



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La interfaz de la Triosafosfato Isomerasa (TIM):
correlación entre la hidratación y el mecanismo de plegamiento

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Eva Isela Mejía Juárez

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Adela Rodríguez Romero
[Instituto de Química](#)

Dr. Miguel Antonio Costas Basín
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Abril, 2022



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.

Mi abuela tenía una teoría muy interesante, decía que, si bien todos nacemos con una caja de cerillos en nuestro interior, no los podemos encender solos, necesitamos como en el experimento, oxígeno y la ayuda de una vela. Sólo que en este caso el oxígeno tiene que provenir, por ejemplo, del aliento de la persona amada; la vela puede ser cualquier tipo de alimento, música, caricia, palabra o sonido que haga disparar el detonador y así encender uno de los cerillos. Por un momento nos sentiremos deslumbrados por una intensa emoción. Se producirá en nuestro interior un agradable calor que ira desapareciendo poco a poco conforme pase el tiempo, hasta que venga una nueva explosión a reavivarlo. Cada persona tiene que descubrir cuáles son sus detonadores para poder vivir, pues la combustión que se produce al encenderse uno de ellos es lo que nutre de energía al alma. En otras palabras, está combustión es su alimento. Si uno no descubre a tiempo cuáles son sus propios detonadores, la caja de cerillos se humedece y ya nunca podremos encender un solo fósforo.

Laura Esquivel- Como agua para chocolate

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El trabajo de investigación se realizó bajo la tutoría principal del Doctor Daniel Alejandro Fernández Velasco. Así como con los miembros del comité tutor:

- Doctora Adela Rodríguez Romero (Instituto de Química)
- Doctor Miguel Antonio Costas Basín (Facultad de Química)

Se agradece profundamente a los miembros del jurado, que brindaron su apoyo y contribución en la revisión y mejoramiento del manuscrito:

- Doctora Garza Ramos Martínez Georgina Regina (Facultad de Medicina)-presidente
- Doctor Brieba de Castro Luis Gabriel (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-CINVESTAV)- vocal
- Doctor Arciniega Castro Marcelino (Instituto de Fisiología Celular)- vocal
- Doctora Hernández Santoyo Alejandra (Instituto de Química)- vocal
- Saab Rincón Gloria (Instituto de Biotecnología)- secretario

Se agradece el apoyo y contribución técnica de la Dra. María Isabel Velázquez López.

Este proyecto se llevó a cabo con el apoyo financiero tanto de la Beca de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de CVU/Becario: 1034835. Así como con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM-DGAPA, con Clave del proyecto: IN218222. Con el Doctor Daniel Alejandro Fernández Velasco como responsable y la Doctora María Isabel Velázquez López como corresponsable.

AGRADECIMIENTOS

A mis 31 años con 6 meses concluyo este camino. Ya son varios los años que he andado las tierras universitarias, de CU. Caminando por su derrame volcánico, escuchando los árboles que se mueven con el viento, surcando las veredas llenas de hojas secas o el sutil pasto verde iluminado por los rayos de sol. En todo este andar he cambiado, así como la universidad, no solo en su territorio; sino en su ser. El cambio me ha llevado a crecer. Y desde aquí, con un poquito de más desarrollo, hoy agradezco profundamente la sabiduría integral que aprendí de sus maestr@s, compañer@s, trabajadores...de sus paisajes. Hoy, mi corazón y mi actuar van impregnados de ella.

El inicio, el proceso y el fin de la maestría, fue posible con la guía, confianza y acompañamiento del Dr. Alejandro Fernández. Gracias por compartirme el LFQP y el compañerismo que ahí brota. Por mostrarme en el hacer; que el trabajo va caminando de la mano con la entrega, la pasión y el disfrute. Ale, agradezco profundamente la escucha y el apoyo continuo, en lo académico y lo personal. También le brindo gracias a la Dra. Adela Rodríguez y al Dr. Miguel Costas, por atender a mis exámenes tutorales, por sus comentarios y preguntas que ampliaron mi mirada en el proyecto, pero en mayor medida en el hacer científico y por lo tanto, en el hacer la vida.

Agradezco a ti Jacinto; que en estos dos años de maestría que transcurrieron durante la pandemia, nuestra aula fue la casa, tú mi compañero de clases, el lunch lo que cocinábamos juntos o tu para los dos y los descansos, esos ratos abrazados junto con laiquita tirados en la cama. Gracias por ser un compañero que me mira a los ojos y me acompaña a ladito para regar y así florecer este bosque que es la vida. Agradezco a mi otra compañera y maestra del amor; Laiquita. Gracias por tu compañía de día y noche a mi lado acostada en tu cama; durmiendo, acicalándote, estirando tu cuerpo o viéndome a la distancia. Doy gracias a mi mamá por

confiar cada vez en mí. Por hacer de nuestro vínculo uno cada vez más horizontal, más natural; dónde el llanto y la confianza sean posibles.

Finalmente agradezco a mi yo interior, por caminar este reto y en él, hacerme de más autoconocimiento, de cachitos más grandes de seguridad y de amor propio. Gracias Universo y madre Tierra, por sostenerme y llenarme de posibilidades diversas para amarte, admirarte, resguardarte y conocerte. Para encontrar los fósforos y el oxígeno que me nutren y en ese camino encenderme de vida.

—El mundo es eso —reveló—. Un montón de gente, un mar de fueguitos. Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.

Eduardo Galeano

Resumen.

En las proteínas, las moléculas de agua son responsables del empaquetamiento y la estabilización estructural. En proteínas diméricas, la abundancia de moléculas de agua en la interfaz sugiere que guían el proceso de plegamiento. La observación de moléculas de agua en la interfaz depende de los datos cristalográficos, de los métodos de afinamiento y de la resolución de la estructura. La Triosafofosato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica que desempeña su rol biológico exclusivamente como dímero. La TIM es un ejemplar óptimo para estudiar la hidratación de la interfaz de proteínas homodiméricas debido a que se cuenta con una extensa cantidad de estructuras cristalográficas obtenidas a diferentes resoluciones.

Almazán, C., *et al.*, 2008, investigaron la mutación puntual del residuo 114 (E114D) de la TIM de *Homo sapiens* (HsTIM), que se encuentra en la interfaz. La mutación E114D resulta en una baja asociación de las subunidades y una disminución en la actividad catalítica, debido a que la mutación provoca la ruptura de la red de moléculas de agua, establecida entre cinco residuos que circundan el sitio de la mutación. Posteriormente Romero, S., *et al.*, 2018, propuso que el nivel de hidratación en la interfaz de las TIMs puede ser un indicativo del número de estados visitados en el mecanismo de desplegamiento. Tomando en cuenta lo anterior, consideramos importante no solo identificar el número de aguas que hidratan la interfaz de las TIMs de los tres dominios; sino también distinguir si las características estructurales de la interfaz y las propiedades de hidratación determinan los rearrreglos sustanciales o ligeros de los monómeros, desencadenando un mecanismo de desplegamiento de dos o más estados, respectivamente. Nosotros propusimos un protocolo que nos permitió identificar tanto las características estructurales de la interfaz como las propiedades de hidratación. Dicho protocolo lo aplicamos en otros dímeros con la finalidad de identificar si los resultados reportados con anterioridad se mantienen. Nuestros resultados evidenciaron que la interfaz de la TIM de distintas especies es ampliamente diversa. Particularmente se distinguieron diferencias significativas en el área de la interfaz, en el área polar de la misma y

en los residuos conservados. Dicha diversidad se observó más marcadamente entre los dominios Eucarya y Bacteria; EuTIMs y BacTIMs respectivamente.

El efecto de la amplia diversidad de las características estructurales se vio reflejado en las propiedades de hidratación; específicamente en el nivel de hidratación de la interfaz; así como en las dos grandes regiones de hidratación propuestas; en la cavidad principal (CavP) y fuera de ella (fCavP). Del mismo modo que en las características estructurales, se encontraron diferencias significativas entre EuTIMs y BacTIMs, respecto a las propiedades de hidratación.

Proponemos que la amplia diversidad de las características estructurales y de las propiedades de hidratación de la interfaz, particularmente para las BacTIMs, son responsables de la nula correlación entre éstas y un mecanismo de plegamiento determinado; así como la falta de identificación de moléculas de agua conservadas en la interfaz de las TIMs.

INTRODUCCIÓN	1
Relevancia de la hidratación en proteínas.....	1
Mecanismo de plegamiento	1
Estudio del plegamiento de proteínas.....	3
Proteínas oligoméricas.....	5
Interfaz de proteínas diméricas.....	5
Propiedades de la interfaz dimérica.....	6
○ Número y distribución de residuos	8
○ Composición química.....	8
○ Polaridad.....	10
○ Parches hidrofóbicos.....	11
○ Interacciones.....	12
Hidratación y detección de moléculas de agua en la interfaz.....	15
Triosafosfato Isomerasa (TIM).....	18
○ Topología.....	19
○ Actividad biológica	20
○ Interfaz.....	21
Importancia de la interfaz.....	23
Hidratación de la interfaz.....	23
Hidratación de la interfaz y su correlación con el mecanismo de plegamiento.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
METODOLOGÍA.....	30
1. Criterios para la selección de las TIMs de estudio.....	30
2. Descripción de las características de interfaz	30
3. Descripción de las características de interfaz de otros dímeros (DIMs).....	31
4. Diseño y ejecución del protocolo para la identificación estructural de aguas en la interfaz	31

5. Clasificación de las moléculas de agua de interfaz (HOHs interfaz)	32
I. Moléculas de agua de la cavidad principal (HOHs CavP).....	33
II. Moléculas de agua fuera de la cavidad principal (HOHs fCavP).....	33
6. Obtención de las características de la cavidad principal (CavP).....	33
7. Construcción de la base de datos general.....	34
8. Evaluación de las características estructurales de interfaz en las TIMs, entre dominios y en otros dímeros.....	34
9. Evaluación de las propiedades de hidratación de interfaz en las TIMs y entre dominios.....	35
10. Evaluación filogenética de las propiedades de hidratación de la interfaz	35
11. Evaluación de las moléculas de agua conservadas: ubicación e interacciones	36
12. Correlación entre el nivel de hidratación y los mecanismos de plegamiento	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
1. TIMs seleccionadas.....	37
.....	41
2. Bases de datos al ejecutar el protocolo para la identificación estructural del número de aguas que hidratan la interfaz.....	41
3. Base de datos general	41
4. Evaluación de las propiedades de la interfaz	42
○ Tamaño de interfaz	42
○ Número de residuos.....	45
○ Composición de residuos.....	45
○ Porcentaje de área polar.....	47
○ Residuos conservados.....	51
5. Evaluación de las propiedades de hidratación de interfaz	53
○ Hidratación de la interfaz	53
○ Hidratación de la interfaz respecto a la resolución.....	54
○ Hidratación de la interfaz respecto al área de la interfaz.....	58
○ Hidratación de la interfaz respecto al porcentaje de área polar.....	59
6. Hidratación en las TIMs y entre dominios	60
○ HOHs interfaz y su clasificación.....	60
7. HOHs CavP y sus propiedades	62

○	La abertura.....	64
○	Fragmentos.....	67
○	Residuos	68
○	Polaridad.....	69
○	Volumen	70
8.	HOHs fCavP.....	72
9.	Evaluación filogenética de las propiedades de hidratación de la interfaz.....	74
○	Árbol filogenético de las TIMs	74
○	Distribución de la filogenia en función del área polar.....	75
○	Distribución de la filogenia en función de las HOHs interfaz.....	76
○	Distribución de la filogenia en función de las HOHs fCavP.....	77
○	Distribución de la filogenia en función de las HOHs CavP.....	78
10.	Correlación entre el nivel de hidratación-mecanismo de plegamiento	81
○	Mecanismo de plegamiento con relación a las propiedades de interfaz.....	81
○	Mecanismo de plegamiento con relación a las HOHs interfaz.....	82
○	Mecanismo de plegamiento con relación a las HOHs fCavP y CavP.....	83
○	Mecanismo de plegamiento con relación a las características de la CavP.....	85
11.	Moléculas de agua conservadas: ubicación e interacciones	87
○	Moléculas de agua conservadas en phyla del árbol filogenético	88
○	Moléculas de agua conservadas en EuTIMs y BacTIMs	92
○	Moléculas de agua conservadas en las TIMs.....	93
	CONCLUSIONES.....	95
	PERSPECTIVAS.....	98
	REFERENCIAS.....	101
	ANEXO	105

INTRODUCCIÓN

Relevancia de la hidratación en proteínas

La vida como ahora la conocemos se establece en un medio acuoso; tal como cuando los primeros organismos surgieron en un mar primordial. Más adelante, los seres vivos que desarrollaron la capacidad de vivir fuera del agua llevaron el océano consigo, pues los procesos biológicos solo pueden ser entendidos en términos de las propiedades físicas y químicas de las moléculas de agua (Voet, 2011). Éstas juegan un rol invaluable en la estructura, estabilidad, dinámica y función de las biomoléculas que constituyen a los seres vivos. Particularmente, en las proteínas, las fuerzas de hidratación aunadas a los puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas entre grupos cargados, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas entre residuos no polares (Dill, 2012); son responsables del empaquetamiento y estabilización de la estructura. Las moléculas de agua no solo interactúan en la superficie de las proteínas, también funcionan como una extensión estructural, al mediar interacciones con la cadena principal (backbone) y/o con las cadenas laterales en el interior; formando grupos de dos o más moléculas de agua en cavidades hidrofóbicas (Levy, 2004)

En proteínas oligoméricas, la abundancia de moléculas de agua en la interfaz sugiere que el solvente es indispensable para el reconocimiento y el autoensamble de los monómeros. Es así como, en el proceso de plegamiento, las moléculas de agua facilitan el empaquetamiento de elementos de estructura supersecundaria, al mediar interacciones de largo alcance entre residuos polares y cargados de la interfaz (Levy, 2004).

Mecanismo de plegamiento

El proceso mediante el cual la cadena polipeptídica adopta su estructura tridimensional, se denomina plegamiento de proteínas. El proceso transcurre desde una población de estados desestructurados, que en conjunto son designados como estado desplegado (D) hasta adquirir su estructura tridimensional, también descrita como estado plegado o nativo (N),

conformación a partir de la cuál la mayoría de las proteínas desempeñan su rol biológico (Fig. 1A). Así mismo, en el proceso, la cadena polipeptídica puede adoptar estados parcialmente estructurados, marginalmente estables con estructura parcialmente plegada; los cuáles son nombrados estados intermedios o estados intermediarios (I) (Fig. 1B). En resumen, los mecanismos o vías de plegamiento indican la velocidad y la serie de pasos que ocurren en la formación desde el estado desnaturalizado hasta el estado nativo, con la posible formación de estados intermedios.

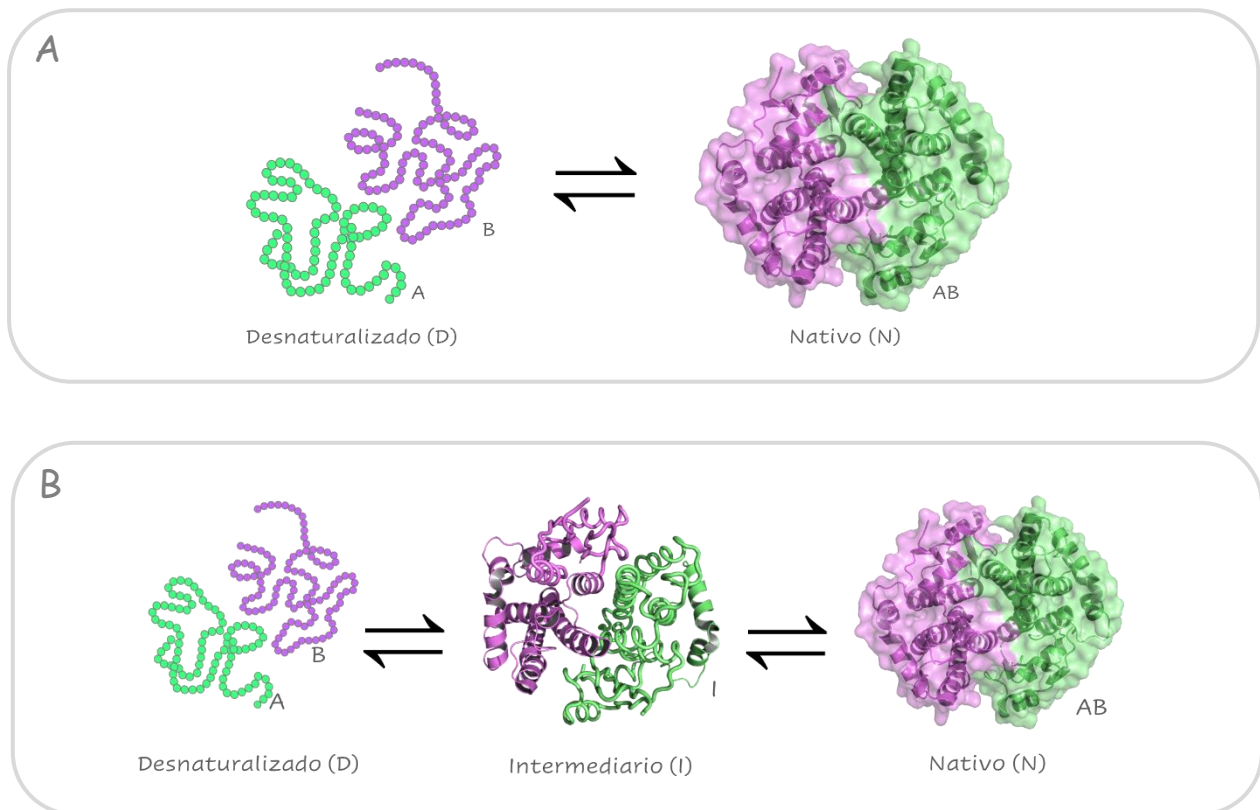


Figura 1.- Representación del mecanismo de plegamiento para el homodímero de la Glutación S-transferasa (PDB 1K30). A) Mecanismo de dos estados ($2D \rightleftharpoons N_2$). B) Mecanismo de tres estados ($2D \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N_2$).

Estudio del plegamiento de proteínas

El estudio experimental del mecanismo de plegamiento se apoya de disciplinas como la termodinámica y la cinética. En los estudios termodinámicos, se analizan sistemas en equilibrio; es decir, sistemas que mantienen sus propiedades químicas, mecánicas y térmicas de manera constante en el tiempo. Por tanto, la termodinámica define y describe la transformación de la energía libre de Gibbs (ΔG) al transitar de un estado en equilibrio a otro. En consecuencia, la termodinámica de plegamiento se refiere al cambio en energía libre (G_f) del estado plegado al estado desplegado; así como la energía asociada a cada conformación visitada.

Por su parte, la cinética estudia la velocidad a la cual ocurren las reacciones químicas; analizando la transformación de los sistemas a través del tiempo. En consecuencia, el estudio de la velocidad del proceso de plegamiento de una proteína y el reconocimiento del número de estados adoptados en el tiempo corresponde a la cinética de plegamiento.

Considerado lo anterior, la caracterización del proceso de plegamiento ya sea termodinámica o cinéticamente, se efectúa a partir de la desnaturalización de la proteína. La desnaturalización se produce por la perturbación gradual de las condiciones experimentales, tales como: temperatura, presión, pH o por la incorporación de un agente desnaturante (Wedemeyer, 2021). En la desnaturalización, específicamente se sigue o se evalúa el efecto del cambio de las condiciones experimentales sobre las poblaciones de los estados nativo, desnaturalizado y los posibles estados intermedios. Particularmente, en los experimentos de desnaturalización térmica la solución de la proteína es calentada a velocidad constante, y los cambios en la conformación de la proteína o el efecto del calor es monitoreado por espectroscopia o calorimetría diferencial de barrido, respectivamente. Los resultados, incluyen la temperatura media (T_m), entalpía ($\Delta H(T_m)$) y el incremento de la capacidad calorífica (Benjawal, 2009).

En la desnaturalización química se emplean distintos agentes caotrópicos, tales como: urea, cloruro de guanidinio (GdnHCl) o tiocinato de guanidinio. Específicamente, la urea

desnaturaliza a las proteínas debido a que disrumpe contactos nativos, al formar puentes de hidrógeno con los átomos de cadena principal y producir conformaciones extendidas favorables. Varias cadenas laterales no polares y grupos peptídicos originalmente ocultos en la proteína plegada se exponen al solvente en el estado desplegado. Así, cuando la concentración de urea incrementa, el estado desnaturalizado es favorecido, debido a que hay mayor superficie y sitios de interacción. La proteína interactúa preferentemente con las moléculas de urea, que con las moléculas de agua. Basado en los estudios de difracción de neutrones, Soper, A., *et al.*, 2003 mostró que cada molécula de urea forma 5.7 puentes de hidrógeno. Está es la razón por la que el ΔG_{tr} es favorable para la transferencia de grupos peptídicos de agua a soluciones de urea. Se sugiere que las moléculas de urea reemplazan algunas de las moléculas de agua en la capa de hidratación formada alrededor de los grupos no polares, de tal manera que incrementa su solubilidad (Fig. 2) (Buchner, 2005).

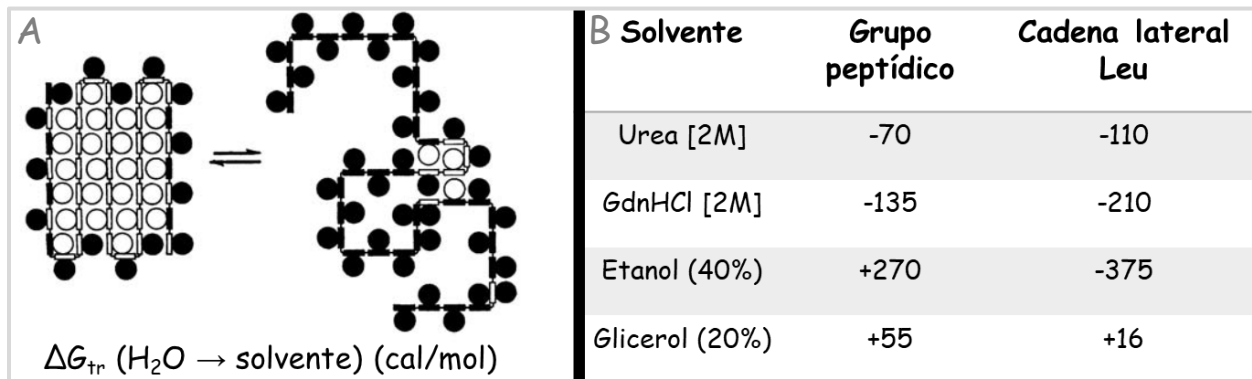


Figura 2.- Desnaturalización por urea. A) Representación de la desnaturalización por urea (Tanford,1965), ilustrando los cambios en la accesibilidad de los grupos peptídicos (rectángulos) y las cadena laterales (círculos). Los símbolos cerrados representan grupos que son accesibles al solvente y los símbolos abiertos representan grupos que no lo son. B) Valores del ΔG_{tr} , para diferentes solutos. Se muestra que la urea y el GdnHCl cuentan con valores ΔG_{tr} negativos. Tomado de Buchner, J., 2005.

Proteínas oligoméricas

Las proteínas oligoméricas poseen estructura cuaternaria, generalmente considerada por ser el mayor nivel de organización estructural dentro de las proteínas. Se ha estimado que aproximadamente el 75% de las proteínas en *Escherichia coli* son oligoméricas; y se considera que la proporción puede ser mayor en organismos eucariontes (Doyle, 2013). En lo esencial, la formación de oligómeros involucra el establecimiento de interacciones intermoleculares entre los átomos de los residuos de cada una de las subunidades que forman el ensamble. Las proteínas oligoméricas generalmente desarrollan su función, después de la asociación de las subunidades; las cuales pueden ser dos o más copias de cadenas polipeptídicas idénticas, formando proteínas homo-oligoméricas, o alternativamente integradas por diferentes cadenas polipeptídicas, generando proteínas hetero-oligoméricas. Desde la perspectiva histórica, los oligómeros, presumiblemente han evolucionado para optimizar su función biológica. Parece haber una fuerte presión de selección para las proteínas monoméricas en complejos oligoméricos, conduciendo a beneficios tales como reducción de área superficial, incremento de la estabilidad y adquisición de funciones novedosas a través de la comunicación entre las subunidades. En algunas circunstancias, la función puede requerir del establecimiento de interacciones covalentes, mientras en otras se puede precisar sólo de la formación de uniones débiles (Jones, 1996). Se ha observado, que las moléculas de agua pueden mediar ambos tipos de interacciones entre los residuos de las subunidades, ocasionando la formación de una interfaz hidratada.

Interfaz de proteínas diméricas

La interfaz de proteínas oligoméricas, se define estructuralmente como la región superficial de las proteínas, que está oculta y en contacto entre las subunidades que interactúan al formar el oligómero (Chothia & Janin, 1975). En el caso de proteínas diméricas, la interfaz se define mediante el cambio de área superficial accesible al solvente (Δ ASA) que tiene lugar cuando dos monómeros A y B, se asocian para formar un dímero AB (Jones & Thornton, 1996).

El área superficial accesible que se entierra o se pierde (BSA) en la interacción de las dos subunidades al formar el dímero, representa el área o tamaño de la interfaz, y se puede calcular como:

$$BSA = AS_{AmonA} + AS_{AmonB} - AS_{Adímero}$$

Donde:

- AS_{AmonA} = área superficial accesible del monómero A
- AS_{AmonB} = área superficial accesible del monómero B
- $AS_{Adímero}$ = área superficial accesible del dímero

Propiedades de la interfaz dimérica

Diversos trabajos reportan las propiedades de la interfaz tanto de complejos proteicos, interacciones antígeno-anticuerpo, contactos cristalinos y distintos estados oligoméricos. En el caso de los dímeros, retomamos los trabajos de Jones & Thornton.,1996, Bajadur, R., *et, - al.*, 2003 y Dey, S., *et, - al.*, 2010. Las tres investigaciones comparten la definición de interfaz detallada en líneas anteriores. Jones & Thornton, estudiaron 59 diferentes complejos encontrados en el PDB, de los cuales 32 corresponden a homodímeros, con resoluciones de 1.35 a 3 Å. Tanto la interfaz como los residuos fueron detectados con el algoritmo de Lee and Richards, desarrollado por Hubbard (Lee, 1971). Por su parte, Bajadur, R., *et, - al.*, 2003 evaluaron 122 estructuras, 84 con una resolución mayor a 2 Å, 32 con resolución en el rango de 2-2.5 Å y 6 en el rango de 2.5-3.0 Å. Todas las entradas del PDB utilizadas corresponden a proteínas reportadas como dímeros en solución. Para estimar el tamaño y los residuos de la interfaz utilizó el mismo algoritmo de Jones & Thornton implementado en el programa NACCESS (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>). Finalmente, en Dey, S., *et, - al.*, 2010 evaluaron 315 entradas del PDB, experimentalmente reportadas como homodímeros en

solución y con una resolución mejor a 3 Å. De las 315 estructuras seleccionadas, 42 fueron identificadas como dímeros débiles; esto es, dímeros en equilibrio con el estado monomérico.

○ Tamaño

En los oligómeros existe un amplio intervalo de distribución en el tamaño de la interfaz, de 368 Å² a más de 7000 Å² por subunidad (Fig. 3) (Jones & Torton, 1996, Bajadur, R., *et al.*, 2003, Dey, S., *et al.*, 2010), con una media de 1940 Å². Las interfaces ocultan 14% de la superficie por cada subunidad, sin embargo, el intervalo puede ir de 4 a 38% (R²=0.41) (Dey, 2010).

En cuanto al tamaño de la interfaz, se ha mostrado que:

- El área de la interfaz es proporcional al número de átomos y residuos que contribuyen a esta.
- Cada átomo de la interfaz contribuye en promedio 9.8 Å² y cada residuo lo hace con 37 Å² (R²=0.98).
- Existe una correlación entre el peso molecular de cada subunidad y el tamaño de la interfaz (R²=0.69) (Jones & Torton, 1996).

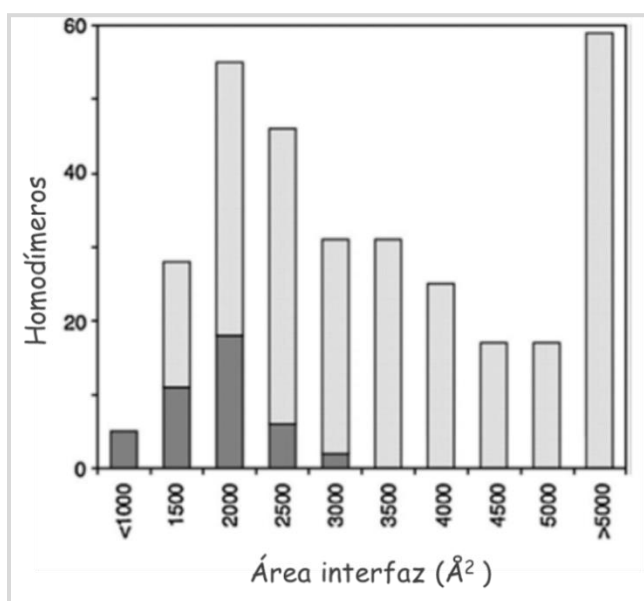


Figura 3.- Distribución del área de interfaz del ensamblaje de homodímeros. En barras oscuras (■) dímeros débiles. En gris claro (□) dímeros obligados. Tomado de Dey, S., *et al.*, 2010.

○ Número y distribución de residuos

En promedio las interfaces proteicas están compuestas de 52 residuos por cada subunidad. La correlación entre el área de la interfaz y el número de residuos es lineal ($R=0.98$). Generalmente, el total de los residuos se distribuyen en dos regiones principales, el núcleo y el borde de la interfaz. El núcleo se compone por residuos con uno o más átomos totalmente ocultos en el dímero y por tanto aislados del solvente. El borde está formado por residuos donde todos los átomos tienen accesibilidad residual al solvente. En las estructuras evaluadas, el 23% del área de interfaz se distribuye en el borde y 77% en el núcleo. Si se considera los 52 residuos que en promedio forman la interfaz; 20 componen el borde y 32 al núcleo. Sin embargo, la proporción entre ambas regiones depende del tamaño y forma de la interfaz, variando ampliamente de un dímero a otro (Bajadur, 2003).

○ Composición química

Los residuos del núcleo tienen una composición similar al interior de la proteína, principalmente integrado por residuos de carácter hidrofóbicos; ya sea aromáticos y/o alifáticos, con la nula presencia de residuos cargados. El núcleo cuenta con aminoácidos denominados “hot spots”; residuos que forman contactos cruciales entre ambas subunidades afectando la estabilidad de la interfaz y la asociación del dímero. El borde de la interfaz se compone de aminoácidos similares a la superficie; residuos alifáticos y cargados (Bajadur, 2002).

La propensión es una medida que muestra la preferencia de cada tipo de residuo por estar en la interfaz en contraste con la superficie de la proteína. Puede ser expresado como la contribución fraccional de cada tipo de residuo en la interfaz (BSA), respecto a la superficie (ASA):

$$p = \ln(f^B/f^A)$$

Dónde:

- p = propensión
- f^B = contribución de residuo al BSA
- f^A = contribución de residuo al ASA

La propensión puede ir de -1 a ≥ 1 , siendo estos últimos valores los que denotan mayor preferencia de contribuir a la interfaz (Jones & Thornton, 1996). En la Tabla 1 se detallan los valores porcentuales de cada residuo en la interfaz y en la superficie; así como el valor de la propensidad para cada uno. En homodímeros, los residuos aromáticos Phe, Tyr y Trp y los Ile, Leu, Val y Met contribuyen mucho más a la interfaz que a la superficie, 41% y 18%, respectivamente. Los residuos cargados aspartato Asp, Glu y Lys hacen lo opuesto, contribuyen 34% a la superficie y solo 16% a la interfaz. La arginina contribuye alrededor del 10% tanto a la superficie como a la interfaz. Y los otros 9 residuos muestran una contribución de 38% a la superficie y 33% la interfaz.

<i>Residuo</i>	Interfaz	Superficie	Propensión interfaz
<i>Ala</i>	5.0	4.8	0.0
<i>Arg</i>	9.9	10.0	0.0
<i>Asn</i>	3.9	5.2	-0.3
<i>Asp</i>	4.4	8.2	-0.6
<i>Cys</i>	1.0	0.4	0.8
<i>Gln</i>	4.0	6.0	-0.4
<i>Glu</i>	6.1	12.6	-0.7
<i>Gly</i>	3.4	4.3	-0.2
<i>His</i>	3.3	2.8	0.2
<i>Ile</i>	5.7	2.3	0.9
<i>Leu</i>	10.4	4.5	0.8
<i>Lys</i>	5.5	12.9	-0.9
<i>Met</i>	3.9	1.6	0.9
<i>Phe</i>	6.8	2.1	1.2
<i>Pro</i>	4.9	5.6	-0.1
<i>Ser</i>	3.7	4.6	-0.2
<i>Thr</i>	4.3	4.7	-0.1
<i>Trp</i>	2.4	1.1	0.8
<i>Tyr</i>	6.1	2.9	0.7

Val	5	3.1	0.6
-----	---	-----	-----

Tabla 1.- Valores de la propensión y porcentaje de contribución de cada residuo en la interfaz y superficie. Tomado de Dey, S., *et. - al.*, 2010.

○ Polaridad

Del total de residuos que integran la interfaz de homodímeros, en promedio, el 65% corresponde a aminoácidos no polares y tan solo el 35% a residuos polares con carga y sin carga (Fig. 4) (Jones & Thornton, 1996). Sin embargo, de manera detallada, la distribución de la polaridad en la interfaz ocurre de la siguiente manera: 1) un cuarto presenta de 40 a 50% de polaridad. Composición similar a la interfaz de complejos proteína-proteína, los cuáles se ensamblan por interacciones no covalentes y se pliegan separadamente para llevar a cabo funciones independientes antes de que se asocien. 2) otro cuarto cuenta con una polaridad de 19 a 30%. Porcentaje que representa las interfaces más hidrofóbicas y 3) la mitad de los homodímeros se distribuyen entre ambos extremos, entre 30 y 40%. No se encontró una tendencia sistemática para la proporción de área polar/ no polar en relación con el tamaño de la interfaz.

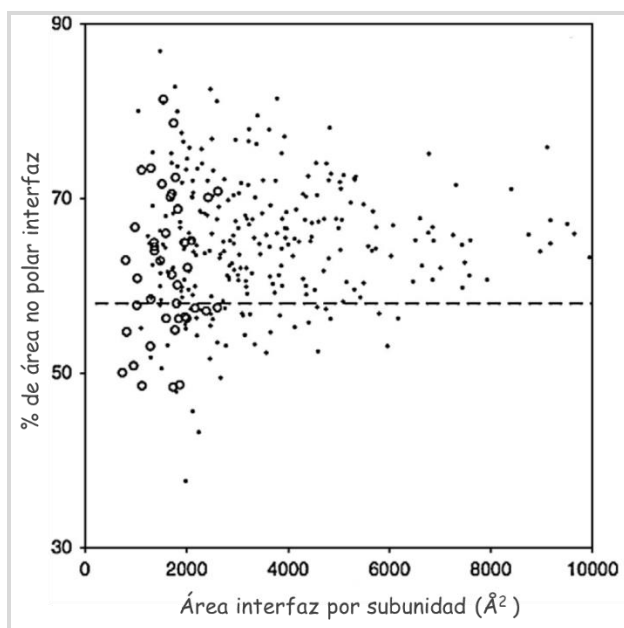


Figura 4.- Porcentaje de área no polar por subunidad en la interfaz de homodímeros. Se grafica el porcentaje de área no polar tanto en la interfaz de dímeros obligados (●) y débiles (○), respecto al tamaño de la interfaz. La línea punteada representa la fracción no polar (58%) en complejos proteína-proteína, por lo cual se considera el límite entre una interfaz hidrofóbica e hidrofílica. Tomado de Dey, S., *et. - al.*, (2010).

○ Parches hidrofóbicos

Al evaluar 18 dímeros, Miller, 1989, propuso la estructura generalizada de la interfaz: un núcleo hidrofóbico central, rodeado por residuos polares cargados. No obstante, los estudios posteriores realizados por Larsen, 1998, mostraron que en la interfaz no está formada por un solo núcleo hidrofóbico; sino más bien por parches pequeños hidrofóbicos eventualmente distribuidos y alternados con puentes de hidrogeno y moléculas de agua enterradas entre las subunidades. De los 136 dímeros evaluados, sólo una tercera parte cuenta con una interfaz clásica; un centro hidrofóbico bien definido y un borde polar. Dos terceras partes forman una mezcla de carácter polar con puentes de hidrógeno y moléculas de agua, intercalada con parches apolares. Diez interfaces están extensivamente interdigitadas (Fig. 5A). También se reconoció que el número de parches correlaciona con el tamaño de la interfaz. El área promedio para las proteínas que presentan un solo parche es de 1400 \AA^2 . Y el promedio para proteínas multiparches, es generalmente más pequeños, alrededor de 600 \AA^2 (Fig. 5B).

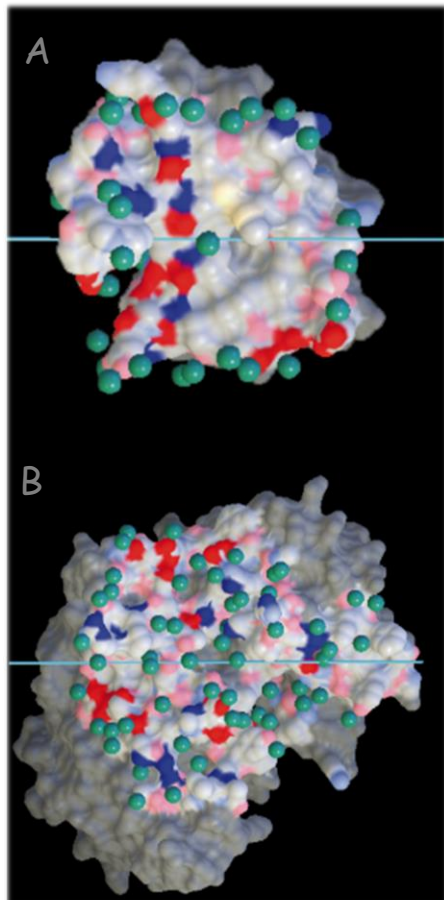


Figura 5.- Esquemización de parches hidrofóbicos en la interfaz. Imágenes estereoscópicas de: **A)** Interfaz clásica (1 parche hidrofóbico), de la proteína cinasa C (PDB 1KPA) **B)** Interfaz interdigitada; con puentes de hidrógeno y moléculas de agua. A manera de ejemplo Adinosuccinato sintasa (PDB 1ADE). Se muestra una subunidad de cada dímero. El eje dimérico es mostrado como una línea azul cian. Los átomos de la interfaz son coloreados de acuerdo con la hidrofobicidad. Los átomos de carbono están en blanco, los átomos de azufre en amarillo, lo átomos de oxígeno y nitrógeno en rojo y azul brillante unidos por puente de hidrógeno, respectivamente. Y los que no están unidos por puentes de hidrógeno; oxígeno y nitrógeno en rojo y azul claro, respectivamente. Así los colores brillante indican interacciones hidrofílicas directas y los colores claros indican regiones hidrofóbicas. Las moléculas de agua de interfaz son mostradas en esferas verdes. Tomado de Larsen, T., 1998.

