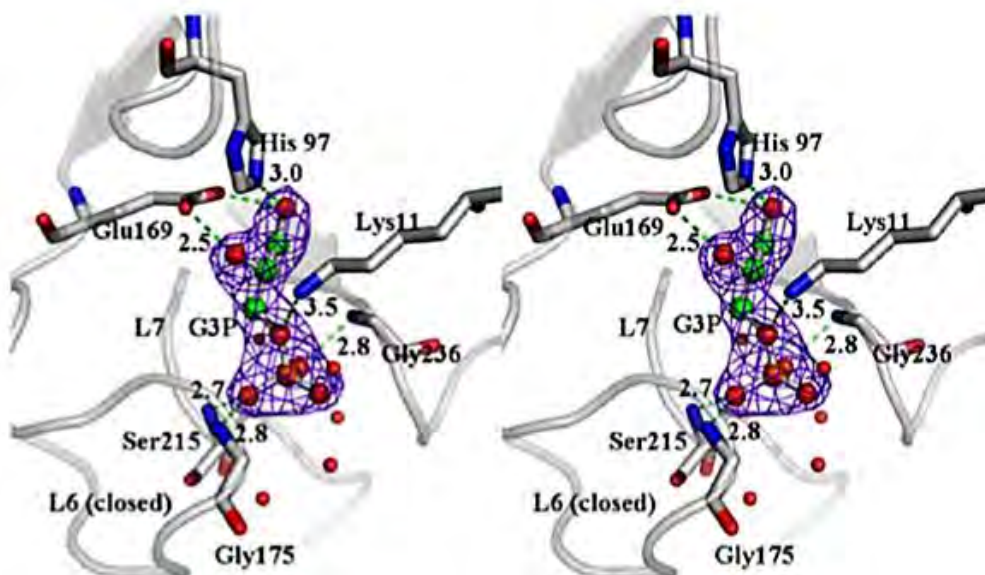


Figura 6. Sitio activo de la TIM con G3P del organismo *Staphylococcus aureus*. Se muestra el mapa de densidad electrónica del G3P (Modificado de Mukherjee et al. 2012).

Los primeros estudios sobre el plegamiento de proteínas homólogas sugirieron en su tiempo que el patrón de plegamiento se conservaba evolutivamente, sin embargo, hoy en día en la literatura se pueden encontrar muchas referencias describiendo una gran cantidad de vías de plegamiento para proteínas homólogas (Vázquez Contreras et al., 2004).

La desnaturalización de la TIM de varias especies ha sido extensivamente estudiada por medio de desnaturalización química y física. La transición entre los estados nativo y desnaturalizado de la TIM han sido descritos con varios modelos y con una gran complejidad, ya sea procesos de dos estados, en los cuales sólo se observa la transición de monómeros desnaturalizados (D) a dímeros nativos (N_2), hasta la presencia de múltiples estados que incluyen intermediarios monoméricos o diméricos; que pueden llevar a la estructura nativa de la proteína, o estados energéticos más bajos dentro del paisaje conformacional conocidos como “agregados” (Zárate-Pérez, Chánez-Cárdenas, and Vázquez-Contreras 2008).

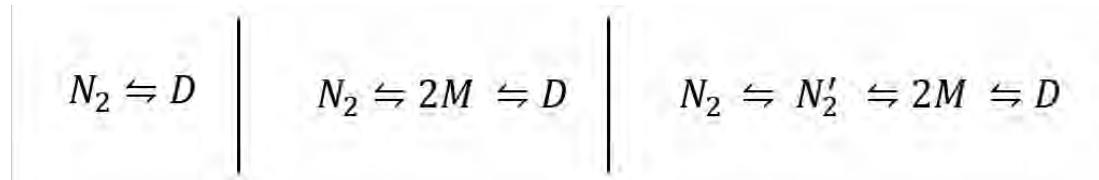


Figura 7. Diferentes modelos describiendo la desnaturalización de TIM. En el extremo izquierdo se muestra un modelo de dos estados sin intermediarios. En medio se muestra un modelo de tres estados, con un intermediario En el extremo derecho se tiene un modelo de cuatro estados, con dos intermediarios.

1.4 EL ÁRBOL DE LA VIDA Y LA CLASIFICACIÓN BACTERIANA

El surgimiento de la vida en la Tierra se ha rastreado hasta hace unos 3.8 mil millones de años, 750 millones después de la formación de la Tierra. Si bien el origen de la vida aún se encuentra en duda, Stanley Miller en los años 50's demostraron que mediante la interacción de descargas eléctricas con una mezcla de gases que se cree se encontraban presentes en la atmósfera primitiva de la Tierra (H_2 , CH_4 , y NH_3), y en la presencia de agua, es posible la formación de una variedad de moléculas orgánicas incluyendo varios aminoácidos (Nisbet and Sleep 2001).

Para la biología, rastrear el origen de la vida y la evolución de procariontes y eucariontes, ha sido problemas fundamentales para los cuales aún no hay una respuesta precisa. Evidencias han llevado a pensar que los eucariontes complejos evolucionaron a partir de ancestros procariontes más simples. También se han encontrado razones para creer que los procariontes en realidad consisten de dos dominios, las arqueas y las bacterias, y que el último ancestro universal común, o mejor conocido por sus siglas en inglés LUCA, vivió a temperaturas extremas; y que los eucariontes derivaron de las arqueas (Woese 1987; Meijer et al. 2002).

El árbol de la vida consiste actualmente en la descripción de las relaciones evolutivas entre todos los organismos de la Tierra, pero también provee indicios de las características y la posible naturaleza de LUCA (Cavalier-Smith 2006b; Ciccarelli et al. 2006). Sin embargo, la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de todos los organismos vivos es uno de los mayores retos que existen actualmente para la biología. A pesar de que se han realizado numerosos intentos para aclarar estas relaciones, muchos grupos y entidades taxonómicas aún son altamente debatidas, aún con la nueva información obtenida de los nuevos métodos moleculares y datos genómicos (Ciccarelli et al. 2006).

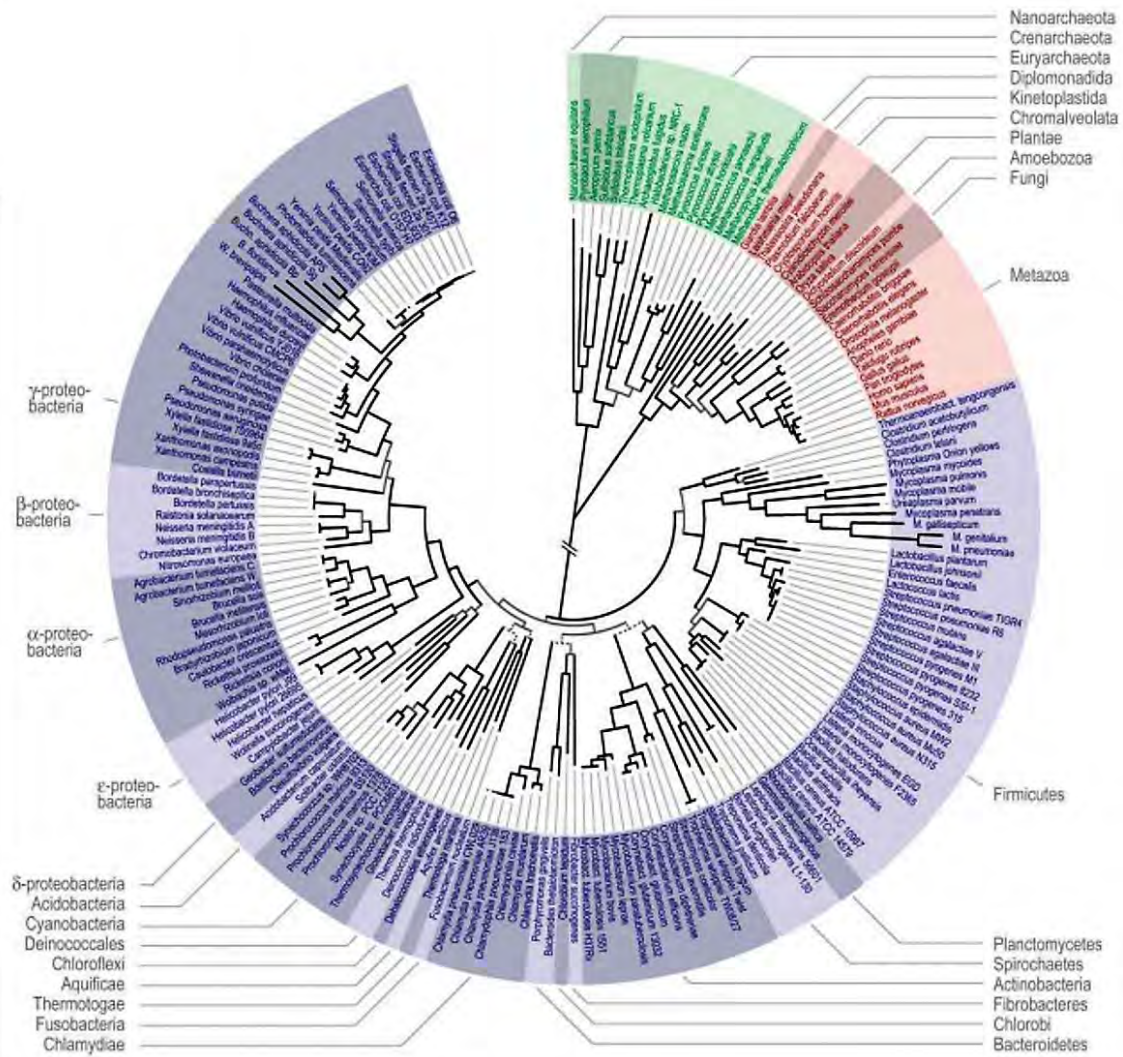


Figura 8. Filogenia Global propuesta a partir de organismos completamente secuenciados. Filogenia basada en el alineamiento de 31 familias universales de proteínas de 191 especies distintas. Se muestra en la sección verde a las Arqueas; en rojo a los Eucariontes; y en azul a las Bacterias. Cada una de las secciones presenta las subdivisiones de cada dominio. (Modificado de Ciccarelli et al., 2006)

La diferencia más reconocida entre los organismos se encuentra entre las bacterias y los eucariontes. Estos dos grupos difieren en las relaciones topológicas entre membranas, genomas y ribosomas dentro de sus células. En todas las bacterias el ADN cromosomal y los ribosomas crean las proteínas membranales que están en contacto directo con la membrana citoplasmática, la cual crece mediante la inserción directa de proteínas y lípidos. Por otra parte, en eucariontes, los cromosomas y ribosomas encargados de la síntesis de las proteínas membranales se encuentran en el retículo endoplasmático y en la cubierta nuclear. La mayoría de los eucariontes presentan un complejo citoesqueleto formado de microtúbulos y filamentos de actina que utilizan motores moleculares con el fin de mediar la segregación cromosomal y la división celular. En contraste, las bacterias presentan una pared celular de vital importancia para la segregación del ADN y la división celular (Woese 1987; Cavalier-Smith 2006b). Diferencias como esto se han estudiado y discutido a lo largo de la historia. El extremo complejo origen de los eucariontes inició después de tres cuartos de la historia de la vida en la Tierra. La tardía aparición de los eucariontes es atribuida a la tardía revolución neomura, durante la cual se dio un cambio radical en los mecanismos de secreción bacteriana y la química de la pared celular, permitiendo por primera vez la flexibilidad de la superficie celular, lo que posteriormente evolucionó a la fagocitosis de otras células, proporcionando una dicotomía entre las eubacteria y los neomura (Cavalier-Smith 2010).

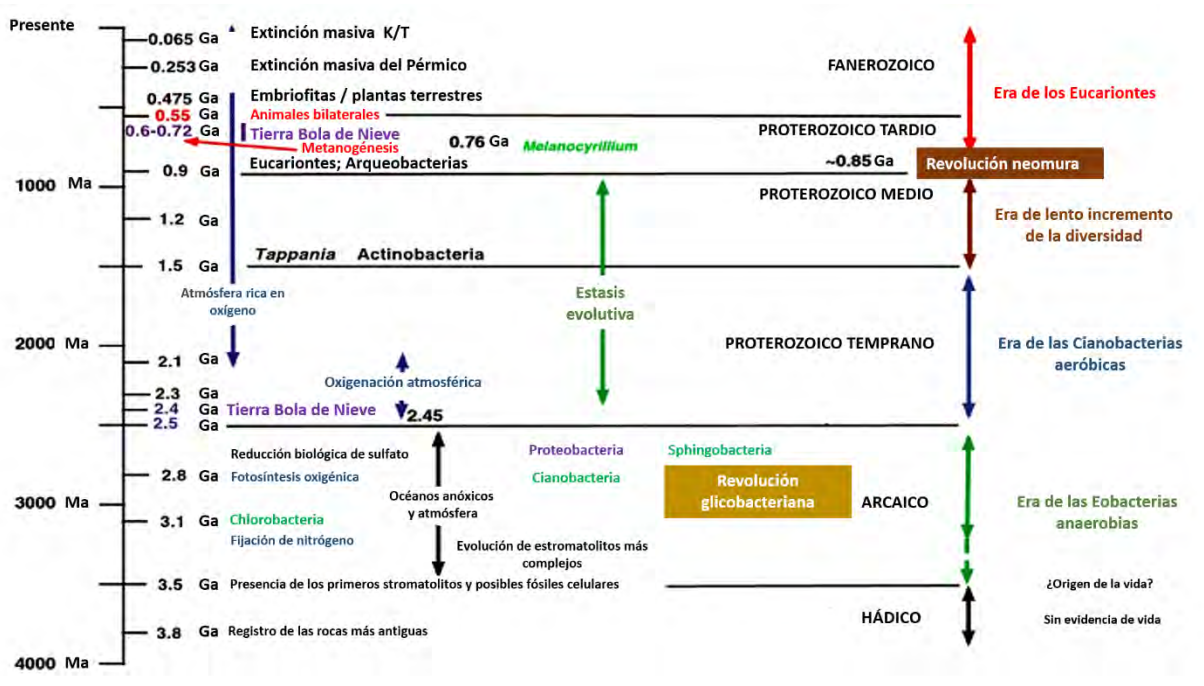


Figura 9. Evento globales en la historia de la vida en la Tierra especificando algunos cambios climáticos, modificaciones metabólicas y registros fósiles de organismos. (Modificado de Cavalier-Smith, 2010).

La historia de los genes es discordante, lo que significa que, al menos para los procariontes, el modelo tradicional del árbol de la vida es un esquema bastante complicado para los que estudian la evolución microbiana (Baptiste et al. 2009; Kunin et al. 2005).

La distinción más básica entre las células procariontes es entre las Negibacterias, aquellas que poseen una cobertura membranal compuesta de dos membranas lipídicas; y las Unibacteria, caracterizadas por la presencia de una sola membrana superficial. Por medio de análisis filogenéticos y estudios paleontológicos se ha mostrado que el ancestro común de toda la vida era una Negibacteria. (T. Cavalier-Smith 2002), y que las Unibacterias evolucionaron a partir de ellos al perder su membrana más exterior. Para determinar esto, se tomaron en cuenta varios cambios que se experimentaron como la evolución flagelar y la evolución de la envoltura membranal, lo cual demuestra que la raíz del ancestro común se encuentra dentro de las Negibacterias, dato que se empata con el registro fósil obtenido, ya sea como una Eubacteria anoxigénica fotosintética (Thomas Cavalier-Smith 2006a) o como un organismo intermedio entre las Actinobacterias y los Firmicutes (Dagan et al. 2010; Lake et al. 2009). Las Negibacterias engloban a los únicos organismos procariontes capaces de usar la luz solar en orden de poder realizar la fijación de dióxido de carbono, siendo los únicos capaces de sobrevivir y crear un ecosistema sin el cual la extensiva evolución de las Posibacterias, Arqueobacterias y Eucariontes no hubiera sido posible. (Thomas Cavalier-Smith 2006b).

El grupo de las Unibacteria comprende a dos grupos que presentan una química membranal radicalmente diferente una de otra: Posibacteria y Arqueobacteria. Las Posibacterias básicamente presentan la misma química membranal que los Eucariontes: fosfolípidos con un esqueleto de glicerol y dos ácidos grasos unidos por enlaces ester. Las Arqueobacterias, hermanas de los Eucariontes, presentan membranas hechas a partir de fosfolípidos de glicerol, donde isoprenoides están unidos por medio de enlaces éter al esqueleto de glicerol, rasgo que les permitió tolerar altas temperaturas.

Las Negibacterias presentan sus dos membranas y usualmente son fotosintéticas, cinco diferentes phyla contienen miembros capaces de fijar carbono por medio de la absorción de energía por clorofila, o por bacterioclorofila. La membrana interna de este grupo de bacterias se asemeja a la que presentan los Eucariontes y las Posibacterias, mientras que la membrana externa tiene una diversidad química más grande, siendo esta la base para la clasificación de las Negibacterias en dos grupos: Eobacteria y Glicobacteria. La membrana externa de las Glicobacterias presenta una composición química diferente en los lados de su membrana, es decir, la parte interna está compuesta de acetil ester fosfolípidos, pero la parte exterior es mucho más impermeable al estar formada por lipopolisacaridos, por lo que presenta complejos macromoleculares que median el intercambio de moléculas en la célula. En las Eobacterias, la membrana externa es simple, ya que no presenta lipopolisacaridos, y en vez de estos posee glicolípidos basados en una cadena larga de dioles en vez de glicerolípidos (Woese 1987); simpleza considerada primitiva si se pone en contraste con las Unibacterias.

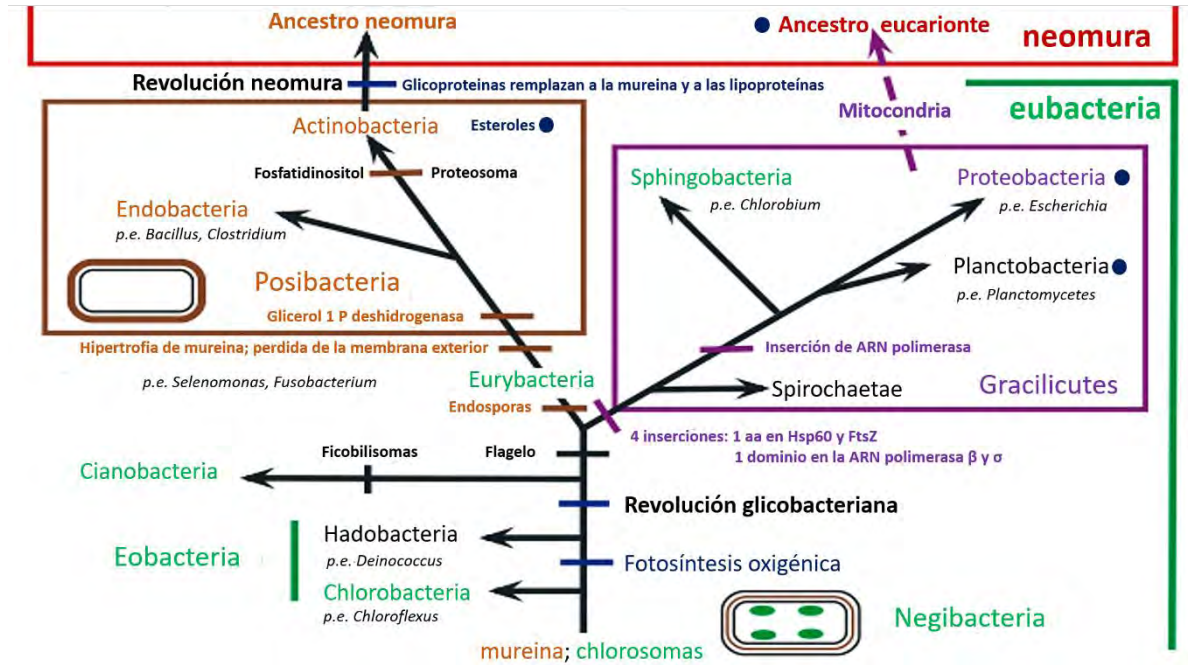


Figura 10. Árbol de la vida basado en las grandes revoluciones estructurales durante la evolución de las bacterias hasta la aparición de los organismos neomura, expresando los cambios que llevaron a la formación de las diferentes phyla bacterianos. Se resaltan 10 phyla bacterianos postulados por Cavalier-Smith de acuerdo a estudios filogenéticos realizados utilizando 149 proteínas (Modificado de Cavalier-Smith, 2006).

1.5 PROTEOBACTERIAS

En 1987 Carl Woese estableció un grupo bajo el nombre de “Bacterias purpuras”, hoy en día conocidas como Proteobacterias, nombre dado haciendo referencia al dios griego *Proteus* que era capaz de asumir muchas formas (Sievers and Swings 2005). Como grupo una característica muy representativa es que todas son gram negativas (M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl 2017; Woese 1987). Estas presentan una amplia diversidad de mecanismos para la generación de energía, ya que cuentan con representantes quimiolitótrofos, quimioorganotrofos y fotosintéticos. También este grupo es diverso con respecto al oxígeno, ya que se tiene la presencia de organismos anaerobios, microaerófilos, y aerobios facultativos.

Por medio de las secuencias de 16S del rRNA de los organismos, se puede clasificar al phylum Proteobacteria en seis clases diferentes, *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* y *Zetaproteobacteria*. Esta última clase siendo la más nueva dentro dentro del phylum ya que cuenta con solamente un representante del género *Mariprofundis*. Sin embargo, a pesar de la separación en estas clases, se ha determinado que varias proteobacterias presentan metabolismos similares e incluso idénticos a pesar de estar filogenéticamente separados. Por ejemplo, la fototrofia y la metilotrofia se encuentran en 3 diferentes clases, y la nitrificación se encuentra en 4 diferentes. Este tipo de similitudes sugieren que dentro de este grupo, la transferencia horizontal de genes ha jugado un papel relevante para establecer la diversidad que presenta este grupo (M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl 2017).

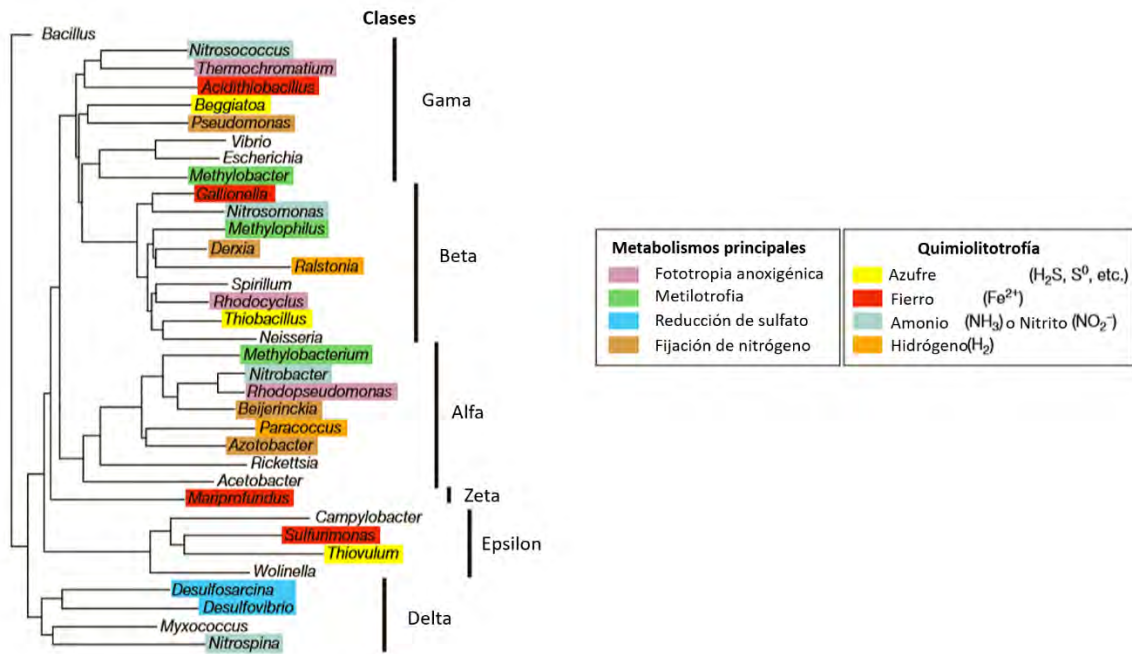


Figura 11. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuenciación de los genes 16S del RNA de organismos pertenecientes al phylum proteobacteria. Se muestran algunos géneros de las diferentes clases en las cuales está subdividido el phyla. En código de colores se presentan los tipos de metabolismo que presentan los diferentes géneros. (Modificado de Madigan, et al. 2017).

2 JUSTIFICACIÓN

La Triosafosato Isomerasa es una proteína de gran interés científico debido tanto a su función, tipo de plegamiento y amplia presencia en los organismos. Sin embargo, la mayor parte de investigaciones de cualquier tipo realizadas con la TIM son de organismos eucariontes. Si bien la estructura y los parámetros cinéticos de la TIM son similares en todos los organismos en los que se ha estudiado, aún es prematuro decir que se conocen todas las características de esta proteína.

La TIM en el dominio bacteria ha sido poco explorado a pesar de la diversidad que este presenta, por lo que la realización de estudios con estos organismos nos podrían llevar a dilucidar en diversas especies, otras características como el patrón de plegamiento varían mucho dependiendo de la secuencia. Las bacterias en este caso, parecen presentar a la TIM con algunas peculiaridades, sin embargo, el estudio de esta proteína ha sido centrado en su mayoría en organismos Eucariontes; dejando de lado la gran variedad que el dominio Bacteria puede ofrecer en información para entender de una manera más clara las propiedades de la TIM y sus variaciones.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización de las propiedades fisicoquímicas, desnaturalización física y química de la enzima Triosafosfato Isomerasa de representantes del phylum Proteobacteria.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Elegir secuencias de la TIM en el dominio proteobacteria.
- Sobreexpresar y purificar la triosafosfato isomerasa de los organismos seleccionados.
- Determinar los parámetros catalíticos y el estado oligomérico de las enzimas.
- Caracterizar las propiedades espectroscópicas de las proteínas.
- Desnaturalización de las TIM's por temperatura y agentes caotrópicos utilizando técnicas espectroscópicas y calorimetría diferencial de barrido.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SELECCIÓN DE ESPECIES POR ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para seleccionar las especies estudiadas en el presente trabajo se realizó un análisis filogenético del dominio Bacteria, utilizando la clasificación propuesta por Cavalier-Smith (T. Cavalier-Smith 2002) con la finalidad de utilizarlo como guía y que permitiera la agrupación de los phyla bacterianos. Posteriormente se realizó la búsqueda por phylum de secuencias de la Triosafofato Isomerasa en el banco de secuencias del NCBI (National Center for Biotechnology information); y se utilizaron los siguientes criterios de búsqueda: gen reportado para especies bacterianas y presentar una longitud de aproximada de 250 residuos. Una vez obtenida la lista de secuencias organizadas por phylum se realizó una nueva filtración de estas utilizando como método de análisis el alineamiento de las secuencias utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), para detectar GAP's en la secuencia, y la conservación de los tres aminoácidos catalíticos reportados para la TIM. Finalmente, con un candidato para cada phylum se realizó la búsqueda de reportes sobre los microorganismos en general; reportes o estudios sobre la TIM; estructuras cristalográficas reportadas; y se realizó la predicción del punto isoeléctrico de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta computacional ProtParam del portal científico ExPASy(Gasteiger et al. 2005) De todos los phyla bacterianos explorados se decidió trabajar con las proteobacterias ya que de entre el dominio Bacteria, presentan una gran diversidad metabólica, lo cual nos permitiría estudiar una diversidad más amplia utilizando organismos cercanamente filogenéticos y así tener una pauta más plausible para comparar y estudiar sus características.

4.2 SUBCLONACIÓN

Después de la elección de las especies, se solicitó la síntesis de los genes a la empresa *GenScript*[®]; en un vector de almacenamiento pUC57 con el cuál se realizó la transformación de células quimiocompetentes *E. coli* DH5- α por medio de choque térmico. Con las células transformadas se realizó la obtención del plásmido por medio del método Fenol-Cloroformo, y se procedió a la liberación del gen utilizando las enzimas para los sitios de restricción *NdeI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3' (New England Biolabs[®]), proceso confirmado con un gel de agarosa al 1% del cual se realizó la purificación del gen mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen[®]). Posteriormente se procedió a la subclonación de los genes al vector de expresión pET-28b(+).

La subclonación se llevó a cabo en dos reacciones de ligación de los genes y el vector de expresión digeridos, 1:3 y 1:5 respectivamente y se dejaron incubando durante 2 días a 16°C. Finalizado el procedimiento se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* DH5- α y se cultivaron en cajas con medio LB con kanamicina (30 mg/mL). De las colonias se extrajo el plásmido que poseía nuestro gen de interés; posteriormente se realizaron digestiones simples y dobles con las enzimas de restricción anteriormente mencionadas, comprobando la presencia del inserto en el plásmido mediante el uso de

geles de agarosa. Con la presencia del inserto comprobada se procedió a la transformación a cepas de expresión *E. coli* BL21(DE3)pLysS por medio de choque térmico. Las cepas fueron almacenadas en glicerol para su posterior uso.

4.3 SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La sobreexpresión se realizó creciendo las cepas transformadas en cajas Petri con medio sólido y kanamicina, se seleccionó una colonia aislada y se incubó en un tubo con 10 mL de medio LB líquido y kanamicina (30 mg mL⁻¹) incubandose toda la noche a 37°C a 250 rpm. A partir de este cultivo se inoculó un tubo con 10 mL de medio LB y kanamicina (30 mg mL⁻¹), dejándolo crecer a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.8 para realizar la inducción con 1mM de IPTG, dejando incubar nuevamente durante 4 horas en las mismas condiciones. Al termino se centrifugó el medio de cultivo a 8000 rpm por 20 minutos, y se resuspendieron las células en buffer (Tris base 100 Mm, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7.7) para lisar por sonicación en frío. Se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos para separar la parte del sobrenadante y de la pastilla de las células lisadas, que posteriormente fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y fueron teñidos con azul de coomassie para analizar la sobreexpresión de la proteína y si se encontraba en la fracción soluble o en la pastilla. Cuyo resultado demostró que la fracción mayoritaria de las proteínas se encontraban como sobrenadante

La purificación de las enzimas se realizó a partir de una colonia seleccionada en una caja con medio LB + kanamicina, de la cual se inoculó un tubo con 10 mL de medio LB líquido y kanamicina (30 mg mL⁻¹) toda la noche a 37°C a 250 rpm. A partir de éste se tomó 1mL y se inoculó 1L de medio LB al cual también se le agregó kanamicina, se mantuvo a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.8. Se indujo usando 1mM de IPTG y se mantuvo en las mismas condiciones por 16 hrs. Transcurrido el tiempo, se centrifugó el medio de cultivo a 8000 rpm durante 20 minutos para cosechar las células. El pellet se resuspendió usando una solución de 35mM Imidazol + 35mM NaH₂PO₄ + 300 mM de NaCl junto con una solución de inhibidor de proteasas 0.2mM de Floururo de fenilmetilsulfonilo (PMSF) diluido en DMSO (Dimetil sulfóxido). Una vez resuspendido la pastilla se realizó la sonicación en frío. Se centrifugó a 15000 rpm por 20 minutos y se separó el sobrenadante de la pastilla.

El sobrenadante fue filtrado y se pasó por una columna de afinidad HisTrap acoplada a un sistema AKTA FPLC (GE®) equilibrada con buffer 35mM Imidazol + 35mM NaH₂PO₄ + 300 mM de NaCl pH 8.0, eluyendo la proteína con un gradiente continuo de 500mM Imidazol + 35mM NaH₂PO₄ + 300 mM de NaCl pH 8.0 recuperando las fracciones que presentaron señal de UV a 280nm y se corrieron en un gel de poliacrilamida en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente la proteína se dializó en buffer Tris 50mM para realizar el corte de la etiqueta de histidinas con trombina mediante el kit Thrombin CleanCleave (Sigma-Aldrich®) durante 4 horas . Se dializó de nuevo a Tris 50mM y posteriormente con buffer 35mM Imidazol + 35mM NaH₂PO₄ + 300 mM de NaCl para poderla pasar de nuevo por la columna HisTrap con el mismo procedimiento que en el paso inicial, pero ahora colectando las fracciones iniciales debido a que la proteína cortada ya no debería unirse a la columna.

La proteína purificada fue dializada contra buffer Trietanolamina 10mM, EDTA 1Mm y DTT 1mM a pH 8.0 a 4° C para su almacenamiento y posterior uso.

4.4 DETERMINACIÓN CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de la proteína purificada fue determinada usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific ®) a partir de su absorbancia a 280nm, utilizando el coeficiente teórico de absorptividad molar (ϵ_{280}) obtenido por el servidor ProtParam (Gasteiger et al. 2005) utilizando la secuencia de la proteína considerando las cisteínas en su forma reducida (Pace et al. 1995) obteniendo la concentración de proteína mg/mL.

4.5 PARÁMETROS CATALÍTICOS

La medición de la actividad catalítica se siguió mediante un ensayo acoplado en dirección G3P a DHAP (Gómez-Puyou et al. 1995), proceso al cual se acopla la reducción del DHAP hacia Glicerol-3-Fosfato catalizada por la enzima α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH) mediante la oxidación de una molécula de NADH a NAD^+ , por lo que por cada G3P transformado se oxida una NADH. Esta oxidación se sigue ya que el NAD^+ no absorbe a una longitud de onda de 340 nm, con lo que se observa una disminución en la absorbancia, por lo que se puede medir el cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo, la cual es posteriormente transformado a μmol de DHAP formado por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{TIM}$, utilizando un coeficiente de absorptividad molar a 340 nm de $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el NADH.

El procedimiento anterior se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: 100 mM de Trietanolamina, 10 mM de EDTA, 1 mM de DTT pH 8.0, 0.2 mM de NADH y 0.9 U de α -GDH, a 25°C, y variando la concentración de G3P desde 0.1 hasta 3.5 mM para obtener los parámetros catalíticos.

Para el análisis de los datos, estos se ajustaron a una regresión no lineal como a un modelo de Michaelis-Menten para obtener la K_m y la V_{mas} por medio de la siguiente ecuación (ecuación X):

$$V_o = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Para el cálculo de la eficiencia catalítica, se modificó el valor de la K_m obtenida considerando que solo el 4% del G3P se encuentra no hidratado, y esta es la única forma del sustrato en el que la TIM es capaz de catalizar (Wierenga, Kapetanidou, and Venkatesan 2010).

4.6 DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN

Se determinó el estado oligomérico de las proteínas mediante experimentos de cromatografía de exclusión molecular con una columna analítica Superdex 75 HR 70/30 (GE[®]) acoplada a un sistema AKTA FPLC (GE[®]). La elución de las proteínas se siguió con un detector de absorción de UV (UVA) (λ_{280}). Además de realizar los cromatogramas de las TIM's seleccionadas se realizaron experimentos con las siguientes proteínas de peso conocido para realizar la curva de calibración: Tiroglobulina (670.0 kDa, radio de Stokes 85.80 Å), Gama-globulina (158.0 kDa, radio de Stokes 51.0 Å), Ovoalbúmina (44.0 kDa, radio de Stokes 28.0 Å), Mioglobina (17.0 kDa, radio de Stokes 19.0 Å), Vitamina B12 (1.35 kDa, radio de Stokes 13.0 Å). Con los datos obtenidos de estas proteínas se graficó el volumen de elución vs R_s , y el volumen de elución vs el logaritmo del Peso Molecular; a partir de estos se obtuvieron las regresiones lineales para obtener el peso molecular y por tanto determinar el estado oligomérico de las proteínas seleccionadas.

Los estándares y las proteínas seleccionadas fueron eluidas en un buffer de Trietilonamina 10mM, EDTA 1 mM, DTT 1mM, pH 8.0. En el caso de las proteínas problema se realizaron corridas a 3 diferentes concentraciones: 500mg/mL, 100mg/ml, y 10 mg/mL. A partir de los volúmenes de elución obtenidos, se realizó la interpolación para obtener el radio de Stokes y el peso molecular de las proteínas, utilizando las curvas de calibración. Finalmente el estado oligomérico se obtuvo dividiendo el peso molecular experimental contra el peso molecular teórico, de donde se obtuvo la cantidad de monómeros asociados de la proteína.

4.7 PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

4.7.1 Dicroísmo Circular

La espectroscopia de Dicroísmo circular es una técnica espectroscópica donde se determina la señal de dicroísmo circular de las moléculas es medido a lo largo de un rango de longitudes de onda. Esta técnica es ampliamente utilizada para el estudio de moléculas quirales de todo tipo y tamaños, pero su mayor aplicación se enfoca en macromoléculas. Uno de sus principales usos es el análisis de la estructura secundaria o la conformación de las proteínas ya que este es sensible a cambios ambientales como la temperatura o el pH, y observar los cambios que tiene en estas condiciones o en interacción con otras macromoléculas. De este tipo de análisis se puede derivar información estructural, cinética y termodinámica de estas macromoléculas (Greenfield 2007).

Los experimentos de Dicroísmo Circular se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan[™] (Applied Photophysics[®]) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience[®]) para el control de temperatura. La proteína fue estudiada en un rango de longitud de onda de 200 a 260 nm, una concentración de 0.4 mg mL⁻¹ a 20°C en un amortiguador de NaH₂PO₄ 10 mM pH 8.0, usando celda de cuarzo de 0.1cm de paso óptico.

4.7.2 Fluorescencia Intrínseca

Las mediciones de fluorescencia intrínseca se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS®) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience®) para el control de temperatura. La concentración de proteína utilizada para estos experimentos fue de 0.4 mg mL⁻¹ en un amortiguador de NaH₂PO₄ 10 mM pH 8.0 a 25°C. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm para seguir la emisión del triptófano de las proteínas de 310 a 410 nm. El centro espectral de masa (CME) se calculó mediante:

$$CME = \frac{\sum \lambda I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}} \quad (2)$$

Donde I_{λ} es la intensidad de la fluorescencia para cada longitud de onda (λ).

4.8 DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA

4.8.1 Dicroísmo Circular

Se realizó el seguimiento de la desnaturalización de las proteínas al monitorear cambios en el espectro de dicroísmo circular. Los experimentos se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics®) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience®) para el control de temperatura. Se tomaron espectros de dicroísmo (190-250 nm) en 3 puntos: en estado nativo a 20 °C (N), en estado desplegado a 80°C (D), y la proteína replegada a 20°C (R). Por medio de la señal a 222 nm se siguieron los cambios de desnaturalización y renaturalización; se realizó una rampa de temperatura de 20 a 80°C y viceversa a tres diferentes tasas de calentamiento (30, 90 y 180 K hr⁻¹). Los experimentos se realizaron a una concentración de 0.4 mg/mL en buffer NaH₂PO₄ 10 mM a pH 8.0.