○ Interacciones

Las interacciones salinas entre grupos de carga opuesta contribuyen a la estabilidad del ensamble proteico. Las uniones más frecuentes son entre Arg-Asp y Arg-Glu (en promedio 2.2 por homodímero); seguidas por Lys-Glu, Lys-Asp, His-Asp y Glu-His (Ikura, 2004) (Tabla 2). La distancia de las uniones salinas, menor a 4 Å, es evaluada de acuerdo con la distancia del átomo donador; NZ de Lys; N, NH1 y NH2 de Arg, ND1 y NE2 de His y la amida del N-terminal y los átomos aceptores; OE1 y OE2 de Glu, OD1 y OD2 de Asp y el carboxilo de C-terminal.

<i>Residuo</i>	Arg	Lys	His	N-terminal
<i>Asp</i>	179	100	11	4
<i>Glu</i>	148	138	11	2
<i>C-terminal</i>	12	13	1	4

Tabla 2.- Distribución de las interacciones salinas en la interfaz de dímeros. Tomado de Xu, D., *et al*, 1997.

En cuanto a los puentes de hidrógeno, se reconoce que involucran un átomo de hidrógeno localizado entre un par de átomos que tienen una alta afinidad por los electrones. Un átomo del par (el donador, generalmente oxígeno o nitrógeno) es unido covalentemente a un átomo de hidrógeno (-NH o -OH) cuyos electrones se comparten desigualmente; y su alta afinidad electrónica hace que el hidrógeno adquiera una ligera carga positiva. El otro átomo del par, también típicamente nitrógeno u oxígeno, tienen un par de electrones no compartidos, lo cual le da una carga ligeramente negativa. A través de interacciones electrostáticas, el donador comparte el hidrógeno con el aceptor, formando un puente (Fig. 6).

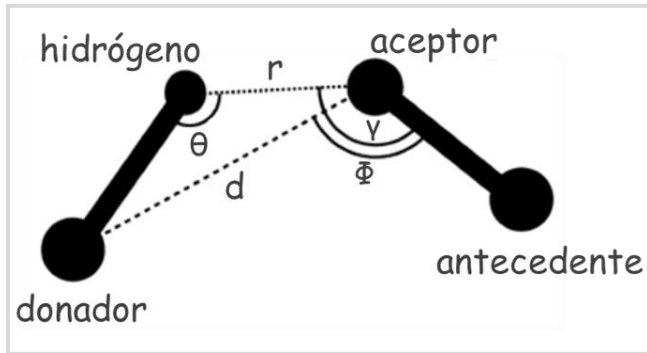


Figura 6.- Variables geométricas del puente de hidrógeno: d =distancia entre el donador y el aceptador, r =distancia entre el aceptador e hidrógeno, θ = ángulo entre donador-hidrógeno-aceptor, Φ =ángulo entre donador-aceptor-aceptor antecedente y γ =ángulo entre hidrógeno-aceptor-aceptor antecedente. Tomado de Xu, D., *et. - al.*, 1997.

Utilizando el programa HBPLUS, con los parámetros estándar, Dey, S., *et. - al.*, 2010, reconocieron que el número de puentes de hidrógeno puede variar ampliamente de una interfaz a otra dependiendo del tamaño y su hidrofobicidad. En homodímeros, los puentes de hidrógeno a través de la interfaz son predominantemente entre oxígeno y nitrógeno. Se ha calculado una media de 17 puentes de hidrógeno, con una baja correlación con el área de la interfaz. En promedio hay un puente de hidrógeno por cada 210 \AA^2 de BSA. El porcentaje de puentes de hidrógeno entre diversos tipos de átomos se distribuye de la siguiente manera: I) 43% cadena lateral-cadena principal, II) 36% cadena lateral-cadena lateral y III) 21% cadena principal-cadena principal (Dey, 2010). A pesar de que los átomos de la cadena principal contribuyen sólo en un 18% al área de la interfaz, es notable que integran el mayor porcentaje de interacciones polares (64%). La Figura 7A muestra la distribución de la distancia entre el donador y el aceptador, evidenciando que la distancia promedio a través de la interfaz es de 2.92 \AA (± 0.24). Respecto al ángulo de enlace del puente de hidrógeno intercadena (Fig. 7B), se obtuvo una media de 150.7° (± 17.1). Se ha mostrado que si el ángulo se encuentra alrededor de 180° , se formará un puente de hidrógeno fuerte y si se encuentra en el intervalo de 160° será débil. Es así como la mayoría de los enlaces en la interfaz son débiles, pues se forman con una distancia de 2 \AA y un ángulo de enlace de $\sim 160^\circ$ (Xu, 1997).

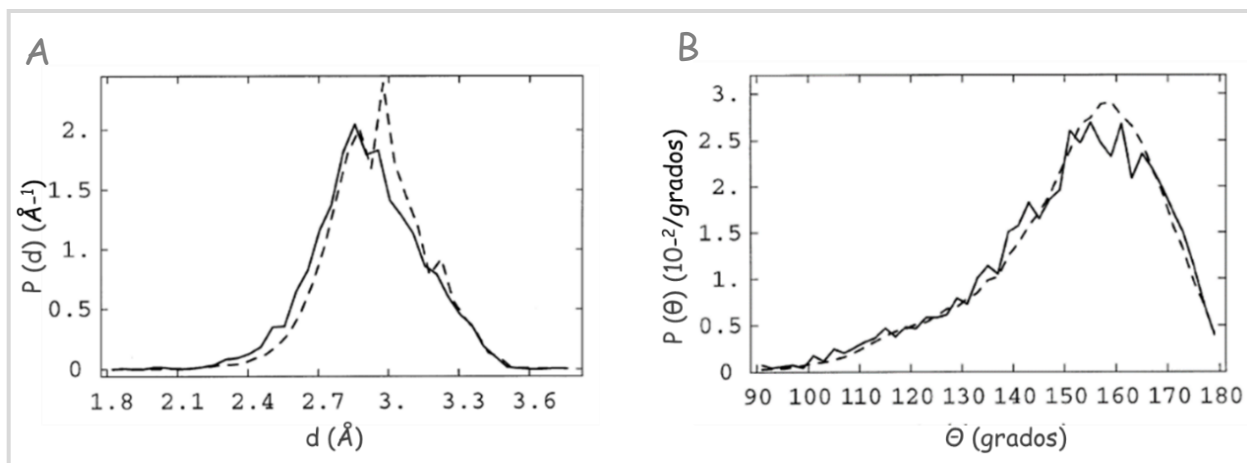


Figura 7.-Distribución de la distancia y el ángulo de enlace del puente de hidrógeno entre el donador y aceptor, en la interfaz de homodímeros. En (- - -) puentes de hidrógeno intracadena y en (-·-·-) puentes de hidrógeno intercadena. A) Distribución de la distancia del puente de hidrógeno. B) Distribución del ángulo de enlace de puente hidrógeno. Tomado de Xu, D., *et. - al.*,1997.

La correlación entre el área polar y el número de puentes de hidrógeno en la interfaz es buena ($R^2=0.83$). En promedio hay un puente de hidrógeno por 75 \AA^2 de superficie polar (Dey, 2010) (Fig. 8).

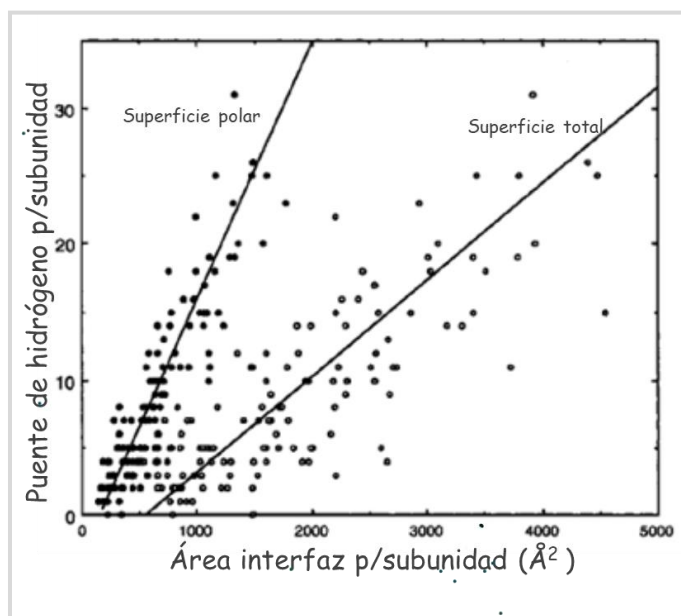


Figura 8.- Número de puentes de hidrógeno en relación con el área total de la interfaz y al área polar de la interfaz. Tomado de Bajadur, R., *et. - al.*, 2003.

Es típicamente desfavorable encontrar moléculas de agua en el interior no polar de las proteínas monoméricas. No obstante, en un ambiente más polar como la interfaz, fácilmente se forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua inmersas en esta región. En el ensamble de las subunidades, se integran contactos directos proteína-proteína, creando un efecto hidrofóbico favorable que contribuye a la estabilidad del ensamble, pero no a la especificidad. No obstante, las interacciones indirectas; mediadas por moléculas de agua, contribuyen tanto a la estabilidad como a la especificidad (Rodier, 2005). La calidad estereoquímica de estos puentes de hidrógeno no es tan buena como la observada dentro de las proteínas. Una molécula de agua entre un donador y un aceptor a través de la interfaz puede usualmente formar un puente de hidrógeno con ambos átomos, debido a su tamaño pequeño y a su flexibilidad. Si la molécula de agua fuera removida, el donador y el aceptor no formarían el puente de hidrógeno o sólo formarían uno débil, debido a las restricciones impuestas por ambas proteínas durante su unión (Xu, 1997).

Hidratación y detección de moléculas de agua en la interfaz

Matthews, 1968 (Chruszcz, 2008) reconoció por primera vez el contenido de solvente en un cristal de proteína va de 27 a 65%. La examinación actual de las estructuras depositadas en el PDB indica que este estimado es todavía válido, con una media de 51%, aunque hay algunas excepciones (Wlodawer, 2008). Debido a que la cristalografía de rayos X puede observar objetos que están repetidos a través del volumen entero en el cristal; sólo las moléculas de agua que están bien ordenadas pueden identificarse de manera correcta en el mapa de densidad electrónica. El número de moléculas de agua identificadas depende de la resolución, de los datos experimentales y de los niveles y métodos de afinamiento. La inclusión de moléculas de agua en el modelo usualmente incrementa el número de parámetros de afinamiento por cuatro (tres coordenadas más el factor B) y subsecuentemente disminuye el R-factor. Sin embargo, moléculas de agua con factor B $>100 \text{ \AA}^2$, indican que el solvente estructural no fue afinado cuidadosamente. Se ha observado que el factor B de las moléculas

de agua generalmente es 1.3 veces el valor del factor B de los átomos de la proteína; lo cual indica que las moléculas de agua de la interfaz son ligeramente más móviles que los átomos de la proteína. Específicamente en la interfaz, las moléculas de agua muestran valores de factor B en el intervalo de 10-70 Å². Solo 2.8% está por debajo y 1.8% por arriba (Wlodawer, 2008).

Las estructuras obtenidas por difracción de rayos X generalmente muestran que en la interfaz se forman cavidades donde el solvente permanece atrapado estableciendo interacciones indirectas (Rodier, 2005). El nivel de hidratación observado en la interfaz presenta una amplia variación entre las estructuras depositadas en el PDB. Mientras que solo una molécula de agua es reportada en la interfaz del inhibidor de tripsina kallikreina pancreática (PTI) (2KAI), la interfaz del dímero de la amino oxidasa de cobre (1OAC) cuenta con 190 moléculas de agua (Rodier, 2005).

El estudio de Rodier tuvo como objetivo cuantificar el número de moléculas de agua en la interfaz, así como reconocer los tipos de interacciones que establecen y los residuos a los cuáles se unen. De las 295 proteínas evaluadas, 115 corresponden a homodímeros. Las propiedades estructurales de la interfaz se calcularon con el programa NACCESS, el cual implementa el algoritmo de Lee and Richards en 1971. Se removieron entradas con resoluciones menores a 2.6 Å o que carecían de información del solvente. Se definió como moléculas de agua de la interfaz, a aquellas moléculas de solvente que están dentro de 4.5 Å de los átomos de la interfaz de ambos lados del ensamble. Entre los resultados, se reconoció que el número de aguas de interfaz (N_w) incrementa en un 15% si el límite de resolución de la estructura es 2Å o más; y si la resolución es de 1.6 Å o mejor, el aumento de moléculas de agua es de 44% (Fig. 9). No obstante, al analizar la hidratación de las estructuras a una misma resolución, por ejemplo 1.6 Å, se identificó que el número de moléculas de agua varía de 8 hasta 120. Al tomar en cuenta lo anterior, el número de aguas detectadas en la interfaz no solo depende de la resolución sino también del tipo de residuos que componen esta área y del

tamaño de la interfaz. Se observó que el número de moléculas de agua aumenta conforme incrementa el tamaño de la interfaz ($R^2=0.82$) (Fig. 10)

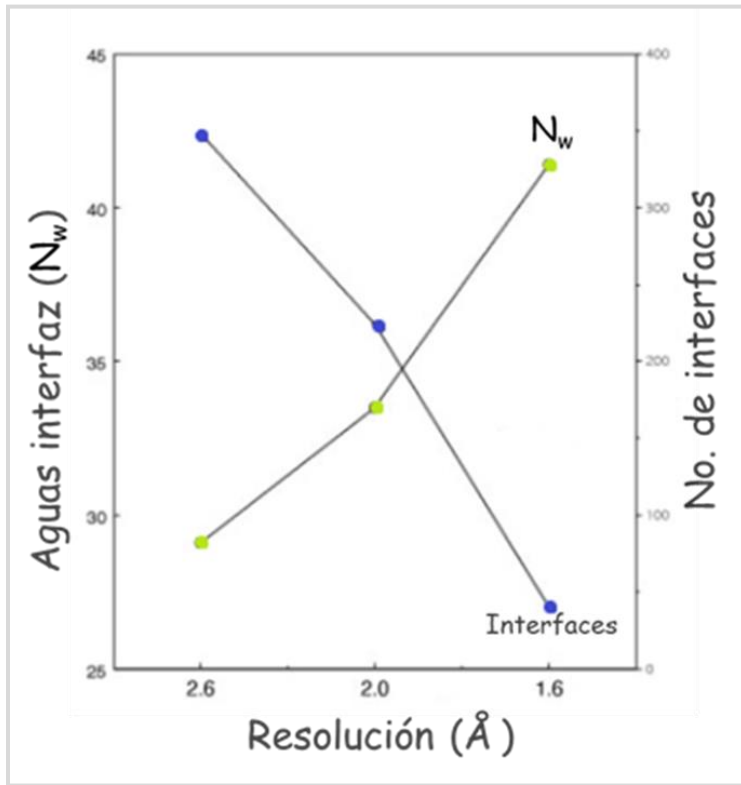


Figura 9.- Correlación entre la resolución y el número de aguas en la interfaz de dímeros. Tomado de Rodier, F., 2005.

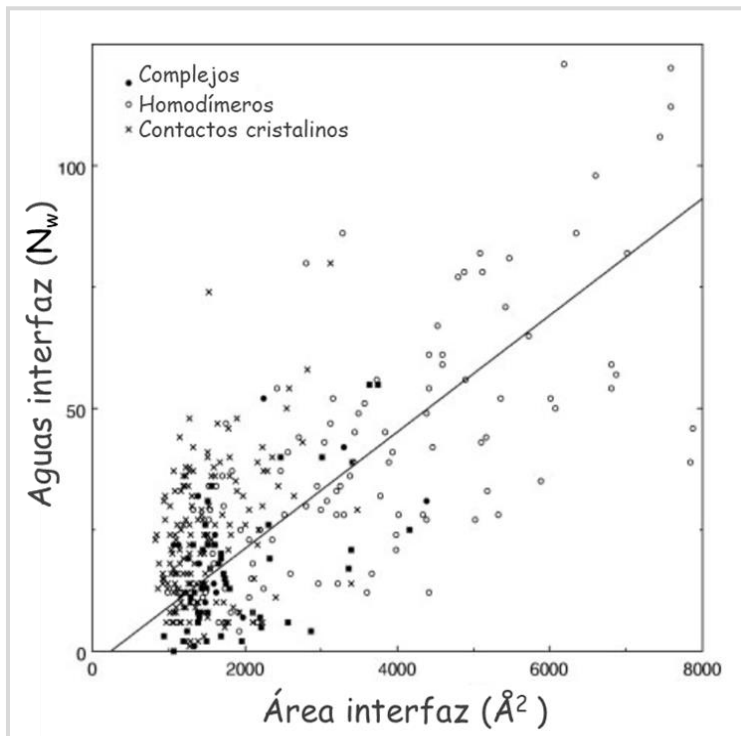


Figura 10.- Hidratación de la interfaz respecto al área. Tanto en complejos (●), homodímeros (○) y contactos cristalinos (X). Tomado de Rodier, F., 2005.

En promedio, las interfaces de homodímeros albergan alrededor de 10 moléculas de agua por 1000 Å² de área de interfaz, con una media de 44 (±33). Por su parte, se identifican en promedio 32 moléculas de agua por cada 1000 Å² de área polar; una molécula de agua inmovilizada por 3 átomos polares.

Las moléculas de agua son donadores de puente de hidrógeno con el grupo carbonilo y aceptores con el grupo amino. En promedio, cada molécula de agua hace una interacción polar con un grupo de la proteína. Es poco frecuente que las moléculas de agua interactúen con grupos polares de ambos lados de la interfaz (Xu, 1997). En promedio la ocurrencia observada de pares donador-HOH-donador y aceptor-HOH-aceptor, son más frecuentes que sus valores esperados, indicando que el enlace de moléculas de agua de interfaz tiende a mediar pares de grupos polares los cuales no pueden formar puentes de hidrogeno directamente entre ellos (Tabla 3).

Tipo	Ocurrencia	Esperado
Donador-HOH-donador	617	525.6
Aceptor-HOH-Aceptor	1756	1664.6
Donador-HOH-aceptor	1688	1870.8

Tabla 3.- Ocurrencia de puentes de hidrógeno mediados por agua en la interfaz. Tomado de Xu, D., *et, - al.*, 1997

Triosafosfato Isomerasa (TIM)

El comité de Nomenclatura de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) clasifica a la Triosafosfato Isomerasa (TIM) con el número 5.3.1.1 (5: isomerasas; 3: oxidorreductasas intramoleculares; 1: interconvertidores de aldolasas y cetosas y otros componentes relacionados; 1: Triosafosfato isomerasa).

○ Topología

Las secuencias de las TIMs conocidas varían en longitud de 220 a 250 residuos y presentan una topología $(\beta/\alpha)_8$ o también denominada topología TIM, la cual consiste en 8 repeticiones de la unidad (β/α) , tal que 8 hebras β forman un barril central en el interior, rodeado por un barril externo de 8 hélices α , interconectados entre sí por asas. Hay 8 asas $\beta\alpha$ superiores o de ida y 8 asas $\alpha\beta$ inferiores o de regreso. Cada asa $\beta\alpha$, corre de una hebra a una hélice ($\beta \rightarrow \alpha$), y cada asa $\alpha\beta$ corre de una hélice a una hebra ($\alpha \rightarrow \beta$) (Fig. 11) (Katebi, 2013). Las asas $\beta\alpha$ están agrupados en dos categorías: las asas que forman la interfaz ($\beta\alpha$ 1, 2, 3 y 4) y las que dirigen la catálisis ($\beta\alpha$ 1, 4, 6, 7 y 8). Por lo tanto, ambos grupos juegan un rol importante en la oligomerización y en la funcionalidad de la enzima.

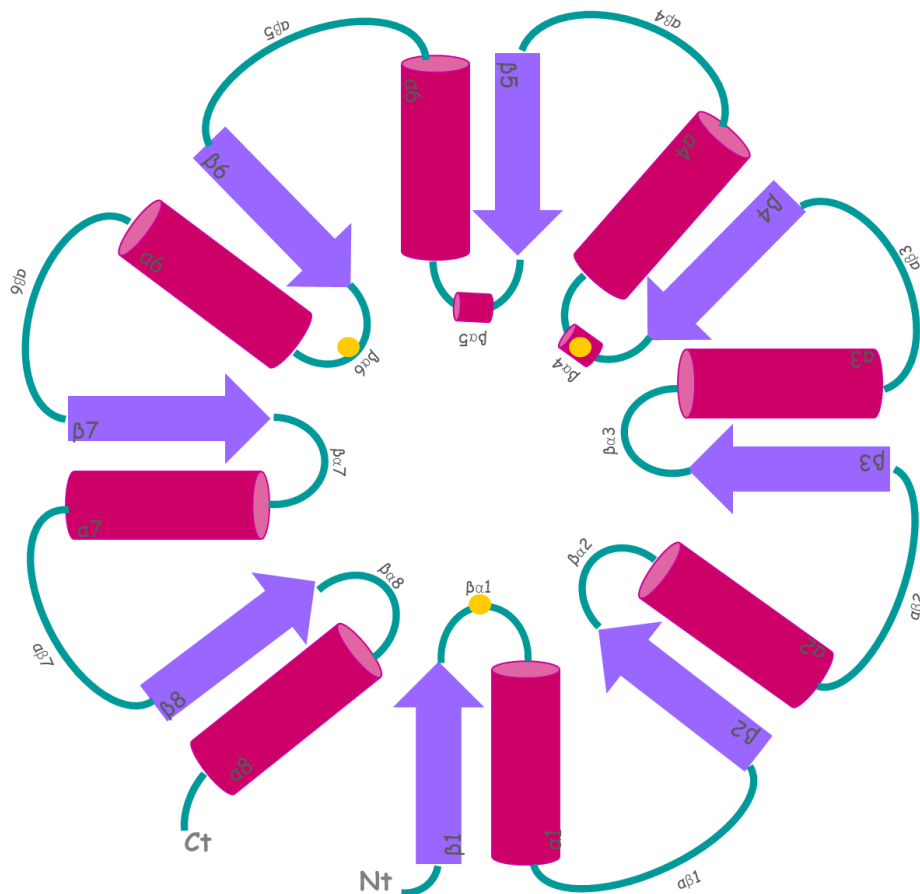


Figura 11.- Esquema de la topología TIM $(\beta\alpha)_8$, se señala el amino terminal (Nt), carboxilo terminal (Ct), 8 hebras β , 8 hélices α , las asa de ida ($\beta \rightarrow \alpha$) $\beta\alpha$ y las asas de regreso ($\alpha \rightarrow \beta$) $\alpha\beta$. En puntos amarillos se indican las asas que contienen los residuos catalíticos.

El sitio activo se encuentra ubicado en las asas de ida. Tres son los residuos centrales en la catálisis: lisina 13(asa $\beta\alpha$ -1), histidina 95 (asa $\beta\alpha$ -4) y ácido glutámico 165 (asa $\beta\alpha$ -6), tomando como referencia la cadena polipeptídica de la TIM de *Homo sapiens* (HsTIM). Es relevante señalar, que los tres residuos se encuentran conservados en las TIMs de todas las especies (Fig. 12).

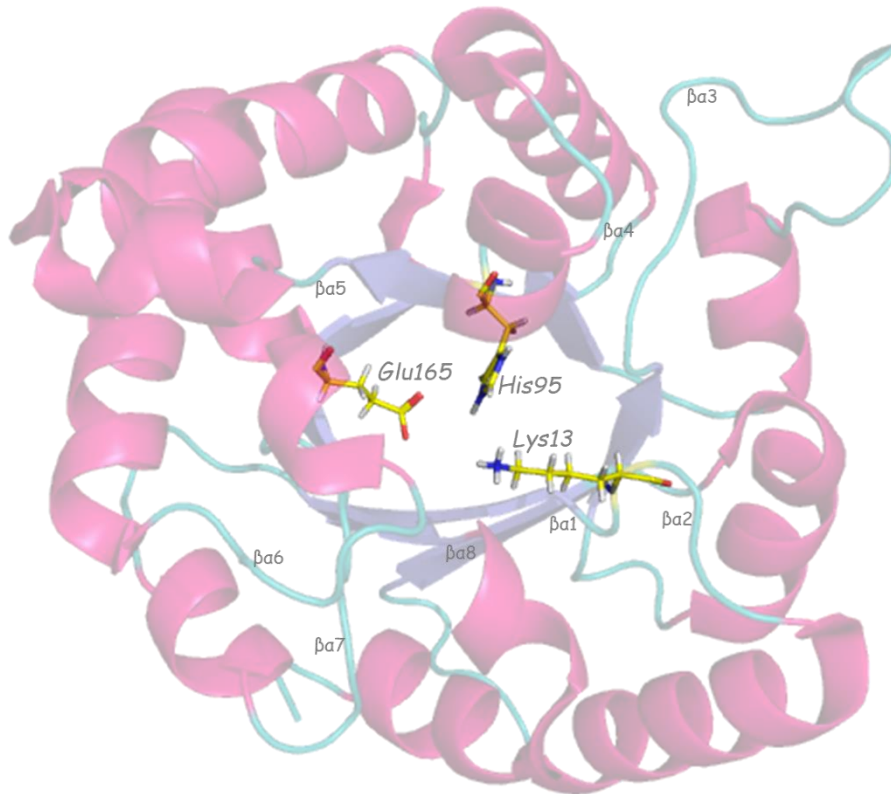


Figura 12.- Barril TIM de *Homo sapiens* (HsTIM) (PDB 4POC). En bastones amarillos, se señala los residuos catalíticos: K13, H95 y E165. En gris oscuro se muestran las asas $\beta\alpha$ y en blanco las asas $\alpha\beta$.

○ Actividad biológica

Durante la glucólisis y la gluconeogénesis la TIM cataliza la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por una reacción de isomerización. Esta enzima cataliza la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el carbono 1 al carbono 2, en una reacción de oxidorreducción intramolecular. La isomerización ocurre a través de un intermediario enediol (Voet, 2011). La TIM presenta una eficiencia catalítica de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; lo

cual indica que esta catálisis es limitada por difusión y por tanto es reconocida como una enzima perfecta. La cadena lateral del Glu165 se encuentra situada idealmente para sustraer el hidrógeno del carbono 1 del DHAP, mientras que la cadena lateral de His95 está posicionada apropiadamente para protonar al oxígeno carbonílico de DHAP. La cadena lateral de la Lys13, cargada positivamente, estabiliza electrostáticamente el estado de transición que se encuentra negativamente cargado.

Estructuralmente el sustrato es atrapado en una cavidad hidrofóbica. El extremo del asa $\beta\alpha$ -6 tiene un motivo “de unión a fosfato” el cual está comprometido en la unión del sustrato. Su movimiento está acoplado a la exclusión del sustrato del solvente, lo cual evita la formación de metil glicoxal fosfato durante la catálisis. La estructura de la TIM puede estar en conformación abierta o cerrada. Las estructuras abiertas tienen el asa $\beta\alpha$ -6 abierta ampliamente y las estructuras cerradas tienen esta asa en una conformación cerrada, cubriendo la cavidad catalítica. Aunado a esto, se ha observado que las asas $\beta\alpha$ -7 y $\beta\alpha$ -8 están más abiertas en la conformación abierta que en la cerrada; no obstante, la magnitud de la transición conformacional de estas dos asas entre el estado abierto y cerrado es mucho menor en comparación con la del asa $\beta\alpha$ -6. En la mayoría de los casos, las estructuras sin ligando están en conformación abierta, pues no obstante, las excepciones ocurren debido a cambios en la secuencia o por mutaciones dirigidas en una sección de la proteína.

○ Interfaz

Las TIMs silvestres, son activas principalmente como dímeros y en algunas Arqueas como tetrameros. La dimerización ocurre a través de la asociación de dos monómeros, lo que origina la formación de la interfaz dimérica. Ésta se compone de las asas $\beta\alpha$ 1,2, 3 y 4 de cada subunidad. El asa $\beta\alpha$ -3 de una subunidad va hasta la cavidad cercana del centro catalítico de la otra subunidad introduciéndose entre la $\beta\alpha$ -1 y 4 y ocultando entre ellas al asa $\beta\alpha$ -2 (Fig. 13). El asa $\beta\alpha$ -3 participa de manera directa en la estabilización de la interfaz dimérica, a partir de mantener interacciones entre ambos monómeros. Algunos residuos del asa $\beta\alpha$ -3

interactúan a través de contactos de Van der Waals con los residuos del sitio activo de la otra subunidad, estabilizando el sitio activo. Las estructuras cristalinas de todas las TIMs, muestran que los residuos del asa $\beta\alpha$ -3 (65-79), forman la mayoría de los contactos entre las dos subunidades.

La dimerización es requerida para la actividad catalítica. En los esfuerzos de comprender la naturaleza oligomérica de la TIM, ha sido propuesto que las TIMs monoméricas son termodinámicamente inestables y que el ensamble de las subunidades induce una máxima estabilidad conformacional. Además, también ha sido argumentado que la dimerización es necesaria para optimizar la geometría del sitio activo (Nájera, 2003)

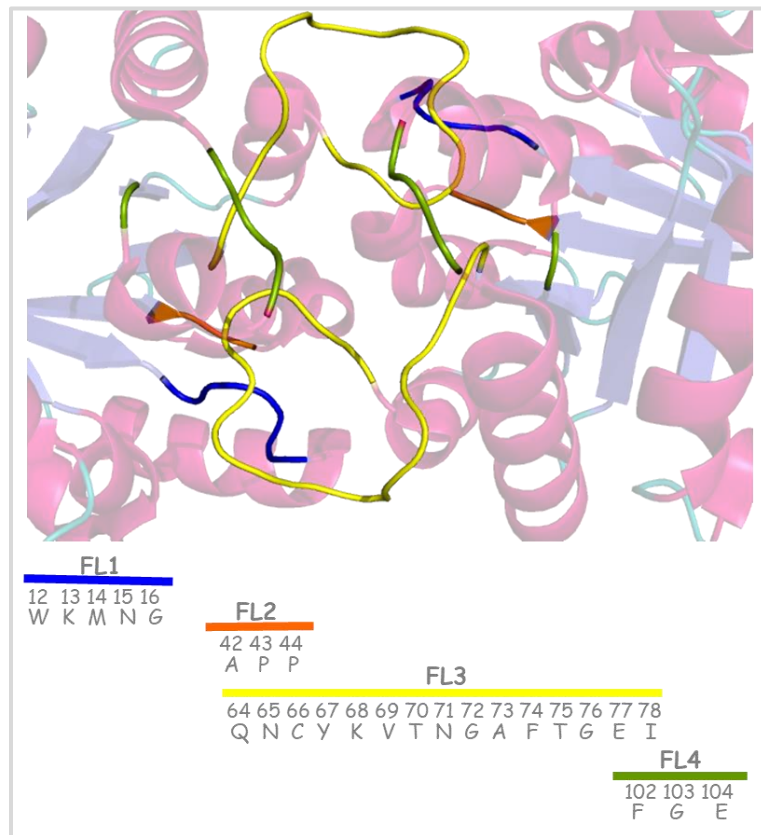


Figura 13.- Caracterización estructural de la interfaz de las TIMs. Se muestran las 4 asas que integran la interfaz. Se describe los residuos que integran cada asa, tomando como referencia HsTIM.

Importancia de la interfaz

El análisis de componentes principales de la TIM (Katebi, 2014), muestra que la dimerización incrementa la rigidez de ciertas asas y la dinámica de otros. El asa $\beta\alpha$ -3, el más grande y de mayor movilidad, al introducirse en la otra subunidad entierra el $\beta\alpha$ -2. Este proceso, ocasiona una reducción de las fluctuaciones de ambas asas. Dos arreglos simétricos de este tipo, uno por cada monómero, producen una interfaz fuerte entre ambas subunidades. La dimerización mantiene a las asas en el sitio y reduce su dinámica. Aunado a esto, se disminuye las fluctuaciones de las asas $\beta\alpha$ -1 y $\beta\alpha$ -4. El decremento en el movimiento de estas asas es requerido para estabilizar la posición de los residuos catalíticos en el sitio activo: K13 en el asa $\beta\alpha$ -1 e H95 en el asa $\beta\alpha$ -4. La reducción de las fluctuaciones también estabiliza la estructura e incrementa los movimientos a lo largo de las regiones del asa $\beta\alpha$ -6, 7 y 8. El incremento del movimiento es necesario para el reclutamiento del sustrato y la liberación del producto. En resumen, la dimerización disminuye las fluctuaciones de las asas $\beta\alpha$ -1,2,3 y 4 de cada subunidad, cambiando no solo la dinámica sino también la correlación con las asas $\beta\alpha$ -6, 7 y 8, aumentando sus fluctuaciones para el reclutamiento del sustrato, la actividad catalítica y la liberación del producto (Katebi, 2014).

Hidratación de la interfaz

En 2008 se estudió la interfaz de la TIM de humano (HsTIM) (Almazán, 2008). Específicamente se indagó la mutación del glutamato 104 a aspartato (E104D). Esta mutación origina una enfermedad autosómica que clínicamente se manifiesta en anemia hemolítica, desordenes neuromusculares, alteraciones neurológicas y cardiopatía; ocasionando la muerte del individuo (Almazán, 2008). El estudio de E104D reveló que la actividad de la enzima se reduce en más de un orden de magnitud relativo a la enzima silvestre. Al analizar los residuos catalíticos, se reconoció que no existía perturbaciones estructurales o geométricas; sin embargo, la baja asociación de los dímeros sugería que la mutación afecta la asociación de los monómeros. Al hacer un análisis estructural de la TIM de diferentes especies, se identificó

que el residuo 104 es parte de un grupo de residuos conservados entre ambas subunidades: Asn65, Glu77, Arg98, Glu104 y Lys112, orientados cara a cara con una distancia de alrededor de 10 Å entre los residuos 104 de ambas subunidades, formando la mayor cavidad de la enzima, con un área de 670 Å² y un volumen de 812 Å³. Estos 5 residuos están presentes en 1043 secuencias de TIMs analizadas, excepto en las arqueobacterias. La conservación sugiere que su presencia puede ser esencial para el ensamble de dímeros pues los 10 residuos están unidos por un grupo de interacciones polares, sin embargo, el único contacto directo intermolecular es el puente salino que se forma entre el Glu77 de una subunidad y la Arg98 de la otra, el resto de las interacciones están mediadas vía solvente. Por tanto, la mutación E104D rompe la red de moléculas de agua conservadas que mantienen la interfaz y la estabilidad de los dímeros de las TIMs.

Con el objetivo de reconocer la red de moléculas de agua conservadas en HsTIM y el resto de las TIMs, Almazán, C., *et al-*, 2008, estudiaron las moléculas de agua de 15 TIMs de 13 diferentes especies a una resolución de 2.4 Å o más, incluyendo la estructura a alta resolución de *Leishmania mexicana*. Los resultados mostraron que hay 18 moléculas de agua conservadas, tres de las cuales están localizadas en la vecindad del sitio activo de un monómero. Las 15 restantes cuentan con un área accesible al solvente alrededor de 10Å² y se encuentran rodeadas del grupo de residuos conservados incluyendo el E104, indicando por tanto que estas moléculas de agua están totalmente ocultas. En promedio cada una de ellas hace más de 4 contactos polares con cualquier residuo o con otra molécula de agua. Al estar rodeadas por residuos que forman la cavidad principal, se sugiere que la red de aguas conservadas se forma durante el proceso de dimerización.

La estructura de E104D HsTIM y la HsTIM silvestre exhiben marcadas diferencias entre los residuos y las moléculas de agua que forman el grupo de los 10 residuos conservados. Se sugiere que el núcleo de residuos conservados aunado a las moléculas de agua que hidratan esta zona, son cruciales para mantener la estabilidad de los dímeros (Fig. 14A). La mutante E104D induce la pérdida de contactos de cadena lateral, que perturban la red conservada de

moléculas de agua, lo que repercute en la asociación de los monómeros y por en tanto una disminución en la actividad catalítica de la enzima (Fig. 14B).

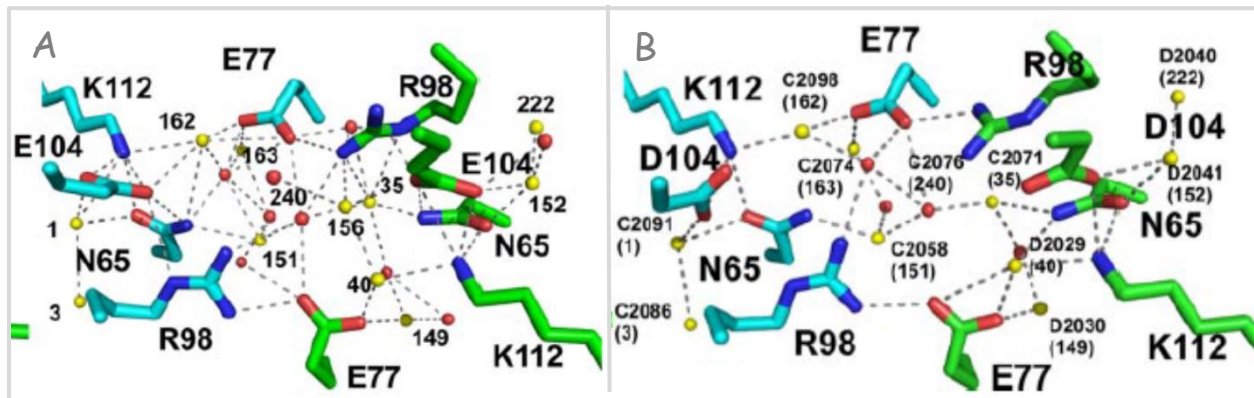


Figura 14.- La mutación E104D perturba tanto el grupo de residuos conservados como la red de moléculas de agua conservadas. A) HsTIM silvestre E104. B) HsTIM mutante D104. En ambos paneles, se muestra el grupo de residuos conservados (N65, E77, R98 y K114). En esferas se muestran las moléculas de agua; en amarillo (●) moléculas de agua conservadas y en rojo (●) moléculas de agua no conservadas. Las líneas punteadas representan las interacciones polares a una distancia de 3.5Å. Tomado de Almazán, C., *et al.*, 2008.

Hidratación de la interfaz y su correlación con el mecanismo de plegamiento

En el trabajo de Romero, S., *et al.*, 2018 estudiaron la relación entre la hidratación de la interfaz y el mecanismo de plegamiento. Los autores efectuaron ensayos al equilibrio, con el objetivo de reconocer el mecanismo de plegamiento de la TIM de *Zea mays* (ZmTIM). Los experimentos de desnaturalización por urea se siguieron por dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, así como por actividad catalítica al variar la concentración de proteína. Los resultados mostraron un mecanismo de dos estados ($N2 \rightleftharpoons 2D$); distinto al plegamiento del resto de la TIM de eucariontes, que frecuentemente exhiben la presencia de estados intermedios (Romero, 2018). Con el propósito de identificar características estructurales del estado nativo que estén correlacionadas con el mecanismo de plegamiento descrito, se resolvió la estructura de ZmTIM por cristalografía de rayos X. La estructura se reportó a 1.8 Å de resolución, registrada con el código PDB 6CG9. Finalmente, al comparar distintas características de la interfaz de ZmTIM con otras TIMs de eucariontes; tal como el número de

puentes de hidrógeno, el número de puentes salinos y el número de moléculas de agua que hidratan la interfaz se propuso que esta última propiedad puede desencadenar la presencia de un mecanismo u otro. A partir del análisis con el programa “Water Analysis Package software” (WAP), y la inspección del mapa de densidad electrónica con el programa COOT, se identificó que la interfaz de ZmTIM está hidratada por 16 moléculas, un número reducido en comparación con el resto de las estructuras evaluadas, que cuentan con más aguas en la interfaz y pueblan estados intermedios (Fig. 15).

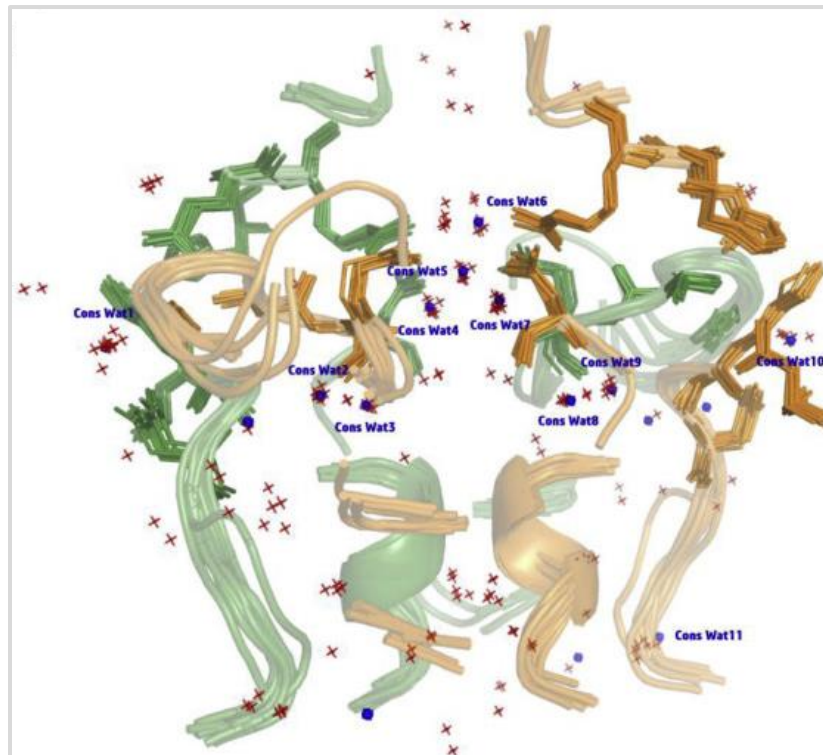


Figura 15.- Moléculas de agua de la interfaz de ZmTIM. Se muestra la superposición de diferentes estructuras de la TIM del dominio Eucarya. Las moléculas de agua de ZmTIM conservadas entre todas las TIMs, son mostradas en esferas azules (●). Los residuos conservados son representados en bastones. Cada monómero es representado en verde y naranja. Tomado de Romero, S., et, - al., 2018.

Al evaluar el caso de *Leishmania mexicana* para la cual se han reportado tanto mecanismos de dos estados como de tres estados, dependiendo de las condiciones de pH a la cual se realizan los experimentos, se reconoció que son 17 aguas las que hidratan su interfaz. Por tanto, este

valor de hidratación en relación con los distintos mecanismos de plegamiento podría considerarse el límite entre una interfaz poco y altamente hidratada. Fue así como se planteó la hipótesis de que el grado de hidratación de la interfaz puede estar relacionado con el número de estados presentes en el mecanismo de plegamiento. Como primera aproximación a la evidencia señalada, se mantiene la hipótesis de que un mecanismo de desplegamiento de dos estados es favorecido por una interfaz poco hidratada, integrada principalmente por un área no polar. De ahí que, la disociación de los monómeros en el proceso de desplegamiento debe acompañarse de un aumento sustancial en la hidratación de la interfaz, lo cual probablemente ocasiona rearrreglos substanciales, que conllevarían a la inestabilidad de los monómeros aislados, causando un desplegamiento en ausencia de estados intermedios. En contraste, para aquellos dímeros que se despliegan con la formación de estados intermedios, se propone que están integrados por una interfaz altamente hidratada y favorecida por interacciones polares que pueden estabilizar el complejo. Así, cuándo ocurre la disociación en el desplegamiento, los monómeros son menos propensos a cambios conformacionales y, por tanto, es posible detectar la presencia de intermediarios parcialmente plegados

JUSTIFICACIÓN

Con el empleo del programa “Water Analysis Package” (WAP) y los ensayos de Almazán, C., *et al.*, 2008 y Romero, S., *et al.*, 2018; se ha podido detectar un número aproximado de moléculas de agua que hidratan la interfaz de las TIMs, no obstante, consideramos relevante contemplar tanto las características estructurales de la interfaz; es decir el tamaño, la composición y polaridad de la interfaz así como las propiedades de hidratación; esto es el número de moléculas de agua en la interfaz (HOHs interfaz), al igual que el número de moléculas de agua en cada región; dentro y fuera de la cavidad, HOHs CavP y HOHs fCavP respectivamente. Pues consideramos que la contemplación de ambas variables (características estructurales y propiedades de hidratación) amplían el número y diversidad de rasgos, que en conjunto o de manera independiente pueden desencadenar un mecanismo de plegamiento determinado. Además, extender este análisis a otras especies tanto del dominio Eucarya como del Bacteria y Arquea, nos brindará más información de esta posible correlación en la TIMs.

HIPÓTESIS

Las características estructurales y las propiedades de hidratación de la interfaz de la Triosafosfato Isomerasa, determinan la presencia de rearreglos sustanciales o ligeros en la interfaz y en consecuencia el número de estados visitados en el mecanismo de desplegamiento químico.

OBJETIVO

Se busca proponer un protocolo que permita identificar las características estructurales y las propiedades de hidratación de la interfaz de la Triosafofato Isomerasa de distintas especies de los dominios Bacteria, Archaea y Eucarya. Con la finalidad de confirmar si ambos rasgos se correlacionan con el mecanismo de desplegamiento químico de las TIMs. En el caso de encontrar correlación, para aquellas TIMs que carecen de ensayos de desnaturalización química, se buscará plantear una predicción del número de estados visitados en el mecanismo de desplegamiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar y evaluar las características de la interfaz y las propiedades de hidratación de la interfaz de las TIMs

Reconocer si las características de la interfaz y las propiedades de hidratación de la interfaz se encuentran conservadas en los tres dominios de la vida.

Determinar si hay una correlación entre las características estructurales y las propiedades de hidratación de la interfaz evaluadas y los mecanismo de desplegamiento químico descritos

Rastrear si las propiedades de hidratación han seguido una o más direcciones evolutivas entre los tres dominios de la vida.

METODOLOGÍA

1. Criterios para la selección de las TIMs de estudio

Se emplearon los siguientes tres criterios para seleccionar las estructuras de estudio:

- 1) Presencia de solvente cristalográfico
- 2) Límite máximo de resolución 2.3 Å (Debido que la detección de moléculas de solvente depende de la resolución y los límites entre una resolución atómica y una resolución baja, se encuentran entre 1.2 Å y ~2.5Å, decidimos 2.3 Å como un límite máximo en el que con mayor seguridad podemos identificar moléculas de agua)
- 3) Ausencia de mutaciones

Tomando en cuenta los tres criterios anteriores, en los casos posibles, se eligieron dos estructuras por especie; la de más alta y baja resolución, con la finalidad de observar el efecto de este parámetro en las propiedades de hidratación. En el Protein Data Bank (PDB) se realizó una búsqueda a partir del número de la comisión enzimática (E.C) para las TIMs, 5.3.1.1., seleccionando aquellas que cumplieron con los criterios señalados. Con el objetivo de conocer los estadísticos cristalográficos de cada estructura; se recopilaron la resolución, los valores de valor de R-work y R-free, así como la presencia de ligando y el año de liberación.

2. Descripción de las características de interfaz

A partir del servidor Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies (PISA), (https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver) que distingue como residuos de interfaz a aquellos que pierden área accesible al solvente (ASA) y que contribuyen al área superficial oculta (BSA) en la formación del ensamblaje. Se obtuvo el valor del área de la interfaz, el número y los residuos que la integran, así como el BSA y porcentaje de ocultamiento de cada residuo para ambos monómeros. Posteriormente, con el servidor EMBOSS Pepstates (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/), el cual realiza un cálculo

estadístico de distintas propiedades de las proteínas, se realizó un registro del número y tipo de residuos polares y no polares que integran la interfaz de cada estructura. A partir del cálculo correspondiente, con la cantidad de residuos polares y no polares se obtuvo el porcentaje de área polar y no polar en la interfaz de cada proteína.

3. Descripción de las características de interfaz de otros dímeros (DIMs)

Con la finalidad de identificar si el protocolo propuesto para las TIMs mantiene los valores reportados con anterioridad para las características de interfaz otros dímeros (DIMs), se realizó un control a partir de las estructuras reportadas en el artículo de Dey (Dey S., *et. - al.*, 2010). De esta manera, en el presente trabajo el número de estructuras analizadas por este autor se redujo considerablemente.

4. Diseño y ejecución del protocolo para la identificación estructural de aguas en la interfaz

Con el objetivo de identificar el nivel de hidratación de la interfaz, se empleó el software WAP utilizado en Romero, S., *et. - al.*, 2018. Al corroborar estructuralmente las aguas identificadas, se distinguió que no todas las moléculas que hidratan esta región eran tomadas en cuenta por WAP. Por lo que se juzgó conveniente elaborar un protocolo que permitiera identificar con certeza el número, ubicación y distribución espacial del total de moléculas de agua que hidratan la interfaz de las TIMs.

El primer paso fue obtener el archivo .pdb, con la finalidad de ubicar estructuralmente los residuos y las aguas que integran la interfaz. Dado que algunas estructuras no contaban con el archivo .pdb que contiene el ensamble biológico, se generó con el visualizador PYMOL utilizando el código “fetch “código pdb”, type=pdb1” y “split_state “código pdb”. En el mismo visualizador, se distinguieron estructuralmente los residuos de la interfaz (identificados en PISA) para cada monómero. Con la herramienta de búsqueda de interacciones polares, se

determinaron para cada residuo las interacciones residuo-residuo y residuo-agua, formadas a una distancia de puente de hidrógeno de 2.4 a 3.6 Å.

De las aguas identificadas en las interacciones residuo-agua, se consideraron moléculas de agua de la interfaz a aquellas que:

- Interactúan con los residuos de uno o ambos monómeros de la interfaz
- Se encuentran embebidas entre los residuos del ensamble y por lo tanto aisladas del solvente superficial (a excepción de aquellas que se ubican en la abertura de la cavidad principal)

Para cada estructura se generó una base datos que cuenta con tres apartados generales:

- 1) Residuos que componen la interfaz. Para cada residuo, se detalla el valor del ASA, del BSA y el porcentaje de enterramiento
- 2) Descripción de las interacciones residuo-residuo y residuo-agua. Para el total de residuos de cada monómero. Se reportan los átomos que participan en la interacción, así como la distancia de ésta.
- 3) Enlistado de moléculas de agua identificadas como parte de la interfaz. Se especifica a qué monómero corresponde cada molécula de agua, los residuos con los que interactúa y la distancia a la cual se establece el puente de hidrógeno.

5. Clasificación de las moléculas de agua de interfaz (HOHs interfaz)

Con el objetivo de identificar regiones de hidratación delimitadas y distintas dentro de la interfaz de las TIMs, las moléculas de agua de interfaz (HOHs interfaz) se clasificaron. Tomando en cuenta que la cavidad de mayor volumen en la topología de las TIMs se forma entre los residuos de ambos monómeros que integran el ensamble, consideramos dos categorías:

- I) Moléculas de agua de la cavidad principal (HOHs CavP)
- II) Moléculas de agua fuera de la cavidad principal (HOHs fCavP)

I. Moléculas de agua de la cavidad principal (HOHs CavP)

Son aguas que ocupan e hidratan el volumen de la cavidad principal (CavP). Considerando lo reportado por Almazán, C., *et. - al.*, 2008, estas aguas pueden mantener puentes de hidrógeno con N65, D77, R98, E104 y K112 (numeración considerada para HsTIM (PDB 2JK2)), así como con otros residuos, dependiendo del volumen y otras características de la CavP. En cavidades con volúmenes mayores, también se tomaron en cuenta aguas que interactúan exclusivamente con otras aguas, pero no con los residuos de interfaz. Estas aguas adicionales, se contabilizaron siempre y cuando se ubicaran en el interior de la CavP y no en las proximidades de la abertura, pues se consideró que aguas con mayor exposición a la superficie, se intercambian con el solvente superficial con mayor facilidad. Finalmente, al ser la CavP una cavidad abierta con una o más aberturas a la superficie, se consideró HOHs CavP a aquellas que están ubicadas dentro de la cavidad en los límites de la abertura; por lo tanto, las moléculas de agua que rodean los límites superficiales de la abertura, se descartaron.

II. Moléculas de agua fuera de la cavidad principal (HOHs fCavP)

Son aguas que interactúan con los residuos de interfaz de uno o ambos monómeros y que están aisladas del solvente superficial y de la cavidad principal. Estas aguas están totalmente inmersas o enterradas en el ensamble.

6. Obtención de las características de la cavidad principal (CavP)

El servidor “Computer Atlas of Surface Topography of Proteins” (CASTp) (Binkowski, 2003) localiza, delimita y mide superficies cóncavas en la estructura tridimensional de proteínas. CASTp provee la información de los residuos y átomos que participan en la formación de

cavidades. Proporciona los valores del volumen (basado en la superficie molecular), del área superficial molecular, el número de abertura y área de cada una, a partir de utilizar el modelo de superficie accesible al solvente (Richards' Surface), así como el modelo de superficie molecular (Connolly's Surface). Con el uso de CASTp, se determinó el valor de los parámetros de la cavidad principal de las TIMs, que en principio ha sido reportada como una (Almazán, C., *et. - al.*, 2008 & Olivares, V., *et. - al.*, 2017). No obstante, para determinadas estructuras, el software contempló más cavidades o fragmentos pequeños, que en conjunto forman la CavP. En estos casos, se consideraron los fragmentos correspondientes, así como la adición de los valores para cada característica (volumen, área de la abertura, número de aberturas y área superficial molecular).

7. Construcción de la base de datos general

Se elaboró una base de datos general que recopila la información extraída de los distintos softwares utilizados, así como aquella generada al aplicar el protocolo para la identificación de moléculas de agua. La base de datos reporta el nombre de la especie, ID PDB de la estructura, la resolución, el número de aminoácidos, la abreviatura de la TIM, número de residuos de interfaz, área de la interfaz, porcentaje de área polar y no polar, aguas en la estructura, aguas de interfaz, agua de CavP y aguas fCavP, volumen superficial de la cavidad, área superficial molecular de la cavidad, número de aberturas, área de la abertura y número de cavidades.

8. Evaluación de las características estructurales de interfaz en las TIMs, entre dominios y en otros dímeros

A fin de contrastar las propiedades de interfaz de los DIMs y las TIMs; así como entre dominios de TIMs: Eucarya (EuTIMs), Bacteria (BacTIMs) y Archaea (ArcTIMs); se analizaron los valores de distribución, promedio, desviación estándar y varianza del área de interfaz, la composición

de residuos y porcentaje de área polar. Para este y posteriores análisis, a excepción del estudio de la resolución; para las TIMs se consideró exclusivamente los valores de las estructuras a alta resolución. En Muscle alignment (Edgar, 2004), con los residuos de interfaz reportados por PISA, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias para identificar los residuos conservados en todas las TIMs. Con el objetivo de distinguir si los residuos conservados se mantienen entre EuTIMs y BacTIMs, se ejecutó un segundo y tercer alineamiento. Se determinó la ubicación estructural, la polaridad y las interacciones que mantienen los residuos conservados.

9. Evaluación de las propiedades de hidratación de interfaz en las TIMs y entre dominios

Se obtuvo la distribución, la frecuencia, la media, la desviación estándar y la varianza de las HOHs interfaz, HOHs CavP y HOHs fCavP de las TIMs. Se hizo una comparación de los valores entre EuTIMs, BacTIMs y ArcTIMs. Con los mismos parámetros estadísticos se evaluaron las características de la CavP: el número y tipo de residuos que conforman la cavidad, el volumen, el área superficial molecular, número de aberturas, área de la(s) abertura(s) y el número de cavidades; en todas las TIMs y entre dominios.

10. Evaluación filogenética de las propiedades de hidratación de la interfaz

En el servidor Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (Kumar, 2018), se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, que permitió construir el árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud. Se evaluó la clasificación de las TIMs en relación con las propiedades de la interfaz y las propiedades de hidratación.

11. Evaluación de las moléculas de agua conservadas: ubicación e interacciones

El servidor 3-Dimensional Structural Superposition (3d-SS) (Praveen, 2008) superpone las estructuras y localiza las aguas invariables con una distancia mínima y máxima de 0 a 1.8 Å. Se utilizó este servidor con las propiedades establecidas, para localizar las aguas conservadas en las TIMs, entre los dominios EuTIMs y BacTIMs; así como en phyla con mayor representación de especies para cada dominio. Se distinguió si las HOHs conservadas son de CavP o fCavP. Se reconoció su ubicación estructural, así como las interacciones que mantiene con los residuos del ensamble, ya sean conservados o no.

12. Correlación entre el nivel de hidratación y los mecanismos de plegamiento

Se recopiló información sobre los mecanismos de plegamiento por desnaturalización química reportados para EuTIMs y BacTIMs. Se evaluó la correlación entre los valores de las características de la interfaz y las propiedades de hidratación con el mecanismo de desplegamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. TIMs seleccionadas

Hasta el 14/03/22, se identificaron 234 estructuras depositadas para la Triosafofosfato isomerasa en el PDB. Con un total de 51 especies más la reconstrucción del ancestro de eucariontes. Las estructuras pertenecen a los tres dominios de la vida y en su totalidad han sido resueltas por cristalografía de rayos X entre 1975 y 2021. La Tabla 4 resume el número de estructuras publicadas por dominio. Se detallan las especies, el número de estructuras, el número de estructuras con mutaciones, el intervalo de resolución y año de publicación. El 83% de las estructuras pertenecen a EuTIMs, seguido por las BacTIMs con un 15 % y en menor porcentaje las ArcTIMs, solo con el 2 %.

Estructuras de Triosafofosfato isomerasa depositadas en el PDB					
Dominio	Especie	Estructuras	Mutantes	Rango de resolución (Å)	Año de liberación
EuTIMs	<i>Ancestro reconstruido de la TIM de eucariontes</i>	1	0	1.9	2019
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8	6	1-2.5	2015-2020
	<i>Caenorhaditis elegans</i>	1	0	1.7	2020
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	0	1.1	2014
	<i>Coccidioides immitis RS</i>	1	0	2.2	2011
	<i>Cryptosporidium parvum Iowa II</i>	1	0	1.55	2009
	<i>Entamoeba histolytica</i>	1	0	1.5	2002
	<i>Fasciola hepática</i>	1	0	1.9	2020
	<i>Gallus gallus</i>	17	11	1.34-2.85	1976-2014
	<i>Giardia intestinalis</i>	5	5	1.45-2.7	2007-2013
	<i>Homo sapiens</i>	17	9	1.5- 2.8	1995-2020
	<i>Leishmania mexicana</i>	13	12	0.82-2.0	1997-2021
	<i>Leishmania sp. Siamensis</i>	2	0	1.88 -1.93	2013-2016
	<i>Opisthorchis viverrini</i>	4	2	1.5-1.7	2018
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	4	0	1.5-2.85	2003-2014
	<i>Penaeus vannamei</i>	1	0	1.7	2016
	<i>Plasmodium falciparum</i>	31	27	1.1-2.8	1997-2017
	<i>Rhizoglyphus microplus</i>	1	0	2.4	2011
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	4	1.2-2.8	1991-2003
	<i>Scylla paramamosain</i>	1	0	1.8	2019
	<i>Schistosoma mansoni</i>	1	0	2.14	2020
	<i>Taenia solium</i>	1	0	2	2006
	<i>Tenebrio molitor</i>	1	1	1.8	2006
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	12	7	1.2-2.35	2015-2018
	<i>Trypanosoma brucei</i>	1	0	2.36	1997
	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	49	31	1-3	1991-2016
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	8	3	1.5-2.3	1999-2013
	<i>Toxoplasma gondii</i>	1	0	2	2017
	<i>Zea mays</i>	1	0	1.8	2018

Estructuras de Triosafosfato Isomerasa depositadas en el PDB					
Dominio	Especie	Estructuras	Mutantes	Rango de resolución (Å)	Año de liberación
BacTIMs	<i>Bartonella henselae</i>	1	0	1.6	2009
	<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457	1	0	2.1	2013
	<i>Burkholderia thaliandensis</i> E2664	1	0	2.35	2012
	<i>Clostridium perfringens</i> str.	1	0	1.54	2015
	<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	1	0	2.1	2015
	<i>Escherichia coli</i>	5	1	1.43-2.8	1993-2014
	<i>Francisella tularensi</i>	1	0	2.65	2017
	<i>Gemmata obscuriglobus</i>	1	0	1.58	2015
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	2	1	2.4-2.85	1990-1996
	<i>Helicobacter pylori</i>	1	0	2.3	2007
	<i>Leptospira interrogans</i> serovar	2	0	1.87-2.08	2016
	<i>Moritella marina</i>	2	0	2.65-2.7	1998
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	0	1.41-1.55	2009-2011
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	0	1.9-2.5	2011-2012
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	1.7	2020
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	1.65	2016
	<i>Streptomyces coelicor</i>	1	0	2.29	2015
	<i>Synechocystis</i> sp.	1	0	1.78	2018
	<i>Thermus thermophilus</i>	1	0	1.6	2005
<i>Thermotoga maritima</i>	1	0	2.85	2000	
Dominio	Especie	Estructuras	Mutantes	Rango de resolución (Å)	Año de liberación
ArcTIMs	<i>Methanocaldococcus jannaschi</i>	1	1	2.3	2007
	<i>Pyrococcus woesei</i>	1	0	2.7	2001
	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	2	0	1.94-2.17	20016
	<i>Thermoproteus tenax</i>	1	1	2.5	2004

Tabla 4.- Listado de las especies de TIMs que cuentan con estructura en el PDB. Se resume el número de especies y estructuras por dominio; (■) Eucarya (EuTIMs), (■) Bacteria (BacTIMs) y (■) Archaeas (ArcTIMs). Se detalla el número de estructuras con mutación, el rango de resolución de las estructuras y el o los años en los que se resolvió la estructura.

Considerando la ausencia de mutaciones como un criterio para la selección de las estructuras. Se identificó que el 61% de las EuTIMs presentan mutaciones, 118 de las 195 estructuras publicadas. En contraste, la TIM de *Escherichia coli* (EcTIM) y la de *Geobacillus stearothermophilus* (GsTIM) son las BacTIMs que cuentan con cambios en la secuencia; que es igual el 6%. De igual manera, la TIM de *Methanocaldococcus jannaschi* (MjTIM) y *Thermoproteus tenax* (TtTIM) son las dos ArcTIMs que cuentan con mutaciones. Este hecho, aunado a la baja resolución de las estructuras de este dominio hicieron que el número de ejemplares seleccionados para el análisis disminuyera notablemente.

Así pues, a partir de los tres criterios de selección se eligieron un total de 52 estructuras, muestreando un total de 40 especies. 31 estructuras de 24 especies diferentes para EuTIMs. Ocho de las cuales cuentan con estructuras a alta y baja resolución. Adicionalmente, en este dominio se incluyó el ancestro reconstruido de la TIM de eucariontes (An(eu)TIM). Para las BacTIMs se escogieron 19 estructuras y un total de 15 especies, 4 con estructuras a alta y baja resolución. Por último, para las Arqueas se seleccionó únicamente a la TIM de *Thermoplasma acidophilum* (TaTIM) tanto a alta como a baja resolución. En la Tabla 5 se detallan las especies seleccionadas por dominio, el ID PDB, la resolución, el año de liberación, los valores de R-work y R-free, el número de aminoácidos y la presencia o ausencia de ligando.

A								
TIMs Eukarya (EuTIMs)								
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	Año liberación	R-work	R-free	No. aa	Ligando
1	<i>Arabidopsis thaliana</i> citosolica	4OBT	1.6	2016	0.17	0.19	257	-
2	<i>Arabidopsis thaliana</i> cloroplasto	4OHQ	2.15	2015	0.17	0.21	256	-
3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1M00	1.7	2002	0.18	0.21	275	SO4/ ACT
4	<i>Cryptosporidium Pavarum</i>	3KRS	1.55	2009	0.16	0.19	271	NA/UNX
5	<i>Coccidioides immtis</i>	3S6D	2.2	2011	0.19	0.23	310	NA
6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4MKN	1.1	2014	0.16	0.18	270	MRD/MPD
7	<i>Entamoeba histolytica</i>	1M6J	1.5	2002	0.18	0.21	261	-
8	<i>Fasciola hepatica</i>	6R8H	1.9	2020	0.19	0.22	250	SO4
9	<i>Gallus gallus</i>	1TPH	1.8	1994	-	-	247	-
10	<i>Homo sapiens</i>	4POC	1.6	2015	0.15	0.19	254	PO4/BR/K/NA
11	<i>Leishmania siamensis</i>	5CG7	1.88	2015	0.17	0.20	271	GOL
12	<i>Leishmania mexicana</i>	1AMK	1.83	1997	0.11	-	251	PGA
13	<i>Opisthorchis viverrini</i>	5ZFX	1.75	2018	0.16	0.20	272	MG
14	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1R2R	1.5	2003	0.16	0.19	248	TRS/DMS/MG
15	<i>Penaeus vannamei</i>	5EYW	1.7	2016	0.19	0.24	249	PGA
16	<i>Plasmodium falciparum</i>	1LYX	1.9	2003	0.18	0.21	248	PGA
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1NEY	1.2	2003	0.13	0.15	247	13P
18	<i>Schistosoma mansoni</i>	600I	2.14	2020	0.18	0.23	256	PGA/GOL/CL/NA
19	<i>Taenia solium</i>	600G	2.02	2020	0.18	0.22	253	PGA/ NA
20	<i>Trichomonas vaginalis</i>	3QST	1.75	2012	0.15	0.18	255	NA
21	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1TCD	1.83	1999	0.19	0.25	249	-
22	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	3Q37	1.65	2011	0.19	0.22	251	-
23	<i>Zea mays</i>	6CG9	1.8	2018	0.14	0.18	256	GOL/ACT
24	Ancestro reconstruido de TIM	6NEE	1.9	2019	0.16	0.20	252	PGH




TIMs Bacteria (BacTIMs)								
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	Año liberación	R-work	R-free	No. aa	Ligando
25	<i>Bartonella henselae</i>	3KXQ	1.6	2009	0.16	0.19	275	EDO/NO3
26	<i>Brucella melitensis</i>	4NVT	2.1	2013	0.18	0.23	262	-
27	<i>Clostridium perfringens</i>	4Y8F	1.54	2015	0.15	0.18	251	ACT/ NA
28	<i>Deinococcus radiodurans</i>	4Y90	2.1	2015	0.14	0.19	247	SO4/GOL/CA/NA
29	<i>Escherichia coli</i>	4MVA	1.43	2014	0.14	0.16	279	JVV/PEG/PO4/EDO/CL
30	<i>Gemmata obscuriglobus</i>	4Y96	1.58	2015	0.18	0.20	255	PO4/CA/NA
31	<i>Helicobacter pylori</i>	2JGQ	2.3	2008	0.20	0.25	233	QGA/PO4
32	<i>Leptospira interrogans</i> serovar	4YMZ	1.87	2016	0.17	0.21	251	13P, SO4, EDO
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3TA6	1.41	2011	0.13	0.16	267	FLC
34	<i>Staphylococcus aureus</i>	3M9Y	1.9	2011	0.16	0.21	254	CIT/NA
35	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6W4U	1.7	2020	0.17	0.22	259	CL/NA
36	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5IBX	1.65	2016	0.20	0.23	255	Na
37	<i>Streptomyces coelicor</i>	4Y9A	2.29	2015	0.23	0.28	261	-
38	<i>Synechocistis</i> sp.	6BVE	1.78	2018	0.15	0.19	245	PGA/NA
39	<i>Thermus thermophilus</i>	1YYA	1.6	2005	0.17	0.18	250	PO4/NA

TIMs Archaea (ArcTIM)								
40	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	5CSR	1.94	2016	0.18	0.22	226	GOL/CL



B								
TIMs Eukarya (EuTIMs)								
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	Año liberación	R-work	R-free	No. aa	Ligando
41	<i>Homo sapiens</i>	1WYI	2.2	2005	0.25	0.30	250	-
42	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1R2T	2.25	2003	0.18	0.22	248	-
43	<i>Plasmodium falciparum</i>	1YDV	2.2	1997	0.19	0.25	248	-
44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1YPI	1.9	1991	-	-	247	-
45	<i>Trichomonas vaginalis</i>	3QSR	2.05	2012	0.15	0.18	255	NA
46	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1SUX	2	2004	0.18	0.19	251	BTS/ SO4
47	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	1IHH	2.2	2001	-	-	250	3PG

TIMs Bacteria (BacTIMs)								
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	Año liberación	R-work	R-free	No. aa	Ligando
48	<i>Escherichia coli</i>	4IOT	1.85	2013	0.17	0.20	255	SO4
49	<i>Leptospira interrogans</i> serovar	2x22	2.08	2016	0.15	0.19	250	PGO, EDO
50	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3VGV	1.55	2009	0.14	0.16	283	GOL
51	<i>Staphylococcus aureus</i>	3UWW	2.25	2012	0.20	0.24	261	3PG/DTT

TIMs Archaea (ArcTIM)								
52	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	5CSS	2.17	2016	0.18	0.23	226	G3P/CL

Tabla 5.- Base de datos de las TIMs de estudio. () EuTIMs, () BacTIMs y () ArcTIMs. **A)** Se lista las TIMs que cuentan con una sola estructura o la estructura de mayor resolución para las especies con dos estructuras. **B)** Se lista las TIMs de menor resolución para las especies con dos estructuras. Para ambas listas, se describe el ID PDB, la resolución, el año de liberación, el valor de R-work y R-free, el número de residuos y la presencia de ligando.

2. Bases de datos al ejecutar el protocolo para la identificación estructural del número de aguas que hidratan la interfaz

La ejecución del protocolo en las 52 estructuras de la TIM, permitió construir la base de datos que se señala en el punto 4 de la metodología. En el Anexo 1, a manera de ejemplo, se muestra la base de datos generada para la TIM de *Zea mays* (ZmTIM PDB 6CG9). En el apartado 3 de la base de datos, se distingue en cian () HOHs CavP y en azul () HOHs fCavP. Las moléculas de agua sin coloración interactúan con los residuos de la interfaz; sin embargo, no son HOHs de interfaz, pues no cumplen con los requerimientos detallados en el punto 4 de la metodología.

3. Base de datos general

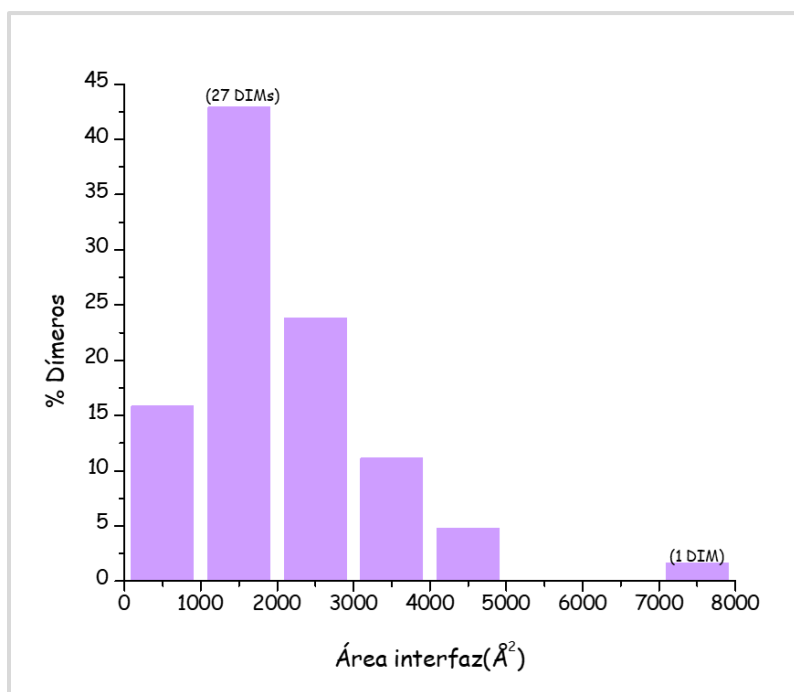
Con la información de PISA (área de la interfaz, número y tipo de residuos de la interfaz), EMBOSS Pepstates (% de área polar y no polar en la interfaz) y CASTp (volumen, área, número de entradas y área de la entrada de la cavidad principal); así como la información generada al aplicar el protocolo, es decir: el número total HOHs interfaz, HOHs CavP y HOHs fCavP, se generó la base de datos general que resume todos los valores obtenidos para cada variable. (Anexo 2). De esta base de datos se extrajo la información para realizar los análisis que se detallan a continuación.

4. Evaluación de las propiedades de la interfaz

A continuación, se detalla el análisis comparativo entre las TIMs y los DIMs. Se examina el tamaño, la composición de residuos y el porcentaje de área polar en la interfaz. Adicionalmente se muestran los resultados de los residuos conservados en la interfaz de las TIMs, así como en EuTIMs y BacTIMs.

○ Tamaño de interfaz

Con los criterios descritos en el punto 1 de la metodología, se seleccionaron un total de 63 estructuras de dímeros. Éstos muestran una amplia distribución en el tamaño de la interfaz; con una amplitud de 608 Å² a 7135 Å² por subunidad (Graf. 1). En contraste con lo reportado por Dey, S., *et al.*, 2010, el límite inferior es superior (365 Å²) y el límite superior es semejante (7000 Å²). El 43 % de los DIMs tienen una distribución de 1000 a 2000 Å² (27 estructuras), el 16% se distribuye en el área más pequeña, entre 500 y 900 Å² y una sola estructura (2%); la amino oxidasa de cobre (PDB 1OAC) muestra la interfaz de mayor tamaño, 7135 Å². El valor promedio del área de la interfaz en los DIMs difiere con lo reportado (1785



Å²) por Dey, S., *et al.*, 2010; 291 Å² menor que nuestros resultados (2076 Å² (±291 Å²)). El aumento en el valor del área promedio de la interfaz y la disminución en el intervalo puede deberse al número y resolución de las estructuras evaluadas.

Gráfico 1.- Distribución del área de interfaz de los DIMs

Por otra parte, la distribución de frecuencia del área de la interfaz de las 40 TIMs evaluadas va de 1459 a 1783 Å² (Graf. 2). Esto es, una diferencia de 324 Å², (22.2%) en la interfaz más grande con respecto a la más pequeña. Una diferencia sustancial al tratarse del área de interfaz de una misma topología. A pesar de esta diferencia, el 75% de las TIMs cuentan con interfaces por debajo de 1650 Å². Se observa un máximo entre 1600 y 1650 Å² (14 estructuras), seguido por un segundo pico en el valor de área más pequeño, de 1450 a 1500 Å²(10 estructuras). Ya que aparentemente se observa una distribución bimodal, nos preguntamos si los máximos corresponden a TIMs de dominios particulares, o si, por el contrario, la distribución de tamaños no está relacionada con el dominio de procedencia de la TIM. Es importante resaltar que el máximo de distribución del área de interfaz de las TIMs se localiza en el mayor pico de distribución de los DIMs evaluados.

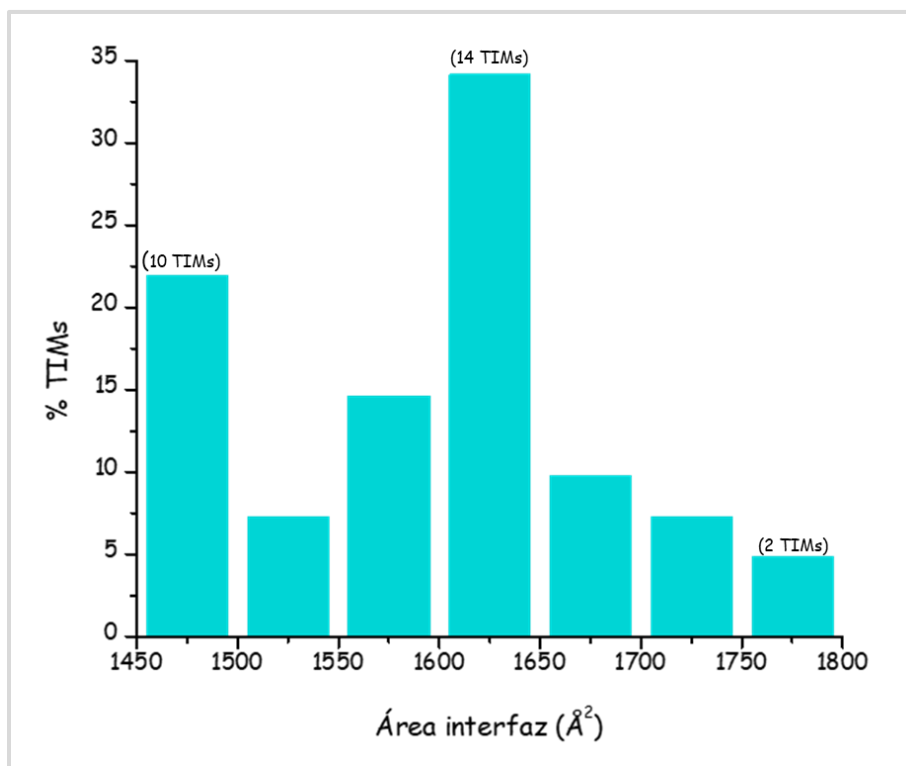


Gráfico 2.- Distribución del área de interfaz en las TIMs.

La media del área de interfaz de las TIMs es de $1595 \text{ \AA}^2 (\pm 83)$, aunque la moda es en el siguiente intervalo de 1600 a 1650 \AA^2 . No obstante, el valor promedio muestra ligeras diferencias entre EuTIMs, BacTIMs y ArchTIM. Siendo este último dominio representado únicamente por la TIM de *Thermoplasma acidophilum* (TaTIM) (PDB 5CSR). La media del tamaño de la interfaz en EuTIMs es el mismo que en las TIMs, $1594 \text{ \AA}^2 (\pm 83)$. Para las BacTIMs, se observó un aumento de 10 \AA^2 respecto al promedio general, $1605 \text{ \AA}^2 (\pm 84)$, sin embargo, dado el valor de la desviación estándar, la diferencia no parece significativa. El tamaño de interfaz de TaTIM, la única ArchTIM, es de 1473 \AA^2 ; 122 \AA^2 menor que la media general (Graf. 3). Este resultado se había previsto, pues como ha sido señalado, las asas de las ArchTIMs son más cortas, provocando un área de interfaz dimérica más reducida en comparación con el resto de las TIMs. A pesar de ello, las TIMs de *Leishmania sp. Siamensis* (LsTIM) y *Leishmania mexicana* (LmTIM) también muestran interfaces pequeñas; 1459 \AA^2 y 1468 \AA^2 , respectivamente.