Los datos obtenidos del termograma se ajustaron a un modelo de dos estados con disociación, y fueron normalizados por medio de la ecuación

$$f_d = \frac{Y_{obsT} - (Y_N + m_N T)}{(Y_{DT} + m_D T) - (Y_n + m_N T)} \quad (3)$$

Donde f_d es la fracción de proteína desnaturalizada, Y_{obsT} es la señal observada a esa temperatura, $(Y_n + m_N T)$ y $(Y_D + m_D T)$ son las ecuaciones de ajuste de las zonas pre y post de la transición de la recta (Y = ordenada al origen, m = pendiente y T = temperatura en K). Al ser un proceso irreversible, los valores de temperatura media fueron obtenidos ajustando los datos a la función sigmoide de Boltzmann (Duy and Fitter 2005).

4.8.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

Para seguir el proceso de desnaturalización por temperatura de las tres proteínas se utilizó el Calorímetro capilar VP-Capillary DSC (Microcal[®]) del laboratorio de Termofísica de la Facultad de Química-UNAM en colaboración con el Dr. Miguel Costas Basín. Se realizaron los experimentos a diferentes concentraciones para BmeTIM (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 0.8, 1.2 y 2.0 mg/mL), BtTIM (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, y 2.0 mL), y GdTIM (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, y 1.2 mg/mL) a diferentes velocidades de barrido (30, 60, 90, 120 y 180 K hr⁻¹), en un buffer de NaH₂PO₄ 10 mM; hasta una temperatura 15°C mayor a la T_m aparente obtenida de los experimentos de desnaturalización térmica seguida por DC. A las tres enzimas se les realizó un rescán después de enfriar la muestra para probar si había un proceso desplegamiento térmico reversible.

A los datos obtenidos se les corrigió el tiempo de respuesta del equipo, la línea física y se normalizaron respecto a la concentración de proteína. De igual forma se les restó la línea base del buffer de la celda de referencia para obtener la capacidad calorífica en exceso (ecuación X). A partir de las curvas normalizadas se obtuvieron los valores de ΔH_{cal} y T_m. Posteriormente las trazas se ajustaron a un modelo de dos estados irreversible (Lumry-Eyring): N → F, donde N es el estado nativo de las proteínas, el cual mediante solamente una transición llega el estado final F, y este estado es incapaz de regresar a su estado original, esta conversión está descrita por una constante de primer orden (k) que varía con la temperatura. La capacidad calorífica en este modelo se expresa mediante la ecuación (Costas 2009):

$$Cp^{exc} = \frac{\Delta H E_A}{RT_m^2} \exp(x) * \exp[-\exp(x)] \quad (4)$$

con:

$$x = \frac{E_A}{RT_m^2} (T - T_m) \quad (5)$$

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

$$Cp^{exc} = B1 + B2 + B3 \quad (6)$$

Donde B1 es la ecuación X, B2 es igual a (1-exp [exp (-x)]) * (mT+b), siendo mT+b la línea base pre-transición, y B3 es igual a (1-exp [exp (-x)]) * (mT+c), siendo (mT+c) la línea base post-transición.

Finalmente se obtuvo la energía de activación E_A del estado nativo al desnaturalizado utilizando el gráfico de Arrhenius

En una transición de dos estados irreversible (Lumry – Eyring) se asume que la conversión cinética de N a F está descrita por una constante de primer orden (k) que cambia con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius

$$\frac{1}{2\pi} \ln k = \ln km - \frac{1}{T_m} - \frac{E_A}{R} * \frac{1}{T} \quad (7)$$

Donde km está dado por:

$$km = VB * \frac{E_A}{T_m}$$

Siendo VB la velocidad de barrido utilizada durante el experimento en grados por minuto; E_A la energía de activación, R la constante de los gases y T_m la temperatura media de desnaturalización.

4.9 DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA

El proceso de desnaturalización con agentes químicos se inició con la realización de pruebas para obtener curvas de desnaturalización. Para esto, se hicieron varias diluciones en intervalos de 0.5M de urea o cloruro guanidinio a una concentración fija de proteína y se incubaron por 24, 48 y 72 horas a 25°C. Complementario a esto, se hicieron curvas de renaturalización en donde se desnaturalizó proteína durante 24 horas a una concentración saturante del desnaturalizante, y a partir de esta se realizaron diluciones cada 0.25M incubándose a 25°C. Se midieron los cambios en la señal a 222 nm.

Una vez pasado el tiempo de incubación se realizó la medición de los espectros de dicroísmo circular (190-250 nm) en 4 puntos: 1) proteína nativa, 2) proteína a la mayor concentración de agente desnaturalizante en dirección de desnaturalización, 3) proteína a la mayor concentración de agente desnaturalizante en dirección de renaturalización, y 4) la proteína con la menor cantidad de agente desnaturalizante en dirección de renaturalización. Y finalmente se siguieron los procesos de desnaturalización y renaturalización por medio de los cambios en la señal a 222 nm.

Los datos obtenidos de las curvas se ajustaron a un modelo de dos estados con disociación $N_2 \leftrightarrow 2D$, donde N_2 representa al estado dimérico nativo y D al monómero desnaturalizado, y fueron normalizados por medio de la ecuación

$$f_d = \frac{Y_{obsT} - (Y_N + m_N T)}{(Y_{DT} + m_D T) - (Y_n + m_N T)} \quad (8)$$

Donde f_D es la fracción de proteína desnaturalizada, Y_{obsT} es la señal observada a la temperatura en la que se realizó el experimento, $(Y_n + m_N T)$ y $(Y_D + m_D T)$ son las ecuaciones de ajuste de las zonas pre y post de la transición de la recta (Y = ordenada al origen, m = pendiente y T = temperatura en K). La constante de equilibrio (k_{eq}) en dirección nativo \rightarrow desplegado se calculó con la ecuación

$$K_{eq} = \frac{2f_D^2 P_T}{1 - f_D} \quad (9)$$

Donde f_D es la fracción de proteína desnaturalizada y P_T es la concentración de proteína total expresada en moles dímero.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Usando la filogenia propuesta por Cavalier-Smith basada en los eventos evolutivos que permitieron la diversificación de

5.1 SELECCIÓN DE ESPECIES

En este estudio el proceso de selección de las proteínas a estudiar inició desde el análisis de las secuencias de la TIM reportadas hasta hoy en día, agrupándolas de acuerdo a las relaciones filogenéticas. Se analizaron y fueron descartando dependiendo de irregularidades en su secuencia, como inserciones o deleciones muy grandes o que sobrepasaran por mucho el estimado de 250 aminoácidos, terminando con una reducida selección por phylum. El phylum proteobacteria presentaba una oportunidad única de poder estudiar la TIM de organismos relativamente cercanos filogenéticamente, pero que presentaban diferencias importantes tanto a nivel de secuencia como a nivel de organismos, permitiéndonos explorar esa diversidad dentro de la TIM.

Usando la filogenia propuesta por Cavalier-Smith basada en los eventos evolutivos que permitieron la diversificación de las bacterias (T. Cavalier-Smith 2002; Thomas Cavalier-Smith 2010), se exploraron las 5 clases del phylum Proteobacteria. Seleccionadas las especies se realizó el análisis de las secuencias de las TIMs de estas utilizando la herramienta computacional ProtParam del portal científico (Gasteiger et al. 2005) con el fin de obtener de forma teórica el punto isoeléctrico (pI) de la enzima, y el índice de inestabilidad de las proteínas (Tabla X).

Tabla 1. Especies seleccionadas con los valores de punto isoeléctrico e índice de inestabilidad obtenido a partir de la secuencia y la temperatura óptima reportada para los organismos.

Phylum	Especie	Punto isoeléctrico	Temperatura óptima de los organismos	Índice de inestabilidad
α	<i>Brucella melitensis</i>	5.58	37	37.03
	<i>Hyphomonas jannaschiana</i>	4.61	37	24.37
	<i>Dinoroseobacter shibae</i>	5.23	33	21.85
	<i>Thalassospira xiamenensis</i>	5.22	40	29.50
	<i>Hirschia marítima</i>	4.91	30	36.77
β	<i>Burkholderia thailandensis</i>	5.58	30 - 35	23.57
	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i>	5.72	25	21.02
	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	5.61	30	28.01
	<i>Dechloromonas aromatica</i>	5.59	30	29.57
	<i>Bordetella petrii</i>	5.37	30	27.89

δ	<i>Desulfarculus baarsii</i>	6.59	35	27.73
	<i>Hippea marítima</i>	5.20	52 – 54	33.04
	<i>Geobacter daltonii</i>	5.48	30	33.37
	<i>Deferrisoma camini</i>	5.30	50	29.80
	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	5.37	30	39.00
ε	<i>Helicobacter bizzoeronii</i>	5.55	37 – 42	31.87
	<i>Helicobacter suis</i>	5.74	38 – 40	33.90
	<i>Helicobacter magdeburgensis</i>	5.99	21 – 25	30.67
	<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	5.68	30	29.70
	<i>Helicobacter macacae</i>	5.64	35 – 40	43.08
γ	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	4.59	37	27.48
	<i>Ewingella americana</i>	5.99	37	19.52
	<i>Tolomonas auensis</i>	5.64	22	37.02
	<i>Idiomarina xiamenensis</i>	4.70	25	34.38
	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>	5.48	25 – 35	33.58

Se realizó la búsqueda de estructuras cristalográficas en la página de Protein Data Bank. De la lista de candidatos solamente se encontraron reportadas las estructuras de *Brucella melitensis* y *Burkholderia thailandensis*,

La última proteína fue del organismo *Geobacter daltonii*, un organismo capaz habitar en ambientes con presencia uranio, además de poder metabolizarlo. Filogenéticamente también presenta una ventaja en ámbito de la exploración de la TIM, ya que de entre el phylum Proteobacteria, pertenece a la clase de los organismos más derivados.

En resumen los organismos de los cuales se realizaron los estudios de la enzima problema son:

- *Brucella melitensis* (α -Proteobacteria)
- *Burkholderia thailandensis* (β -Proteobacteria)
- *Geobacter daltonii* (δ -Proteobacteria)

5.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y ESTRUCTURAS

Con las proteínas seleccionadas se realizó la comparación de las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI y se alinearon contra la secuencia de la TIM de *E.coli* con el fin de comparar sus secuencias y encontrar diferencias como la longitud de la secuencia, gaps, etc. También se realizó la comparación del porcentaje de identidad de las secuencias.

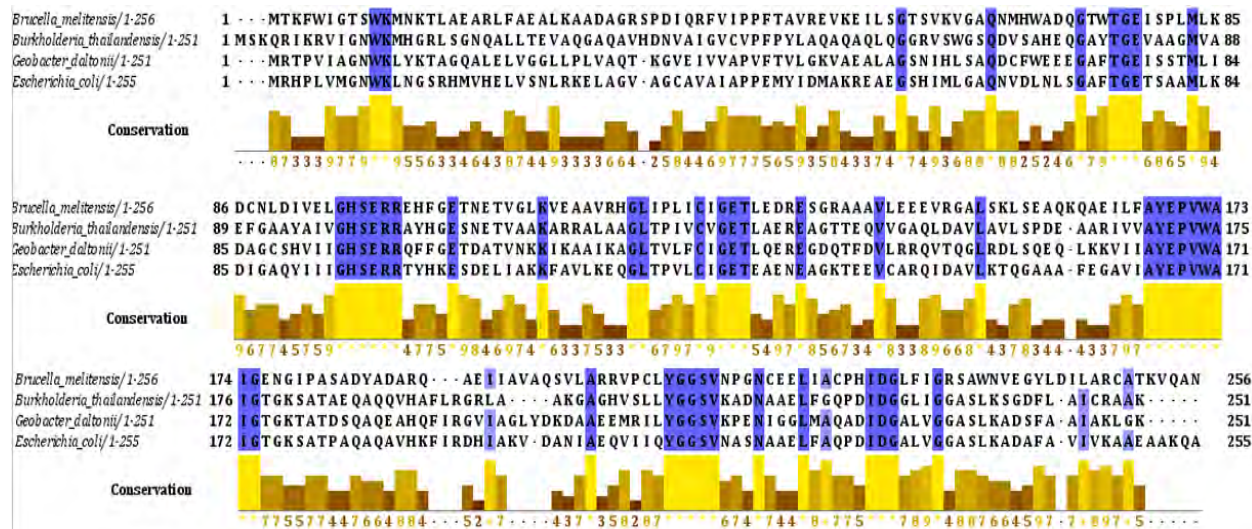


Figura 12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la TIM de las tres especies seleccionadas contra la secuencia de TIM de *E. coli*. Se muestran en azul los aminoácidos conservados entre las 4 secuencias, y en amarillo el alto de las barras es proporcional al nivel de conservación de los aminoácidos para cada posición en la secuencia.

Brucella_melitensis	100%			
Burkholderia_thailandensis	31.07%	100%		
Geobacter_daltonii	36.25%	40.63%	100%	
Escherichia_coli	29.8%	47.01%	46.21%	100%
	Brucella_melitensis	Burkholderia_thailandensis	Geobacter_daltonii	Escherichia_coli

Figura 13. Porcentaje de identidad de las 3 secuencias de las TIM seleccionadas contra la secuencia de *E.coli*. (Porcentajes obtenidos utilizando la herramienta computacional Sequence Identity And Similarity (SIAS), de la Universidad Complutense Madrid).

Se realizó un análisis computacional de las secuencias para obtener algunas propiedades el peso molecular, el punto isoeléctrico, y el coeficiente de absorptividad molar, cantidad de cisteínas y triptofanos (tabla x).

Tabla 2 Características fisicoquímicas de las secuencias TIM seleccionadas.

Proteína (especie)	Número de aminoácidos	Peso molecular (Da)	Punto isoeléctrico	Coeficiente de absorptividad molar E_{280nm} ($M^{-1} cm^{-1}$)	Número de cisteínas	Número de triptófanos
<i>Brucella melitensis</i> (BmeTIM)	257	26766.4	5.58	21220	4	3
<i>Burkholderia thailandensis</i> (BtTIM)	254	26138.4	5.58	25565	3	3
<i>Geobacter daltonii</i> (GdTIM)	254	27026.9	5.48	22585	3	3

De las enzimas seleccionadas, se conoce la estructura cristalográfica de las TIMs *Brucella melitensis* y *Burkholderia thailandensis*, por lo que se realizó el alineamiento entre la estructura de las dos, obteniendo un RMSD de 0.539 Å (figura x), posteriormente se analizaron las estructuras para conocer el número de cavidades, la formación de puentes disulfuro, puentes salinos y puentes de hidrógeno.



Figura 14. Alineamiento de las estructuras cristalográficas de BmeTIM (verde, 4NVT) y BtTIM (azul, 4G1K).

El porcentaje de identidad más grande entre las tres proteínas estudiadas en este trabajo es de 40.63% dada entre GdTIM y BtTIM, siendo la mayor parte de esta identidad entre los aminoácidos catalíticos de la enzima, y los cercanos a estos. En contraste, con dos de las proteínas que presentan estructura cristalográfica, BmeTIM y BtTIM, presentan un RMSD de 0.539 Å, resaltando como a pesar de la diferencia entre la secuencia de las proteínas, estas llegan a la misma estructura terciaria como todas las TIM's conocidas.

5.3 SUBCLONACIÓN DE LOS GENES

Los genes fueron optimizados y sintetizados por la empresa *GenScript*[®]; y estos fueron enviados en un vector de almacenamiento pUC57 del cual se extrajeron los genes utilizando las enzimas para los sitios de restricción *NdeI* en el extremo 5' y *XhoI* (New England Biolabs[®]), posteriormente se procedió a la subclonación de los genes al vector de expresión pET-28b(+) y se corrieron geles de agarosa de los tres genes para comprobar la presencia del inserto dentro del plásmido.

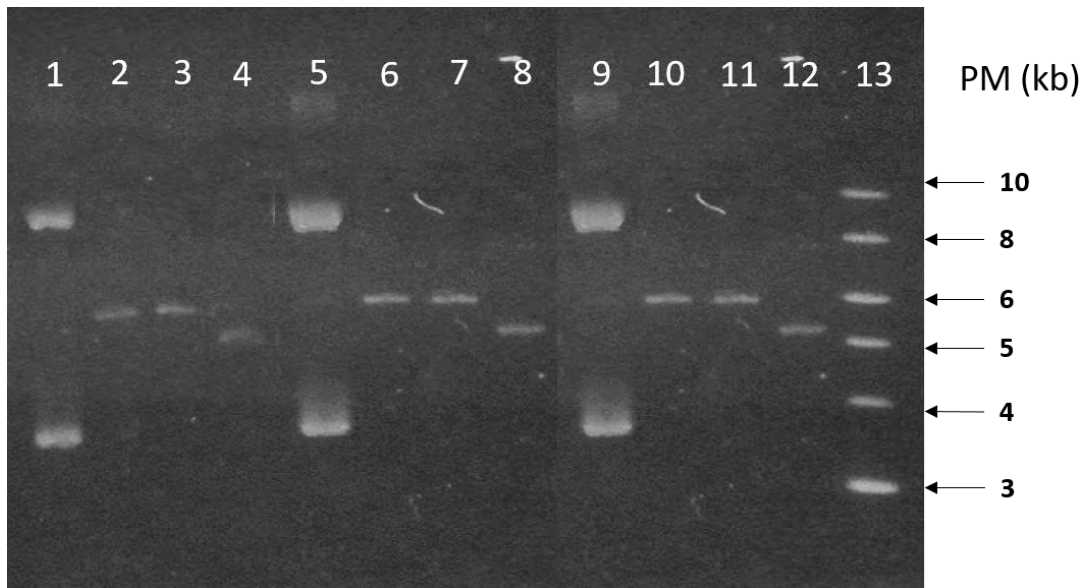


Figura 15. Fotografía de gel de agarosa mostrando las digestiones del vector pET-28b(+). Se muestran (1) Vector pET-28b(+) con gen de BmeTIM sin digerir, (2) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM con la enzima NdeI, (3) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM con la enzima XhoI, (4) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM doble digestión con las enzimas NdeI y XhoI, (5) Vector pET-28b(+) con gen de BtTIM sin digerir, (6) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM con la enzima NdeI, (7) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM con la enzima XhoI, (8) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM doble digestión con las enzimas NdeI y XhoI, (9) Vector pET-28b(+) con el gen de GdTIM sin digerir, (10) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM con la enzima NdeI, (11) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM con la enzima XhoI, (12) Digestión del vector pET-28b(+) + BmeTIM doble digestión con las enzimas NdeI y XhoI (13) Marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder (New England Biolabs®),

5.4 PRUEBAS DE SOBREEXPRESIÓN

En la sobreexpresión de las tres proteínas, la mayor parte en la fracción soluble, por lo que se procedió a la sobreexpresión de las proteínas en medio de cultivo de 1L.