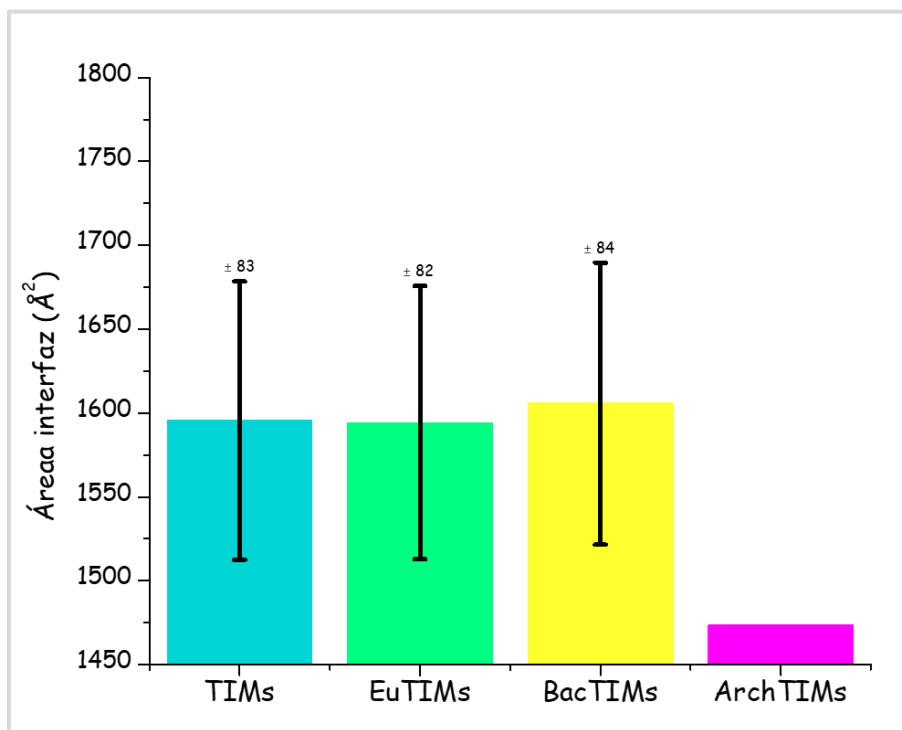


Gráfico 3.- Histograma con los valores promedios del área de la interfaz para las TIMs en general, y para cada dominio en particular. Se muestra la barra de error a excepción de las ArchTIMs, que corresponde a la TIM de *Thermoplasma acidophilum*.

○ Número de residuos

Al igual que en el tamaño de la interfaz, los DIMs muestran una amplia distribución en el número de residuos, con una amplitud de 18 a 195, y una media de 55 (± 30). Este último valor y la observación de una correlación positiva entre el número de residuos y el área de la interfaz ($R^2=0.97$) es similar a lo reportado por Dey, S., et al-, 2010 (Graf. 4A).

Para la TIMs, son en promedio 41(± 2) residuos los que integran su interfaz. Y este valor se mantiene entre las EuTIMs y BacTIMs. No obstante, al observar la distribución de residuos se distingue que el número puede variar en un 18%, yendo de 37 a 45(Graf. 4B). Al igual que en los DIMs se mantiene la correlación lineal entre el área de la interfaz y el número de residuos ($R^2=0.81$).

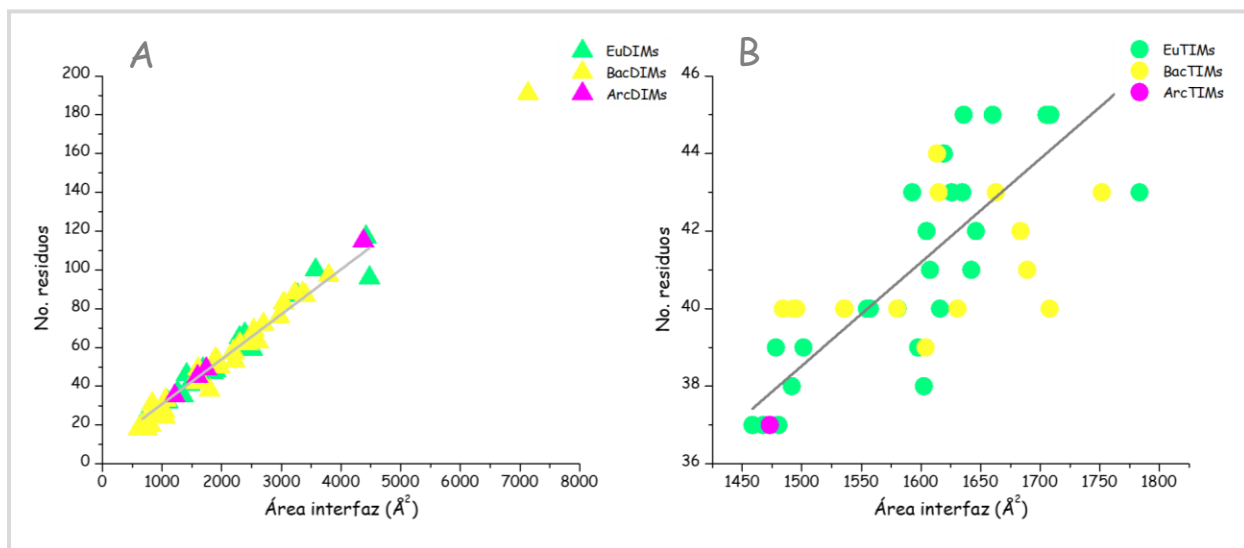


Gráfico 4.- Relación entre el número de residuos y el área de la interfaz para A) Dímeros ($R^2=0.97$). B) TIMs ($R^2=0.81$)

○ Composición de residuos

La composición de residuos no polares tanto alifáticos como aromáticos, en las TIMs y los DIMs es de 42% y 44% (± 2), respectivamente. Se distinguió una disminución en relación con lo reportado previamente para los DIMs (60%). Dentro de estos residuos la Gly, Ile y Met están representados 2% más en la TIMs que en los DIMs. Además, la Asn es el único aminoácido

polar sin carga, que se encuentra dos veces más frecuentemente en las TIMs que en los DIMs; 8 y 4%, respectivamente. En cuanto a los residuos polares cargados: Asp, Glu y Lys representan el 16%, tanto para las TIMs como para los DIMs; variando ligeramente el porcentaje de cada residuo. Por último, la Arg está más representada en los DIMs que en las TIMs, 6 y 3%, respectivamente (Graf. 5).

En resumen, el porcentaje de residuos no polares y polares en las TIMs es muy similar a los DIMs, tanto en lo evaluado en este estudio como lo descrito en los distintos trabajos (Dey, 2010). Sin embargo, surge la interrogante, si las ligeras diferencias identificadas en el porcentaje de ciertos residuos, repercute en la formación de interacciones que mantienen el ensamble a través de la interfaz, afectando en los niveles de hidratación de esta.

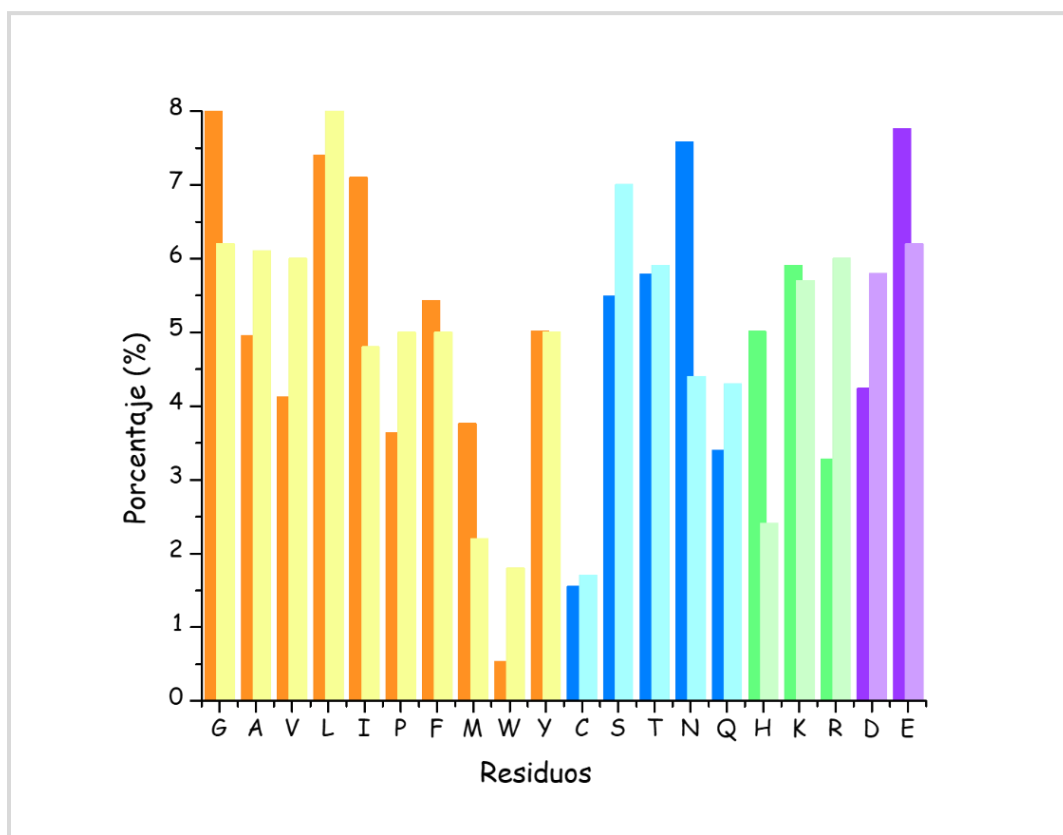


Gráfico 5.- Representación de cada residuo en la interfaz, tanto en las TIMs como en los DIMs. En barras oscuras se representa a las TIMs y en barras claras a los DIMs. Se distingue a los aminoácidos por no polares (naranja), polares sin carga (azul), polares con carga positiva (verde) y polares con carga negativa (púrpura).

○ Porcentaje de área polar

De los DIMs evaluados, dos cuartas partes se distribuyen entre 30 y 49% de área polar, y una cuarta parte (18 estructuras) entre 50 y 59% (Graf. 6A). Es relevante notar que el límite superior de área polar es mayor a lo descrito en los trabajos anteriores. Este aumento, también se ve reflejado en el valor promedio, 46% (± 11), 11% más de lo reportado por Dey, S., *et al.*, 2010. Nosotros proponemos que el aumento se puede deber a cuatro aspectos: 1) las 252 estructuras no evaluadas, de la base de datos de Dey, S., *et al.*, 2010, cuentan con menor porcentaje de área polar, lo cual originó un aumento en el valor promedio de área polar de las estructuras evaluadas 2) los programas utilizados, NACCESS para los trabajos de Dey y PISA para el nuestro, identifican diferentes residuos como parte de la interfaz. Es posible que PISA determine más residuos de carácter polar en comparación con NACCESS, 3) el límite máximo de resolución de nuestro trabajo (2.3 Å) dejó fuera a estructuras con interfaces que cuentan con un menor porcentaje de área polar y 4) las mutaciones que presentan distintas estructuras, no tomadas en cuenta en este trabajo, afecta el porcentaje de residuos polares en la interfaz.

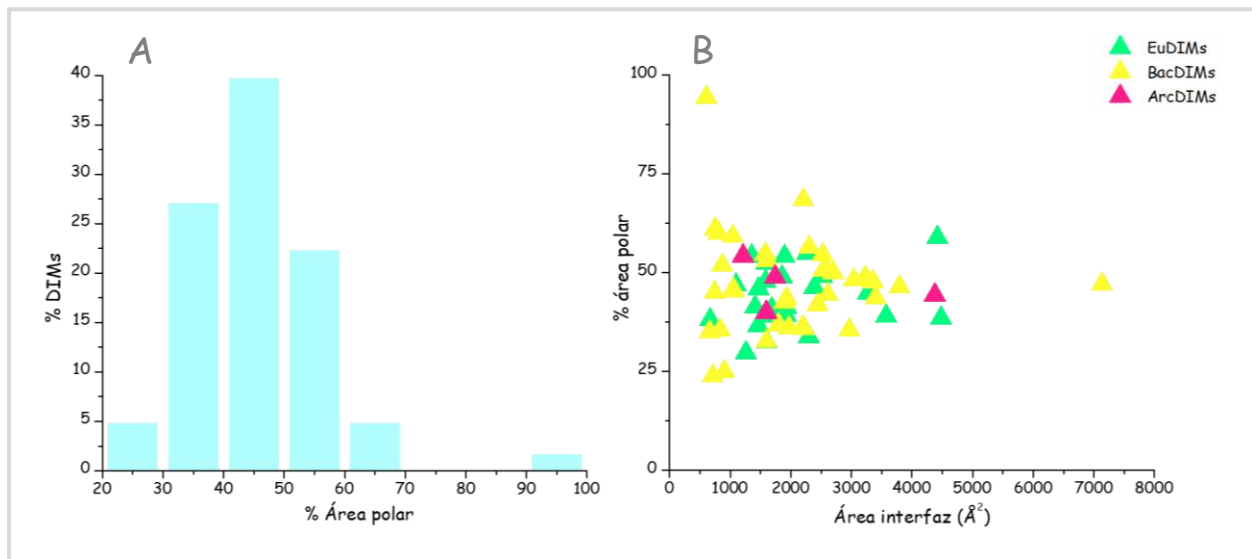


Gráfico 6.- Porcentaje de área polar para los DIMs. A) Distribución del porcentaje de área polar en los dímeros. B) Porcentaje de área polar en la interfaz de los dímeros, respecto al área de la interfaz.

El Gráfico 6B muestra que los DIMs con interfaces pequeñas (de 600 a $\sim 1000 \text{ \AA}^2$) cuentan con un amplio intervalo de área polar; de 23% a 94%. Al examinar la distribución los DIMs entre dominios, no se observa una correlación entre el porcentaje de área polar y el dominio al que pertenece la estructura.

El Gráfico 7A muestra que la distribución del porcentaje de área polar en la interfaz de las TIMs va de 35 a 65%, con un promedio de 49% (± 6), o lo que es igual a 775 \AA^2 del área total promedio (1595 \AA^2 por dímero).

Tanto la diferencia de 324 \AA^2 (22.2%) en el tamaño, como la diferencia de 30% en el porcentaje de área polar en la interfaz de las TIMs, son significativas ya que en todos los casos la interfaz está formada por los mismos elementos estructurales. Estas diferencias son las primeras evidencias de que la interfaz de las TIMs es más heterogénea y diversa de lo reportado hasta el momento. Aunado a esto, los resultados obtenidos, señalan que las TIMs son 14% más polares según lo reportado por Dey, S., *et al.*, 2010, y sólo 3% más polares que los DIMs evaluados en este trabajo

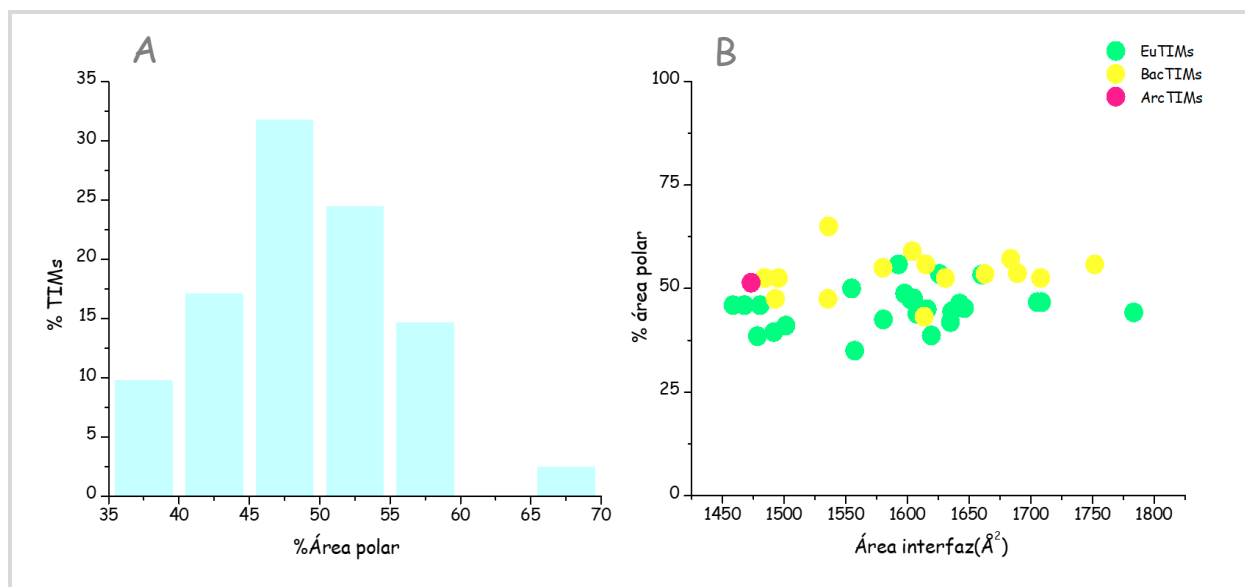


Gráfico 7.- Porcentaje de área polar en las TIMs. A) Distribución del porcentaje de área polar. B) Porcentaje de área polar en la interfaz, en relación con el tamaño de la interfaz.

Al analizar el Gráfico 7B, se aprecia tres aspectos fundamentales: 1) Se observa una gran dispersión en la polaridad de la interfaz de las TIMs, la cual va de 35 a 65%, 2) no hay una correlación entre el tamaño de la interfaz y el porcentaje de área polar y 3) existe una distribución diferenciada del porcentaje de área polar en los dominios. Las EuTIMs se distribuyen ente 35 y 50%. En contraste, la mayoría de las BacTIMs cuentan con interfaces más polares. El 80% de las BacTIMs, se distribuyen en porcentajes de área polar por arriba del 50%; a excepción de *Helicobacter pylori* (HpTIM), *Gemmata obscuriglobus* (GoTIM) y *Stenotrophomonas maltophilia* (SmaTIM). Así mismo, la TIM que exhibe la interfaz más polar es la de *Bartonella melitensis* (BmTIM) (PDB 4NVT), una BacTIM con un 65% de área polar. En cuanto a TaTIM, la única ArcTIM, se identificó un 51% de área polar. Al ser una sola estructura, no es confiable asignar diferencias con el resto de las TIMs.

A pesar de que el Gráfico 7B sugiere que la polaridad de las BacTIMs es mayor que la observada para las EuTIMs, el promedio del porcentaje de área polar de las BacTIMs (54 (±5)) no es significativamente diferente al obtenido para las EuTIMs (45 (±5)) (Graf. 8).

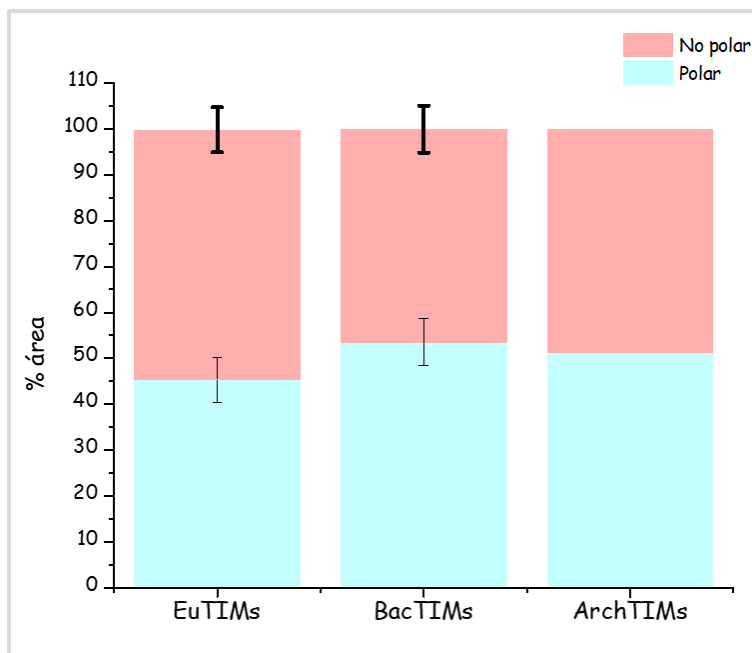


Gráfico 8.- Promedio del porcentaje de área polar y no polar en la interfaz de las TIMs para cada dominio.

Al evaluar el porcentaje de área polar, tanto en las TIMs como en los DIMs; se obtienen 3 conclusiones fundamentales (Graf. 9): 1) el porcentaje de área polar es independiente del tamaño de la interfaz, 2) Como era de esperarse la heterogeneidad en la polaridad de la interfaz de los DIMs (23 a 94%, 63 estructuras) es mucho más amplia que la encontrada para las TIMs (35 a 65%, 41 estructuras). Cabe aclarar que sólo el 15% de los DIMs ocupan los valores extremos; ~23% y 94% y 3) A pesar de que las TIMs cuentan con un porcentaje de polaridad más restringido y un valor promedio de área polar sin diferencias significativas, se distingue una distribución diferenciada entre dominios. Las EuTIMs son menos polares (35-56%) en comparación con las BacTIMs (43-65%). Estas conclusiones nos llevan a preguntarnos, respecto a las TIMs ¿dónde se distribuye el área polar dentro de la interfaz?, ¿los residuos no polares se encuentran distribuidos en el core de la interfaz? o por el contrario ¿forman parches?, y si es así, ¿en qué regiones a lo largo de la interfaz se distribuyen? Y finalmente ¿si los residuos polares extra, en las BacTIMs, estableciendo interacciones directas o formando una red de interacciones indirectas a través de moléculas de agua?

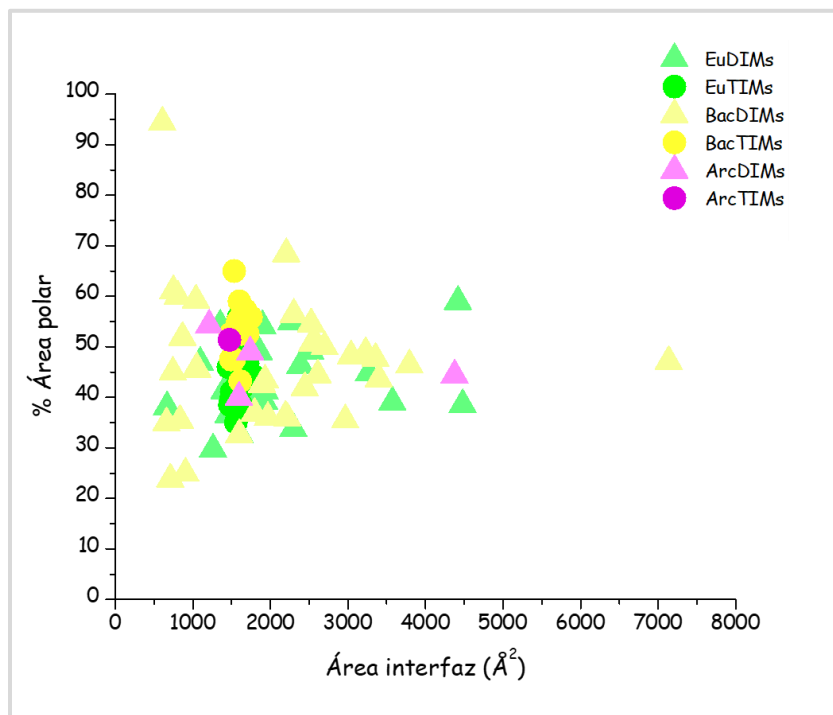


Gráfico 9.- Comparación del porcentaje de área polar en relación con el tamaño de la interfaz, entre las TIMs y los DIMs.

○ Residuos conservados

El alineamiento de secuencias múltiples realizado en MUSCLE, evidenció que de los 41 residuos (± 2) que en promedio componen la interfaz de las TIMs, sólo seis se encuentran conservados para ambos monómeros en los tres dominios. Tomando como referencia la numeración de la TIM de humano (HsTIM); los seis residuos son: la Lys13 del asa $\beta\alpha$ -1, la Thr75 y Gly76 del asa $\beta\alpha$ -3; la His95, el Glu97 y la Arg98 del asa $\beta\alpha$ -4 (Fig. 16). En principio, de estos resultados, se resalta que la Lys13 es un residuo que, en conjunto con el Glu97, posibilita la posición correcta de la His95, uno de los dos residuos catalíticos que también están conservados en todas las TIMs. No obstante, solo la His95 y la Lys13 son residuos que posibilitan la catálisis, respectivamente y que en adición integran la interfaz; ya que el Glu165 del asa $\beta\alpha$ -6, es el otro residuo catalítico, que también está conservado en todas las TIMs, pero no integra la interfaz. En segundo lugar, todos los residuos conservados se ubican dentro de un asa; ya sea el asa $\beta\alpha$ -1,3 o 4. A pesar de que el asa $\beta\alpha$ -3 es el que más contribuye a la interfaz tanto en número de residuos como en estabilidad; es el asa $\beta\alpha$ -4 quien cuenta con más residuos conservados (His95, Glu97 y Arg98). Finalmente, es importante aclarar que nuestros resultados no coinciden con lo reportado por Almazán, C., *et al.*, 2008. Entre ambos resultados, la R98 es el único residuo coincidente como conservado; pues la Asn65, Glu77, Glu104 y Lys112 no se mostraron como conservados en nuestro alineamiento de secuencia múltiple. Esta diferencia probablemente se debe a tres razones: 1) PISA no identifica a Asn65, Glu77, Glu104 y Lys112 como parte de la interfaz en todas las TIMs. Dicho de otra manera, los cinco residuos considerados por Almazán, C., *et al.*, 2008, si están conservados en todas las TIMs, sin embargo, no en todas las especies integran la interfaz, 2) el número de secuencias que se utilizó para el alineamiento, ocasiona la identificación de residuos distintos y 3) la realización del alineamiento múltiple muestra resultados distintos si se realiza exclusivamente con los residuos que integran la interfaz, como en nuestro caso; en comparación con la secuencia completa de la proteína.

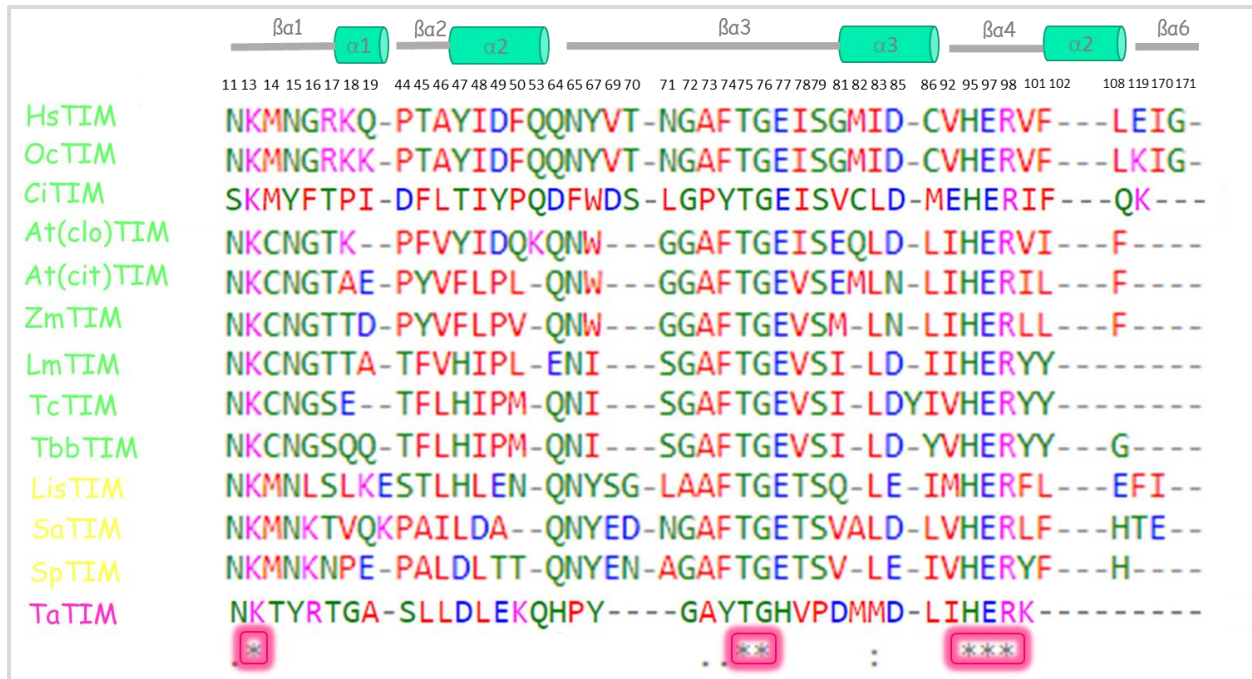


Figura 16.- Alineamiento múltiple de secuencia de los residuos de interfaz de las TIMs. A manera de ejemplo se muestra el alineamiento de algunas TIMs de cada dominio. En cuadros rosa, se señalan los residuos conservados: Lys13, Thr75, Gly76, His95, Glu97 y Arg98.

El segundo y tercer alineamiento para EuTIMs y BacTIMs, evidenciaron diferencias. En adición a los seis residuos conservados en la interfaz de todas las TIMs (Lys13, Thr75, Gly76, His95, Glu97 y Arg98) la interfaz de las EuTIMs cuenta con dos más: la Gly72 y el Glu77 situados en el asa β α -3 (Fig. 17A). Este último residuo coincidente con lo reportado por Almazán, C., *et al.*, 2008. Y por su parte, las BacTIMs cuentan con Asn11 en el asa β α -1 y la Leu83 en la hélice α3 (Fig. 17B).

Las diferencias en la conservación de residuos para EuTIMs y BacTIMs, no están vinculadas a los cambios en área polar de la interfaz para cada dominio. Razón por la cual se propone que la disparidad en el porcentaje de área polar entre los dos dominios no se encuentra en los residuos conservados; sino en aquellos que han cambiado en la TIM de cada especie.

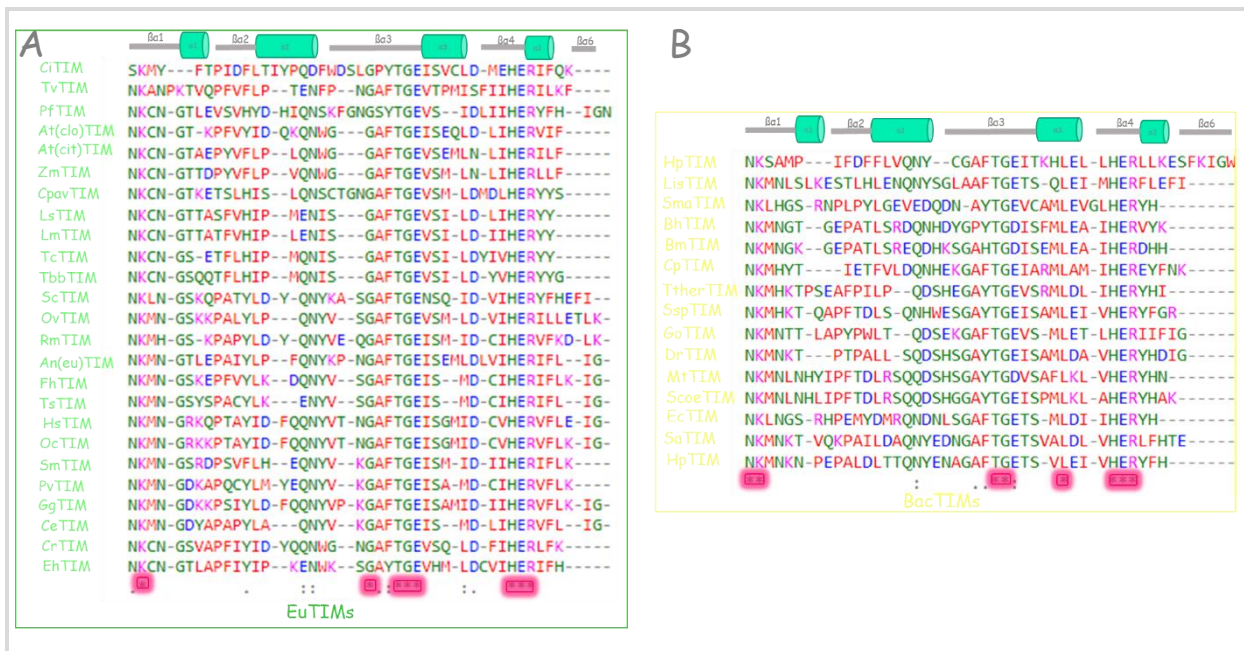


Figura 17.- Alineamiento múltiple de secuencia de los residuos de interfaz de las EuTIMs y las BacTIMs. Aunado a la Lys13, Thr75, Gly76, His95, Glu97 y Arg98. A) Las EuTIMs conservan la Gly72 y el Glu77. B) Las BacTIMs conservan la Asn11 y la Leu83.

Para concluir este punto es relevante recalcar que la conservación de residuos de la interfaz es una propiedad más, que aunada al tamaño de ésta y al porcentaje de área polar, enfatizan las diferencias significativas en las características de la interfaz entre EuTIMs y BacTIMs. A continuación se hace la evaluación de las propiedades de hidratación, lo cual nos mostrará si dichas diferencias repercuten en el número de moléculas de agua en la interfaz.

5. Evaluación de las propiedades de hidratación de interfaz

○ Hidratación de la interfaz

El número de moléculas de agua que hidratan la interfaz de las TIMs muestra una amplia distribución. Hay una diferencia de 39 moléculas de solvente, entre la interfaz más hidratada que pertenece a la TIM de *Cryptosporidium pavarum* (CpTIM n=55) y la TIM menos hidratada de *Thermoplasma acidophilum* (TaTIM n=16) (Graf. 10). Aunado al menor número de residuos y a la menor área de interfaz; era esperado que TaTIM, mostrara una hidratación reducida.

Aunque la distribución es amplia, el 58% de las TIMs (23 de 40 estructuras) cuenta entre 25 y 34 moléculas de agua.

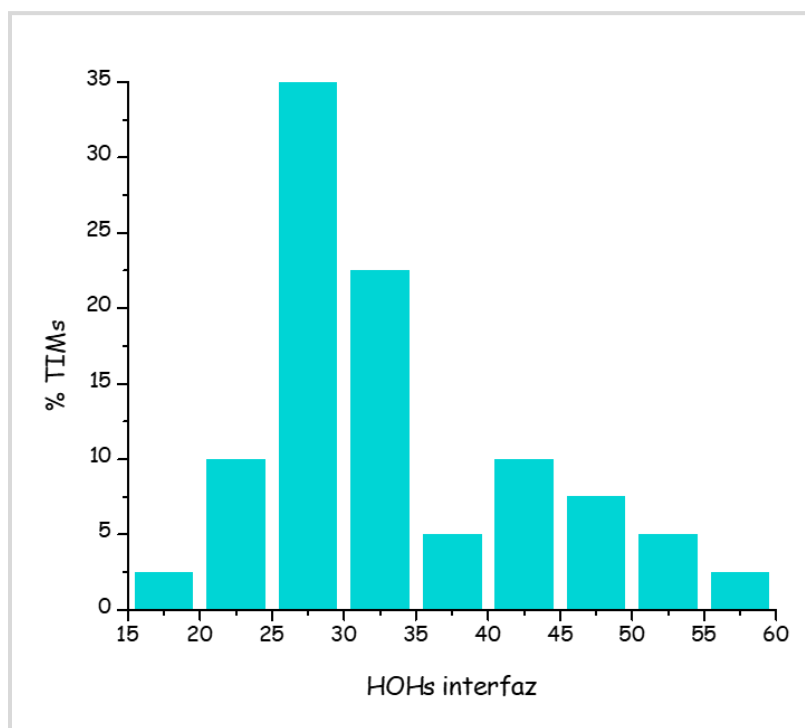


Gráfico 10.- Distribución de las HOHs de interfaz de las TIMs.

○ Hidratación de la interfaz respecto a la resolución

La posibilidad de detectar una molécula de agua en una estructura proteica está determinada no sólo por las características de la molécula sino por la resolución con la que se determina la estructura. Es claro que a resoluciones bajas no es posible detectar moléculas de solvente, por ello decidimos que 2.3 Å fuera el límite superior de resolución. Nuestros resultados entre el nivel de hidratación y la resolución no evidenciaron una correlación ($R^2=-0.18$) ($m=-4.68$) (Graf. 11). Para estructuras con la misma resolución, por arriba de 2 Å el nivel de hidratación exhibe una diferencia de 7 moléculas de agua. Y para resoluciones mejores de 2 Å, la hidratación muestra una diferencia de hasta 39 moléculas de agua. La ausencia de correlación entre ambos parámetros también se puede identificar al examinar la estructura con mejor resolución; que es la TIM de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrTIM) a 1.1 Å con 33 HOHs interfaz; 22 moléculas de agua por debajo de la TIM más hidratada, de CpTIM a 1.55 Å. De hecho, 33 HOHs interfaz,

también son observadas en otras TIMs con diferente resolución (ScTIM a 1.2 Å, OvTIM a 1.75 Å y OcTIM a 1.55 Å).

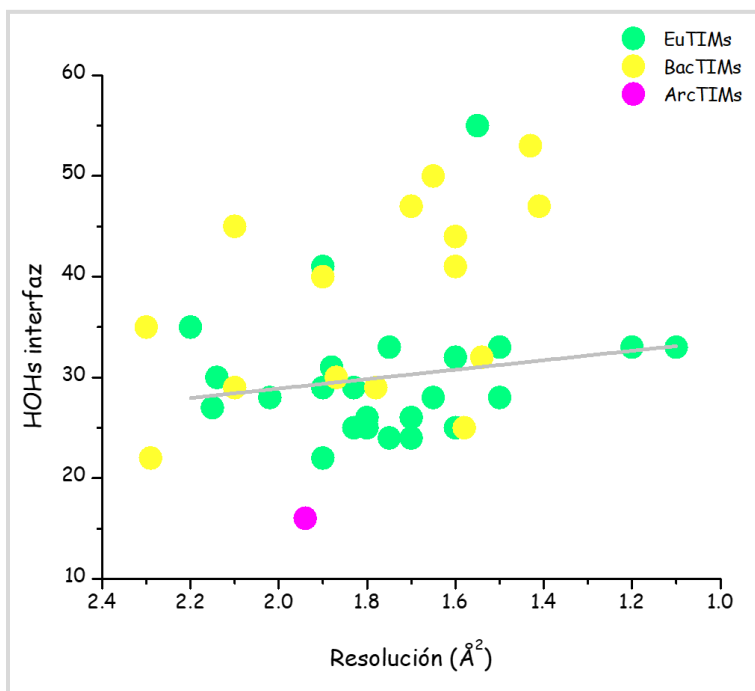


Gráfico 11.- Número de aguas en la interfaz respecto a la resolución. Se muestra la distribución de número de aguas en relación con la resolución. Se distingue la distribución de las HOHs por dominio.