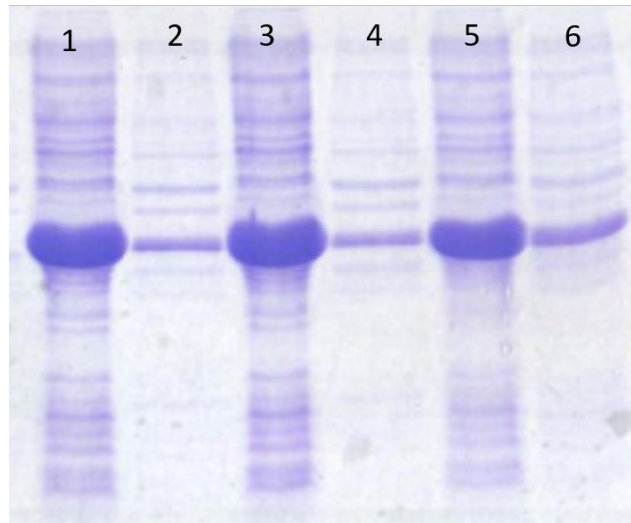


Figura 16. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%, mostrando las pruebas de sobreexpresión después de haber sido lisadas y centrifugadas. (1) Fracción soluble de BmtTIM, (2) pastilla de BmeTIM, (3) fracción soluble BtTIM, (4) pastilla BtTIM, (5) fracción soluble GdTIM, (6) pastilla de GdTIM

La subclonación y sobreexpresión de las tres enzimas fue exitosa. En los tres casos las proteínas se expresaron de forma soluble, por lo que no se tuvo que recurrir a procedimientos desnaturalizantes para poder trabajar con ellas. De igual manera la purificación se llevó de forma simple, ya que se utilizó el procedimiento estándar para otras TIM's para poder obtener a las proteínas puras.

5.5 PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

El proceso de purificación se realizó por cromatografía acoplada a un sistema FPLC en un proceso de dos pasos. En el primero se purifica a la proteína aprovechando la etiqueta de Histidinas, la cual es removida utilizando trombina para posteriormente remover la cola en un segundo paso por la columna de afinidad. A continuación se ejemplifica este proceso con BmeTIM, como representación del comportamiento observado en las tres proteínas.

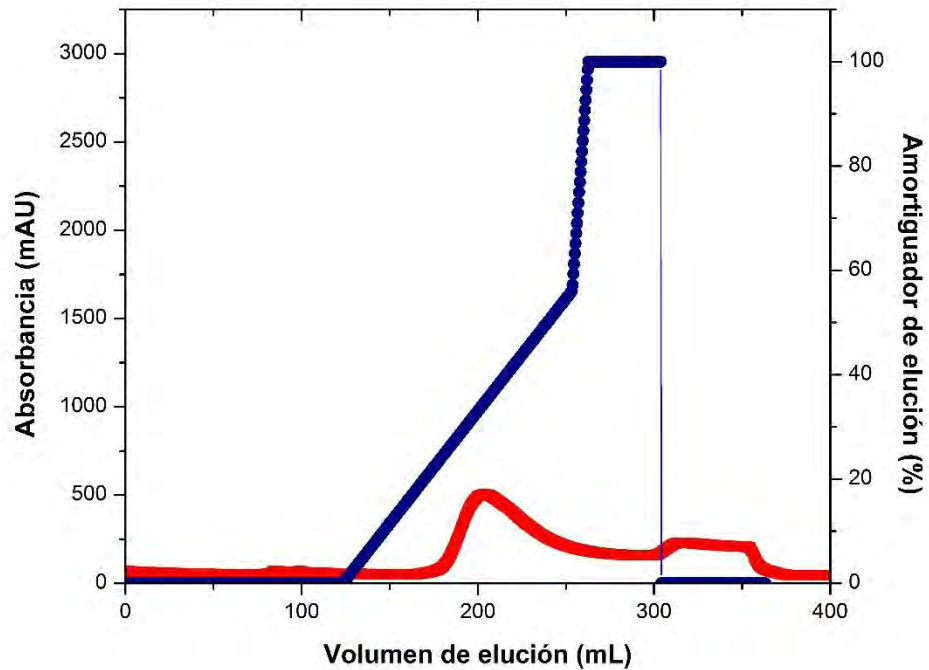


Figura 17. Cromatograma del primer paso de purificación de la enzima BmeTIM con colas de histidinas utilizando una columna de afinidad Protino Ni-TED. En rojo se muestra la señal de absorbancia del paso del sobrenadante del lisado celular, con un pico a los 200 mL representando a la proteína deseada. En azul se muestra el gradiente en porcentaje del amortiguador de elución.

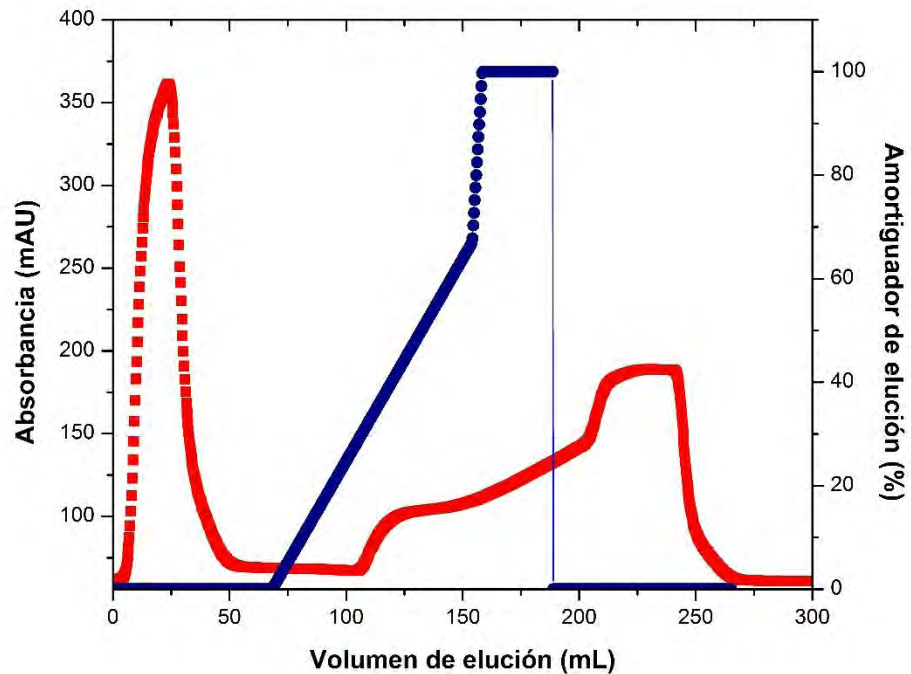


Figura 18. Cromatograma del segundo paso de purificación de la enzima BmeTIM sin colas de histidinas utilizando una columna de afinidad Protino Ni-TED. En rojo se muestra la señal de absorbancia del paso del sobrenadante del lisado celular, con un pico que inicia a los 0 mL representando a la proteína deseada que no se pegó a la columna. En azul se muestra el gradiente en porcentaje del amortiguador de elución.

Se corrieron geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes con las muestras obtenidas de cada uno de los pasos de purificación, y la medición de la actividad específica de la proteína durante estos pasos.

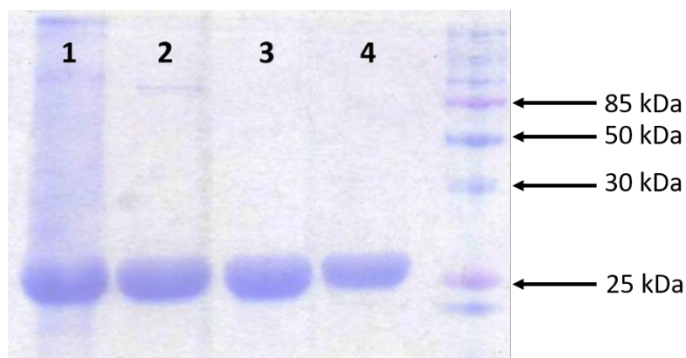


Figura 19. Gel de poliacrilamida desnaturante al 12%, mostrando los pasos de purificación de BmeTIM. (1) Sobrenadante del lisado celular antes de ingresar a la columna, (2) BmeTIM con cola de histidinas después del paso por la columna Protino Ni-TED, (3) BmeTIM después del proceso de corte con trombina, (4) BmeTIM pura.

Tabla 3. Datos de purificación de Bme TIM. Los datos corresponden a un promedio de 3 veces que se realizó el procedimiento de purificación.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración proteína (mg mL⁻¹)	Actividad específica (μmol min⁻¹ mg⁻¹)	Eficiencia catalítica (M⁻¹seg⁻¹)
<i>Sobrenadante antes de la columna Protino Ni-TED</i>	30	1.243	760.234	8.09x10 ⁶
<i>Después de la columna Protino Ni-TED</i>	35	1.323	8042.134	8.559 x10 ⁷
<i>Después del corte con trombina</i>	50	1.400	8023.453	8.540 x10 ⁷
<i>Después del paso por la segunda columna Protino Ni-TED sin cola de histidinas.</i>	50	1.401	20296.784	2.280 x10 ⁸

Tabla 4. Datos de purificación de Bt TIM. Los datos corresponden a un promedio de 3 veces que se realizó el procedimiento de purificación.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración proteína (mg mL⁻¹)	Actividad específica (μmol min⁻¹ mg⁻¹)	Eficiencia catalítica (M⁻¹seg⁻¹)
<i>Sobrenadante antes de la columna Protino Ni-TED</i>	50	1.028	603.453	1.087x10 ⁷
<i>Después de la columna Protino Ni-TED</i>	60	1.221	900.234	1.622 x10 ⁷
<i>Después del corte con trombina</i>	30	2.950	1053.134	1.897 x10 ⁷
<i>Después del paso por la segunda columna Protino Ni-TED sin cola de histidinas.</i>	25	2.568	8392.226	2.114 x10 ⁸

Tabla 5. Datos de purificación de Bme TIM. Los datos corresponden a un promedio de 3 veces que se realizó el procedimiento de purificación.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración proteína (mg mL⁻¹)	Actividad específica (μmol min⁻¹ mg⁻¹)	Eficiencia catalítica (M⁻¹seg⁻¹)
<i>Sobrenadante antes de la columna Protino Ni-TED</i>	50	1.028	923.441	7.520x10 ⁶
<i>Después de la columna Protino Ni-TED</i>	60	1.221	11345.727	9.240 x10 ⁷
<i>Después del corte con trombina</i>	30	2.950	12342.067	1.005 x10 ⁸
<i>Después del paso por la segunda columna Protino Ni-TED sin cola de histidinas.</i>	25	0.710	17376.424	1.842 x10 ⁸

En los geles de poliacrilamida se observa de forma clara como para el caso de las tres enzimas se eliminan las impurezas dejando al final una sola banda.

5.6 PARÁMETROS CINÉTICOS

Se realizó la purificación de tres lotes de cada proteína para los cuales se obtuvieron y promediaron los parámetros catalíticos. Los valores obtenidos de los ensayos de actividad se ajustaron a una regresión no lineal tipo Michaelis-Menten.

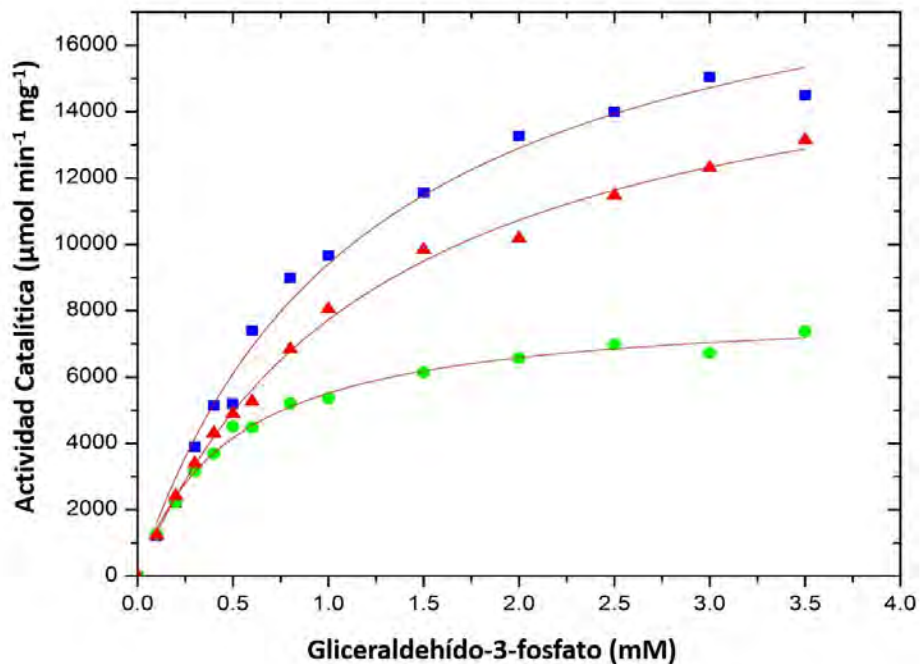


Figura 20. Cinéticas enzimáticas de las TIMs. Los ensayos realizados variando la concentración de G3P (0.1 – 3.5 mM) a una temperatura de 28 °C a pH 8. Los datos se ajustaron a una regresión no lineal con una cinética tipo Michaelis-Menten. En azul se muestran los datos para BmeTIM (--■--), BtTIM (--●--), GdTIM (--▲--).

Tabla 6. Parámetros catalíticos con sus valores de desviación estandar obtenidos de las TIMs bacterianas estudiadas en este trabajo comparados contra los valores de la TIM reportados para *Moritella marina* y *Escherichia coli*

TIM	K_m (mM)	V_{max} (μmol min⁻¹ mg⁻¹)	k_{cat} (min⁻¹)	Eficiencia Catalítica (M⁻¹s⁻¹)
<i>BmeTIM</i>	1.19 ± 0.03	16741 ± 308	(4.48 ± 0.82) × 10 ⁵	(1.82 ± 0.39) × 10 ⁸
<i>BtTIM</i>	0.60 ± 0.13	9070 ± 102	(2.42 ± 0.24) × 10 ⁵	(1.99 ± 0.40) × 10 ⁸
<i>GdTIM</i>	1.41 ± 0.26	16608 ± 108	(4.48 ± 0.29) × 10 ⁵	(1.56 ± 0.39) × 10 ⁸
<i>Moritella marina</i>	1.9	15572	4.2 × 10 ⁵	1.06 × 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i>	1.03	20194	5.4 × 10 ⁵	2.53 × 10 ⁸

Dentro de estos ensayos para calcular los parámetros catalíticos no hay diferencias significativas entre las TIM's de este estudio comparándolos con los parámetros publicados en otros estudios, pues la eficiencia catalítica se encuentra dentro del mismo orden de magnitud y las tres cinéticas presentan un comportamiento Michaeliano.

5.7 PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

5.7.1 Fluorescencia intrínseca

Obtuvimos los espectros de fluorescencia de las tres proteínas, a continuación se muestran los espectros comparados de las tres proteínas con los datos crudos y normalizados. De igual manera se obtuvieron a partir de estos el centro espectral de masas (CME) y la longitud de onda máxima de emisión.

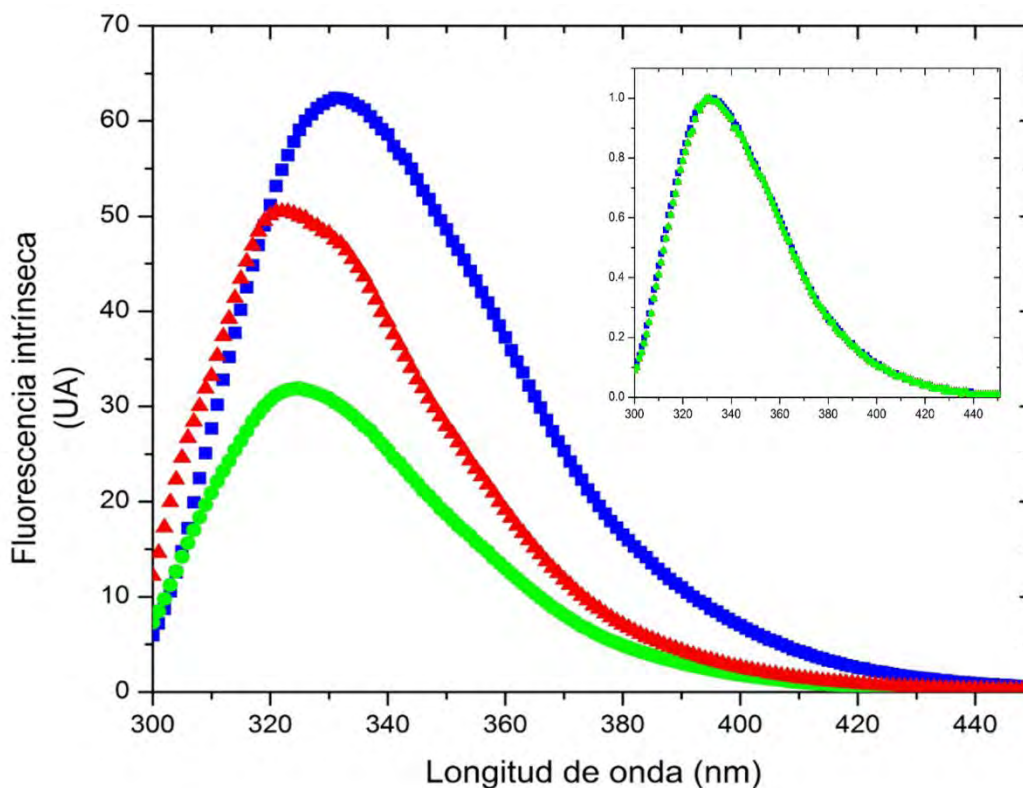


Figura 21. Espectros de fluorescencia intrínseca en datos crudos y normalizados (inserto) obtenidos utilizando una λ de excitación de 295 nm a 25° C en un buffer de NaH_2PO_4 10 mM a una concentración de proteína de 0.4 mg mL⁻¹; BmeTIM (-- ■ --), BtTIM (-- ● --), GdTIM (-- ▲ --).

Tabla 7. Datos obtenidos de los espectros de fluorescencia de las TIMs bacterianas.

TIM	Número de triptófanos	λ_{max} (nm)	Intensidad _{max} (UA)	CME (nm)
BmeTIM	3	333	62.4	344.89
BtTIM	3	331	24.3	337.53
GdTIM	3	331	24.3	343.45

En la fluorescencia intrínseca, se observa un espectro de emisión entre los 325 y los 340 nm, lo cual nos indica que los triptófanos se encuentran en un ambiente hidrofóbico. La fluorescencia es sensible a la polaridad y a alteraciones del ambiente molecular. Usualmente la fluorescencia del Trp decae y se corre hacia el rojo cuando el triptófano se encuentra más expuesto a un ambiente acuoso, lo cual se observa cuando se sigue la desnaturalización. Sin embargo, el triptófano también puede sufrir un apagamiento (quenching) estando en estado nativo; para lo cual se han propuesto diferentes tipos de apagamiento producidos por: transferencia de energética, apagamiento por contacto de aminoácidos, apagamiento por colisión, etc. Con respecto a los resultados obtenidos y haciendo la comparación de los espectros de emisión de las tres proteínas, se observa que a pesar de que las tres TIM's tienen en su secuencia la misma cantidad de triptófanos, el máximo de intensidad de los datos sin normalizar presentan una distinguible diferencia. Esto se puede explicar por el fenómeno de apagamiento.

Al presentar los datos normalizados de cada proteína por la cantidad de triptófanos se observa el alineamiento de los espectros. Analizando las estructuras se encontró que dos de los tres triptófanos de BmeTIM se encuentran expuestos mientras que uno se encuentra enterrado; por otro lado en la estructura BtTIM dos están enterrados y solamente un triptófano es el que se encuentra expuesto al solvente. Con esto, podemos explicar de forma clara la diferencia de los espectros de fluorescencia obtenidos para las proteínas.

5.7.2 Dicroísmo circular

En los espectros de dicroísmo circular de las tres proteínas se observan dos mínimos aproximadamente a los 220 y 210 nm, mostrando la presencia de hélices α y hebras β en proteínas.

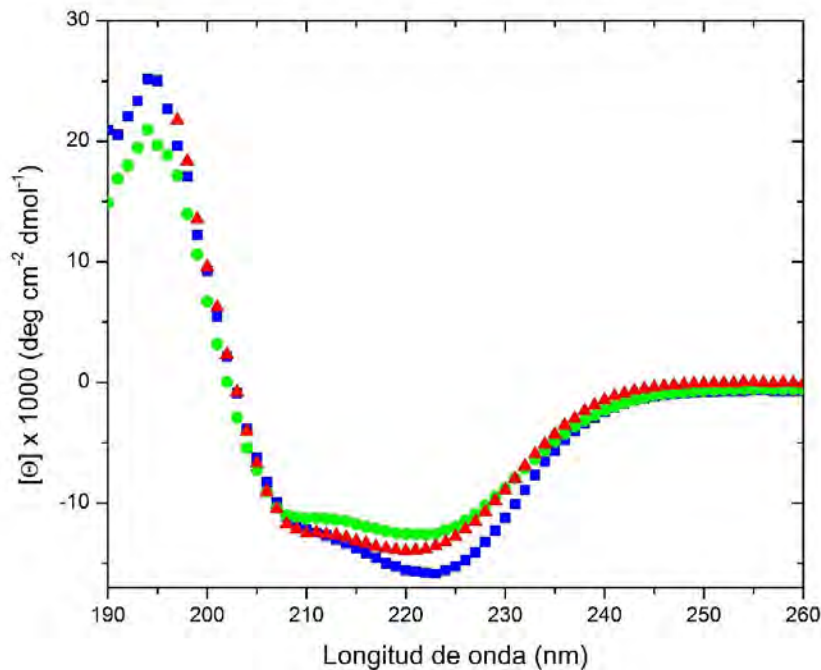


Figura 22. Espectro de dicroísmo circular nativo de las TIMs bacterianas tomado a una temperatura de 25°C en buffer NaH_2PO_4 pH 8.0 a una concentración de proteína de 0.4 mg mL^{-1} ; BmeTIM (--■--), BtTIM (--●--), GdTIM (--▲--).

En cuanto al dicroísmo circular podemos observar que las tres presentan la firma característica de un barril TIM, ya que poseen dos mínimos cercanos a 222 nm y 210 nm, y un máximo cerca de los 195 nm, lo que nos habla de la presencia de hélices alfa y hebras beta, en mayor o menor proporción debido a algunas variaciones que presentan las TIMs.

5.8 DETERMINACIÓN ESTADO OLIGOMÉRICO

Utilizando las curvas de calibración que se realizaron con las proteínas de peso conocido, se determinaron el radio de Stokes (R_s) y el peso molecular experimental de las proteínas.

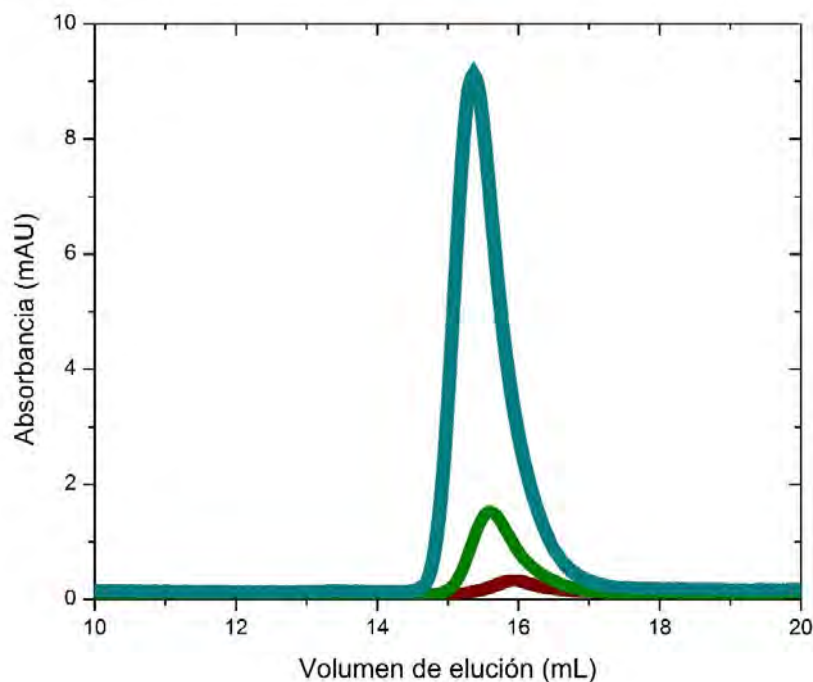


Figura 23. Cromatograma de elución de BmeTIM en una columna de exclusión molecular con una columna analítica Superdex 75 HR 70/30 (GE[®]) a tres diferentes concentraciones; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (■--), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (■--), y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (■--).

Tabla 8. Tabla con los datos obtenidos a partir de la interpolación de las curvas obtenidas con las proteínas de calibración.

TIM	Peso molecular teórico (monómero) (Da)	Volumen de elución (mL)	Radio de Stokes (Å)	Peso molecular experimental (Da)	Número de monómeros calculados
BmeTIM	26766	15.38	32.68	44192	2.22
BtTIM	26138	15.97	28.69	53041	1.70
GdTIM	28026	15.59	31.18	53291	2.00

Para la determinación del estado oligomérico se realizaron los ensayos de SEC por triplicado, a diferentes concentraciones de proteína. Las tres proteínas resultaron ser oligómeros, en específico dímeros, a pesar de que se encontraron algunas variaciones que pudieron derivarse de errores de mediciones.

5.9 DESPLEGAMIENTO TÉRMICO

El desplegamiento térmico se siguió por dos métodos, el primero, el Dicroísmo Circular, nos habla de los cambios en la estructura secundaria de la proteína y por tanto se puede obtener una comparación entre los porcentajes de hélices alfa y hojas beta que presenta la proteína. El segundo, la Calorimetría Diferencial de Barrido, determina el cambio de la capacidad calorífica de la proteína al pasar del estado nativo y al estado desnaturalizado. Además, también se puede obtener información sobre el porcentaje de replegamiento de la proteína comparando este cambio en la capacidad calorífica con el obtenido al realizar un segundo barrido.

5.9.1 Dicroísmo circular

Se tomaron espectros de dicroísmo (190-250 nm) en 3 puntos: teniendo a la proteína en estado nativo a 20 °C (N), la proteína en estado desplegado a 80°C (D), y la proteína replegada a 20°C (R). Todas las muestras medidas tenían una concentración de 0.4 mg/mL.

Siguiendo los cambios en la señal a 222 nm se observaron los procesos de desnaturalización y renaturalización de las tres proteínas (Imagen x,y,z).

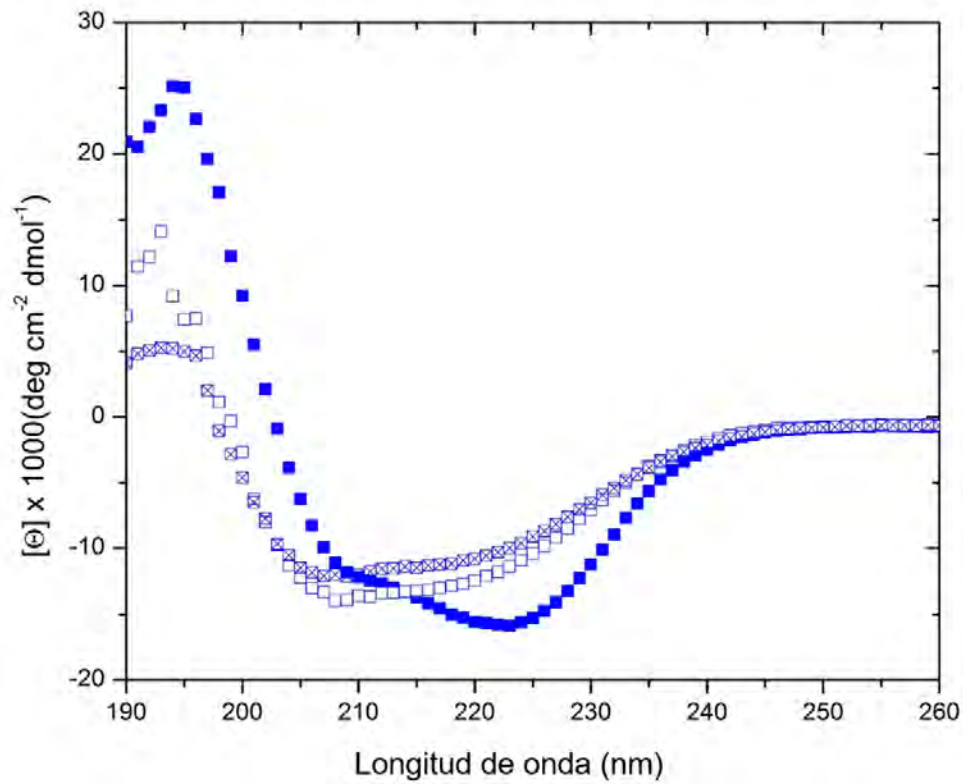


Figura 24. Espectro de Dicroísmo Circular comparativo de la proteína BmeTIM. Se muestra la proteína en estado nativo (—■—), en estado desnaturado (---□---), y renaturalizada (---⊗---)

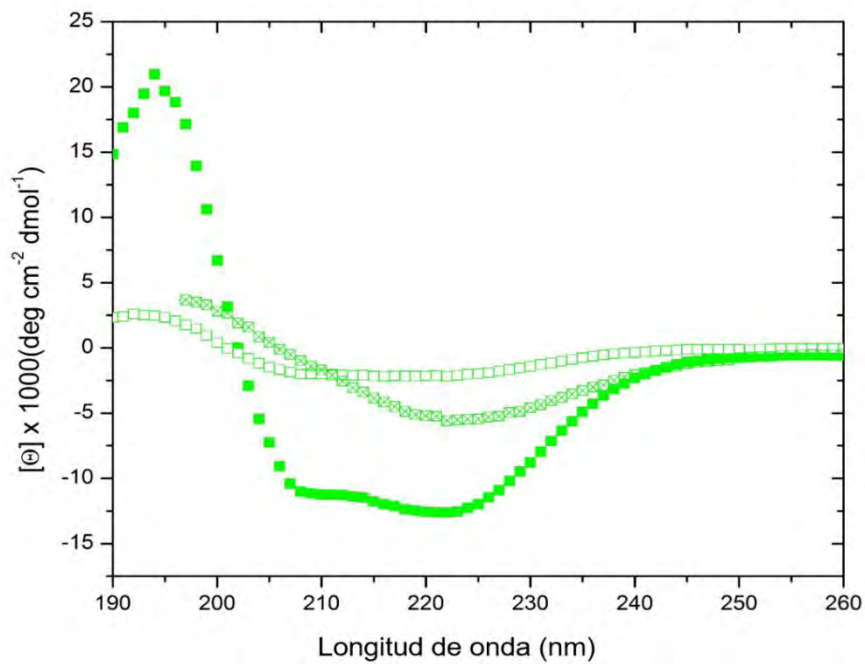


Figura 25. Espectro de Dicroísmo Circular comparativo de la proteína BtTIM. Se muestra el espectro de la proteína en estado nativo (—■—), en estado desnaturado (---□---), y renaturalizada (---⊗---).

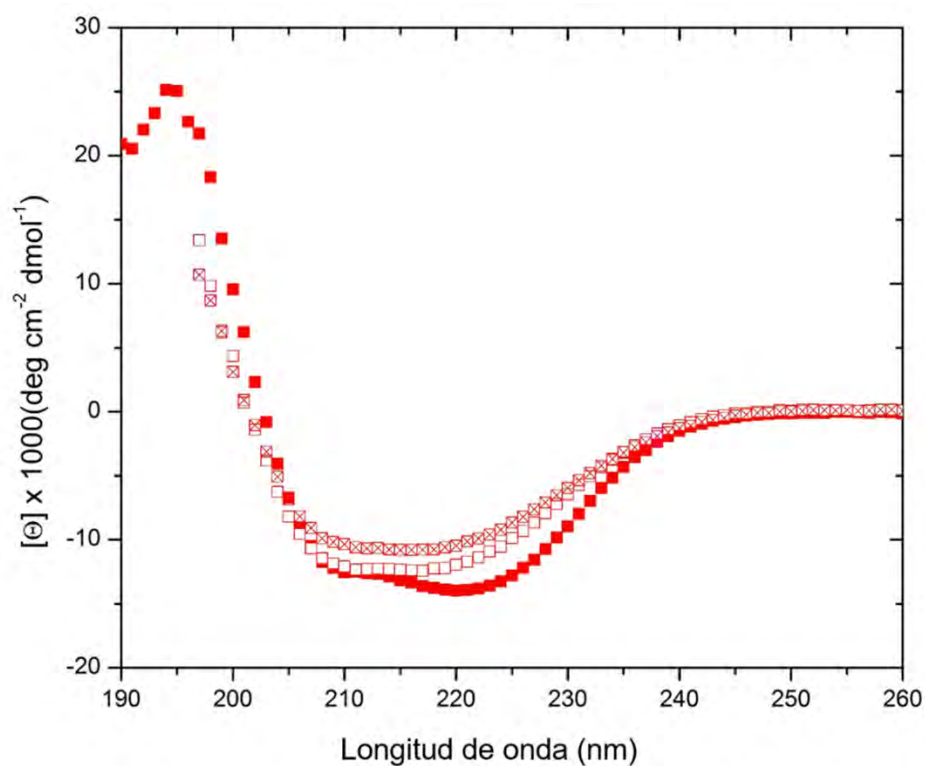


Figura 26. Espectro de Dicroísmo Circular comparativo de la proteína GdTIM. Se muestra el espectro de la proteína en estado nativo (—■—), en estado desnaturalizado (—□—), y renaturalizada (—⊠—).

Posteriormente, se determinó la desnaturalización térmica midiendo los cambios en la señal de DC a 222 nm. Sustituyendo los datos adquiridos se obtuvieron los valores de T_m de las tres proteínas (Tabla 9).

La rampa de temperatura se estableció de 20 a 80°C y viceversa a tres diferentes tasas de calentamiento (30, 90 y 180 K h⁻¹). Sin embargo al no observarse un corrimiento de la señales dependiente de la tasa de calentamiento, se muestran únicamente los termogramas de las tres proteínas obtenido a una tasa de 90 K h⁻¹ (Figura 27). °C

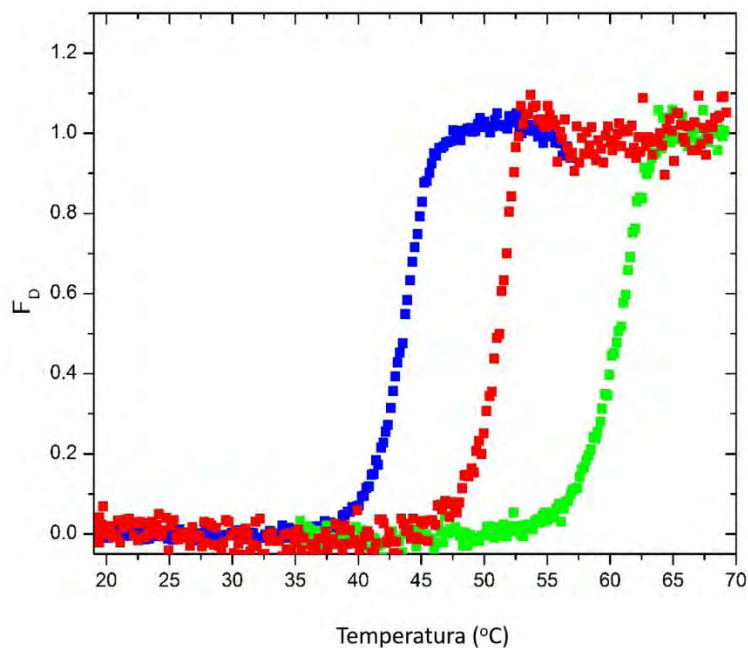


Figura 27. Termograma comparativo de las tres proteínas: BmeTIM (■--), BtTIM (■--), y GdTIM (■--), seguidos por DC. Se muestra la fracción desnaturalizada (F_D) contra la temperatura ($^{\circ}\text{C}$). El proceso se siguió a una velocidad de barrido de 90 K/hr. Los experimentos se realizaron en buffer NaH_2PO_4 pH 8.0 a una concentración de proteína de 0.4 mg mL^{-1}

Tabla 9. Temperaturas medias de desnaturalización obtenidas de la ecuación de Boltzman en los termogramas de los tres proteínas. Se muestran los valores a las tres diferentes velocidades de barrido y el factor de error para cada medición. Los tres experimentos se realizaron en NaH_2PO_4 pH 8.0 a una concentración de proteína de 0.4 mg mL^{-1}

Velocidad de barrido	BmeTIM	BtTIM	GdTIM
30 K hr^{-1}	43.1 ± 0.02	59.1 ± 0.03	50.7 ± 0.04
90 K hr^{-1}	43.4 ± 0.02	60.5 ± 0.03	50.8 ± 0.04
180 K hr^{-1}	43.5 ± 0.03	60.3 ± 0.06	50.5 ± 0.04

En la figura 24, referida a la comparación de los espectros de dicroísmo estado en los tres estados de BmeTIM, se observa un desplazamiento de los mínimos en estado desplegado y renaturalizado en comparación del nativo. Al comparar con el espectro de otra TIM en otros estudios, se ha observado una pérdida casi completa de la señal cuando se encuentra la proteína en estado desplegado, comportamiento diferente con BmeTIM donde se observan mínimos y máximos en el espectro. Este fenómeno nos habla de que el estado desplegado de BmeTIM, aún presenta estructura secundaria residual.

Al comparar los espectros desnaturalizado y renaturalizado de BmeTIM, se observan algunas diferencias. Por lo que se realizó la deconvolución de estos datos con el fin de ver una comparación en los porcentajes de estructuras secundarias que presentaban estos dos estados de la proteína. Con los porcentajes vemos algunas variaciones. Considerando esto, y los espectros obtenidos de BmeTIM en los

tres puntos del experimento, podemos sugerir que al calentar BmeTIM al calentarse no es capaz de desplegarse completamente, y al momento de bajar la temperatura mantiene esa estructura intermedia y ya no es capaz de adquirir completamente su estructura nativa.

Tabla 10. Valores de deconvolución de la proteína BmeTIM obtenidos de los experimentos de Dicroísmo Circular.

	Nativo	Renaturalizado
<i>Hélices</i>	40.1%	37.3%
<i>Hojas paralelas</i>	6.7%	7.2%
<i>Hojas antiparalelas</i>	7.3%	7.8%
<i>Vueltas beta</i>	15.7%	16.1%
<i>Aleatoria</i>	28.9%	30.6%

Esta información nos sugiere que el desplegamiento térmico BmeTIM es irreversible, para comprobarlo se realizó la prueba de desnaturalización utilizando la técnica de DSC.

5.9.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

La desnaturalización térmica seguida por medio de DSC, se realizó tomando en cuenta los parámetros obtenidos del Dicroísmo Circular, por lo que las muestras fueron calentadas 15 °C más arriba de la T_m aparente obtenida de los termogramas. A las tres enzimas se les realizó un segundo barrido (rescan) posterior al enfriamiento de la muestra para probar si el proceso de desplegamiento térmico es reversible.