El Gráfico 12 muestra como dos estructuras, de una misma especie, a baja y alta resolución, no necesariamente muestran el mismo número de moléculas de agua hidratando la interfaz. Se observan tres casos distintos: 1) La estructura a más alta resolución cuenta con más moléculas de aguas. Esto sucede en 5 de las 12 especies. PftTIM, ScTIM, TbbTIM, EcTIM y SaTIM; esta última con una diferencia de 2 moléculas de agua entre ambas estructuras, 2) la estructura a baja resolución muestra mayor hidratación que la estructura a más alta resolución. Esto ocurre en HsTIM, TvTIM y TcTIM (3 aguas adicionales), LsTIM y MtTIM (4 aguas adicionales) y TaTIM (8 aguas adicionales) y 3) Ambas estructuras muestran el mismo nivel de hidratación. Solo se observa en el caso de OcTIM. Cabe destacar que, si se mantiene la hipótesis de que las moléculas de agua en la interfaz integran una red de interacción entre los residuos de ambas subunidades, el número de moléculas de agua localizadas en esta región no tendría que variar con la resolución de la estructura. Las variaciones observadas podrían

deberse a los datos experimentales o a los métodos de afinamiento empleados en cada estructura.

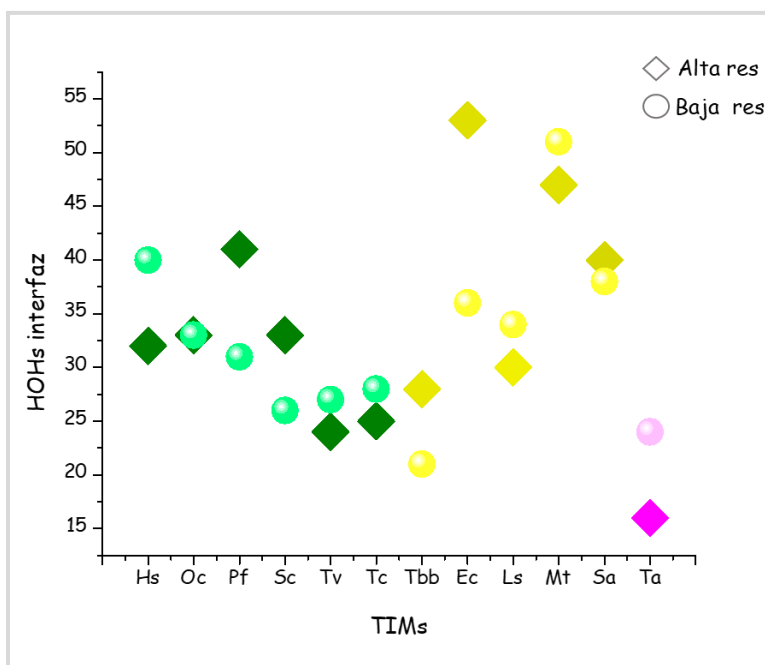


Gráfico 12.- Número de aguas que hidratan la interfaz de dos diferentes estructuras para la TIM de una misma especie. En rombo y tono oscuro (◊) estructuras a alta resolución, en esferas y tono claro (○) estructuras a baja resolución.

La Tabla 6 muestra un resumen de las especies evaluadas a dos resoluciones. Así como las diferencias en relación con la resolución, las estructuras también muestran pequeñas diferencias en el área de la interfaz, particularmente la TIM de *T. brucei* con 60.3 \AA^2 (correspondiente a 3.9%) y en el porcentaje de área polar (desviación máxima 3.3%). Estas diferencias podrían deberse a que PISA detecta distintos residuos como parte de la interfaz; lo que influye en el valor del área y por tanto en el porcentaje de área polar, repercutiendo en el número de aguas detectadas en esta región.

TIMs a ambas resoluciones

Especie	PDB ID	Resolución (Å)	R- work	R-free	Área interfaz (Å²)	% área polar	HOHs interfaz
<i>Homo sapiens</i>	4POC	1.6	0.15	0.19	1705.2	46.7	32
	1WYI	2.2	0.25	0.30	1659.4	46.7	40
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1R2R	1.5	0.16	0.19	1708.7	46.7	33
	1R2T	2.25	0.18	0.22	1720.1	50	33
<i>Plasmodium falciparum</i>	1LYX	1.9	0.18	0.21	1660.1	53.3	41
	1YDV	2.2	0.19	0.25	1653.6	55.8	31
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1NEY	1.2	0.13	0.15	1625.9	53.5	33
	1YPI	1.9	-	-	1599.8	53	26
<i>Trichomonas vaginalis</i>	3QST	1.75	0.15	0.18	1634.7	41.9	24
	3QSR	2.05	0.15	0.18	1751.6	43.18	27
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1TCD	1.83	0.19	0.25	1480.5	45.9	25
	1SUX	2	0.18	0.19	1462.6	48.71	28
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	3Q37	1.65	0.19	0.22	1602.4	47.4	28
	1IIH	2.2	-	-	1542.1	48.71	21
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3TA6	1.41	0.13	0.16	1683.7	57.1	47
	3GVG	1.55	0.14	0.16	1669.3	59.52	51
<i>Escherichia coli</i>	4MVA	1.43	0.14	0.16	1603.8	59	53
	4IOT	1.85	0.17	0.20	1640.2	57.5	36
<i>Leptospira interrogans serovar</i>	4YMZ	1.87	0.17	0.21	1751.9	55.8	30
	2X22	2.08	0.15	0.19	1731.7	59.09	34
<i>Staphylococcus aureus</i>	3M9Y	1.9	0.16	0.21	1614.8	55.8	40
	3UWW	2.25	0.20	0.24	1626.1	54.54	38
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	5CSR	1.94	0.18	0.22	1473.1	51.4	16
	5CSS	2.17	0.18	0.23	1481.1	48.71	24

Tabla 6.- Comparación de dos estructuras a alta y baja resolución de una misma especie. Se compara valores cristalográficos y propiedades de la interfaz: área, porcentaje de área polar y número de aguas.

○ Hidratación de la interfaz respecto al área de la interfaz

Por otra parte, se indagó si el área de la interfaz determina el número de moléculas de agua que la hidratan. El tamaño de la interfaz de las TIMs no presenta una correlación con el número de aguas que hidratan esta región ($R^2 = 0.22$) ($m=0.02$). Por ejemplo, al observar el área de interfaz en el intervalo más poblado por las TIMs (entre 1600 y 1650 Å²), se distinguen amplios niveles de hidratación, desde 22 hasta 53 moléculas de agua (Graf. 13).

El Gráfico 13 también permite distinguir una clara diferencia entre la distribución de hidratación de las EuTIMs y las BacTIMs. El 88% de las EuTIMs cuenta con una hidratación entre 22 y 35 moléculas de agua. A excepción de la TIM de *Plasmodium falciparum* (PFTIM) a 1.9 Å con 41 aguas y la TIM de *Cryptosporidium parvum* (CpavTIM) a 1.55 Å con 55 aguas, que se encuentran por fuera de este intervalo de distribución. Comparativamente, el 64% de las BacTIMs se distribuyen en límites superiores de hidratación, de 35 a 53 moléculas de agua. Salvo ScoeTIM, GoTIM, DrTIM, SspTIM, LisTIM y CpTIM con 22, 25, 29, 30 y 32 moléculas de agua, respectivamente.

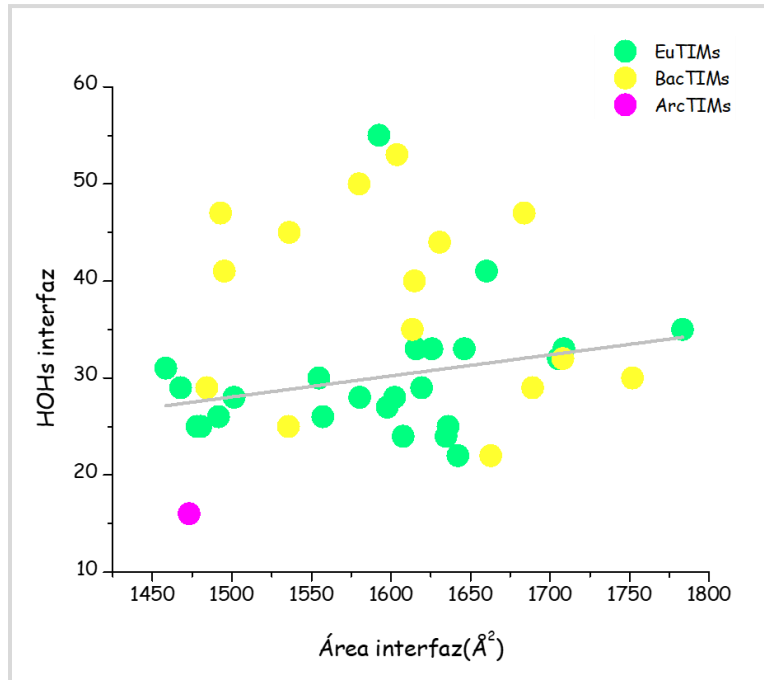


Gráfico 13.- Número de aguas en la interfaz respecto al área de la interfaz. Se distingue las TIMs por dominio.

○ **Hidratación de la interfaz respecto al porcentaje de área polar**

Se buscó identificar si particularmente el porcentaje de área polar determina el nivel de hidratación. Los resultados muestran una correlación entre estos dos parámetros ($R^2=0.64$) ($m=0.89$) (Graf. 14). Este resultado nos muestra de manera indirecta que, para la mayoría de las TIMs, el aumento de área polar en la interfaz posibilita la formación de interacciones entre los residuos de ambos monómeros mediadas por moléculas de agua.

Aunado a lo anterior, se buscó reconocer si el porcentaje de área polar determina por igual o de manera diferenciada la hidratación de las dos grandes regiones caracterizadas para la interfaz de las TIMs; la CavP y fCavP.

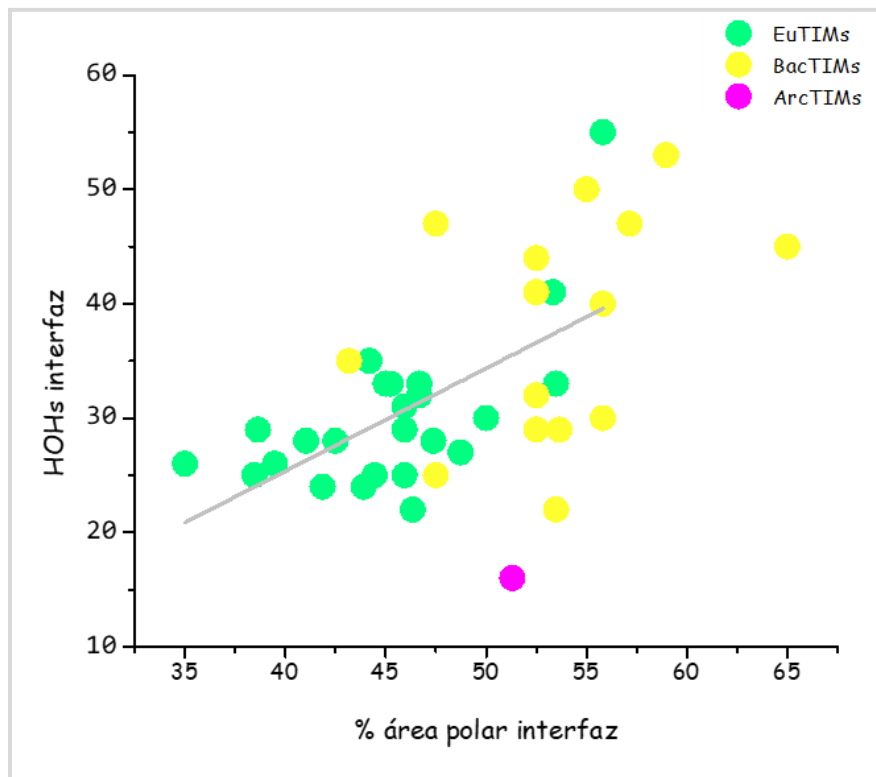


Gráfico 14.- Correlación entre el porcentaje de área polar en la interfaz y el número de moléculas de agua que la hidratan.

6. Hidratación en las TIMs y entre dominios

○ HOHs interfaz y su clasificación

En promedio las TIMs hidratan la interfaz con 33 moléculas de agua (± 9). No obstante, esta media cambia ligeramente entre los dominios; EuTIMs y BacTIMs. Las EuTIMs muestran una media de hidratación semejante a los valores generales de las TIMs, 30 moléculas de agua (± 7). Por arriba de ambas medias, tanto de TIMs como de EuTIMs, se encuentran las BacTIMs con una media de 37 (± 11). Finalmente, la ArcTIM de TaTIM, refleja un nivel de hidratación por debajo de la media, 16 moléculas de agua. Tal como ha sido señalado en líneas anteriores este resultado era esperado al ser TIMs con asas de interfaz más pequeños y por tanto con un área de interfaz más reducida para hidratar. Al tomar en cuenta el aumento de 9% en área polar en la interfaz de las BacTIMs, es posible que esto favorezca más interacciones indirectas mediadas por moléculas de agua, lo cual se refleja en el aumento promedio de la hidratación (Graf. 15).

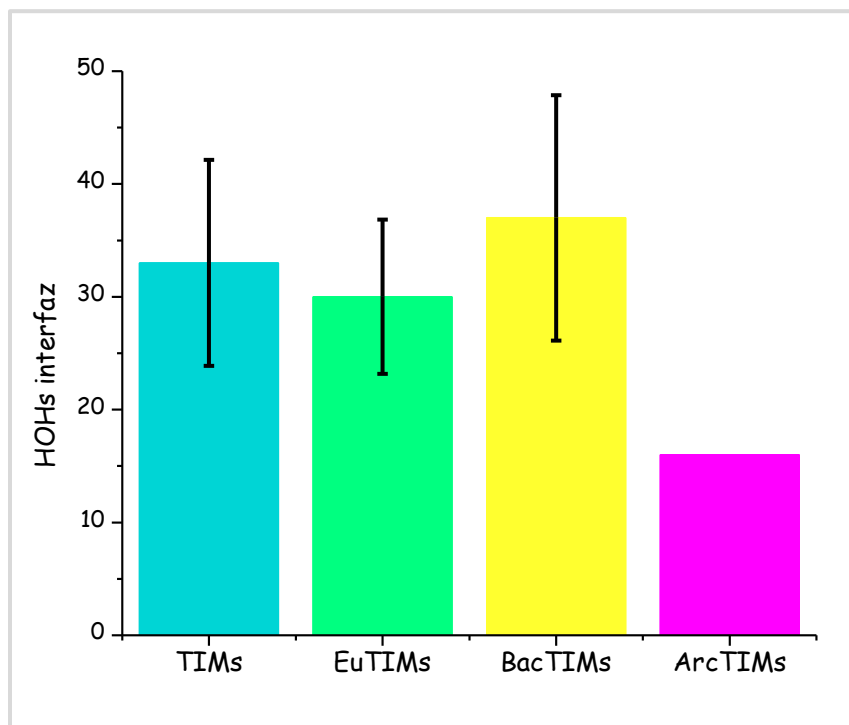


Gráfico 15.- Promedio de aguas que hidratan la interfaz en las TIMs, EuTIMs, BacTIMs y ArcTIM. Se utiliza la misma gama de colores para las TIMs y para cada dominio.

Como ha sido señalado, las HOHs de la interfaz se ubicaron en dos categorías: HOHs CavP y HOHs fCavP. La clasificación se realizó con la intención de ubicar al menos dos grandes regiones de hidratación en la interfaz de las TIMs con posibles propiedades diferenciadas. Ambos grupos de moléculas de aguas se consideraron al tomar en cuenta que la cavidad de mayor volumen se forma en la interfaz y que ésta se hidrata de moléculas de solvente; así como la región que está fuera de ella. La Figura 18 muestra de manera esquemática la ubicación de ambas regiones.

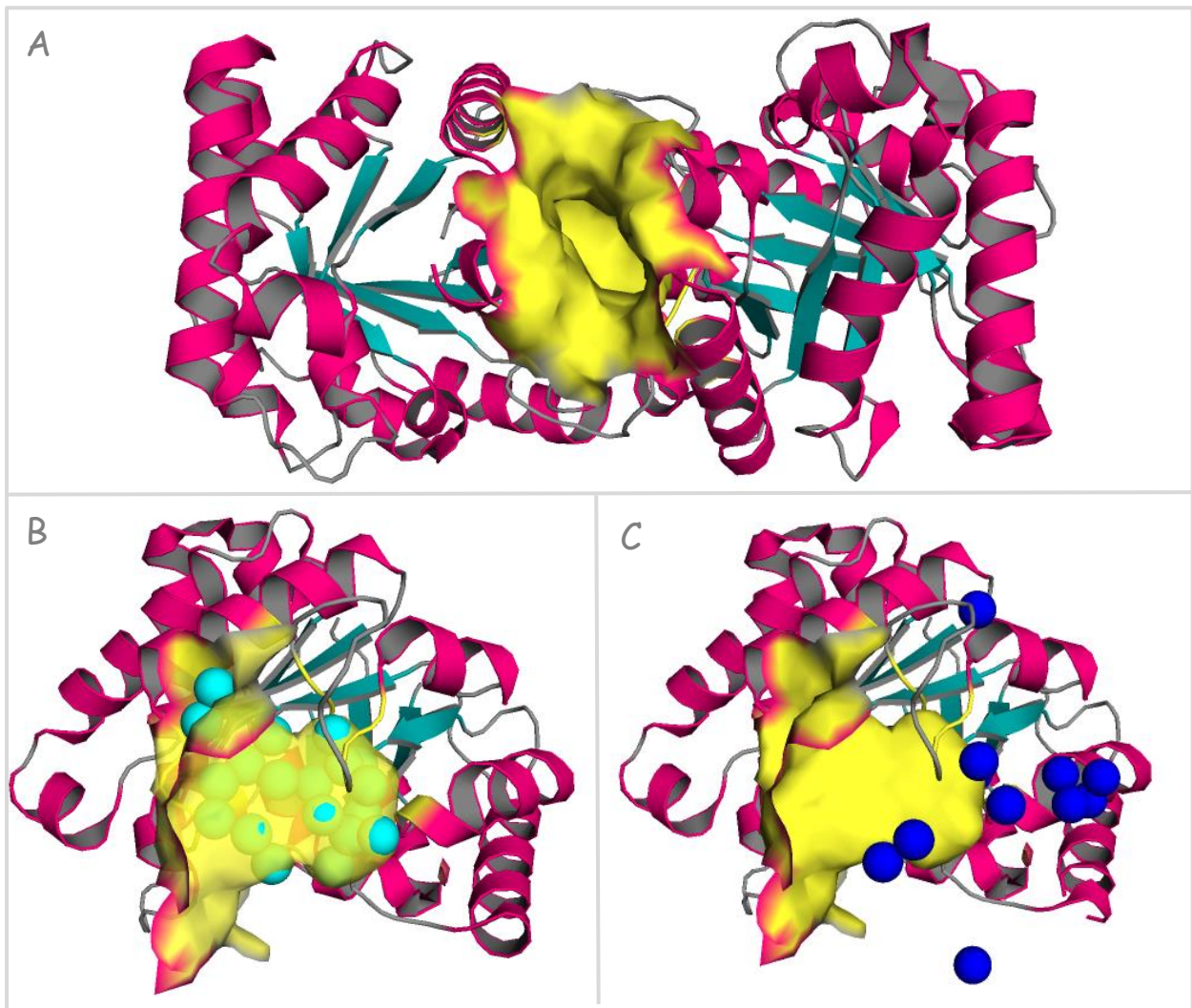


Figura 18.- Esquema de las regiones propuestas para la hidratación de la interfaz de las TIMs. A manera de ejemplo se muestra HsTIM (PDB 4POC). **A)** Vista frontal del dímero de HsTIM, en () se muestra la apertura de la CavP. **B)** Vista lateral del monómero A de HsTIM. Dentro de la CavP en () las HOHs CavP. **C)** Vista lateral del monómero A de HsTIM. En () las HOHs fCavP.

Al advertir la distribución de hidratación promedio en la interfaz de las TIMs (33 HOHs) respecto a los tipos de aguas, CavP y fCavP; los resultados mostraron claramente que la distribución de moléculas de agua es mayor dentro de la cavidad que fuera de ella. En promedio hay 20 (± 9) HOHs CavP y 12 (± 5) HOHs fCavP (Graf. 16).

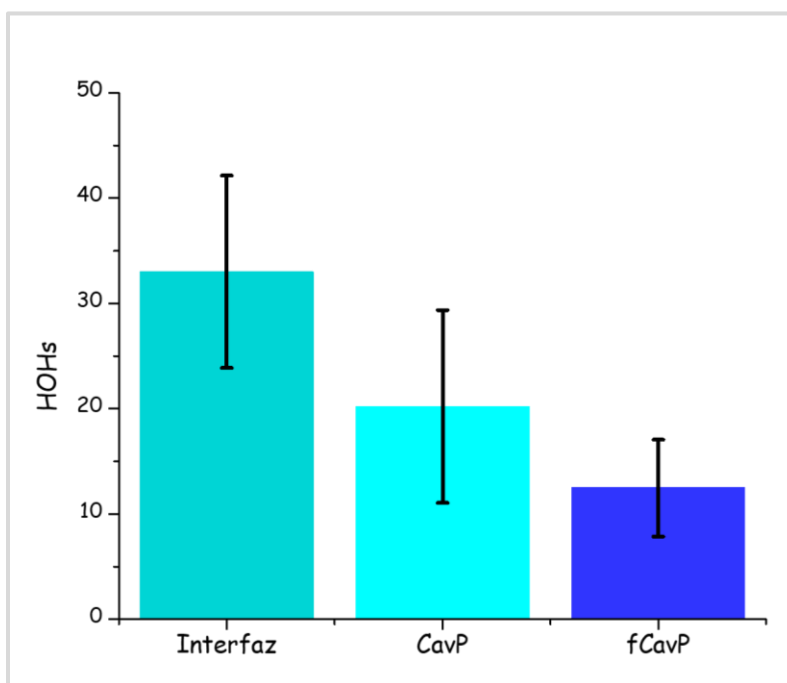


Gráfico 16.- Representación esquemática de las regiones de hidratación en la interfaz de las TIMs.

7. HOHs CavP y sus propiedades

La diferencia entre HOHs CavP y HOHs fCavP no solo se ve reflejada en la media; sino también en la variabilidad. El intervalo de moléculas de agua dentro de la CavP es mayor, que el observado fuera de ella. El número de moléculas de agua que hidratan la CavP puede ir desde 2 hasta 43 (Graf. 17A). Comparativamente, la distribución y las medias de hidratación cambian entre los tres dominios. Las EuTIMs muestran una distribución de 4 a 37, con un promedio de 18(± 7) moléculas de aguas, mientras que las BacTIMs albergan de 8 a 43 moléculas de agua y en promedio, 5 moléculas de agua más (23 HOHs ± 11) que las EuTIMs. Así pues, al tomar en cuenta los niveles de hidratación promedio de la interfaz y de la CavP, se puede

identificar que las 7 HOHs interfaz adicionales con las que cuentan las BacTIMs se encuentran dentro de la CavP, hidratando esta región.

Contrariamente al alto nivel de hidratación en la CavP para las EuTIMs y las BacTIM, la ArcTIM de *Thermoplasma acidophilum*, sólo cuenta con dos moléculas de solvente dentro de la CavP (Graf. 17B). De manera que la mayoría de las aguas que hidratan su interfaz (16) se ubican fCavP. El detectar la CavP en la interfaz de TaTIM, es un resultado significativo, pues como ha sido reportado por Almazán, C., *et. - al.*, 2008, las Archaeas carecen de esta cavidad al no contar con los residuos conservados Asn65, Asp77, Arg98, Glu104 y Lys11, que la integran. No obstante, nuestro trabajo no reconoció los mismos residuos como conservados en la interfaz de las TIMs y al localizar por CASTp una pequeña cavidad en la misma región; conformada por residuos similares para la CavP de otras TIMs; consideramos óptimo tomar a ésta como la CavP de TaTIM.

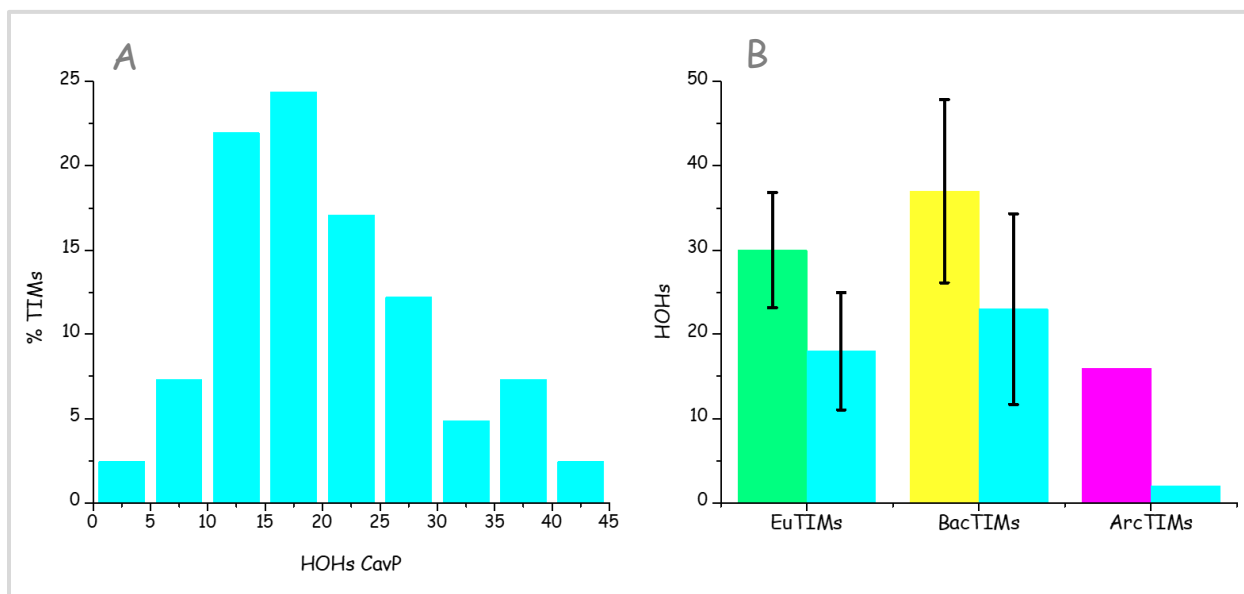


Gráfico 17.- Distribución y promedio de las HOHs de la CavP en la interfaz de las TIMs. A) Distribución del número de HOHs en la CavP de las TIMs. B) Promedio del número de HOHs en la CavP, para cada dominio, respecto al valor promedio de HOHs en la interfaz.

Los datos obtenidos por CASTp mostraron variaciones en las características estructurales de ésta al comparar entre especies. A continuación, se detalla la hidratación de la CavP en relación con cada propiedad evaluada:

○ La abertura

En principio la CavP cuenta con distinto número de aberturas al solvente. Como muestra el Grafico 18A, este número puede ir de 1 a 4. No obstante, más de la mitad de las TIMs cuentan con dos aberturas a la superficie. De hecho, la media es de 2 (± 0.8) para todos los dominios, variando ligeramente el valor de la desviación estándar para EuTIMs (± 0.6) y para BacTIMs (± 1.1). Aunado al número de entradas, el área total de la(s) abertura(s) también puede variar ampliamente. La diferencia puede ser de 720 \AA^2 entre el límite superior y el límite inferior (Graf. 18B). El área total promedio de la abertura(s) es de 176 \AA^2 (± 138), 167 \AA^2 (± 138) para EuTIMs y 196 \AA^2 (± 146) para BacTIMs. El valor del área total de las entradas de TaTIM es de 54 \AA^2 .

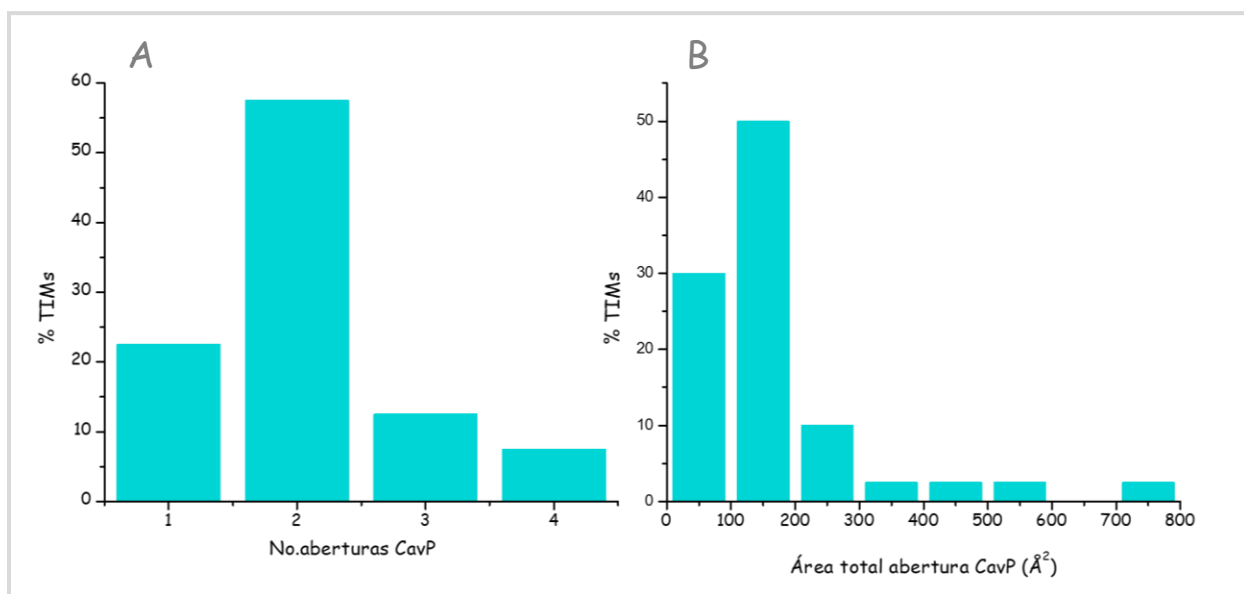


Gráfico 18.- Distribución del área de la abertura y el número de aberturas de la CavP. A) Número de aberturas con las que cuentan la CavP. B) Distribución del área de la abertura de la CavP en la interfaz de las TIMs.

Se evaluó si el área total de la abertura, el volumen de la CavP y el área de la interfaz determinan el número de aberturas que forma la CavP hacia la superficie. Los resultados muestran que ninguna de las tres propiedades influye en el número de aberturas con las que cuenta la CavP (Graf. 19). La importancia de evaluar el número de aberturas en la CavP de las TIMs radica en identificar si ésta(s) es una región de entrada y salida para las moléculas de solvente y por lo tanto repercute en el nivel de hidratación.

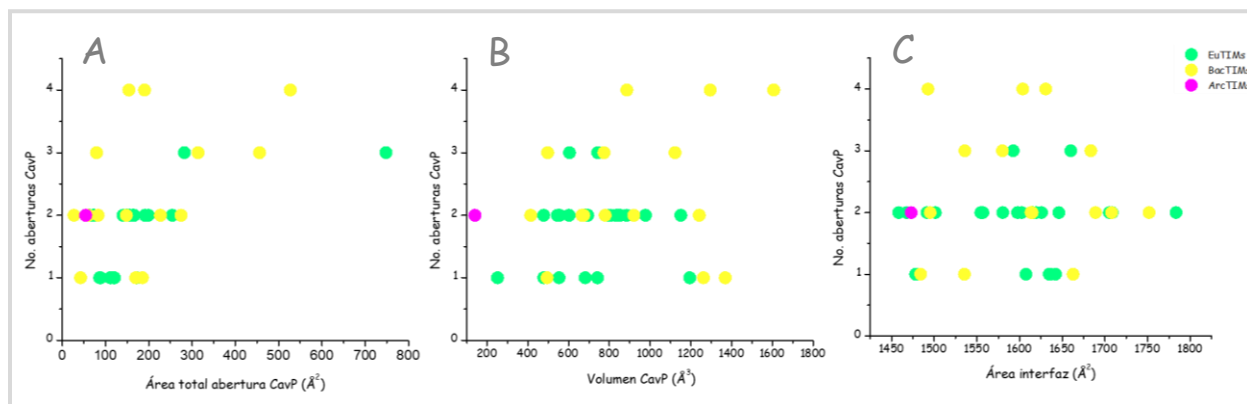


Gráfico 19.- Número de aberturas de la CavP en relación con: A) área total abertura CavP, B) Volumen CavP y C) Área interfaz.

Posteriormente se evaluó si el número de aberturas y su área total influyen en el nivel de la hidratación de la interfaz y de la CavP. Los resultados no muestran una correlación entre el número de aberturas y área total con el número de moléculas de solvente que hidratan la interfaz y la CavP (Graf. 20). El número de aberturas y el área total de éstas no influye en el número de moléculas de agua que ocupan e hidratan el volumen de la CavP, y por ende de la interfaz. Nuestros resultados retoman y aportan a lo ya señalado por Almazán, C., *et al.*, 2008, quienes proponen que la abertura no es una puerta de entrada para hidratar la cavidad, sino más bien, la CavP se forma y se hidrata durante el ensamble, en el proceso de plegamiento y asociación. Nosotros mantenemos la hipótesis de que la o las aberturas se forman subsecuentemente a la integración e hidratación del volumen de la CavP. Una vez hidratada la CavP, algunos residuos superficiales que están expuestos al solvente en ambos monómeros no interactúan directamente; sino a través de moléculas de agua, formando interacciones

indirectas. Así pues, el número de entradas con las que cuenta la CavP se forman posterior al ensamblaje e hidratación de la interfaz y por tanto el número de éstas no determina el nivel de moléculas de solvente. No obstante, es probable que las aguas más expuestas a la superficie entren y salgan con un recambio mucho mayor que las que se encuentran en el interior.

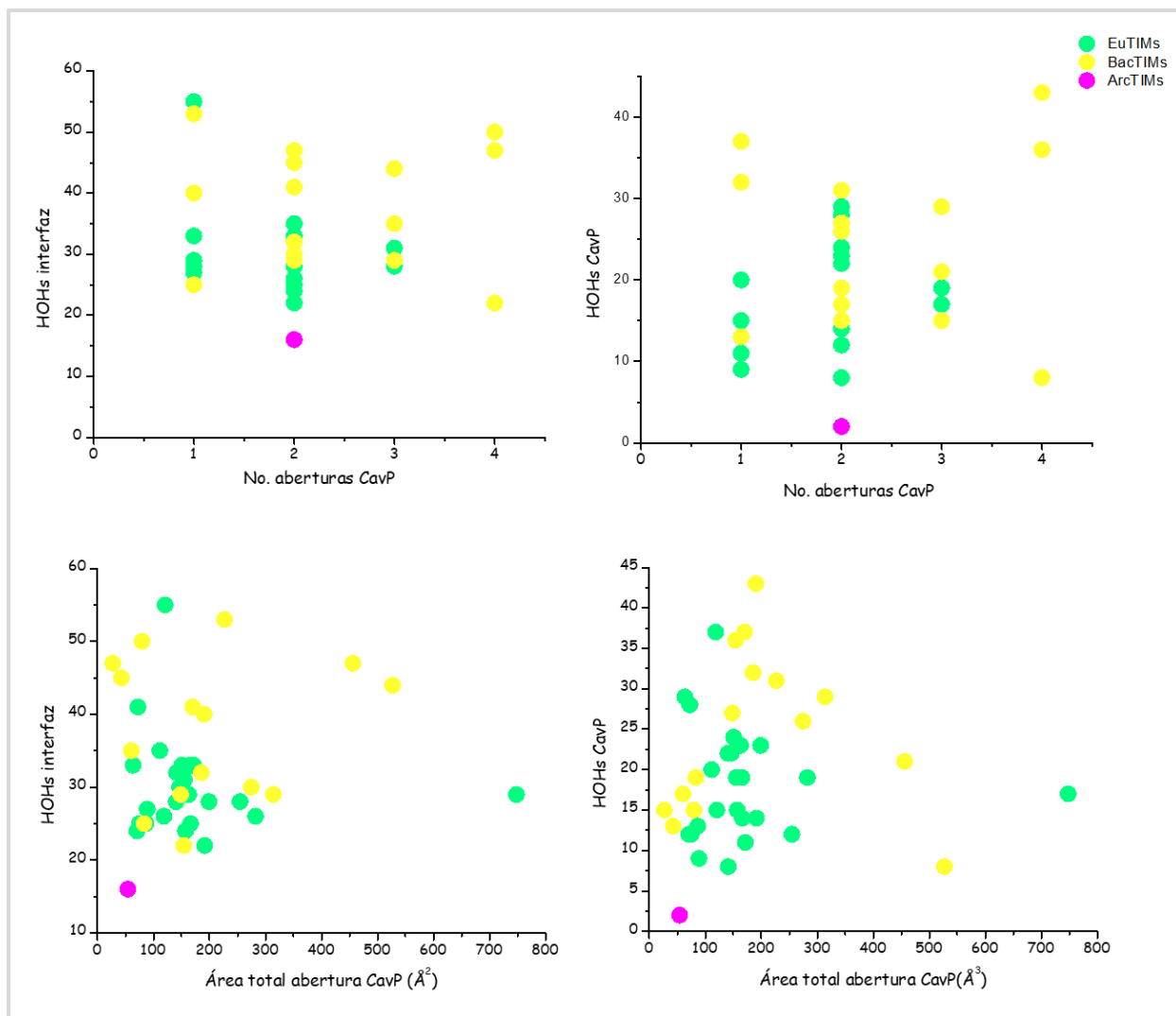


Gráfico 20.- Número de HOHs interfaz y CavP a partir del número de aberturas y área total de la abertura de la CavP (Å²).

○ Fragmentos

Como fue señalado, el servidor CASTp determinó para ciertas TIMs cavidades o fragmentos pequeños, que en conjunto forman la CavP. Así pues, al evaluar el número de fragmentos o cavidades más pequeñas en las que posiblemente está distribuida la CavP, no se reconoció una distribución diferenciada del número de fragmentos entre los dominios. Del mismo modo, no se identificó que el área de la interfaz repercuta en el número de fragmentos localizados para la CavP de algunas TIMs (Graf. 21). En trabajos como los de Almazán, C., *et al.*, 2008 y Olivares, V., *et al.*, 2017, se ha reportado que la cavidad que se forma en la interfaz de las TIMs es una sola. En ningún trabajo anterior se ha mencionado que ésta es más de una o que se encuentra fragmentada en ciertos grupos filogenéticos; razón por la que consideramos conveniente utilizar otro(s) software(s) que corroboren la información obtenida en CASTp o que la refuten. Y si fuera el caso que la CavP ha tenido una tendencia evolutiva, hacer un estudio filogenético de la evolución de la CavP.