En el caso de BmeTIM, se observó en el rescan una pequeña endoterma (Imagen x), por lo que se procedió a repetir el experimento con otra muestra de proteína, pero esta vez calentando la muestra sólo hasta la temperatura donde termina la endoterma (322.60 K) en vez de los 331.58 K utilizados en el experimento anterior.

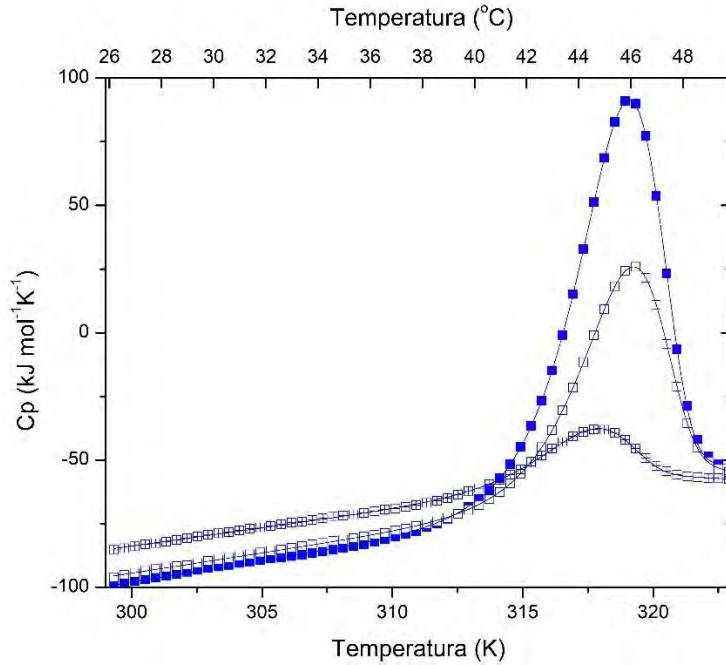


Figura 28. Endotermas comparativas de BmeTIM. En la gráfica se hace la comparación de las tres endotermas: el primer scan (-- ■ --), el rescán realizado calentando la muestra 15 grados más de su T_m app calculada (T_m app = 43.43°C) (-- ☒ --); y el rescán realizado hasta la temperatura en la que la curva de la endoterma acaba (-- □ --). La línea sólida presentada en todas las gráficas corresponde al ajuste a dos estados.

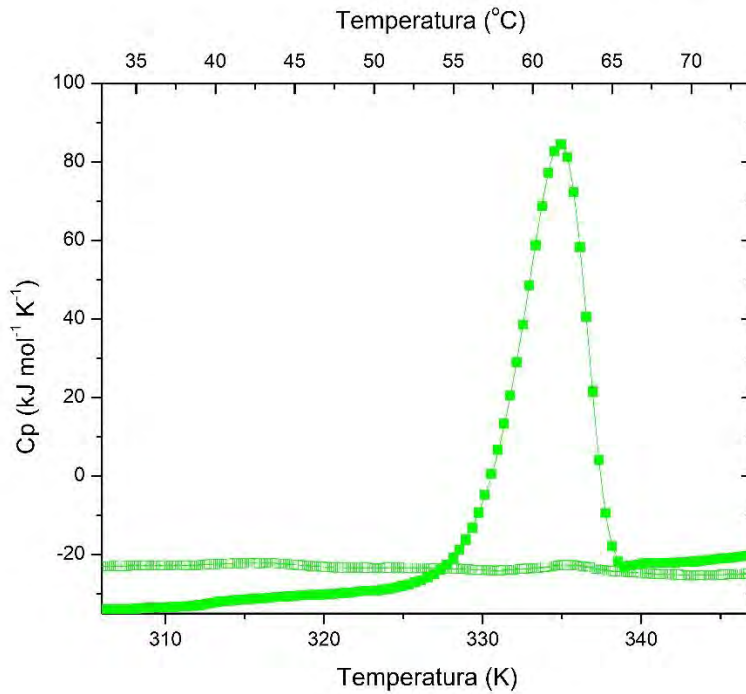


Figura 29. Endoterma comparativa de BtTIM. Se observa la endoterma obtenida del primer scan (-- ■ --); y los datos obtenidos del rescán de la muestra calentada 15°C más alta que la T_m app de la enzima (-- ☒ --). La línea sólida presentada en todas las gráficas corresponde al ajuste a dos estados irreversible.

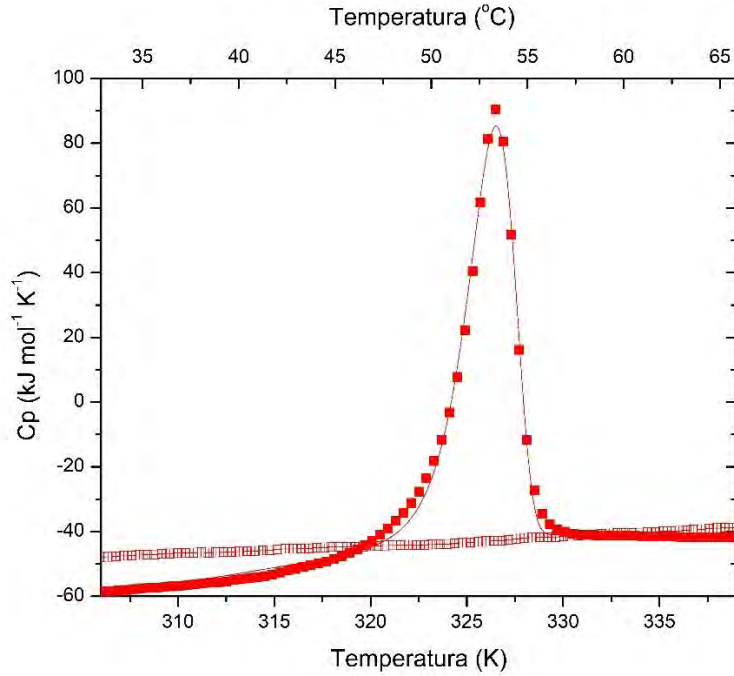


Figura 30. Endoterma comparativa de GdTIM. Se observa la endoterma obtenida del primer scan (---■---); y los datos obtenidos del rescán de la muestra calentada 15°C más alta que la T_m app de la enzima (---⊠---). La línea sólida presentada en todas las gráficas corresponde al ajuste a dos estados irreversible.

Como se mencionó anteriormente, los experimentos se realizaron a diferentes velocidades de barrido (30, 60, 90, 120 y 180 K hr⁻¹) para las tres enzimas y se graficaron las endotermas obtenidas para cada una de las mediciones. Con esto se analizó la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido.

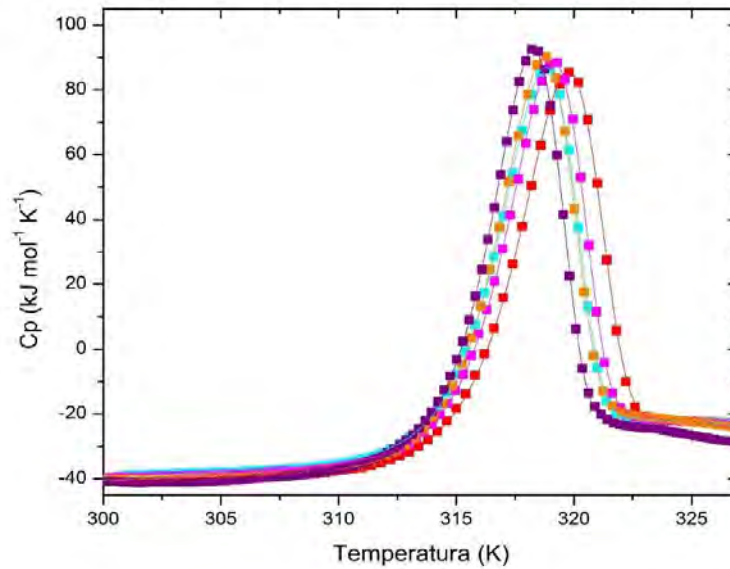


Figura 31. Trazas calorimétricas de BmeTIM a 5 velocidades de barrido diferentes; 30 (---■---), 60 (---■---), 90 (---■---), 120 (---■---) y 180 (---■---) K hr⁻¹ ajustadas a un modelo de dos estados.

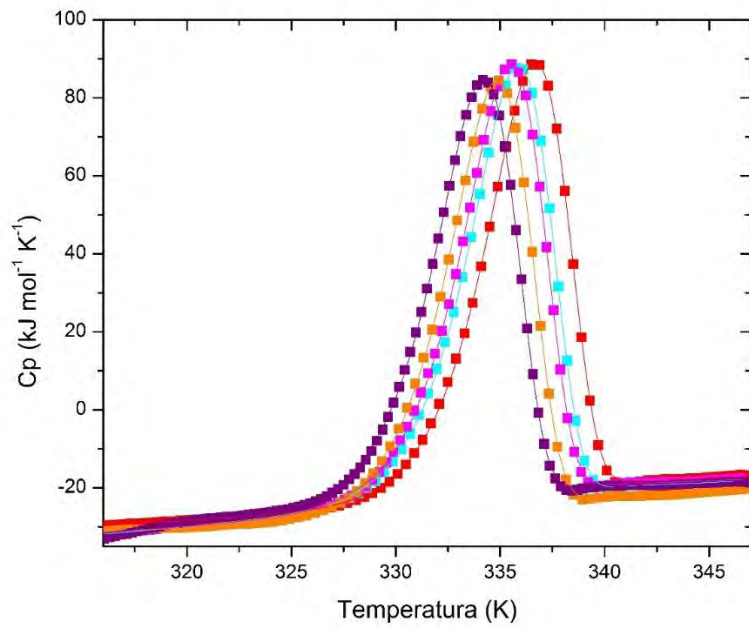


Figura 32. Trazas calorimétricas de BmeTIM a 5 velocidades de barrido diferentes; 30 (—■—), 60 (—■—), 90 (—■—), 120 (—■—) y 180 (—■—) $K\ hr^{-1}$ ajustadas a un modelo de dos estados.

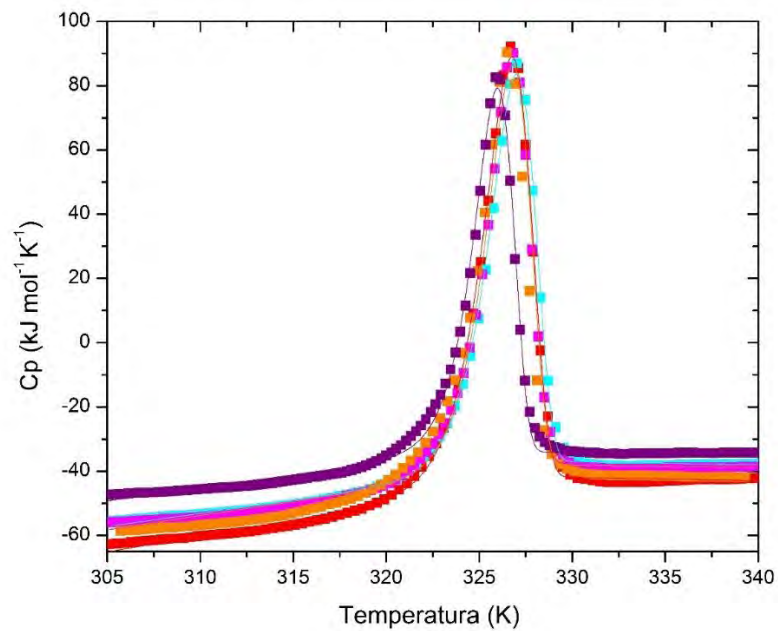


Figura 33. Trazas calorimétricas de BmeTIM a 5 velocidades de barrido diferentes; 30 (—■—), 60 (—■—), 90 (—■—), 120 (—■—) y 180 (—■—) $K\ hr^{-1}$ ajustadas a un modelo de dos estados.

Utilizando estos datos se procedió a calcular la E_a del estado nativo al desnaturalizado por medio dos métodos: el gráfico de Arrhenius ($\ln k$ vs $1/T$) y el promedio de las trazas a diferentes velocidades de barrido. La comparación de los valores de E_a se muestra en la tabla X. .

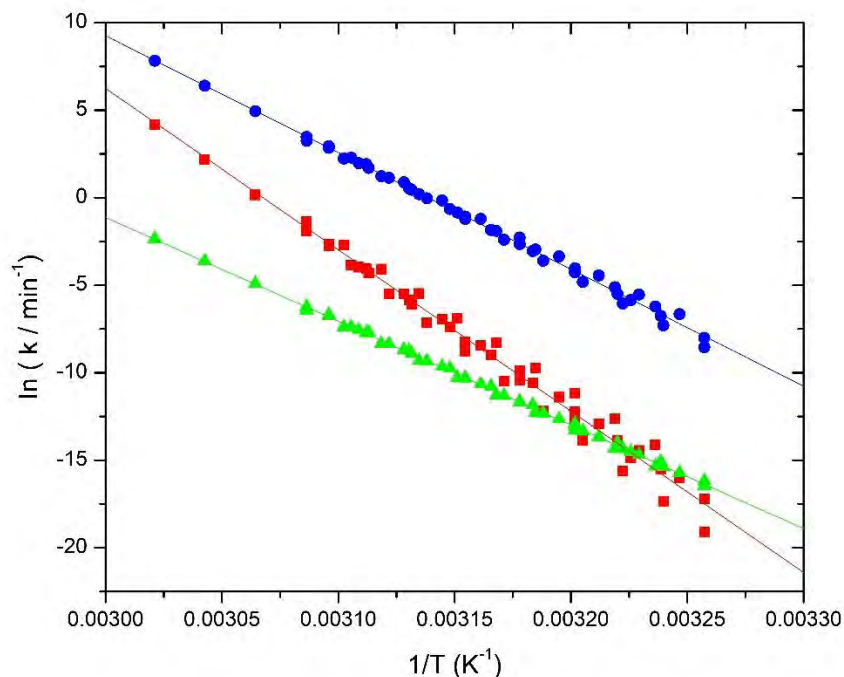


Figura 34. Gráfico de Arrhenius de BmeTIM (—■—), BtTIM (—●—) y GdTm (—▲—).

Tabla 11. Valores de DH , T_m y E_a calculados a partir de los datos obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido.

	BmeTIM	BtTIM	GdTm
DH (KJ/mol)	468 ±4.816	563 ±4.031	477 ±9.833
T_m (°C)	44.85 ±0.019	58.85 ±0.015	52.85 ±0.001
E_a (KJ/mol)	554.6	492.5	766.6

En la segunda repetición de BmeTIM se encontró un aumento en el área bajo la curva de la endoterma del rescán (Imagen x). Lo cual indica que esta transición es parcialmente reversible. Mientras que para BtTIM y GdTm, no se observó ninguna endoterma en el “rescán”, lo cual indica que ambas transiciones son irreversibles.

En la repetición de BmeTIM, el pico del segundo ciclo es mucho mayor, lo que nos sugiere un aumento en la reversibilidad de la muestra. A altas temperaturas se pueden generar cambios químicos en los aminoácidos de una proteína, lo cual puede provocar el mal replegamiento de la misma o la agregación (Benítez-Cardoza, Rojo-Domínguez, and Hernández-Arana 2001), sin embargo, la T_m de BmeTIM no es muy elevada esto resulta poco probable ya que para que los aminoácidos sufran alguna modificación

química se necesitan temperaturas arriba de los 200 °C (Weiss et al. 2018). Una resolución más factible apoyada en los espectros de dicroísmo, sugiere que la proteína no se despliega completamente, es decir que aún presenta estructura secundaria, un porcentaje de ello puede desplegarse, pero el resto puede permanecer inalterado, y al momento de bajar la temperatura este porcentaje de estructura secundaria que presentó un cambio, no retoma su orden original causando los desplazamientos en los mínimos de la proteína y la disminución en su capacidad calorífica, tal y como se observa en la figura X.

En el estudio realizado por Romero et al., 2015, se encontró por primera vez la presencia de reversibilidad en TIM's bacterianas, característica única en este dominio hasta el momento, ya que en el caso de los Eucariontes, donde se han realizado la mayoría de los estudios de la TIM, se ha encontrado que su desplegamiento es irreversible. Se ha propuesto en el trabajo que la reversibilidad puede estar asociada con un bajo punto isoeléctrico, la ausencia de estructura residual en el desplegamiento térmico, una Tm baja, un volumen de cavidades reducida, y baja estabilidad conformacional (Romero-Romero et al. 2015). Algunos de estos puntos fueron considerados para la selección de las especies de este trabajo. De entre las características mencionadas se hace una comparación con la información obtenida con BmeTIM en la siguiente tabla.

Tabla 12 Datos comparativos de tres TIM's bacterianas reportadas como reversibles, BmeTIM, y la TIM de Escherichia coli reportada como irreversible.

Característica	DrTIM	ScTIM	CpTIM	BmeTIM	EcTIM
<i>Punto isoeléctrico</i>	4.9	5.2	5.0	5.5	5.6
<i>Ausencia de estructura residual durante desplegamiento térmico.</i>	Si	Si	Si	No	-
<i>Bajo volumen de cavidades (Å³)</i>	2134	2921	2241	3493	4667
<i>Tm (C°)</i>	44.6	45.3	58.3	43.4	54.0

Si bien BmeTIM presenta algunas características de las características sugeridas que favorecen la reversibilidad, el volumen de las cavidades y la ausencia de estructura residual no son cumplidas y solamente presenta lo que parece ser una reversibilidad de tipo parcial. Deben ser considerados otros factores que pueden intervenir en la reversibilidad de una proteína como el tiempo de purificación, en este caso la proteína en cuestión presentaba un periodo de 3 semanas en almacenamiento al momento de realizar los experimentos, por lo que se debe considerar esto como una variable que afecte la capacidad de reversibilidad. También se debe a considerar de que el factor de haber calentado la proteína a una temperatura más cercana al pico que se observa en la endoterma de la proteína, ya que al calentarse a una menor temperatura se puede juzgar que la proteína no se despliega completamente, sino simplemente tiene una desnaturalización parcial, con lo que se observaría una falsa renaturalización. Este aspecto se podría explorar de manera más profunda aplicando este mismo factor a las otras dos proteínas, es decir, calentando BtTIM y GdTIM hasta la temperatura en donde se observa su pico en la endoterma y observar si hay un tipo de reversibilidad. En caso de encontrarlo podríamos suponer lo que se mencionó

de una desnaturalización parcial; mientras en caso de que aun así no se encuentre ninguna señal al hacer el rescán, podríamos entonces realmente sugerir que BmeTIM presenta un caso genuino de reversibilidad parcial

Teniendo esta reversibilidad parcial de BmeTIM, se realizó el ajuste de la endoterma a un modelo de dos estados con el fin de obtener un ΔC_p . Con estos datos se procedió a la crear la curva de estabilidad de la proteína y se comparó con las curvas de estabilidad de las proteínas reversibles reportadas por Romero et al. cómo se muestra en la siguiente figura.

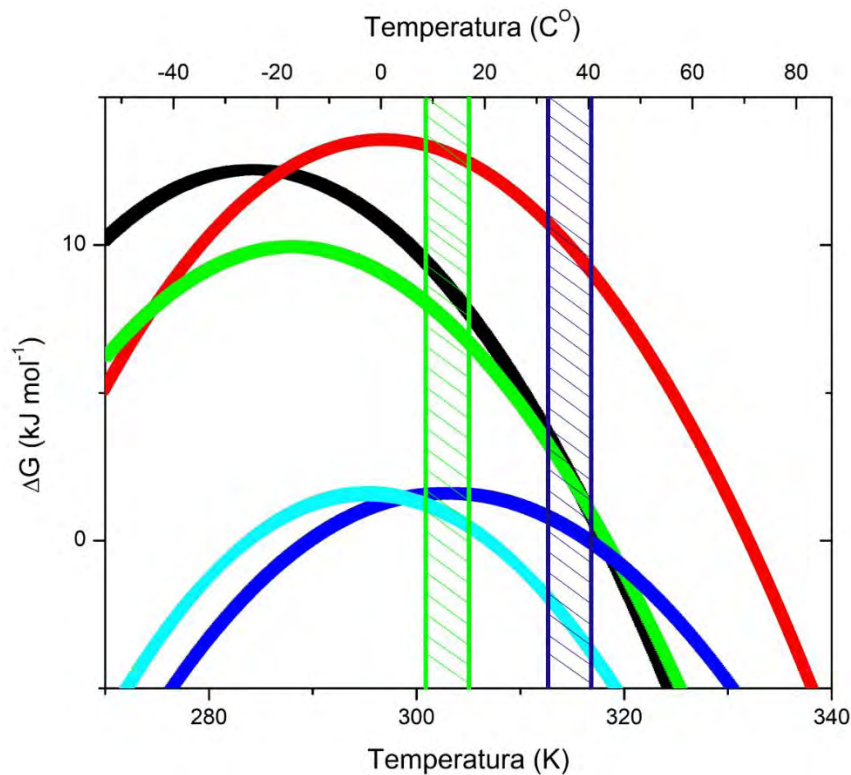


Figura 35. Curvas de estabilidad comparativa de TIM's bacterianas. *Clostridium perfringens* (—■—), *Deinococcus radiodurans* (—■—), *Streptomyces coelicolor* (—■—), *Moritella marítima* (—■—), y *Brucella melitensis* (—■—). Se muestran como barras la temperatura óptima de crecimiento de *Brucella melitensis* y *Streptomyces coelicolor*.

BmeTIM muestra un valor de DH menor que el de las proteínas reversibles, en este caso, es más parecido a los valores obtenidos para *Moritella marítima*. También es de apreciar que su rango de estabilidad es menor. En las barras se muestra la temperatura óptima de crecimiento de BmeTIM y de SctIM, lo cual nos indica que los valores de la temperatura óptima de los organismos parecieran siempre encontrarse a temperaturas mayores al máximo de la curva de estabilidad de las proteínas.

Desde una perspectiva evolutiva Keeling & Doolittle, 1997 proponen por medio de análisis filogenético que la TIM de los organismos Eucariontes está cercanamente relacionado con la TIM de las α -proteobacteria. Con los resultados del presente estudio se puede sugerir que en caso de ser correcta esta relación entre los organismos, esto podría explicar cómo BmeTIM puede ser un paso intermedio entre la TIM de los organismos eucariontes y las bacterias, ya que con los datos que se tienen hasta ahora parece ser que los representantes del dominio eucarionte poseen TIM irreversibles, mientras que algunos grupos de bacterias tiene una TIM totalmente reversible.

5.10 DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA

5.10.1 Urea

El primer paso fue la obtención del tiempo de equilibrio inició incubando las enzimas con diferentes concentraciones de urea por un periodo mínimo de 24 horas. Se realizaron mediciones a 222 nm realizadas cada 24 horas con el fin de observar si se presentaban cambios, en ausencia de estos, se asume que la proteína ha llegado a su tiempo de equilibrio.

Como caso particular, BtTIM no mostró cambios espectroscópicos evidentes después de incubar por 24 horas, por lo que el tiempo de incubación aumentó a 72 horas.

Una vez obtenido el tiempo de equilibrio, los datos se ajustaron a la ecuación de Boltzmann con el fin de calcular la CM para cada caso particular (Tabla X). A la par de esto, se compararon los espectros de DC de las enzimas nativas (sin urea), desnaturalizadas (8 M urea) y renaturalizadas (desnaturalizadas en 8 M urea y posteriormente renaturalizadas en 0.5 M urea); con el fin de compararlos y determinar si se presentaban casos de reversibilidad.

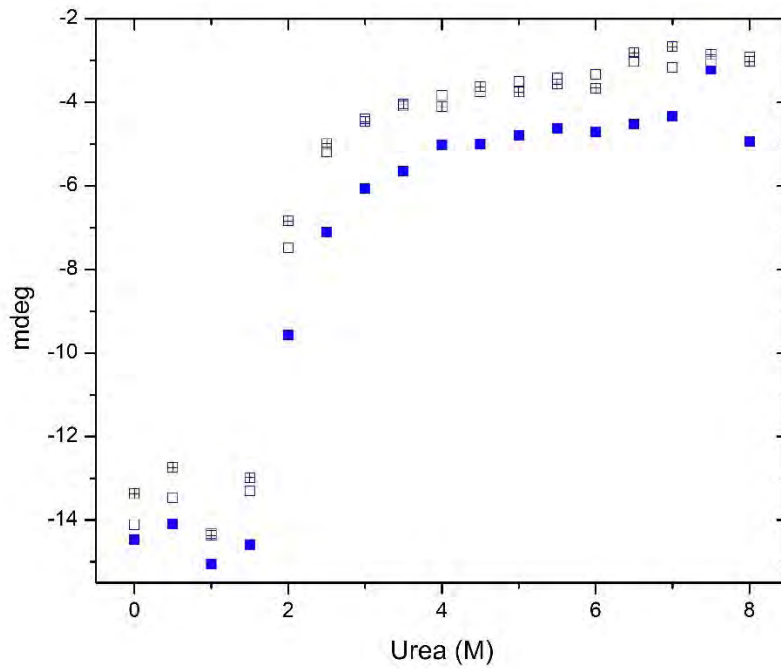


Figura36. Determinación del tiempo de equilibrio para BmeTIM. Se muestra el espectro a las 24 horas (—■—), a las 48 horas (—□—), y a las 72 horas (—⊠—).

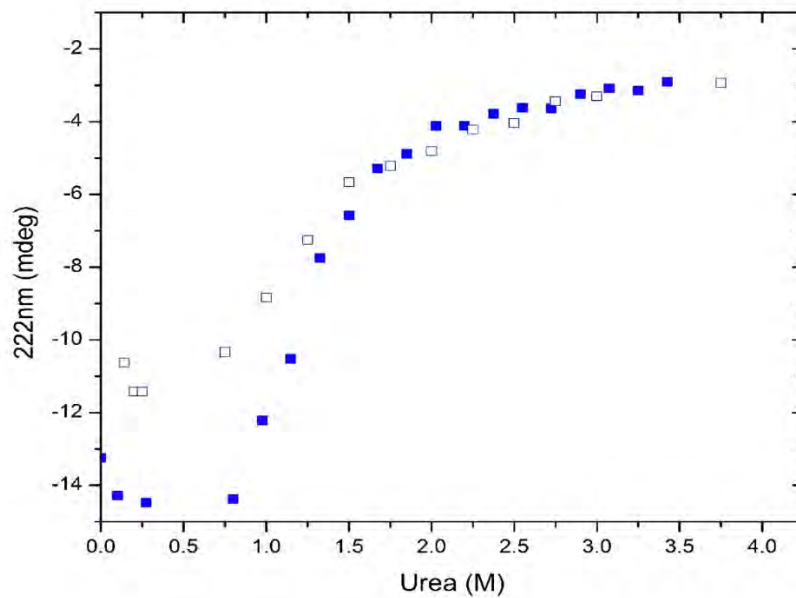


Figura 37. Prueba de reversibilidad de BmeTIM después de haber sido desnaturada con urea al 8 M y renaturalizada hasta una concentración de 0.5 M. Se observa el espectro de desnaturación de BmeTIM N – U (—■—) y de renaturalización U – N (—□—).

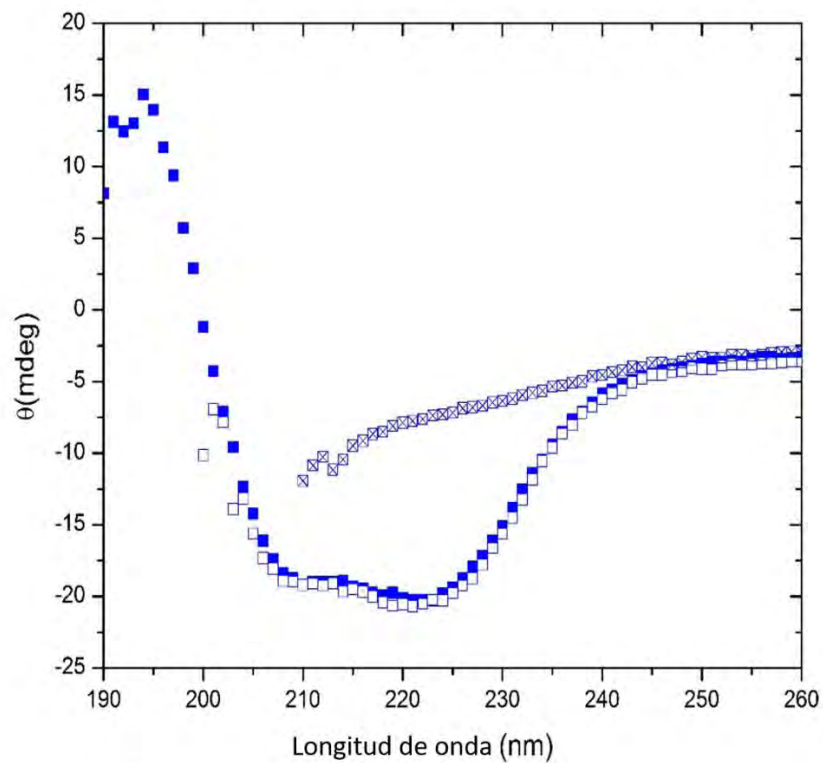


Figura 38. Se muestran los espectros de DC comparativos obtenidos de las diferentes etapas de la proteína. Se muestra el DC de la proteína nativa (—■—), el DC obtenido cuando la muestra se encuentra desplegada con 8 M de Urea (—⊗—), y el espectro de DC de la proteína renaturalizada (—□—).

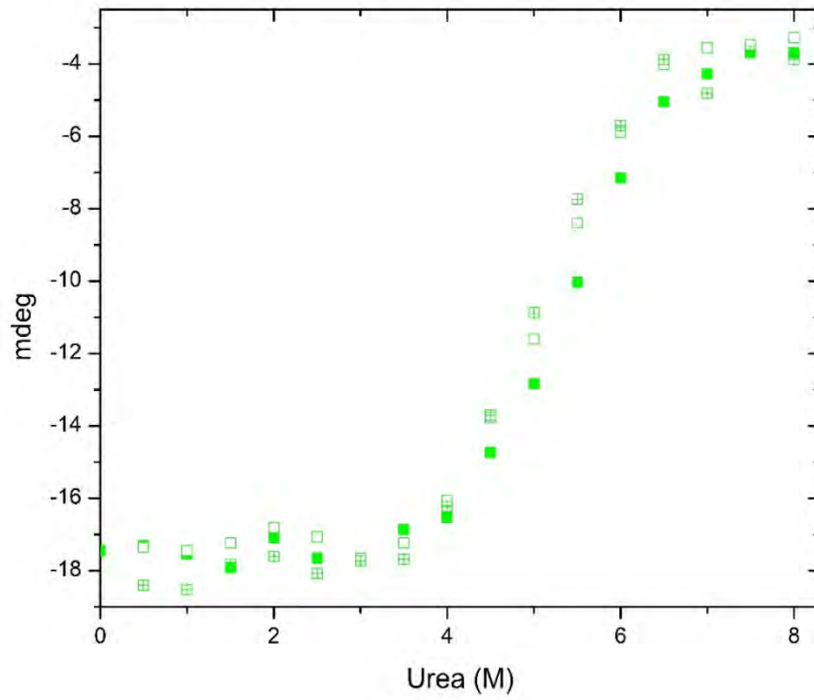


Figura 39. Determinación del tiempo de equilibrio para BtTIM. Se muestra el espectro a las 24 horas (—■—), a las 48 horas (—□—), y a las 72 horas (—⊗—).

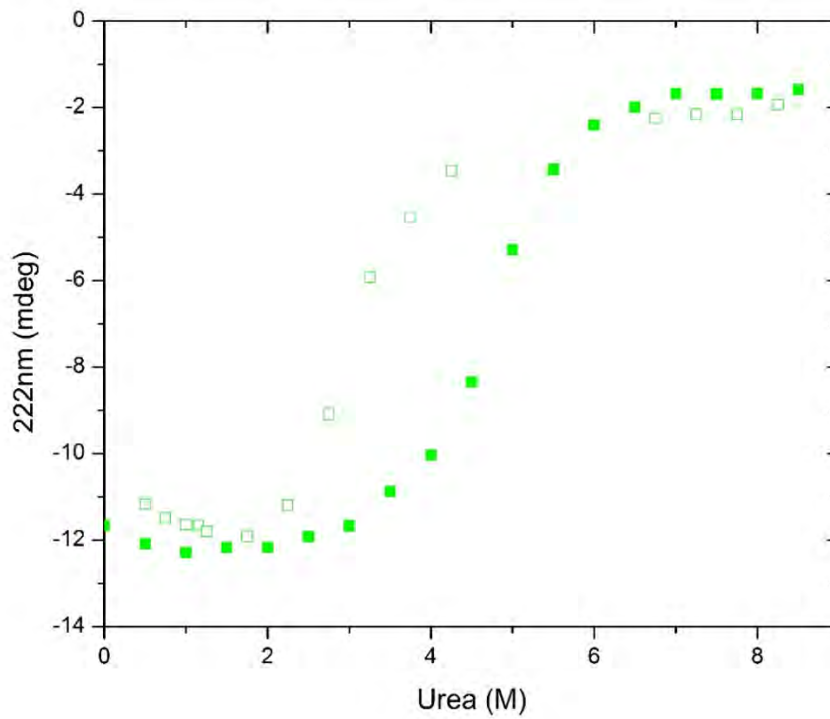


Figura 40. Prueba de reversibilidad de BtTIM después de haber sido desnaturada con urea al 8 M y renaturalizada hasta una concentración de 0.5 M. Se observa el espectro de desnaturación de BmeTIM N – U (—■—) y de renaturalización U – N (—□—).

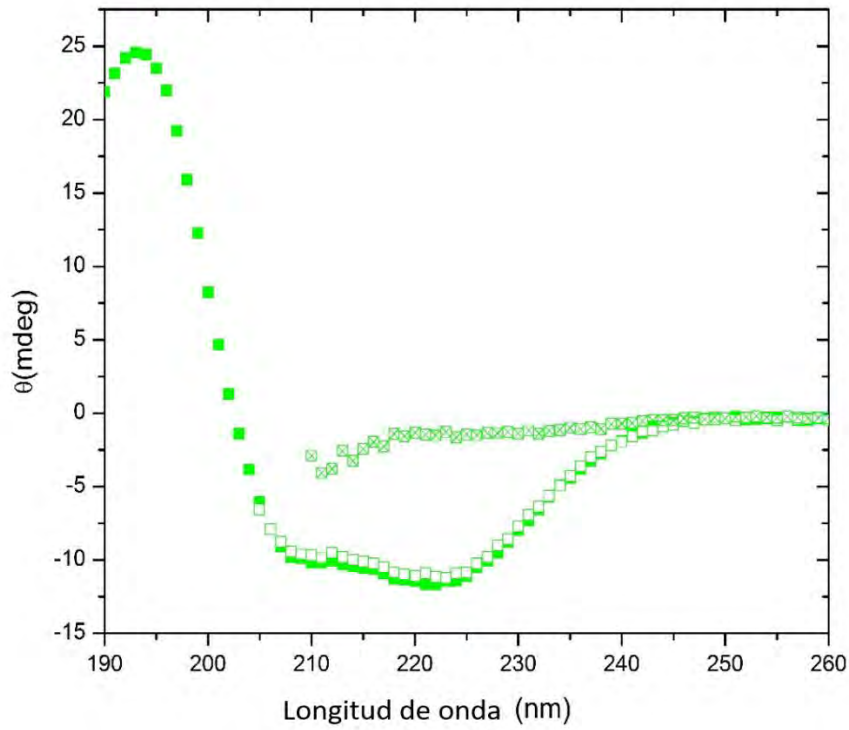


Figura 41. Se muestran los espectros de DC comparativos obtenidos de las diferentes etapas de la proteína. Se muestra el DC de la proteína nativa (--■--), el DC obtenido cuando la muestra se encuentra desplegada con 8 M de Urea (--⊠--), y el espectro de DC de la proteína renaturalizada (--□--).

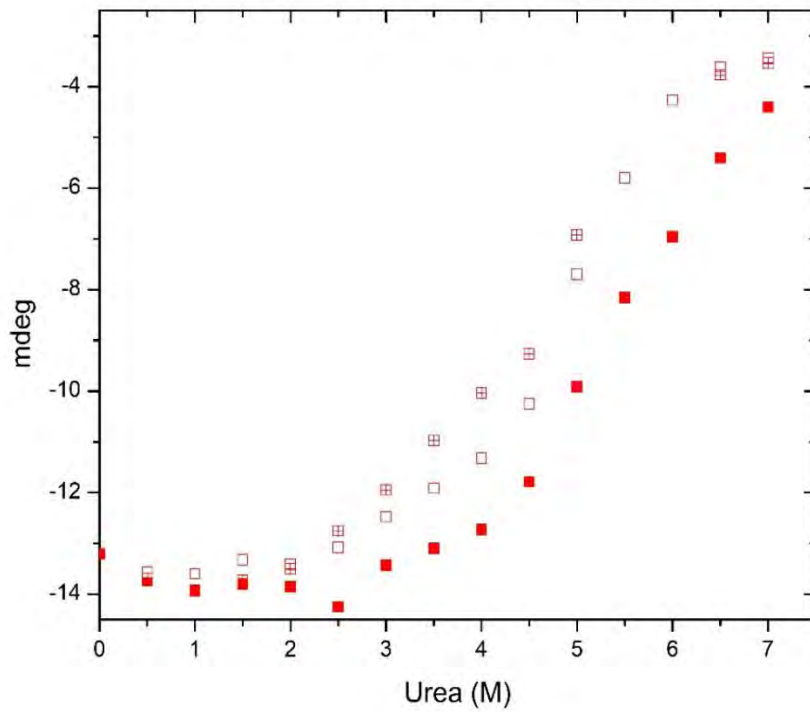


Figura 42. Imagen X. Determinación del tiempo de equilibrio para GdTIM. Se muestra el espectro a las 24 horas (--■--), a las 48 horas (--□--), y a las 72 horas (--⊠--).

Tabla 13. Valores de la CM calculados para las tres proteínas. Estos valores fueron obtenidos mediante el ajuste de la ecuación de Boltzman a partir de los datos obtenidos de los tiempos de equilibrio de cada una de ellas.

	CM (M)
<i>BmeTIM</i>	1.89
<i>BtTIM</i>	4.97
<i>GdTIM</i>	4.67

En general, la desnaturalización química con un agente como la urea, se utiliza principalmente para evaluar la estabilidad de las proteínas, los efectos de las mutaciones sobre las proteínas y el desplegamiento de estas (Bennion and Daggett 2003). En este caso los resultados nos muestra que *BmeTIM* es la más susceptible de las proteínas estudiadas a la urea, ya que con solamente 2 M de Urea, la proteína comienza a perder su estructura secundaria; a diferencia de *BtTIM* y *GdTIM*, que en este caso son bastante resistentes ante la exposición con agentes caotrópicos a altas molaridades y en tiempos prolongados.