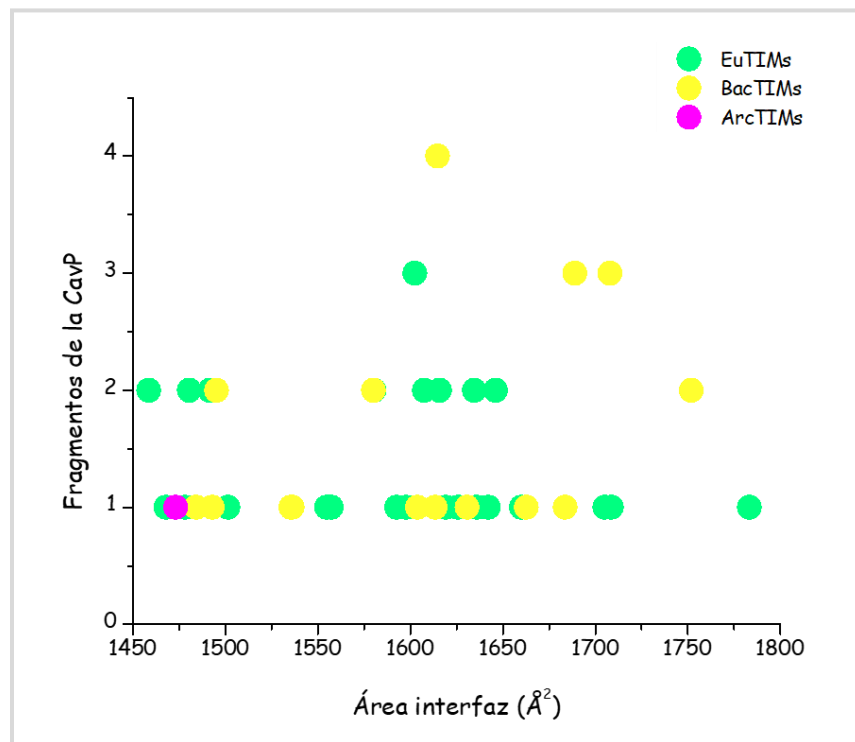


Gráfico 21.- Número de fragmentos en las que CASTp toma en cuenta la CavP

○ Residuos

El servidor CASTp identificó los residuos de cada monómero, que forman la CavP de cada TIM. Al contrastar el listado arrojado por CASTp con los residuos determinados por PISA como parte de la interfaz, se distinguió que hay residuos que CASTp toma en cuenta como parte de la CavP, y no obstante PISA no los considera. Esto posiblemente ocurre porque PISA ubica como residuos de interfaz a aquellos que pierden área accesible al solvente, así pues, al ser la CavP una cavidad abierta y estar llena de moléculas de agua, los residuos que forman la cavidad están hidratados y no pierden área accesible al solvente; por lo tanto, PISA no los considera como parte de la interfaz. De igual manera, es importante tener presente que la interfaz y la CavP no son regiones delimitadas, más bien son un continuo a lo largo del ensamble; por lo cual ubicar con precisión los límites estructurales y de composición tanto de la interfaz como de la CavP es una tarea difícil. A pesar de estas complicaciones, se realizaron los estudios correspondientes para identificar las propiedades de los residuos de la CavP.

En promedio la CavP está integrada por 16 residuos (± 4) residuos para cada monómero. De estos, exclusivamente 12 (± 4) son residuos de interfaz, según PISA. Dicho de otra manera, 4 de 16 residuos que en promedio forman la CavP, no pertenecen a la interfaz. Las medias del número de residuos que componen la CavP cambian ligeramente entre los dominios y se muestran en la Tabla 7.

	TIMs	EuTIMs	BacTIMs	ArcTIMs
Residuos CavP (CASTp)	16 (± 4)	15 (± 3)	19 (± 5)	7
Residuos CavP exclusivos de interfaz (PISA)	12 (± 4)	11 (± 3)	14 (± 4)	6

Tabla 7.- Valor promedio de los residuos que integran la CavP obtenidos con los servidores CASTp y PISA.

Considerando el total de residuos que forman la CavP, según CASTp; la Asn65, Glu77, Arg98, Glu104 y Lys112 están conservados en ambos monómeros de todas las TIMs, tal como menciona Almazán, C., en 2008. No obstante, tomando en cuenta los residuos que PISA estima como parte de la interfaz y por ende los residuos detectados como conservados en el alineamiento; solo la R98 forma propiamente parte de la interfaz de todas las TIMs (Fig. 13). El Glu77 también está conservado, pero exclusivamente en la interfaz de las EuTIMs (Fig. 14A). Es así como el resto de los residuos: Asn65, Glu104 y Lys112 están conservados e integran la CavP, según CASTp, pero no forman la interfaz de las TIMs, según la información de PISA.

○ Polaridad

El Gráfico 22 nos señala que para algunas TIMs el aumento en área polar de la interfaz repercute en el área polar de la CavP ($R^2=0.57$) ($m=0.38$) (Graf. 22A). No obstante, mayoritariamente la polaridad de la CavP se correlaciona con el volumen de ésta ($R^2=0.65$) (Graf. 22B).

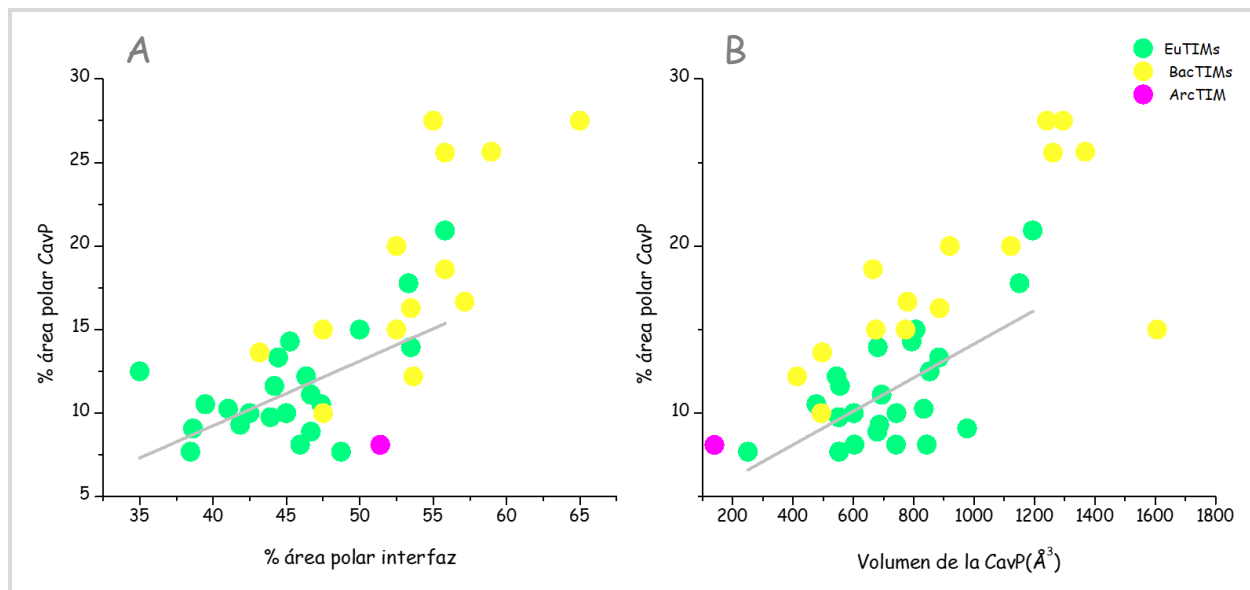


Gráfico 22.- Porcentaje de área polar en la CavP, en relación con: A) el porcentaje de área polar de la interfaz y B) volumen de la CavP (Å³).

También se encontró que la polaridad de la CavP determina el número de moléculas de agua que hidratan la CavP ($R^2=0.73$) ($m=1.5$) y por ende a interfaz ($R^2=0.72$) ($m=1.5$) (Graf. 23)

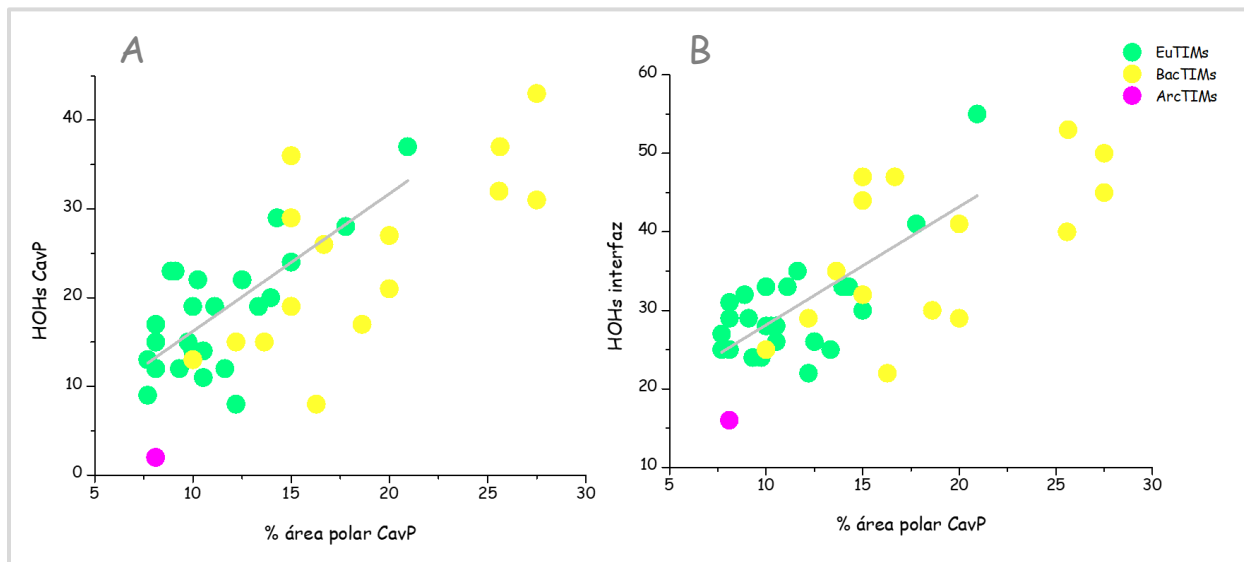


Gráfico 23.- Porcentaje de área polar en la CavP con relación a: A) las HOHs de la CavP y B) HOHs de la interfaz.

○ Volumen

La CavP puede ocupar un amplio intervalo en cuanto al volumen, desde 140 \AA^3 hasta 1607 \AA^3 . El 73% de las TIMs muestran volúmenes entre 400 y 900 \AA^3 y solo el 20% de las TIMs forman cavidades con volúmenes por arriba de 1000 \AA^3 (Graf. 24A).

El Gráfico 24B evidencia que no hay correlación entre el área de la interfaz y el volumen de la cavidad ($R^2=0.03$). El área que cubre la interfaz de las diversas TIMs no determina el volumen de la CavP. No obstante, la distribución diferenciada entre dominios, respecto al volumen de la cavidad se mantiene como en los otros parámetros (área de interfaz, porcentajes de polaridad, número de residuos y el nivel de hidratación). El volumen promedio de las BacTIMs es ligeramente mayor que el de las EuTIMs. Las BacTIMs forman cavidades más grandes 208

\AA^3 (± 364) que las EuTIMs 725\AA^3 (± 83.2). La ArcTIM de TaTIM ocupa el límite inferior en la distribución del volumen de la CavP (140\AA^3).

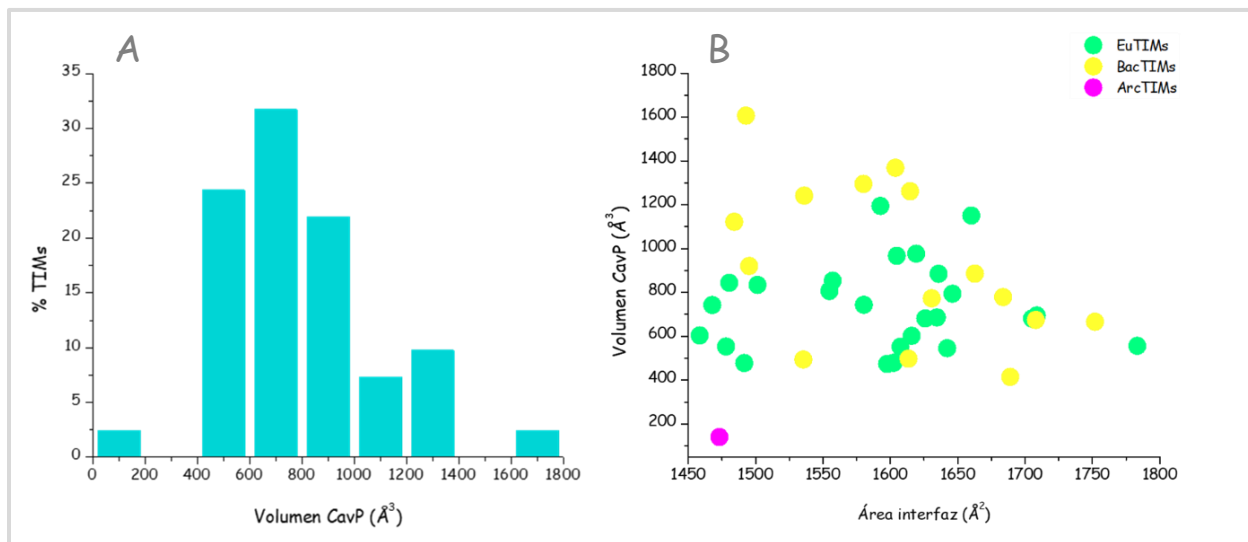


Gráfico 24.- A) Distribución del volumen de la CavP. B) Volumen de la CavP respecto al área de la interfaz.

Una vez reconocida la distribución del volumen que puede ocupar la CavP, se buscó identificar si éste influye en el número de moléculas de agua que puede albergar en su interior. El Gráfico 25A evidencia como las HOHs CavP incrementan, al aumentar el volumen de esta región ($R^2=0.74$) (Graf. 25A). Se distingue una vez más, como algunas BacTIMs integran cavidades con volúmenes mayores, y cómo éstas a la vez se hidratan con mayor cantidad de solvente. Contrariamente, en el otro extremo, la ArcTIM de *Thermoplasma acidophilum* forma la CavP de menor volumen y de menor nivel de hidratación, 140\AA^3 y 2 moléculas de agua, respectivamente.

Finalmente, para mostrar que los niveles de hidratación en la interfaz se ven influenciados específicamente por el número de aguas que hidratan la CavP, esto es, que el aumento o disminución de las aguas de interfaz, se debe al número de HOHs CavP, se graficaron las HOHs interfaz respecto a las HOHs de la CavP. El Gráfico 25B muestra una correlación positiva entre

ambas cantidades ($R^2=0.73$). En general el aumento de HOHs en la interfaz correlaciona con el aumento en la hidratación de la CavP.

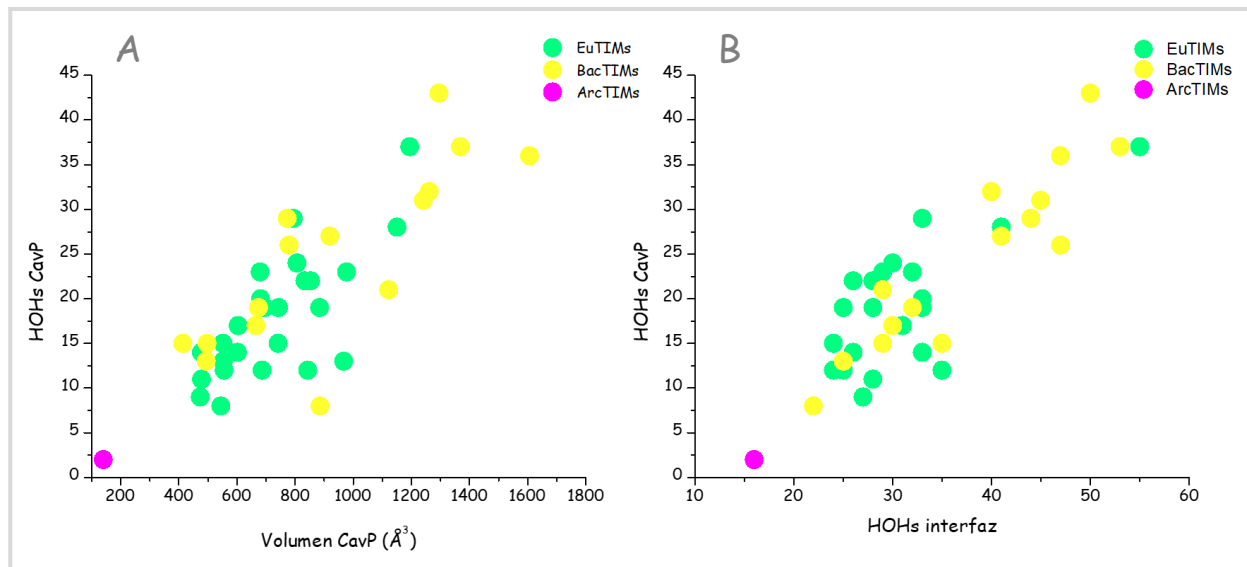


Gráfico 25.- Nivel de hidratación de las HOHs de la CavP. A) Aguas de la CavP respecto al volumen de la CavP. B) Aguas de la interfaz respecto al volumen de la CavP

8. HOHs fCavP

Finalmente se identificó que el número de moléculas de solvente que hidratan la región de la interfaz fuera de la cavidad es poco variable entre las TIMs analizadas. La distribución va de 4 a 23 moléculas de agua; siendo $12 (\pm 5)$ moléculas de agua la media para todos los dominios (Graf. 26). Al analizar el Grafico 27 y comparar los valores de la media y la desviación estándar; se distingue que no existen diferencias en la hidratación fuera de la cavidad entre las EuTIMs, $12 (\pm 5)$ y las BacTIMs y $13 (\pm 4)$. Si el grado de hidratación en esta región de la interfaz solo ha cambiado de 2 a 3 moléculas de agua, se puede inferir que es un área conservada, esto es, las moléculas de agua fCavP probablemente mantienen interacciones equivalentes o similares, entre las distintas especies de TIMs. Es importante distinguir si las HOHs fCavP que no varían entre todas las TIMs; se encuentran ubicadas estructuralmente en las mismas regiones,

manteniendo el mismo número y tipo de interacciones con los residuos y/o aguas de la interfaz.

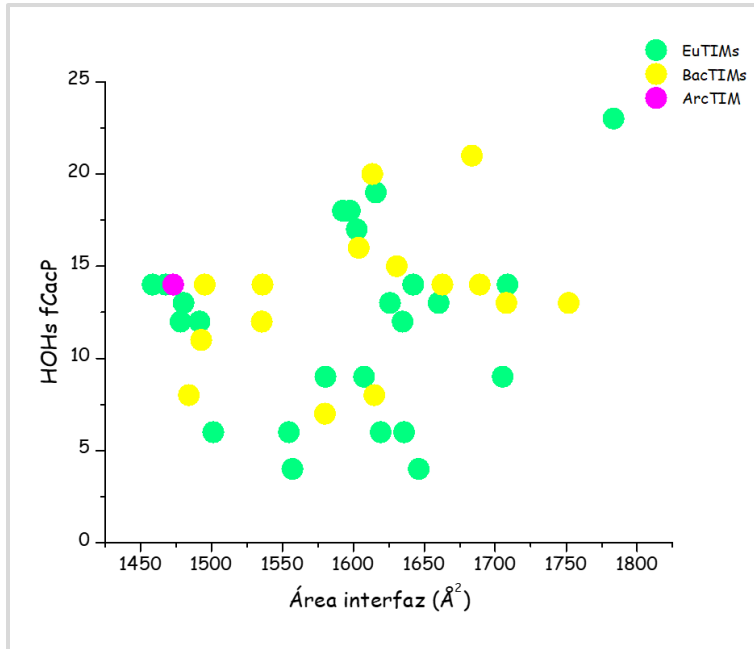


Gráfico 26.- Distribución de las HOHs fCavP en relación con el área de la interfaz (Å²).

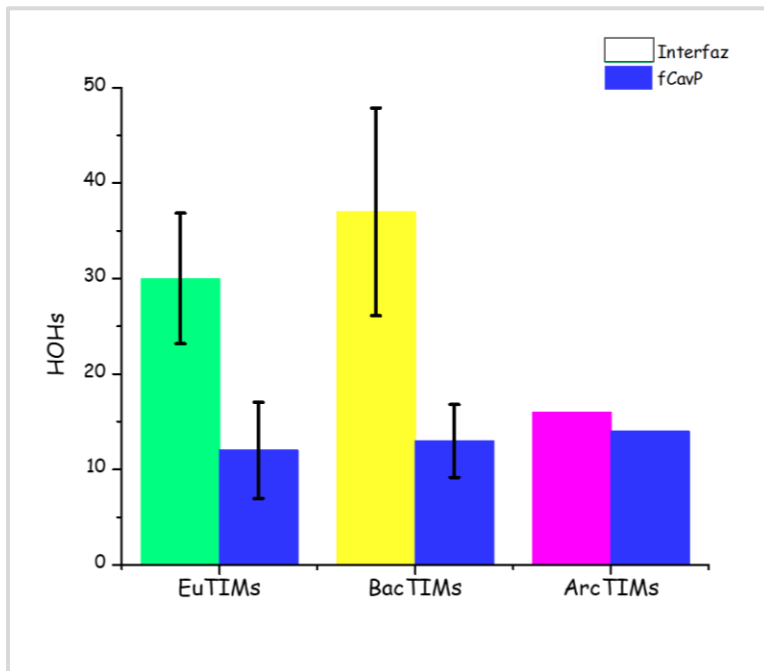


Gráfico 27.- Promedio de aguas fCavP respecto al promedio de aguas en la interfaz.

9. Evaluación filogenética de las propiedades de hidratación de la interfaz

○ Árbol filogenético de las TIMs

Se muestra el árbol filogenético generado en MEGA, con las 40 secuencias de las estructura a mayor resolución; 23 EuTIMs, 15 BacTIMs y 1 ArcTIM. Las TIMs empleadas se agruparon adecuadamente, a excepción de *Coccidioides immitis* de la familia de hongos Onygenaceae (EuTIM), agrupada dentro de las bacterias y alejada de *Saccharomyces cerevisiae* que también pertenece al phylum Ascomycota (Fig. 19).

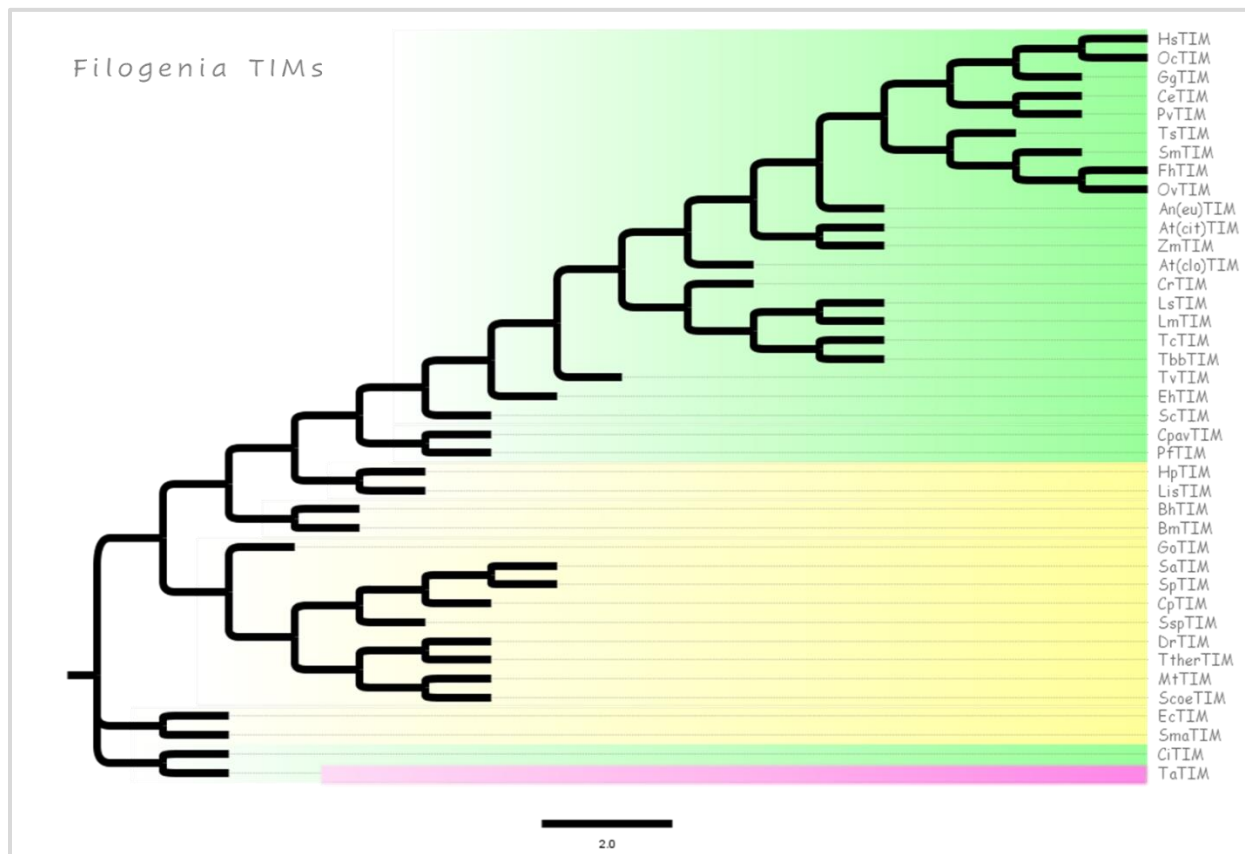


Figura 19.- Árbol filogenético de las TIMs de estudio. En verde (■) EuTIMs, en amarillo (■) BacTIMs y en magenta (■) ArcTIM. Enfrente de cada rama se señala la abreviatura de cada especie.

○ Distribución de la filogenia en función del área polar

La heterogeneidad de la polaridad en la interfaz de las TIMs es significativa. Puede alcanzar una diferencia de 30% entre la interfaz más polar y la menos polar (Graf. 7A). Al mapear la polaridad de la interfaz en el árbol filogenético observamos claramente una distribución diferenciada y una agrupación de los clados en los distintos intervalos de área polar entre la interfaz de todas las TIMs, particularmente entre las EuTIMs y BacTIMs (Fig. 20). Se observa que la mayoría de las BacTIMs (80%) pueblan los mayores porcentajes de área polar (Graf. 7B). De hecho, la TIM de *Bartonella melitensis* (BmTIM) (PDB 4NVT) es la BacTIM con mayor porcentaje de área polar (65%) y la EuTIM de *Caenorhabditis elegans* (CeTIM)(1MO0) es la TIM con menos área polar (30%).

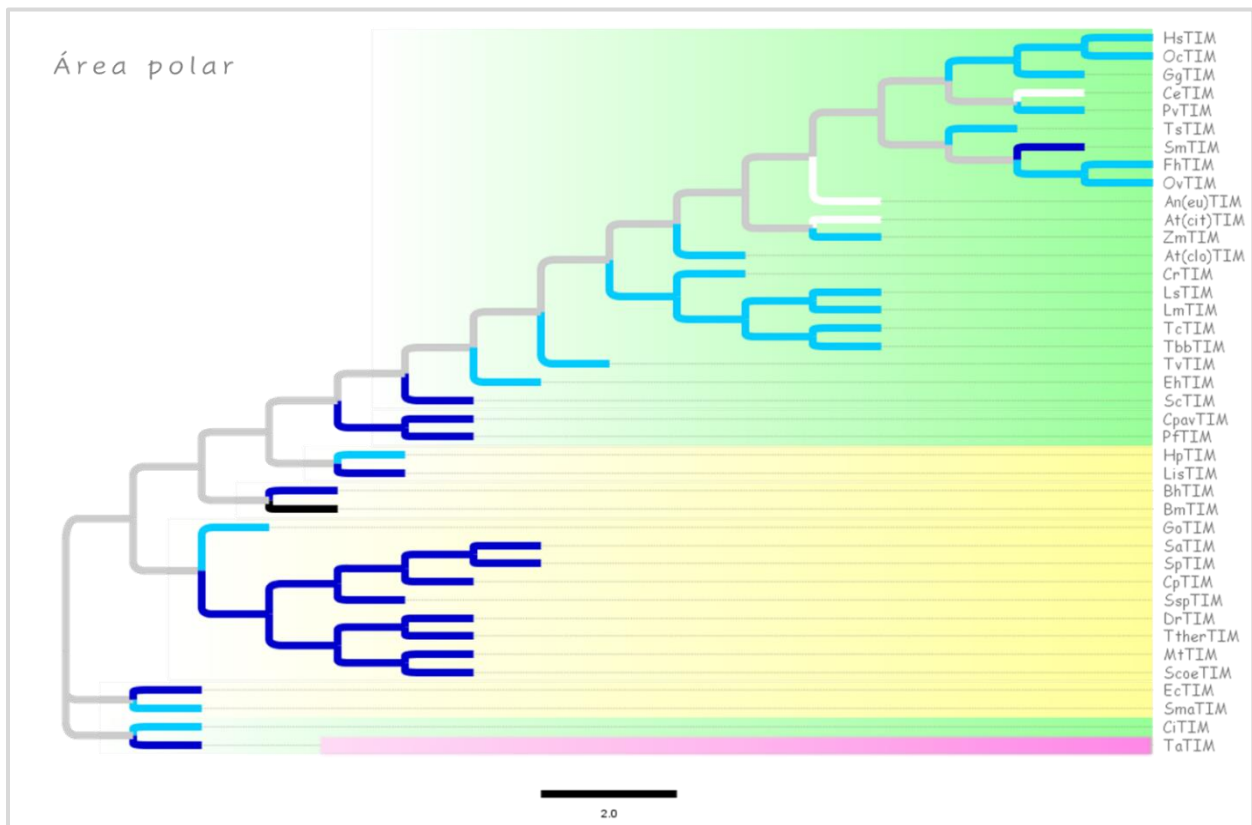


Figura 20.- Distribución filogenética de las TIMs en relación con el porcentaje de área polar en la interfaz. En gama de azules, para cada rama, los intervalos de área polar propuestos: (□) 30-39%, (■) 40-49%, (■) 50-59% y (■) 60-65%. Enfrente de cada rama se señala la abreviatura de cada especie. En verde (■) EuTIMs, en amarillo (■) BacTIMs y en magenta (■) ArcTIM.

○ Distribución de la filogenia en función de las HOHs interfaz

El mapeo del árbol filogenético en relación con las HOHs de la interfaz corrobora lo reportado en el gráfico 14 (correlación entre el porcentaje de área polar y HOHs interfaz). Así mismo muestra una relación entre los intervalos de polaridad y el número de moléculas de agua (Fig. 21). Sin embargo, al considerar los valores de la desviación estándar, no se encuentran diferencias significativas entre cada intervalo de hidratación. Estos resultados permiten predecir que, para la mayoría de las TIMs, el aumento de área polar en la interfaz conlleva a la formación de interacciones mediadas por moléculas de agua entre los residuos de ambas subunidades.

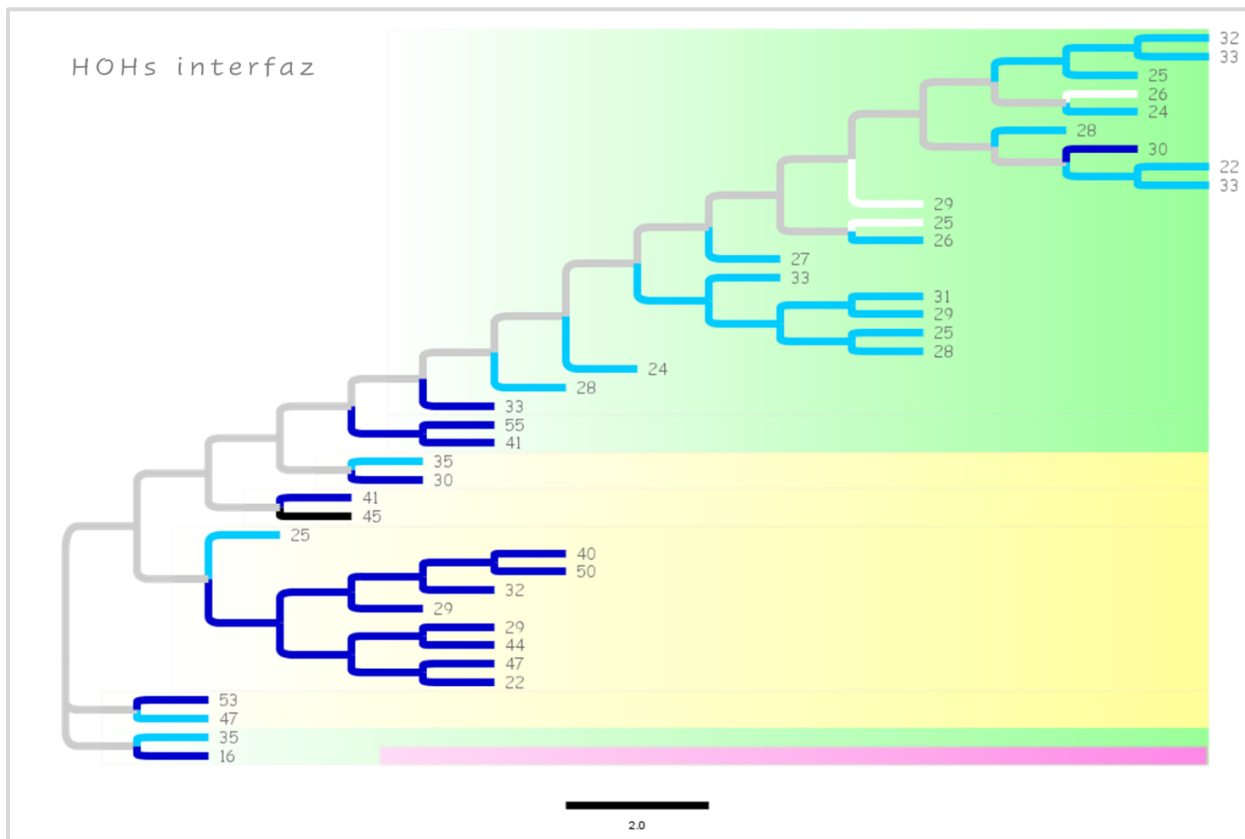


Figura 21.- Distribución filogenética de las TIMs, en relación con el número de moléculas de agua que hidratan la interfaz. En verde (■■■) EuTIMs, en amarillo (■■■) BacTIMs y en magenta (■■■) ArcTIM. En gama de azules, para cada rama, los intervalos de área polar propuestos: (□) 30-39%, (■) 40-49%, (■) 50-59% y (■) 60-65%. Los números enfrente de cada rama representan el número de moléculas de agua en la interfaz de cada especie. El número enfrente de cada rama representa el número de moléculas de agua de interfaz (HOHs interfaz) de cada especie.

○ Distribución de la filogenia en función de las HOHs fCavP

Como fue evidenciado anteriormente, el nivel de hidratación fuera de la cavidad es semejante en todas las TIMs, con una media de 12 (± 5) Gráfico 26 (pag.73). Los valores de la media y desviación estándar en cada intervalo de polaridad propuesto muestran que área polar en la interfaz no interviene en el número de moléculas fCavP. La distribución filogenética a partir de las HOHs fCavP, aunado a lo reportado a la Gráfico 23(pag.70), demuestran que la diversidad en el número de HOHs interfaz no está dado por las moléculas de agua ubicadas fCavP sino por las HOHs CavP y la polaridad de esta región.

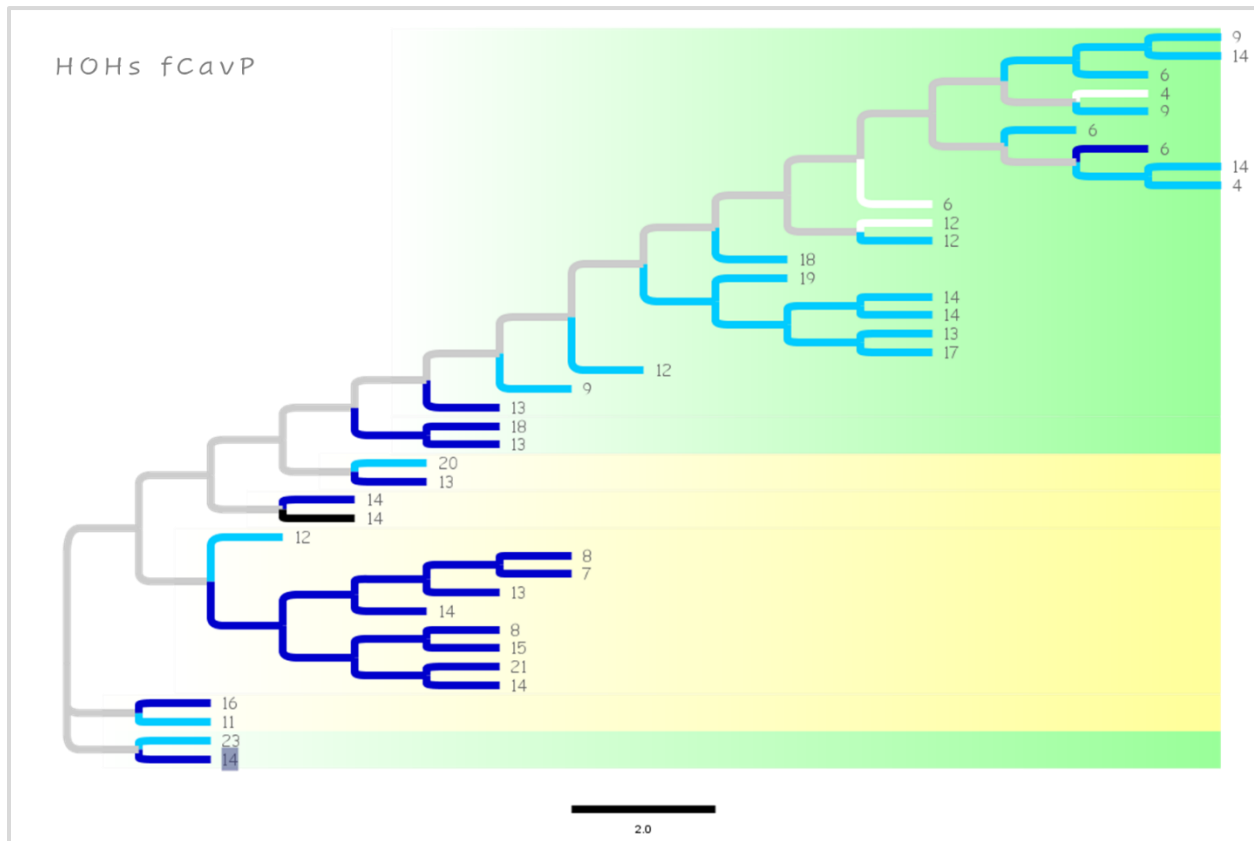


Figura 22.- Distribución filogenética de las TIMs, en relación con el número de moléculas de agua que hidratan la región fCavP. En verde (■) EuTIMs, en amarillo (■) BacTIMs y en magenta (■) ArcTIM. En gama de azules, para cada rama, los intervalos de área polar propuestos: (▭) 30-39%, (▭) 40-49%, (▭) 50-59% y (▭) 60-65%. Los números enfrente de cada rama representan el número de moléculas de agua fCavP de cada especie.

○ Distribución de la filogenia en función de las HOHs CavP

El mapeo de la filogenia en función de las HOHs CavP no mostró claras diferencias en relación con los intervalos de polaridad propuestos (Fig. 23). Esto sucede así, tal que al observar la ArcTIM de *T. acidophilum* que cuenta únicamente con dos moléculas de agua, se encuentra el mismo intervalo de polaridad semejante al de las BacTIMs.