Además de analizar los tiempos de equilibrio con urea, se realizaron pruebas de reversibilidad con la urea, los cuales se siguieron por medio de los espectros de dicroísmo circular en estado nativo, desnaturalizado, y renaturalizado. Tanto *BmeTIM* y *BtTIM* muestran un espectro completamente desnaturalizado con la urea, y una recuperación total del espectro después de haber renaturalizado la muestra. Sin embargo, se observa en las gráficas obtenidas que estas dos proteínas presentan un fenómeno de histéresis en el proceso de renaturalización. Con el fin de comprobar el porcentaje de renaturalización se probaron las actividades de las muestras, donde, *BmeTIM* presentó la recuperación de un 70% de la actividad en comparación de la actividad de la proteína en estado nativo, y *BtTIM* no presentó ninguna muestra de actividad residual.

El objetivo de este trabajo era realizar la exploración del espacio secuencia de la TIM dentro del dominio Bacteria, ya que como se mencionó antes, la diversidad de organismos dentro de esto dominio es muy elevado. A lo largo de este trabajo se encontraron diferencias entre las tres proteínas que bajo un foco pueden resultar significativas, y que bajo otra perspectiva solamente suman un rango de diferencias que terminan cayendo dentro de la definición de lo que es una triosafosfato isomerasa. Esta proteína, como ya se ha mencionado varias veces, se encuentra presente en casi la mayoría de los organismos, sin embargo, en esta variedad recae la función vital que tiene dentro de uno de los ciclos energéticos más relevantes de la vida; por lo que esta proteína como era ya bien conocido, puede tener una gran variabilidad en cuanto a su secuencia, pero su función se encuentra inalterada al igual que muchas características.

En el presente trabajo se determinó la postura de encontrar no variaciones extraordinarias de la TIM, sino encontrar un conjunto de pequeñas particularidades que definiera a cada proteína, pues como muestran los resultados, las tres proteínas trabajadas realizan la misma función, pero cada una presenta particularidades que presentan una aportación para la extensa dilucidación de conocimiento que aún no se conoce sobre la TIM y en general sobre la maquinaria que rige a las proteínas.

6 CONCLUSIONES

1. BmeTIM, BtTIM y GdTIM fueron sobreexpresadas y purificadas de manera exitosa.
2. La eficiencia catalítica de las tres proteínas es similar a la eficiencia reportada para otras TIM.
3. En el estudio de fluorescencia intrínseca se pudo comprobar que las proteínas se presentaban plegadas, ya que los triptófanos se encontraban en un ambiente hidrofóbico.
4. Se corroboró que las TIM purificadas se presentaban en forma de dímero.
5. Los resultados obtenidos del desplegamiento térmico de BmeTIM, seguido por Dicroísmo Circular mostraron la presencia de estructuras residuales en su forma desnaturalizada, y en la renaturalizada, por lo que se propone esta enzima presenta algún tipo de cambio conformacional. Para BtTIM, se obtuvo una pérdida total de la estructura secundaria y no hubo un replegamiento de la proteína después de enfriarse. Mientras que para GdTIM, se obtuvo un cambio mínimo con respecto a los espectros de Dicroísmo para los tres casos, aun estando a temperatura de desnaturalización se encontró poco cambio en los espectros.
6. En la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido tanto GdTIM y BtTIM no presentaron reversibilidad.
7. BmeTIM presentó un aumento parcial en la reversibilidad en el proceso de desnaturalización térmica al realizar el calentamiento de la proteína a una temperatura más baja teniendo como punto de consideración su T_m .
8. BmeTIM comparte algunas de las características que parecen determinar la reversibilidad de las TIM ante un proceso de desnaturalización térmica, lo cual puede explicar que solamente presente una reversibilidad de tipo parcial.
9. BtTIM resulta ser la proteína más termoestable, mientras que BmeTIM es la que presenta menos estabilidad.
10. El desplegamiento con agentes químicos muestra que BmeTIM es más susceptible a la desnaturalización que las otras dos proteínas, por lo que su estabilidad global puede ser también más baja.

7 PERSPECTIVAS

- Obtener la estructura cristalográfica de la proteína GdTIM.
- Explorar el aumento de la reversibilidad con respecto a su T_m .
- Medir actividad residual de BmeTIM posterior al calentamiento para probar un restablecimiento de la función catalítica.
- Realizar experimentos con reversibilidad con proteína fresca.
- Realizar experimentos de DSC a BtTIM y GdTIM calentando hasta su T_m para comprobar si se muestra una reversibilidad parcial como en el caso de BmeTIM.
- Caracterizar más representantes del dominio bacteria con el fin de seguir explorando posibles variaciones en el comportamiento de la TIM.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Akob, Denise M., Heath J. Mills, and Joel E. Kostka. 2007. "Metabolically Active Microbial Communities in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments." *FEMS Microbiology Ecology* 59 (1): 95–107.
- Baptiste, Eric, Maureen A O'Malley, Robert G Beiko, Marc Ereshefsky, J Peter Gogarten, Laura Franklin-Hall, François-Joseph Lapointe, et al. 2009. "Prokaryotic Evolution and the Tree of Life Are Two Different Things." *Biology Direct* 4 (1): 34.
- Benítez-Cardoza, C. G., A. Rojo-Domínguez, and A. Hernández-Arana. 2001. "Temperature-Induced Denaturation and Renaturation of Triosephosphate Isomerase from *Saccharomyces Cerevisiae*: Evidence of Dimerization Coupled to Refolding of the Thermally Unfolded Protein." *Biochemistry* 40 (30): 9049–58.
- Bennion, Brian J, and Valerie Daggett. 2003. "The Molecular Basis for the Chemical Denaturation of Proteins by Urea." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5142–47.
- Blacklow, Stephen C., Ronald T. Raines, Wendell a. Lim, Philip D. Zamore, and Jeremy R. Knowles. 1988. "Triosephosphate Isomerase Catalysis Is Diffusion Controlled. Appendix: Analysis of Triose Phosphate Equilibria in Aqueous Solution by ³¹P NMR." *Biochemistry* 27 (4): 1158–67.
- Brett, Paul J, David Deshazer, and Donald E Woods. 1998. "Burkholderia Pseudomallei- I i Ke Species." *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (1 998): 317–20.
- Cavaliere-Smith, T. 2002. "The Neomuran Origin of Archaeobacteria, the Negibacterial Root of the Universal Tree and Bacterial Megaclassification." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (1): 7–76.
- Cavaliere-Smith, Thomas. 2006a. "Cell Evolution and Earth History: Stasis and Revolution." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361 (1470): 969–1006.
- . 2006b. "Rooting the Tree of Life by Transition Analyses." *Biology Direct* 1 (1): 19.
- . 2010. "Deep Phylogeny, Ancestral Groups and the Four Ages of Life." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 (1537): 111–32.
- Chothia, C, and A M Lesk. 1986. "The Relation between the Divergence of Sequence and Structure in Proteins." *The EMBO Journal* 5 (4): 823–26.
- Ciccarelli, Francesca D., Tobias Doerks, Christian von Mering, Christopher J. Creevey, Berend Snel, and Peer Bork. 2006. "Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life Francesca." *Science* 311 (March): 1283–88.
- Dagan, Tal, Mayo Roettger, David Bryant, and William Martin. 2010. "Genome Networks Root the Tree of Life between Prokaryotic Domains." *Genome Biology and Evolution* 2 (1): 379–92.
- Dill, Ken A., S. Banu Ozkan, M. Scott Shell, and Thomas R. Weikl. 2008. "The Protein Folding Problem." *Annual Review of Biophysics* 37: 289–316.
- Duy, Cihangir, and Jörg Fitter. 2005. "Thermostability of Irreversible Unfolding ??-Amylases Analyzed by

- Unfolding Kinetics." *Journal of Biological Chemistry* 280 (45): 37360–65.
- Gasteiger, E, C Hoogland, a Gattiker, Ss Duvaud, Mr Wilkins, Rd Appel, and As Bairoch. 2005. "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server." *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607.
- Gómez-Puyou, a, E Saavedra-Lira, I Becker, R a Zubillaga, a Rojo-Domínguez, and R Pérez-Montfort. 1995. "Using Evolutionary Changes to Achieve Species-Specific Inhibition of Enzyme Action--Studies with Triosephosphate Isomerase." *Chemistry & Biology* 2: 847–55.
- Grant, Alastair, David Lee, and Christine Orengo. 2004. "Progress towards Mapping the Universe of Protein Folds." *Genome Biology* 5: 107.
- Greenfield, Norma J. 2007. "Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure." *Nature Protocols* 1 (6): 2876–90.
- Höcker, Birte, Catharina Jürgens, Matthias Wilmanns, and Reinhard Sterner. 2001. "Stability, Catalytic Versatility and Evolution of the (B α)₈-Barrel Fold." *Current Opinion in Biotechnology* 12 (4): 376–81.
- Karplus, M. 1997. "The Levinthal Paradox: Yesterday and Today." *Folding & Design* 2 (4): S69–75.
- Keeling, Patrick J, and W Ford Doolittle. 1997. "Evidence That Eukaryotic Triosephosphate Isomerase Is of Alpha-Proteobacterial Origin." *Evolution* 94: 1270–75.
- Knowles, Jeremy R, and W John Albery. 1977. "Perfection in Enzyme Catalysis: The Energetics of Triosephosphate Isomerase." *Acc. Chem. Res.* 10 (4): 105–11.
- Kunin, Victor, Leon Goldovsky, Nikos Darzentas, and Christos A. Ouzounis. 2005. "The Net of Life: Reconstructing the Microbial Phylogenetic Network." *Genome Research* 15 (7): 954–59.
- Lake, J. A., R. G. Skophammer, C. W. Herbold, and J. A. Servin. 2009. "Genome Beginnings: Rooting the Tree of Life." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1527): 2177–85.
- Liu, Shu-qun, Xing-lai Ji, Yan Tao, De-yong Tan, Ke-Qin Zhang, and Yun-Xin Fu. 2009. "Protein Folding , Binding and Energy Landscape : A Synthesis." *Protein Engineering*, 207–52.
- M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark. 2017. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson. Vol. 33.
- Maes, Dominique, Johan P Zeelen, Narmada Thanki, Nicola Beaucamp, Marco Alvarez, Minh Hoa, Dao Thi, et al. 1999. "The Crystal Structure of Triosephosphate Isomerase (TIM) From." *Proteins* 453 (June): 441–53.
- Meijer, Wim G., Paulo De Boer, Geertje Van Keulen, Patrick J Keeling, W Ford Doolittle, Cesar César Ribeiro, Joaquim C G da Silva, et al. 2002. "The Neomuran Origin of Archaeobacteria, the Negibacterial Root of the Universal Tree and Bacterial Megaclassification." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (1). Elsevier Ltd: 7–76.
- Mukherjee, Somnath, Amlan Roychowdhury, Debajyoti Dutta, and Amit Kumar Das. 2012. "Crystal Structures of Triosephosphate Isomerase from Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus MRSA252 Provide Structural Insights into Novel Modes of Ligand Binding and Unique Conformations of Catalytic Loop." *Biochimie* 94 (12). Elsevier Masson SAS: 2532–44.

- Nagano, Nozomi, Christine A. Orengo, and Janet M. Thornton. 2002. "One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on Their Sequences, Structures and Functions." *Journal of Molecular Biology* 321 (5): 741–65.
- Nisbet, E. G., and N. H. Sleep. 2001. "The Habitat and Nature of Early Life." *Nature* 409 (6823): 1083–91.
- Onuchic, J N, N D Socci, Z Luthey-Schulten, and P G Wolynes. 1996. "Protein Folding Funnels: The Nature of the Transition State Ensemble." *Folding & Design* 1 (6): 441–50.
- Orosz, Ferenc, Judit Oláh, and Judit Ovádi. 2009. "Triosephosphate Isomerase Deficiency: New Insights into an Enigmatic Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1792 (12). Elsevier B.V.: 1168–74.
- Pace, C N, F Vajdos, L Fee, G Grimsley, and T Gray. 1995. "How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 4 (11): 2411–23.
- Perozzo, Remo, Gerd Folkers, and Leonardo Scapozza. 2004. "Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects." *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24 (1–2): 1–52.
- Prakash, Om, Thomas M. Gihring, Dava D. Dalton, Kuk Jeong Chin, Stefan J. Green, Denise M. Akob, Greg Wanger, and Joel E. Kostka. 2010. "Geobacter Daltonii Sp. Nov., an Fe(III)- and Uranium(VI)-Reducing Bacterium Isolated from a Shallow Subsurface Exposed to Mixed Heavy Metal and Hydrocarbon Contamination." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (3): 546–53.
- Química de México México Vázquez Contreras, Sociedad, Sánchez Rebollar, Brenda Guadalupe, Chánez Cárdenas, María Elena, Edgar Vázquez-Contreras, Brenda Guadalupe Sánchez-Rebollar, María Elena Chánez-Cárdenas, and Raymundo Cruz Almanza. 2004. "The Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from T. Cruzi in Guanidinium Hydrochloride Is a Four State Process. Intrinsic Fluorescence Studies." *Journal of the Mexican Chemical Society Rev. Soc. Quím. Méx* 48 (48): 296–99. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47548417>.
- Rieder, Sidney V, and Irwin A Rose. 1959. "The Mechanism of the Triosephosphate Isomerase Reaction The Mechanism of the Triosephosphate Isomerase Reaction." *The Journal of Biological Chemistry* 234 (13): 1007–10.
- Romero-Romero, Sergio, Miguel Costas, Adela Rodriguez-Romero, and D Alejandro Fernandez-Velasco. 2015. "Reversibility and Two State Behaviour in the Thermal Unfolding of Oligomeric TIM Barrel Proteins." *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (32): 20699–714. doi:10.1039/C5CP01599E.
- Sievers, Martin, and Jean Swings. 2005. *Volume Two. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*
- Soundararajan, Venkataramanan, Rahul Raman S. Raguram, V. Sasisekharan, and Ram Sasisekharan. 2010. "Atomic Interaction Networks in the Core of Protein Domains and Their Native Folds." *PLoS ONE* 5 (2).
- Vijayabaskar, M. S., and Saraswathi Vishveshwara. 2012. "Insights into the Fold Organization of Tim Barrel from Interaction Energy Based Structure Networks." *PLoS Computational Biology* 8 (5): 18–24.
- Weiss, Ingrid M., Christina Muth, Robert Drumm, and Helmut O.K. Kirchner. 2018. "Thermal

Decomposition of the Amino Acids Glycine, Cysteine, Aspartic Acid, Asparagine, Glutamic Acid, Glutamine, Arginine and Histidine." *BMC Biophysics* 11 (1). BMC Biophysics: 1–15.

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

Wierenga, R. K., E. G. Kapetaniou, and R. Venkatesan. 2010. "Triosephosphate Isomerase: A Highly Evolved Biocatalyst." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (23): 3961–82.

Woese, C R. 1987. "Bacterial Evolution." *Microbiological Reviews* 51 (2): 221–71.

Zárate-Pérez, Francisco, María Elena Chánez-Cárdenas, and Edgar Vázquez-Contreras. 2008. "The Folding Pathway of Triosephosphate Isomerase." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 84 (08). Elsevier Inc.: 251–67.

Zwanzig, R., A. Szabo, and B. Bagchi. 1992. "Levinthal's Paradox." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1): 20–22.

9 ANEXO

Brucella melitensis

La familia Brucellaceae son un grupo de bacterias patógenas facultativas que causan enfermedades en animales y humanos. *Brucella melitensis* es la especie más patógena del género *Brucella* que está involucrada en la brucelosis bovina. La brucelosis constituye una barrera para el comercio de animales y sus productos debido a que esta enfermedad provoca el aborto de las crías. En humanos la infección por este microorganismo produce lesiones tisulares como granulomas (Alton and Forsyth., 1996).

Brucella melitensis es una α -proteobacteria gram-negativa con morfología de cocobacilo de alrededor de 1.5 μ m. Son organismos que no esporulan, no presentan capsulas ni flagelos, y por tanto no presentan movimiento. La membrana exterior se asemeja a cualquier otro bacilo gram-negativo con un componente dominante de lipopolisacarido y tres grupos principales de proteínas. El metabolismo de estos organismos es principalmente oxidativo y muestran poco consumo de carbohidratos. Son organismos aerobios que prefieren una concentración mínima de CO₂ de alrededor del 5 al 10%, su multiplicación es lenta a su temperatura óptima de crecimiento.



Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión de la bacteria *Brucella melitensis* en color falso.

Burkholderia thailandensis

Burkholderia thailandensis está cercanamente relacionada a *Burkholderia pseudomallei*, una bacteria patógena que produce un alto rango de síntomas clínicos conocidos melioidosis. Sin embargo, *B. thailandensis* no presenta patogenicidad, por lo que se ha convertido en un modelo para el estudio de la patogenicidad.

Burkholderia thailandensis es una β -proteobacteria gram-negativa y móvil debido a la presencia de entre dos a cuatro flagelos polares. Es un organismo capaz de crecer en una alta variedad de nutrientes y temperaturas. Sus colonias son lisas y presentan un color distintivo rosa, lo que la diferencia de *Burkholderia pseudomallei*, es capaz de asimilar L-arabinosa, 5-keto-gluconato y adonitol (Brett, Deshazer, and Woods 1998).

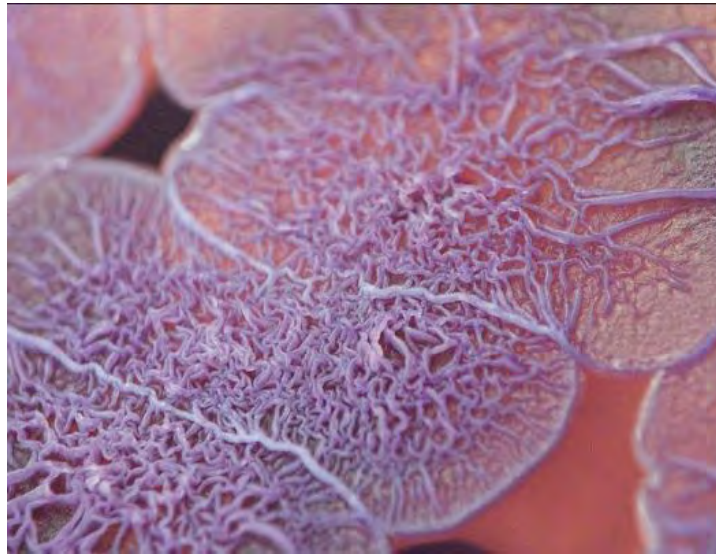


Figura 2. Fotografía de la bacteria *Burkholderia thailandensis* en cultivo.

Geobacter daltonii

Geobacter daltonii es una δ -proteobacteria gram-negativa que no forma esporas, ligeramente curva, puede tener una longitud de hasta 1.5 μ m, y forma colonias color rosa en acetato y ácido fumárico. Es capaz de crecer en oxihidroxido de hierro (III), citrato férrico, azufre, malato y ácido fumárico como aceptores de electrones. Estas bacterias se encuentran bien adaptadas a sedimentos en presencia de contaminantes, la reducción de Uranio (VI), la reducción y degradación de hidrocarburos aromáticos (Prakash et al. 2010), por lo que presenta una buena opción para la biorremediación de cuerpos de agua contaminados con metales pesados o desechos radiactivos (Akob, Mills, and Kostka 2007).



Imagen 3. Fotografía de colonias de la bacteria *Geobacter daltonii* obtenidas de un acuífero contaminado por residuos radiactivos en Oak Ridge, Estados Unidos.