Así mismo se distingue lo que se detalló en el Gráfico 25A (pág72); las BacTIMs forman las cavidades de mayor volumen y con mayor número de moléculas de agua en su interior. De hecho, la TIM con la CavP más hidratada es la de *Streptococcus pneumoniae*, una BacTIM con 43 moléculas de agua.

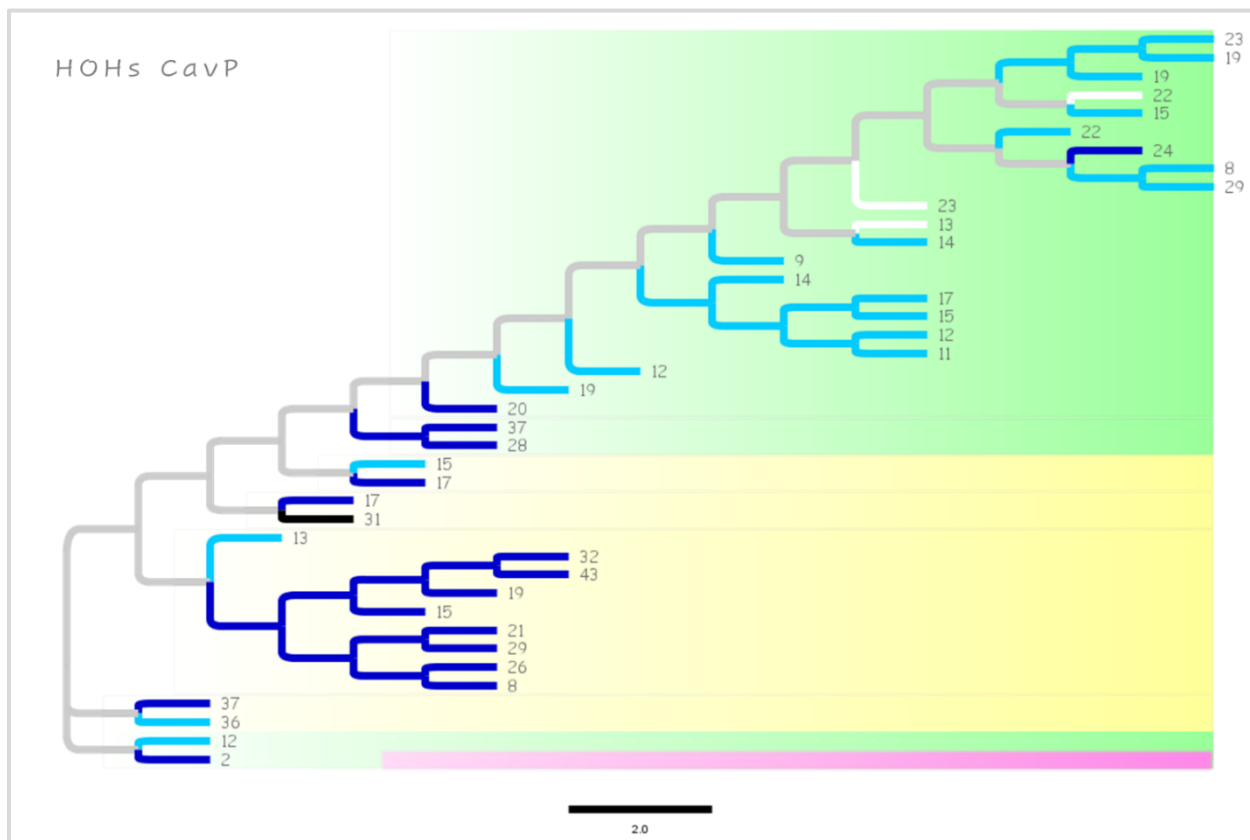


Figura 23.- Distribución filogenética de las TIMs, en relación con el número de moléculas de agua que hidratan la CavP. En verde (■) EuTIMs, en amarillo (■) BacTIMs y en magenta (■) ArcTIM. En gama de azules, para cada rama, los intervalos de área polar propuestos: (□) 30-39%, (■) 40-49%, (■) 50-59% y (■) 60-65%. Los números enfrente de cada rama representan el número de moléculas de agua CavP de cada especie.

Distribución de la filogenia en función de las propiedades de la CavP

El mapeo de la filogenia en función de las características de la CavP reveló diferencias significativas entre los phyla; así como entre los dominios.

Para el número de aberturas en la CavP, se identificó que las TIMs de determinado phylum o división, por ejemplo, Agioespermae y Euglenozoa para las EutIMs y Proteobacteria, Firmicutes y Deinococcus-thermus para las BacTIMs; comparten un número similar de aberturas (Fig. 24A). Para el área total de la(s) abertura(s) no se ubicaron phyla o clados con diferencias significativas. Sin embargo, en el árbol se observa una amplia diversidad en los valores de esta característica; con una diferencia de 728 \AA^2 entre el área mayor y la menor (Fig. 24B).

En cuanto al volumen de la CavP y el porcentaje de área polar de la misma, es perceptible que las BacTIMs alcanzan volúmenes mayores de la CavP que las EuTIMs (Fig. 24C). Por otra parte, para el porcentaje de área polar dentro de la CavP correlaciona con los intervalos de área polar de la interfaz (Fig. 24D). De igual manera se reconoce que el volumen de la CavP correlaciona con el porcentaje de área polar de ésta y que por tanto las BacTIMs forman las cavidades más polares. A modo de ejemplo, la TIM de *Brucella melitensis* con la interfaz más polar (65%) forma la CavP más polar de todas (28%).

Para los posibles fragmentos en los que puede estar dividida la CavP de algunas TIMs, fue interesante identificar que las especies de phyla particulares que difieren de la media; también se salen del promedio en el número de aberturas de la CavP. Particularmente en especies del phylum Euglenozoa de las EuTIMs y especies del phylum Firmicutes para las BacTIMs. La cercanía y acomodo de estas especies en el árbol filogenético permite proponer a manera de hipótesis, que la CavP en las TIMs no siempre ha sido una. Es fundamental e importante realizar más estudios que permitan identificar el curso evolutivo de la CavP, pues este entendimiento brindaría aún más información que nos posibilite entender a nivel estructural

y de la hidratación, la importancia de la interfaz de las TIMs y su relevancia en la disociación del ensamblaje por cualquier tipo de agente desnaturizante.

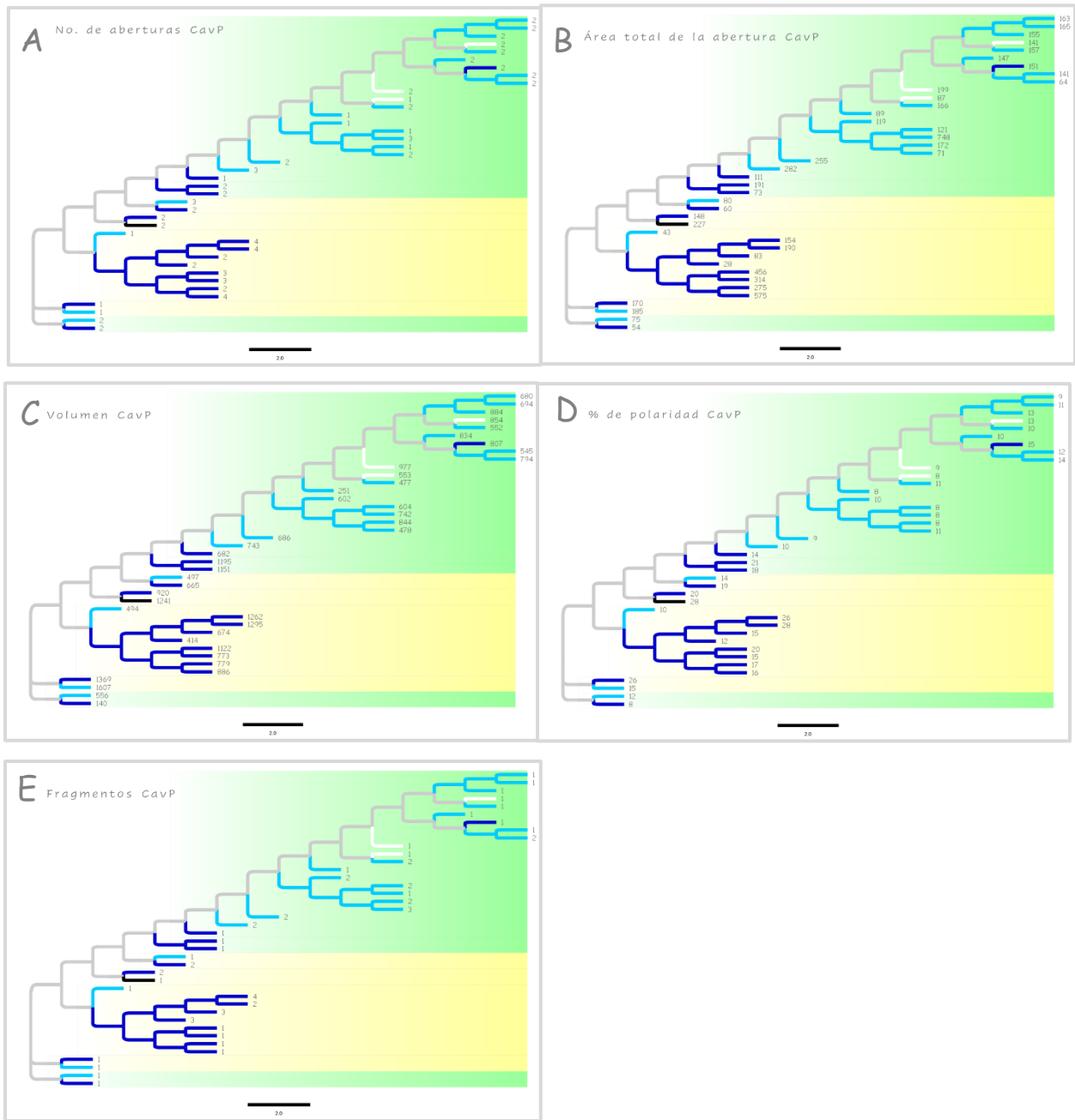


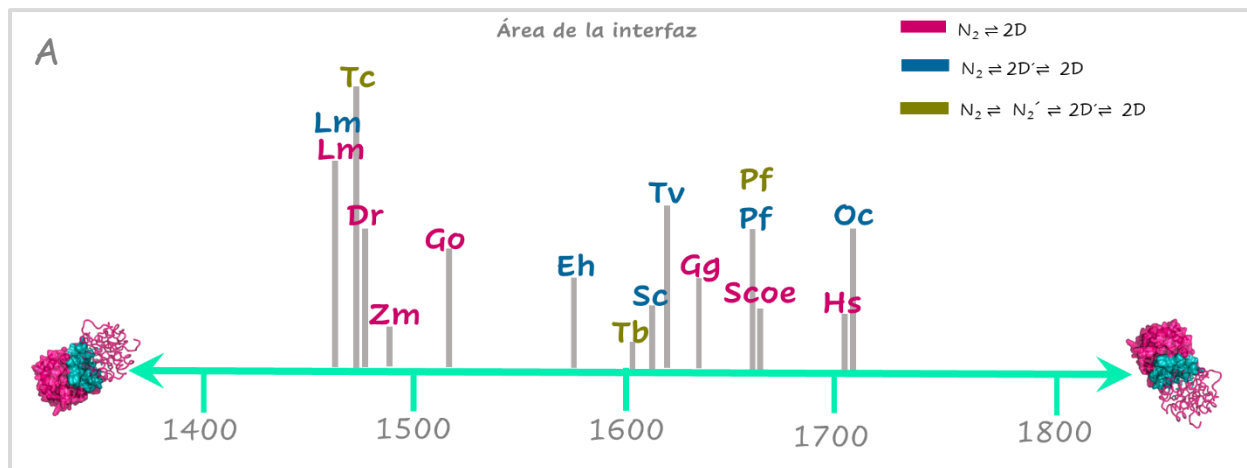
Figura 24.- Distribución filogenética de las TIMs, en relación con las propiedades de la CavP. En verde (■) EuTIMs, en amarillo (■) BacTIMs y en magenta (■) ArcTIM. En gama de azules, para cada rama, los intervalos de área polar propuestos: (□) 30-39%, (■) 40-49%, (■) 50-59% y (■) 60-65%. **A)** No. De aberturas de la CavP, **B)** Área total de la abertura de la CavP, **C)** Volumen de la CavP, **D)** Porcentaje de polaridad de la CavP y **E)** Fragmentos de la CavP. El número enfrente de cada rama, para cada árbol, representa el valor de la característica según corresponda.

10. Correlación entre el nivel de hidratación-mecanismo de plegamiento

Con el objetivo de considerar un mayor número de características que puedan incidir en el número de pasos que desencadenan un determinado mecanismo de plegamiento, se tomaron en cuenta tanto propiedades de la interfaz como las propiedades de hidratación. A continuación, se detalla el análisis para cada una de ellas.

○ Mecanismo de plegamiento con relación a las propiedades de interfaz

La Figura 25 muestra los mecanismos de plegamiento descritos en la desnaturalización con urea para distintas TIMs. Al observar la disposición de las proteínas en función del área de la interfaz, no se distingue una tendencia de la distribución conforme a cada mecanismo de plegamiento (Fig. 25A). De manera forzada podríamos señalar dos grupos; alrededor de 1500 Å² donde se agrupan TIMs de dos estados y en el intervalo de 1600 a 1700 Å² donde se agrupan TIMs que forman intermediarios monoméricos; sin embargo, es claro que en ambos intervalos hay TIMs que presentan otro mecanismo de plegamiento. Incluso en ambos grupos hay proteínas que muestran el mecanismo de plegamiento más complejo ($N_2 \rightleftharpoons N_2' \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$).



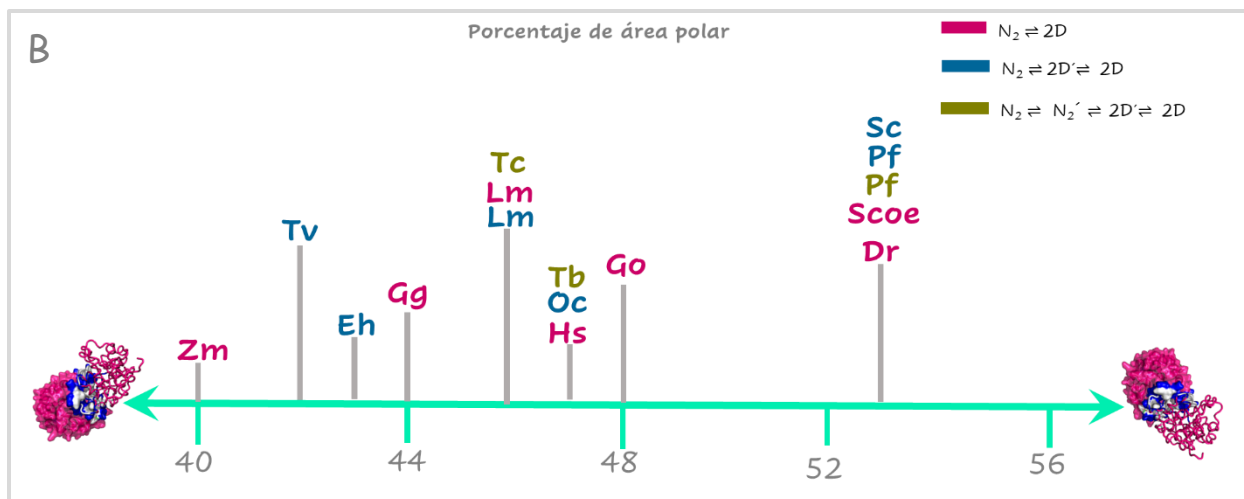


Figura 25.-Distribución de las TIMs que cuentan con mecanismo de plegamiento químico descrito, en relación con A) el área de la interfaz y B) el porcentaje de área polar en la interfaz. En (■) TIMs que describen un mecanismo de dos estados ($N_2 \rightleftharpoons 2D$), en (■) TIMs que describen un mecanismo de tres estados con intermediarios monoméricos ($N_2 \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$) y en (■) TIMs que describen un mecanismo de cuatro estados, con intermediarios dimericos y monoméricos, respectivamente ($N_2 \rightleftharpoons N_2' \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$). Hay TIMs que cuentan con más de un plegamiento descrito, dependiendo de las condiciones de concentración de proteína o pH.

Se observa un comportamiento similar al relacionar el mecanismo de plegamiento con el porcentaje de área polar (Fig. 25B).

De hecho, es más clara la ausencia de una distribución diferenciada para cada mecanismo de plegamiento. TIMs con un mismo mecanismo de plegamiento, pueden distribuirse en un amplio intervalo de polaridad. Por ejemplo, las TIMs que describen un mecanismo de dos estados pueden ir de 40 a 53 % de polaridad.

○ Mecanismo de plegamiento con relación a las HOHs interfaz

La disposición de las TIMs por su mecanismo de plegamiento en función de las HOHs interfaz no muestra una tendencia diferenciada. El nivel de hidratación para las TIMs con mecanismo de plegamiento descrito va de 22 a 41; en este intervalo de distribución no se distinguen agrupaciones de las TIMs por su mecanismo de plegamiento (Fig. 26). Se observan TIMs con

mecanismo de dos, tres y cuatro estados alrededor de 25 moléculas de aguas; y de igual manera TIMs con los tres mecanismos de plegamiento por arriba de 30 moléculas de agua.

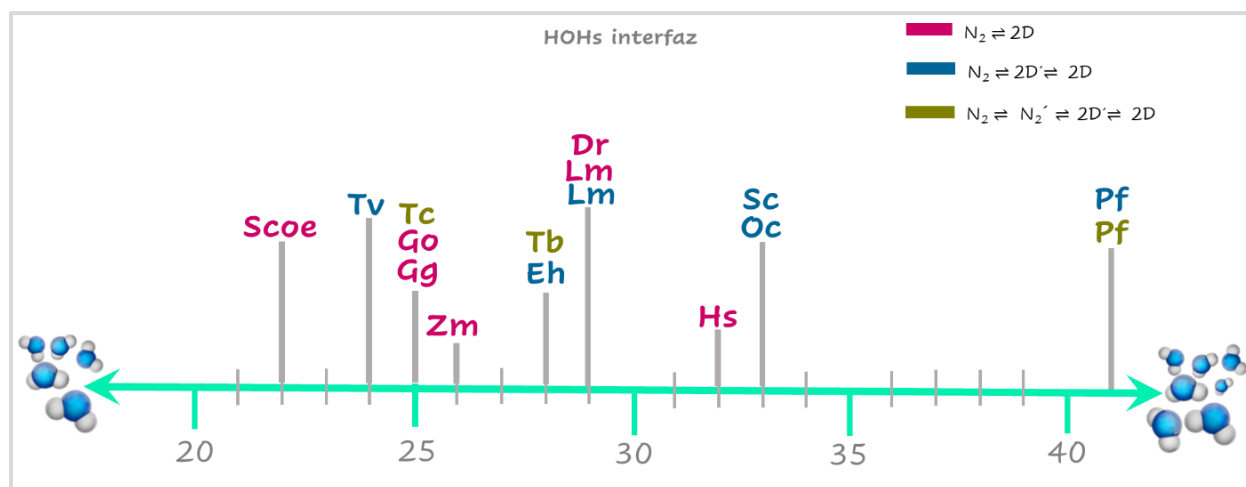


Figura 26.-Distribución de las TIMs que cuentan con mecanismo de plegamiento químico descrito, en relación con el número de moléculas de agua de la interfaz (HOHs interfaz). En (■) TIMs que describen un mecanismo de dos estados ($N_2 \rightleftharpoons 2D$), en (■) TIMs que describen un mecanismo de tres estados con intermediarios monoméricos ($N_2 \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$) y en (■) TIMs que describen un mecanismo de cuatro estados, con intermediarios diméricos y monoméricos, respectivamente ($N_2 \rightleftharpoons N_2' \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$). Hay TIMs que cuentan con más de un plegamiento descrito, dependiendo de las condiciones de concentración de proteína o pH.

Con la finalidad de diferenciar si las moléculas de agua que conducen a un mecanismo sencillo o con la formación de estados intermedios; son aguas agrupadas en algunas de las dos regiones descritas para la interfaz; la CavP y fCavP, se examinó la distribución de las TIMs en función de ambos tipos de aguas.

○ Mecanismo de plegamiento con relación a las HOHs fCavP y CavP

La Figura 27 muestra que no hay una clara correlación entre el número de HOHs CavP y HOHs fCavP y el mecanismo de plegamiento. Esto indica que los rearrreglos sustanciales o ligeros de los residuos de la interfaz que conllevan a poblar un número de estados en el desplegamiento

químico no está determinado por la cantidad de moléculas de agua que hidratan cualquiera de las dos regiones propuestas para la TIM; la CavP y fCavP.

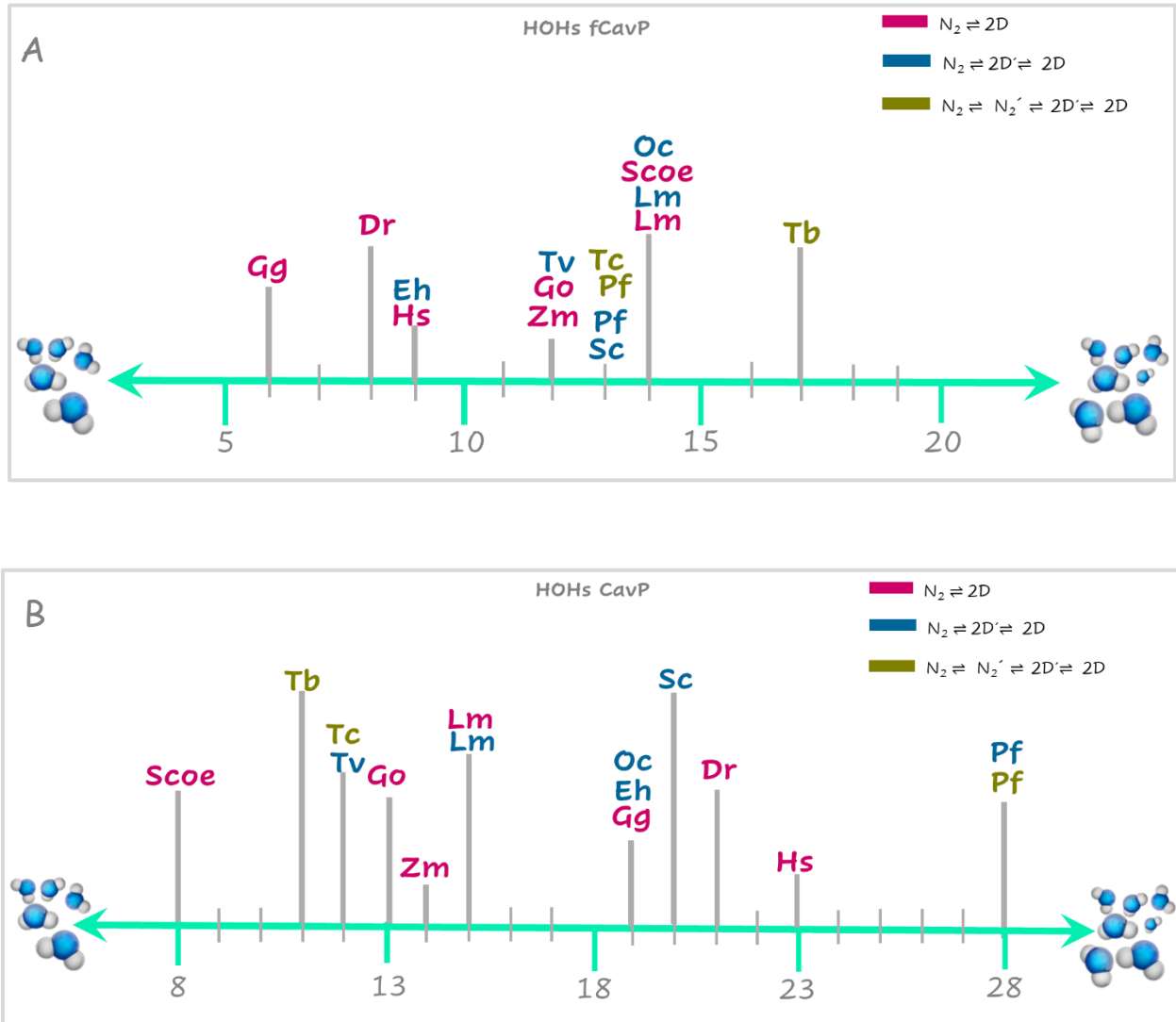
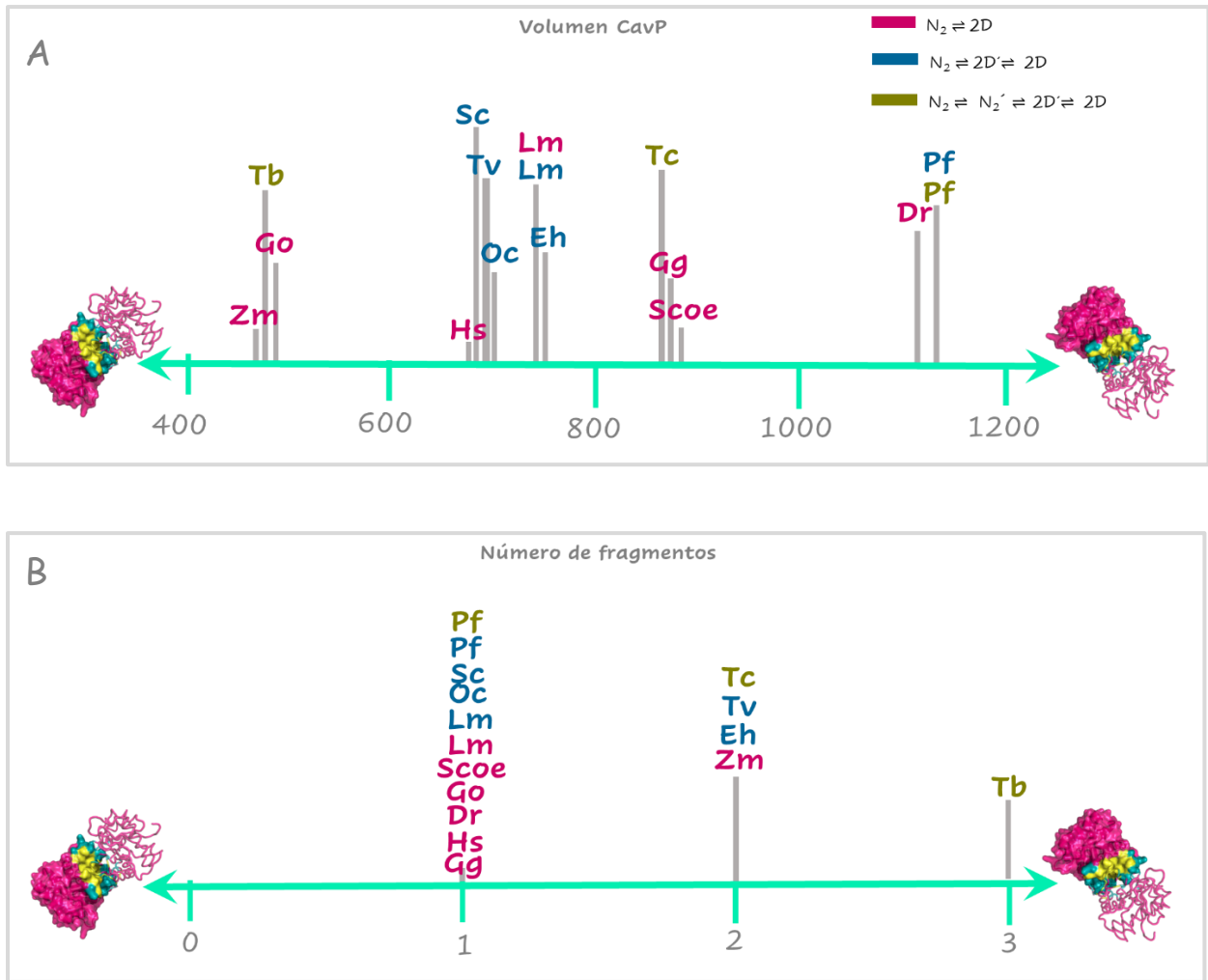


Figura 27.-Distribución de las TIMs que cuentan con mecanismo de plegamiento químico descrito, en relación con el número de moléculas de agua, **A)** fuera de la CavP (HOHs fCavP) y **B)** en la cavidad (HOHs CavP). En (■) TIMs que describen un mecanismo de dos estados ($N_2 \rightleftharpoons 2D$), en (■) TIMs que describen un mecanismo de tres estados con intermediarios monoméricos ($N_2 \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$) y en (■) TIMs que describen un mecanismo de cuatro estados, con intermediarios diméricos y monoméricos, respectivamente ($N_2 \rightleftharpoons N_2' \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$). Hay TIMs que cuentan con más de un plegamiento descrito, dependiendo de las condiciones de concentración de

○ Mecanismo de plegamiento con relación a las características de la CavP

Al examinar si las propiedades que describen a la CavP (volumen, número de fragmentos, número de aberturas y área total de la abertura) están relacionadas con un determinado mecanismo de plegamiento, no se encontró correlación (Fig. 28). La organización de las TIMs en cada característica es indistinta al mecanismo de plegamiento que describe cada proteína. Para cada propiedad de la CavP, el acomodo de las TIMs es homogéneo.



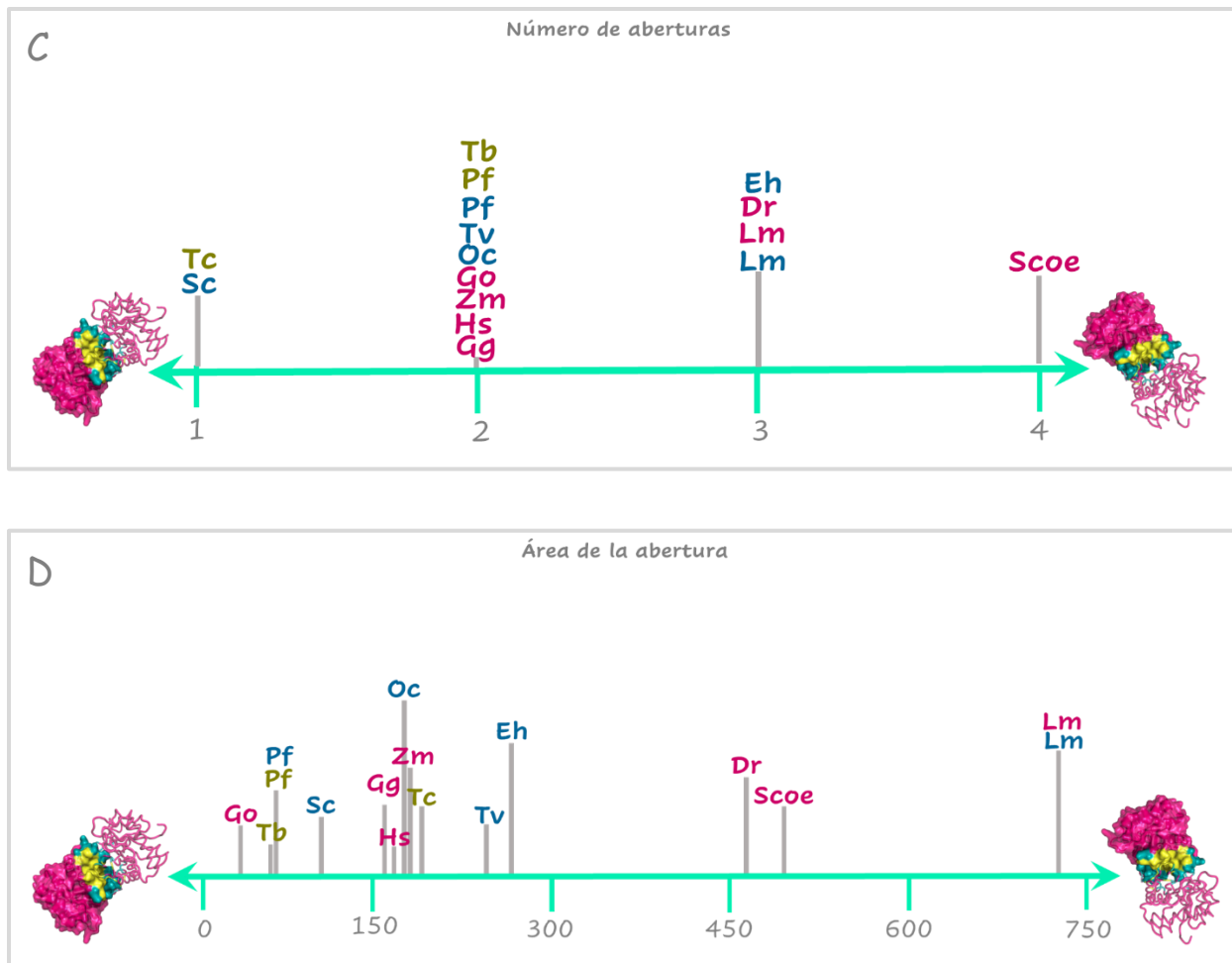


Figura 28.—Distribución de las TIMs que cuentan con mecanismo de plegamiento químico descrito, en relación con las propiedades de la CavP **A)** volumen de la CavP, **B)** Número de fragmentos en la CavP, **C)** Número de aberturas y **D)** Área de la abertura. En (■) TIMs que describen un mecanismo de dos estados ($N_2 \rightleftharpoons 2D$), en (■) TIMs que describen un mecanismo de tres estados con intermediarios monoméricos ($N_2 \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$) y en (■) TIMs que describen un mecanismo de cuatro estados, con intermediarios diméricos y monoméricos, respectivamente ($N_2 \rightleftharpoons N_2' \rightleftharpoons 2D' \rightleftharpoons 2D$). Hay TIMs que cuentan con más de un plegamiento descrito,

El conjunto de propiedades evaluadas; tanto de la interfaz como de la hidratación para las TIMs reflejaron que ninguna de estas propiedades correlaciona con el mecanismo de plegamiento que se visita por desnaturalización química. Los resultados hasta ahora obtenidos muestran que la hipótesis planteada no es verdadera; sin embargo, pensamos que puede existir errores en la metodología propuesta particularmente en dos aspectos: 1) al ser

la CavP una cavidad abierta que varía en el área de la o las aberturas; el número de aguas consideradas en esta región pudo verse aumentado o disminuido en algunos casos. Afectando así al número total de aguas consideradas como parte de la interfaz y por ende de la CavP, 2) en el trabajo de Rodier F., *et. - al.*, 2005, se considera que las aguas de la interfaz son aquellas que interactúan con residuos de ambos monómeros. En este trabajo, adicionalmente se contemplaron las moléculas de agua que interactúan única y exclusivamente con residuos de un monómero, pues se valoró que al ser la interfaz un continuo entre ambos monómeros, éstas moléculas de agua también estarían influyendo en el desencadenamiento de los rearrreglos sustanciales o ligeros, llevando a un mecanismo de dos o más estados, respectivamente. A pesar de estos errores metodológicos nuestros resultados mostraron que no hay correlación entre las características de la interfaz, las propiedades de hidratación y el mecanismo de plegamiento químico de las TIMs. Por este mismo motivo no fue posible realizar la predicción para aquellas TIMs que no cuentan con la descripción de mecanismo de plegamiento.

11. Moléculas de agua conservadas: ubicación e interacciones

Pese a no identificar correlación entre las características de la interfaz y las propiedades de hidratación con el mecanismo de plegamiento, con el servidor -Dimensional Structural Superposition (3d-SS) se buscó identificar las moléculas de agua invariantes o conservadas en phyla particulares del árbol filogenético, entre los dominios Eucarya y Bacteria y finalmente entre todas las TIMs; con el objetivo de examinar si estas moléculas de agua y/o las interacciones que mantienen entre los residuos de ambos monómeros; podrían vincularse con un mecanismo de plegamiento determinado. El siguiente análisis detalla las moléculas de agua localizadas como conservadas en cada grupo; así como las interacciones que mantienen éstas con los residuos de la interfaz.

Dado que los resultados en cuanto a las características de la interfaz y las propiedades de hidratación evidenciaron grandes diferencias entre las EuTIMs y las BacTIMs; decidimos

conveniente identificar las moléculas de agua conservadas en tres distintos niveles: I) en phyla de los dos dominios localizados en el árbol, II) entre EuTIMs y BacTIMs y III) en todas las TIMs analizadas. Esto se realizó con el objetivo de reconocer si el tipo y número de moléculas de agua conservadas se ve afectado por el nivel de análisis.

○ Moléculas de agua conservadas en phyla del árbol filogenético

En la disposición de las especies en el árbol filogenético, se ubicaron aquellas que pertenecen a un mismo phylum. Del total de phyla ubicados, se seleccionaron aquellos que contaban con mayor representación de especies. Para las BacTIMs se optó por las especies de phylum Firmicutes y para las EuTIMs se eligió el phylum Euglenozoa.

De las 25 EuTIMs que contemplamos en nuestra base de datos; TbbTIM, TcTIM, LmTIM y LsTIM forman parte del phylum Euglenozoa. La Tabla 8 resume las aguas conservadas en estas cuatro TIMs; así como las interacciones que mantienen con los residuos de la interfaz; tanto conservados y no conservados. Se aprecia que las cuatro EuTIM del phylum Euglenozoa conservan entre ellas un total de 19 HOHs interfaz. Diez de estas moléculas de agua (4 HOHs fCavP y 6 HOHs CavP) interactúan con residuos conservados de la interfaz. El que las HOHs conservadas mantengan interacciones con los residuos conservados de la interfaz, nos hace referencia a una red de interacción importante al menos en las TIMs de este phylum.

De las 19 moléculas de agua conservadas en las especies de phylum Euglenozoa; 10 son HOHs fCavP, 7 HOHs CavP y 2 moléculas de agua (HOH 252 y 290) han desplazado su hidratación fuera de la interfaz. Estas dos moléculas, en TbbTIM son HOHs fCavP, sin embargo, en las 3 TIMs restantes se han desplazado e hidratan la superficie expuesta al solvente de la interfaz; no quedan ocultas entre ambos monómeros del ensamble figurando como HOHs fCavP (Fig. 29).

Por su parte, para las BacTIMs se optó por el phylum Proteobacteria, el cual está representado por BmTIM, HpTIM, BhTIM, EcTIM y SmaTIM.

Los resultados mostraron que las BacTIMs del phylum Proteobacteria cuentan únicamente con tres moléculas de agua conservadas (Fig. 30). Es importante notar que las tres moléculas de agua no se conservan su posición, ya sea HOHs CavP o fCavP; en todas las especies del phylum. De hecho, las 3 moléculas de agua pueden hidratar la superficie de la interfaz expuestas al solvente, en distintas especies. Así mismo, el HOH 304, que en la mayoría de las especies es una HOH fCavP, para BhTIM es una HOH CavP (Tabla 9). Estas diferencias son una muestra de la alta heterogeneidad de la interfaz de las BacTIMs; tanto en el área de esta como en el volumen de la CavP.

Moléculas de agua conservadas en las especies del phylum Proteobacteria							
Monómeros que participan en el ensamble dimérico más estable (PISA)							
MonD				MonA			
BmTIM	HpTIM	BhTIM	EcTIM	SmaTIM	Interacción con aa conservados	Interacción con aa No conservados	
301					R102	D81	
302					-	G17, G19, T49	D69, H71
303					-	T49, A48, L51, S52	T49, S52, R53
304	A2025	A277	B409	A481	-	A48, S52, T49	G17, T49
305					-	H71	Q68, I96
306					-	R53, H71	D81, H106
307					-	S52, T49, S52, R83	Q68, D81
308					-	Q68, I96, H99	D105
309					T79	H78, D81	A48
312					-	H71, H78, 81	D81, Q68, K14
315					-	-	M86, E89, R53
320					-	D69	C80
327					-	H107	H71, H78
328					-	H78	Q68
329					-	D105	D69
335	B2081	B269	B593	B537	R102	-	R102
356					-	D69	D69, I82
357					-	D81	389
358					G80	-	407
369					-	Q68	408
384					-	I82	409
385					-	H106, H107	418

Tabla 9.- Moléculas de agua conservadas en las TIMs que pertenecen al phylum Proteobacteria: **BmTIM**- *Brucella* *militensis*, **HpTIM**-*Helicobacter pylori*, **BhTIM**-*Bartonella henselae* y **EcTIM**-*Escherichia coli* y **SmaTIM**-*Stenotrophomonas maltophilia*. En cada recuadro se muestran los monómeros más estables que participan en el ensamble dimérico más estable (monómero D (MonD) y monómero A (MonA)). En este caso la proteína de referencia es BmTIM. Las moléculas de agua en la interfaz de BmTIM son las que se enlistan en la primera columna de lado izquierdo para ambos recuadros. En (■) HOHs fCavP y en (■) HOHs CavP. Las moléculas de agua conservadas en el resto de las TIMs del phylum Proteobacteria se muestran con el mismo color de molécula de agua al que pertenecen en BmTIM; a excepción de aquellas que se muestran en (■), que son moléculas de agua que no conservan su posición en todas las especies del phylum Proteobacteria. Se señala los residuos conservados y No conservados con los que interactúan las moléculas de agua conservadas.

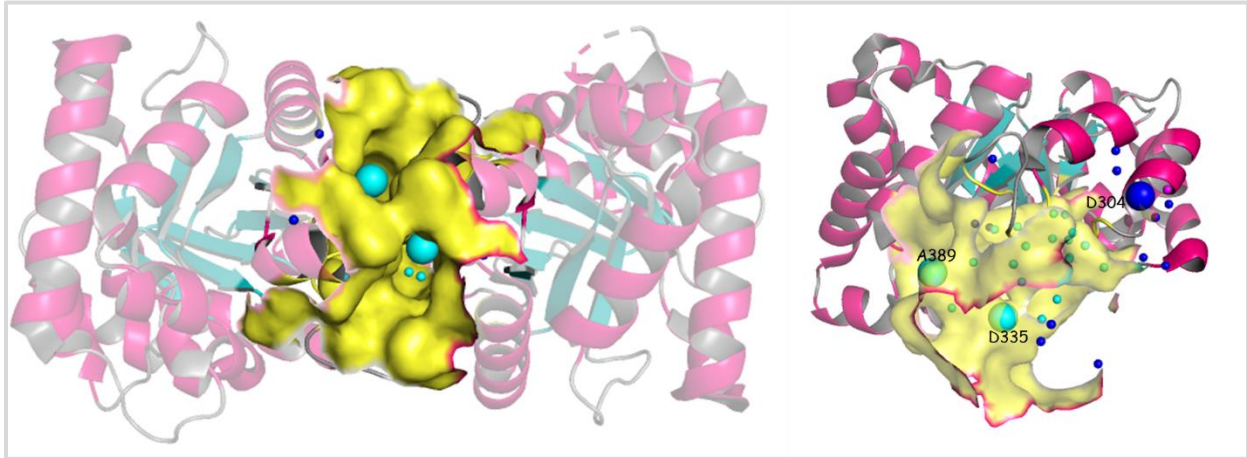


Figura 30.- Moléculas de agua conservadas en las 5 especies del phylum Proteobacteria. Como referencia se muestra la estructura de BmTIM (PDB 4NVT). Las moléculas de HOH de mayor tamaño son las HOHs conservadas. En (■) se muestra la CavP, en (■) HOHs CavP, (■) HOHs fCavP. **A)** Vista frontal del dímero BmTIM mostrando la abertura de la CavP y **B)** Vista lateral de un monómero de BmTIM. En cada molécula de agua conservada se señala su número.

Al contrastar el número de moléculas de agua conservadas en ambos Phyla de cada dominio, identificamos que el Phylum Euglenozoa de las EuTIMs cuenta con un mayor número de moléculas de agua conservadas (Tabla 8) y que, a su vez, la mayoría de ellas conservan su ubicación en las regiones de la interfaz; ya sea en la CavP o fCavP. Al buscar moléculas de agua conservadas entre las especies de ambos Phyla, detectamos una sola molécula de agua conservada. Esta molécula de agua hidrata la CavP en las nueve especies. Al identificar si la molécula de agua hidrata la interfaz de la ArcTIM de *Thermoplasma acidophilum* no se encontró, por lo cual no está conservada. El hecho de identificar una sola molécula de agua conservada entre dos phyla de dominios distintos nos hace referencia de la heterogeneidad estructural, química y de hidratación en la interfaz de las TIMs, lo cual se hace más amplio en cantidad y calidad cuando se compara entre especies de dominios distintos, específicamente entre EuTIMs y BacTIMs.

○ Moléculas de agua conservadas en EuTIMs y BacTIMs

Al buscar moléculas de agua conservadas en cada dominio, se identificó que exclusivamente, las EuTIMs cuentan con éstas, pues para las BacTIMs no se reconoció ninguna molécula de agua conservada. Las 25 EuTIMs analizadas, cuentan con un total de 6 moléculas de agua conservadas, de las cuáles 2 hidratan la CavP y 4 la región fCavP, para todas las especies del dominio Eucarya (Tabla. 10) (Fig. 31).

Moléculas de agua conservadas en las EuTIMs											
Monómeros que participan en el ensamble dimérico más estable (PISA)											
MonC						MonD					
TbbTIM	At(clo)TIM	OcTIM	CpavTIM	Interacción con aa conservados	Interacción con aa NO conservados	TbbTIM	At(clo)	Oc	Cpav	Interacción con aa Conservados	Interacción con aa No Conservados
252	-	-	-		I83, D86, H48(B)	252	-	-	-	-	Y87, H48
254	-	-	-		N67	254	-	-	-	-	N16, T45, H48
257	-	-	-		H48	255	B309	B581	B328	-	N67
258	-	-	-	G77	-	256	-	-	-	-	Q66
259	-	-	-	-	N16, T45, H48	257	-	-	-	-	I83, D86
264	B314	A518	A284	E78A	-	261	-	-	-	E78B	N67, V79
270	-	-	-	E78A, R99	-	263	-	-	-	E78B, R99B	N67
277	-	-	-	E78A, R99	N67	270	B306	B579	B282	H96B, R99B	Q66, V93
280	-	-	-	-	G17	275	B341	B552	B363	-	G77
286	-	-	-	G77B	F46	289	-	-	-	-	F46
300	-	-	-	H96	-	290	B315	B582	B313	-	L47, M51
539	-	-	-	E78A	N67, V79	294	-	-	-	E78B	E78
545	A342	A514	A533	R99A	Y103	297	-	-	-	E78	-
						305	-	-	-	R99B	Y103
						318	-	-	-	R99B, E78B, R99A	-

Tabla 10.- Moléculas de agua conservadas en las TIMs que pertenecen al dominio EuTIMs. Se enlistan 4 EuTIMs a manera de ejemplo: Tbb- *Trypanosoma brucei brucei*, At(clo)TIM-*Arabidopsis thaliana cloroplasto*, OcTIM-*Oryctolagus cuniculus* y Cpav-*Cryptosporidium Pavarum*. En cada recuadro se muestran los monómeros más estables que participan en el ensamble dimérico más estable (monómero C(MonC) y monómero D (MonD)). En este caso TbbTIM es la proteína de referencia. Las moléculas de agua en la interfaz de TbbTIM son las que se enlistan en la primera columna de lado izquierdo para ambos recuadros. En (■) HOHs fCavP y en (■) HOHs CavP. Las moléculas de agua conservadas en el resto de las TIMs del dominio Eucarya se muestran con el mismo color de molécula de agua al que pertenecen en TbbTIM. Se señala los residuos conservados y No conservados con los que interactúan las moléculas de agua conservadas.

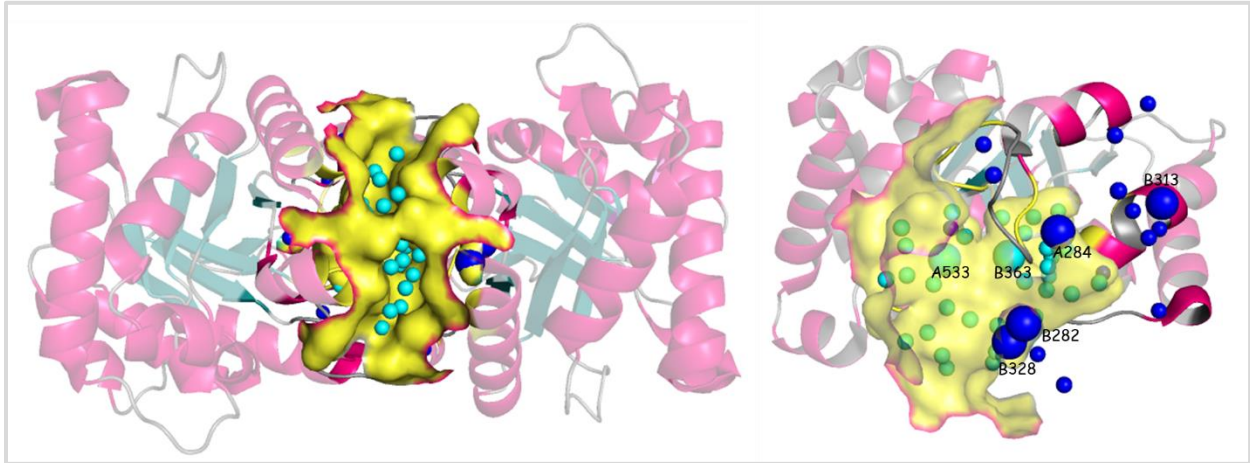


Figura 31.- Moléculas de agua conservadas para las especies del dominio Eucarya. Como referencia se muestra la estructura de CpvTIM (PDB 3KRS). Las moléculas de HOH de mayor tamaño son las HOHs conservadas. En (■) se muestra la CavP, en (■) HOHs CavP, (■) HOHs fCavP. **A)** Vista frontal del dímero CpvTIM mostrando la apertura de la CavP y **B)** Vista lateral de un monómero de CpvTIM. En cada molécula de agua conservada se señala su número.

Al buscar moléculas de agua invariantes en las BacTIMs, no se identificó ninguna molécula de agua conservada. Tomando en cuenta lo señalado en líneas anteriores, en relación con el Phyla Proteobacteria donde reconocimos únicamente tres moléculas de agua invariantes, este resultado no fue inesperado. Así pues, la nula identificación de moléculas de agua conservadas en la interfaz de las TIMs bacterianas son una evidencia más de la heterogeneidad estructural, química y por lo tanto de hidratación de ésta.

○ Moléculas de agua conservadas en las TIMs

La superposición de todas las estructuras mostró que no hay moléculas de agua invariantes en la interfaz. Si consideramos lo propuesto en la introducción; la interfaz de proteínas diméricas se establece a partir de la formación de interacciones directas o indirectas, que otorgan especificidad y estabilidad entre ambos monómeros. Independientemente de la especie y del dominio, la interfaz de todas las TIMs está formada por los mismos elementos de estructura secundaria con el mismo modo de asociación. Por lo tanto, se tenía la

expectativa de que la interfaz de las TIMs mostraría características conservadas y poco variables. Debido a esto, hipotetizamos que en la interfaz de las TIMs habría determinadas moléculas de agua responsables de mantener el ensamble en todas las TIMs. No obstante, al retomar la amplia distribución de las propiedades de la interfaz analizadas, como de la hidratación, se evidenció que la interfaz y la hidratación de esta región en las TIMs es ampliamente diversa y heterogénea.

CONCLUSIONES

Las TIMs son proteínas homodiméricas que muestran disparidad en las características estructurales de la interfaz entre diferentes especies. Tan sólo el área de la interfaz y el porcentaje de área polar de la misma; muestra una diferencia de 324 \AA^2 y 30 %, respectivamente. La amplia distribución se observa más marcadamente entre las EuTIMs y las BacTIMs; siendo estas últimas las que pueblan valores mayores.

Se identificó que la Lys13 del asa $\beta\alpha$ -1, la Thr75 y Gly76 del asa $\beta\alpha$ -3, la His95, Glu97 y Arg98 del asa $\beta\alpha$ -4 son los seis residuos interfaciales conservados para ambos monómeros en las TIMs evaluadas de los tres dominios. En adición, con la información de CASTp, se distinguió que la Asn65 y Glu77 del asa $\beta\alpha$ -3, la Arg98 y Glu104 del asa $\beta\alpha$ -4 y la Lys112 de la hélice α -5 son residuos conservados que forman la CavP de las EuTIMs y BacTIMs; a pesar de no ser identificados como residuos conservados de la interfaz. Lo importante a resaltar es que tanto la interfaz como la CavP son un continuo en el ensamble de la TIM, la formación de límites precisos entre una región y otra es válida para su estudio; sin embargo, en los hechos esto no sucede. La ausencia de límites distinguibles también se observó en la hidratación de cada región propuesta, la CavP y fCavP.

Observamos que la resolución no determina el nivel de hidratación; sin embargo, de las características estructurales evaluadas identificamos que el área polar de la interfaz es el único rasgo que determina el nivel de hidratación.

Se advirtió una hidratación diferenciada entre la CavP y fuera de ella; dónde está última cuenta con una menor distribución y un valor promedio similar entre dominios. Contrariamente, la CavP muestra niveles de hidratación mayores y más amplios entre las especies. No se identificó las causas de la vasta diversidad en cuanto al número de aberturas, el área total, el volumen y la posible formación de fragmentos para la CavP. No obstante, se distinguió que el volumen y el porcentaje de área polar de la CavP, determinan el número de moléculas de agua que hidratan esta región, repercutiendo en el nivel de hidratación general de la interfaz. Razón

por la cual, proponemos que la CavP y su hidratación son responsables de la extensa diversidad estructural y de hidratación en la interfaz de las TIMs evaluadas. Finalmente, así como en las características estructurales de la interfaz, las TIMs bacterianas son las que cuentan con mayor distribución y niveles de hidratación.

No distinguimos una correlación entre las características estructurales y las propiedades de hidratación de la interfaz de las TIMs, con el mecanismo de desplegamiento químico. Dicho de otra manera, los rearrreglos sustanciales o ligeros de los residuos de la interfaz que conllevan a poblar un número de estados determinado no está definido por cualquiera de las características evaluadas de la interfaz. Consideramos que más allá de intentar correlacionar una variable cuantitativa (características de interfaz y propiedades de hidratación) con una variable cualitativa o proceso (mecanismo de plegamiento), es importante plantear el análisis como un hecho multivariable, como una interfaz continua que integra un dímero dinámico y fluctuante, tanto en las condiciones micro ambientales de la célula, experimentales o en silico.

La repercusión de la vasta heterogeneidad en características estructurales y de propiedades de hidratación incurre en el número de moléculas de agua conservadas tanto a nivel de phylum, de dominio y en el total de las TIMs. Particularmente la alta heterogeneidad en las características interfaciales de las BacTIMs ocasiona la nula presencia de moléculas de aguas conservadas en las TIMs.

En conclusión, al retomar que las estructuras cristalinas de todas las TIMs, muestran estructuralmente los mismos elementos de estructura secundaria integrando la interfaz (asas $\beta\alpha$ 1,2, 3 y 4 en cada subunidad), que la dimerización contribuye a la estabilización, a partir de incrementar la rigidez de las asas $\beta\alpha$ interfaciales y finalmente que todas las TIMs silvestres, son activas principalmente como dímeros, a excepción de algunas Arqueas que son activas como tetrámeros (Katebi, 2014), manteníamos la hipótesis que las características estructurales de la interfaz fueran homogéneas o poco variables entre especies de un mismo dominio, lo cual posibilitaría la identificar las características estructurales y propiedades de hidratación que desencadenan un mecanismo de plegamiento determinado. Contrariamente,

nuestros resultados evidenciaron que la interfaz es muy heterogénea entre las distintas TIMs evaluadas; especialmente en las BacTIMs, que cuentan con las interfaces más variables tanto en estructura como en hidratación. Dicha diversidad y amplia distribución, repercute en la ausencia de una correlación entre las características estructurales de la interfaz, las propiedades de hidratación y un mecanismo de desplegamiento químico determinado.

PERSPECTIVAS

En cuanto a las propiedades de interfaz:

- 1) Analizar y describir la red de interacciones entre los residuos conservados y no conservados de la interfaz utilizando RIP-MD
- 2) Evaluar la red de interacciones y reconocer en qué porcentaje los átomos de cadena principal y lateral contribuyen a la interfaz de la proteína
- 3) Evaluar el empaquetamiento de la interfaz
- 4) Calcular los puentes de hidrógeno y las uniones salinas. Medir el número, las distancias y los ángulos de estos.

En cuanto a las propiedades de hidratación de la interfaz:

- 1) Elaborar un mapa general de la interfaz, con el fin de reconocer de regiones particulares, tanto de residuos como de la hidratación.
- 2) Debido a que la presencia de ligando en la estructura acarrea modificaciones estructurales y por ende la modificación de los residuos de interfaz se puede ver afectada incidiendo así en los niveles de hidratación, planteamos conveniente evaluar los niveles de hidratación de cada estructura en relación con la presencia o ausencia de ligando.
- 3) Seleccionar TIMs para las cuales el mecanismo de plegamiento este corroborado por varias técnicas experimentales, con la finalidad de realizar una simulación de dinámica molecular que permita corroborar el número de moléculas de agua en la interfaz de cada especie.
- 4) Efectuar un lapso del mecanismo de desplegamiento con un tiempo de trayectoria permitido, con el objetivo de reconocer los rearrreglos de las interacciones, tanto de los residuos como de las moléculas de agua. Detectar cuántas y cuáles son las moléculas de agua que muestran mayores fluctuaciones, con la finalidad de ubicar si moléculas de agua particulares están incidiendo en la manifestación de un mecanismo de plegamiento determinado.

- 5) Postular criterios generales para resolver los mapas de densidad electrónica de las estructuras analizadas, con la finalidad que el número de moléculas de agua totales en cada estructura este dado por criterios estandarizados
- 6) Postular mismos métodos de afinamiento para refinar los mapas de densidad electrónica de las estructuras analizadas, con la finalidad que el número de moléculas de agua totales en cada estructura este dado por criterios estandarizados
- 7) Se propone minimizar las estructuras de las TIMs con un mismo campo de fuerza y posteriormente efectuar el protocolo planteado o una simulación de dinámica molecular; para detectar las moléculas de agua de interfaz.

En cuanto a las características de la CavP:

- 1) Corroborar las características de la cavidad principal utilizando el servidor CAVER
- 2) Reconocer el patrón de evolución de las propiedades que describen a la cavidad principal. Identificar si hay una causa estructural que origine la amplia diversidad de sus características.

“A esto me refiero cuando hablo de libertad, de dar libre juego a todos los impulsos creadores y benevolentes que yacen en nuestro corazón. Por lo general, estamos ciegos ante este hecho: que estamos en posesión de todas las facultades necesarias para ser felices y que nos harán amarnos unos a otros”

Suzuki, D., Budismo Zen y psicoanálisis, 1964

REFERENCIAS

1. Almazán R, C., Arreola, R., Rodríguez L.D., Aguirre L, B., Tuena de Gómez P.M., Pérez M, R., Costas M., Gómez-Puyou & Torres-Larios A., 2008, Structural Basis of Human Triosephosphate Isomerase Deficiency. *Journal Biological Chemistry*. 283, 34: 23254-23263
2. Conte, L., Chotia, C., Janin, J., 1999, The atomic structure of protein-protein recognition sites, *J Mol Biol*, 285, 5: 2177-2198
3. Chruszcz, M., Potrzebowski, W., Zimmerman, M., Grabowski, M., Zheng, H., Lasota, P., Minor, W., 2008, Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals- does symmetry matter? *Protein Science*, 17: 623-632
4. Benjwal, S., Verma, S., Röhm, K-H & Gursky, O., 2009, Monitoring protein aggregation durin thermal unfolding circular dichroism experiments. *Protein Science*, 15, 3: 635-639
5. Bajadur, P.R., Chakrabarti, P., Rodier, F., & Janin, J., 2003, Dissecting subunit Interfaces in homodimer Proteins, *PROTEINS*, 53: 708-719
6. Binkowski, T., Naghibzadeh, S., Liang, J., 2003, CASTp: Computed Atlas of Surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*. 13: 3352-335
7. Bucher, J., Kiefhaber, T., *Protein Folding Handbook*, 2005, WILEY-VCH. Germany
8. Dey, S., Pal, A., Chakrabarti, P., & Janin, J., 2010, The subunit interfaces of weakly associated Homoedimeric proteins, *Science Direct*, 398: 146-160
9. Doyle, C.M., Rumfeldt, J.A., Broom, H.R., Broom, A., Stathophulos, P.B., Vassall, K.A., Almey, J.J., & Meiering, E.M., 2013, Energetics of oligomeric Protein folding and association, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531: 44-64
10. Edgar, R., 2004, Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high trougput, *Nucleic Acids Research*. 32,5:1792-1797
11. Hong, S., Kim, D., 2016, Interaction between bound water molecules and local protein structures: A statical analysis of the hydrogen bond structures around bound water molecules, *Proteins*, 84: 43-51

12. Ikura, T., Urakubo, Y., Ito, N., 2004, Water-mediated interaction at a protein-protein interface, *Chemical Physics*, 307: 111-119
13. Janin, J., Bahadur, R.P., & Chakrabarti., 2008, Protein-protein interaction and quaternary structure, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41, 2: 133-180
14. Jones, S., & Thornton, J., 1996, Principles of protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13-20
15. Katebia, A., Jernigan, R., 2013, The critical role the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics and functionality, *PROTEIN SCIENCE*, 23:213-228
16. Krissinel, E., 2001, Macromolecular complex in crystals and solutions, *Acta Cryst D Biol Crystallography*, 67: 376-385
17. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018, Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 6:1547-1549
18. Kuriyan J., Konforti, B. & Wemmer, D, 2013, *The molecules of life: Physical and chemical principles.* USA. Garland Science, Taylor, and Francis Group.
19. Lapidus, L., 2017, Protein unfolding mechanisms and their effects on folding experiments, *F100Research*, 6: 1-8
20. Larsen, T., Olson, A., Goodsell, A., 1998, Morphology of protein-protein interfaces, *Current Biology*, 6, 4: 421-427
21. Lee, B., Richard, F.M., 1971, The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility, *Journal of Molecular Biology*, 55: 379-400
22. Lehninger, A.L., Nelson, D.L and Cox, M, 2013, *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York: Wort Publishers. Freeman. 6th edition
23. Levy Y, Onuchic, J, 2004, Water and proteins: A love-hate relationship, *PNAS*, 101: 3325-3326
24. Liseur, C., 2014, *The Assembly of Protein Oligomers-Old stories and New Perspectives with Graph Theory*
25. Miller, S., 1989, The structure of interfaces between of subunits of dimeric and tetrameric proteins, *Protein Eng*, 3: 77-83

26. Morris, E. and Searle, M., 2012, Overview of Protein Folding Mechanism: Experimental and Theoretical approaches to probing energy landscapes. Wiley Online Library. 68: 28.2.1-28.2.2
27. Nájera, H., Costas, M., & Fernández, A., 2003, Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme, *Biochem*, 370: 785-792
28. Ofran, Y., & Rost, B., 2003, Analyzing six types of Protein-Protein Interfaces, *Science direct*, 325: 377-387
29. Praveen, S., Ramesh, J., Sivasankari, P., Sowmiya, G., & Sekar, K., 2008, WAP (version 2.0): an updated computing and visualization server for water molecules, *Applied Crystallography*, 41: 952-954
30. Rodier, F., Prasad. R., Chakrabarti, P., & Janin, J., 2005, Hydration of protein-protein interfaces. *Proteins*, 60: 36-45
31. Romero, S., Fernández, D. and Costas, M., 2018, Estabilidad termodinámica de proteínas. *Educación química*. 29, 3: 3-17
32. Saha, R.P., Bahadur, R.P., & Chakrabarti, P., 2005, Inter residue Contacts in Proteins and proteins-protein interfaces and their use in characterizing the Homoedimeric interface. *Proteome*, 4: 1600-1609
33. Shanthi, V., Rajesh, C.K., Jayalakshmi, J., Vijay, V.G & Sekar, K., 2003, WAP: water analysis package—a Web bases package to calculate geometrical parameters between water oxygen and protein atoms, *Applied Crystallography*, 36: 167-168
34. Soper, A., Castner, E.W., & Luzar, A., 2003, Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? *Biophys Chem*, 105: 649-666
35. Yan, C., Wu, F., Jernigan, R.L., Dobbs, D., & Honavar, V., 2008, Characterization of Protein-Protein Interface, *Protein J*, 27,1: 59-70
36. Voet, D. and Voet, J., 2011, *Biochemistry*. United States of America. John Wiley & sons, INC. 4th edition.

37. Wedemeyer, W., and Scheraga, H., 2001, Protein Folding: Overview of Pathways. *Eyclopedia of life sciences*, 1-9
38. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M., 2008, Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures, *FEBS J*, 275, 1: 1-21
39. Xu, D., Tsaii, C-J., Nussinov, R., 1997, Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interface. *Protein Engineering*, 10, 9: 999-1012

ANEXO

ANEXO 1- Base de datos generada al ejecutar el protocolo, a manera de ejemplo, la base de datos de ZmTIM.

Residuos interfaz ZmTIM							
%	BSA (Å ²)	ASA	Residuo A	Residuo B	ASA	BSA (Å ²)	%
80	5.62	7.51	N13	N13	7.14	4.95	70
50	26.19	61.83	k15	k15	64.96	26.36	50
100	126.84	128.93	C16	C16	129.8	127.71	100
40	23.9	69	N17	N17	65.49	23.73	40
70	16.3	26.56	G18	G18	26.65	17.17	70
30	23.71	84.65	T19	T19	82.8	29.46	40
40	35.78	103.97	T20	T20	110.83	42.76	40
10	0.29	112.72	D21	D21	75.82	0.29	10
100	21.44	23.45	P48	P48	23.6	21.26	100
90	67.88	76.95	Y49	Y49	78.42	68.5	90
100	118.35	119.45	V50	V50	121.47	120.24	100
100	27.84	30.49	F51	F51	26.1	24.23	100
100	1.67	1.83	L52	L52	3.96	3.01	80
60	38.98	73.35	P53	P53	76.92	38.66	60
10	0.62	58.99	V54	V54	71.36	0.6	10
100	35.3	38.79	Q68	Q68	39.5	36.21	100
60	3.95	7.49	N69	N69	8.89	4.86	60
90	36.14	44.9	W71	W71	45.45	35.63	80
40	10.13	27.71	G75	G75	27.25	10.13	40
80	48.8	66.9	G76	G76	68.09	49.48	80
60	51.46	101.98	A77	A77	103.94	51.78	50
80	48.8	66.92	F78	F78	67.4	36.78	60
100	144.34	144.59	T79	T79	146.29	146.16	100
90	63.98	71.19	G80	G80	69.95	63.13	100
90	56.03	66.18	E81	E81	65.6	54.37	90
100	26.44	26.92	V82	V82	27.93	27.45	100
70	3.52	5.36	S83	S83	4.78	2.82	60
100	102.03	106.71	M86	M86	100.65	96.04	100
110	2.68	2.68	L87	L87	1.84	1.84	110
60	68.47	132.88	N89	N89	128.64	51.11	40
70	59.75	85.48	L90	L90	91.87	57.87	70
50	1.17	2.42	I96	I96	2.63	1.18	50
50	7.17	16.53	H99	H99	16.39	6.99	50
70	42.46	63.28	E101	E101	64.07	41.37	70
80	53.35	67.05	R102	R102	66.81	54.54	80
40	43	140.13	L105	L105	141.02	43.89	40
60	57.19	111.88	L106	L106	109	54.73	60
20	9.53	61.18	F112	F112	63.08	7.35	20

Apartado 1) Se enlista los residuos que integran la interfaz para cada uno de los monómeros de ZmTIM. Para cada residuo se muestra su ASA, su BSA (Å²) y su % de enterramiento.

Monómero A							Monómero B								
Distancia	Átomo	HOH	Distancia	Átomo q' interactúa	Residuo	Átomo q' interactúa	aa MonA	Átomo q' interactúa	Residuo	Átomo q' interactúa	Distancia	HOH	Átomo	Distancia	
3.1	ND2	442	3	N	K15	OD1	N13	ND2	T79	OG1	3.1				
2.9	O	438													
2.7	NZ	380	2.8	OE2	E101	NZ	k15						432	O	3.6
3.1	NZ	484	3	OD1	N13	N									
2.8	NZ	416	3	NE2	Q68	O									
			3	N	N17	O									
3.2	O	464					C16	O	G76	N	2.9	437	O	3.3	
3	ND2	451					N17	ND2	G76	O	3				
2.9	OD1	430	3	O	K15	N									
3	OD1	464													
2.6	N	318					G18								
2.7	O	368													
2.6	OG1	329					T19								
3.4	OG1	507													
2.7	OG1	366	2.7	H-N-CP	D21	O-CL	T20	ND2	N89	OD1	2.8				
3.2	OG1	481													
2.7	O	354													
3.2	OD1	485					D21								
2.5	OD2	306													
3.1	N	481													
			3.3	N	L52	O	P48								
			3	N	F51	O									
3.1	N	480	3.1	N	L52	O	Y49								
3	OH	403	1.8	O-CP	N69	H-O-CP						502	OH	2.9	
3	N	362					V50								
			3	O	P48	N	F51								
			3.1	O	Y49	N	L52								
			3.3	O	P48	N									
2.7	O	382					P53								
3	N	362					V54								
2.8	N	388	3	O	K15	NE2	Q68	OE1	G80	N	2.9	432	OE1	2.8	
3.2	O	475													
2.9	OD1	333					N69								
3	ND2	367													
2.7	O	352	2.8	O	V82	N	W71								
							G75								
			2.8	N	F78	O	G76	N	C16	O	2.9				
								O	N17	ND2	3.6				
								O	C16	N	3				
2.8	O	412					A77								
			2.8	O	G76	N	F78								
			3	N	E81	O									
							T79	OG1	E101	OE1	2.7				
								N	E101	OE1	2.8				
								OG1	N13	ND2	3				
								O	R102	NH1	2.9				
2.8	O	386					G80	N	Q68	OE1	2.8				
2.9	OE1	403	3	O	F78	N	E81	OE2	R102	NH2	3.3				
2.7	OE1	367													
3.3	OE2	497													
2.7	O	346													
3.3	O	403	2.8	N	W71	O	V82								
2.8	N	403													
2.7	OG	364	3.2	N	M86	OG	S83								
			3.1	N	L87	O	M86								
			3.1	N	L90	O									
			3.2	OG	S83	N									
			2.5	O-CP	S83	H-N-CP									
			3.1	O	S83	N	L87								
			3.1	N	L90	O									
2.5	O	304					N89	OD1	T20	N	2.9				
								OD1	T20	OG1	3.5				
2.6	O	319	3.1	O	M86	N	L90								
			3.1	O	L87	N									
3.2	O	475					I96								
3	N	475	3.1	N	E101	ND1	H99								
2.9	NE2	442	3	N	R103	O	H99								
2.6	OE2	332	2.9	N	L105	O	E101	OE1	T79	OG1	2.6				
			2.8	NZ	K15	OE2		OE1	T79	N	2.9				
			3.1	ND1	H99	N									
3	NH2	390	3.1	N	L106	O	R102	NH1	E81	OE2	3.3	411	NH2	2.9	
			2.8	O	H99	N		NH1	E81	OE2	2.7				
								NH1	T79	O	2.9				
2.7	O	361	2.9	O	E101	N	L105								
2.6	O	335	3.1	O	R102	N	L106								
							F112								

Apartado 2A) Se enlistan las interacciones encontradas residuo-residuo y residuo-agua, para cada residuo del monómero A. Se detalla los átomos que participan en cada tipo de interacción y la distancia.

Monómero A							aa Mon B	Monómero B						
Distancia	Átomo	HOH	Distancia	Átomo q'interactúa	Residuo	Átomo q'interactúa		Átomo q'interactúa	Residuo	Átomo q'interactúa	Distancia	HOH	Átomo	Distancia
			3	OG1	T79	ND2	N13	OD1	K15	N	3	555	O	2.9
							k15	NZ	E101	OE2	2.8	519	ND2	3.1
								N	N13	OD1	3	557	NZ	2.9
								O	Q68	NE2	2.9			
3.1	O	364	2.9	N	G76	O	C16					462	O	3.2
			3	P	G76	ND2								
			3.6	O	G76	ND2	N17	N	K15	O	3	604	ND2	3.1
												483	OD1	2.8
												462	OD1	2.7
							G18					544	O	2.9
												535	N	2.9
							T19							
2.9	OG1	304	2.9	OD1	N89	N	T20	H-N-CP	N89	O-CL	1.9	495	O	2.8
			3.5	OD1	N89	OG1						617	OG1	3.2
							D21					426	OD2	3.6
												486	OD2	2.8
												486	OD1	2.6
												501	OD2	3.6
							P48	O	L52	N	3.4			
								O	F51	N	2.9			
2.9	OH	386					Y49	O	L52	N	3.1	602	N	3
												516	OH	2.9
							V50					513	O	2.8
							F51	N	P48	O	2.9			
								N	P48	O	3.4			
								N	Y49	O	3.1			
							P53					429	O	2.6
							V54					513	N	3
2.7	OE1	346	2.8	N	G80	OE1	Q68	NE2	K15	O	2.9	606	O	3.1
												503	N	2.8
2.9	ND2	386					N69					438	ND2	3.1
												421	OD1	2.9
							W71	N	V82	O	2.8	458	O	2.8
												557	O	3
							G75					550	O	2.9
			2.9	O	C16	N	G76	O	F78	N	2.8			
			3	N	C16	O								
							A77					587	N	3
												475	O	2.7
							F78	O	E81	N	3			
								N	G76	O	2.8			
			2.9	OE1	E101	N	T79							
			2.6	OE1	E101	OG								
			2.9	NH1	R102	O								
			3.1	ND2	N13	OG								
			2.9	OE1	Q68	N	G80					502	O	2.8
			2.4	NH2	R102	OE2						432	O	2.6
3.5	OE2	497	2.7	NH1	R102	OE2	E81	N	F78	O	3	411	OE2	2.5
												516	OE1	2.8
												438	OE1	2.7
												516	O	3.4
												516	N	2.9
							V82	O	W71	N	2.8			
							S83	OG	M86	N	3.1	437	OG	2.7
								O	M86	N	3.2			
								O	L87	N	3.1			
								O	L90	N	3			
								N	S83	OG	3.1			
								N	S83	O	3.2			
								N	S83	O	3.1			
3.1	ND2	481					N89					622	ND2	3.3
2.7	O	366	2.8	N	T20	OD1								
							L90	N	M86	O	3	492	O	2.8
							I96					606	O	3.2
							H99	O	R102	N	2.9	606	N	3.1
								ND1	E101	N	3	519	NE2	2.9
			2.7	OG1	T79	OE1	E101	O	L105	N	2.9			
			2.8	N	T79	OE1		N	H99	ND1	3	447	OE2	2.7
								OE2	K15	NZ	2.8			
			3.3	OE2	E81	NH2		N	H99	O	2.9	430	NH2	2.9
			2.8	OE2	E81	NH1	R102	O	L106	N	3.1	411	NH2	3.3
			2.9	O	T79	NH1								
							L105	N	E101	O	2.9	514	O	2.8
												540	O	2.9
							L106	N	R102	O	3.1	449	O	2.7
							F112							

Apartado 2B) Se enlistan las interacciones encontradas residuo-residuo y residuo-agua, para cada residuo del monómero B. Se detalla los átomos que participan en cada tipo de interacción y la distancia.

HOHs Monomero A							
A				B			
HOH	Residuo	Átomo	Distancia	HOH	Residuo	Átomo	Distancia
304	N89	O	2.5	411	R102	NH2	2.9
306	D21	OD2	2.5	432	k15	O	3.6
318	G18	N	2.6		Q68	OE1	2.8
319	L90	O	2.6	437	C16	O	3.3
329	T19	OG1	2.6	502	Y49	OH	2.9
332	E101	OE2	2.6		N69	ND2	2.8
333	N69	OD1	2.9				
335	L106	O	2.6				
346	E81	O	2.7				
352	W71	O	2.7				
354	T20	O	2.7				
361	L105	O	2.7				
362	V50	N	3				
	V54	N	3				
364	S83	OG	2.7				
366	T20	OG1	2.7				
367	N69	ND2	3				
	E81	OE1	2.7				
368	G18	O	2.7				
380	k15	NZ	2.7				
382	P53	O	2.7				
386	G80	O	2.8				
388	Q68	N	2.8				
390	R102	NH2	3				
403	Y49	OH	3				
	E81	OE1	2.9				
	V82	O	3.3				
	V82	N	2.8				
412	A77	O	2.8				
416	k15	NZ	2.8				
430	N17	OD1	2.9				
438	N13	O	2.9				
442	N13	ND2	3.1				
	H99	NE2	2.9				
451	N17	ND2	3				
464	C16	O	3.2				
	N17	OD1	3				
475	Q68	O	3.2				
	I96	O	3.2				
	H99	N	3				
480	Y49	N	3.1				
481	T20	OG1	3.2				
	D21	N	3.1				
484	k15	NZ	3.1				
485	D21	OD1	3.2				
497	E81	OE2	3.3				
507	T19	OG1	3.4				

Apartado 3A) Se enlistan las aguas localizadas en la interacción residuo-agua.

Solo aquellas distinguidas en color integran la interfaz. En cian () HOHs

CavP y en azul () HOHs fCavP. HOHs localizadas en el monómero A.

HOHs Monomero B							
A				B			
HOH	Residuo	Átomo	Distancia	HOH	Residuo	Átomo	Distancia
304	T20	OG1	2.9	411	E81	OE2	2.5
346	Q68	OE1	2.7		R102	NH2	3.3
364	C16	O	3.1	421	N69	OD1	2.9
366	N89	O	2.7	426	D21	OD2	3.6
386	Y49	OH	2.9	429	P53	O	2.6
	N69	ND2	2.9	430	R102	NH2	2.9
481	N89	ND2	3.1	432	E81	O	2.6
497	E81	OE2	3.5	437	S83	OG	2.7
				438	N69	ND2	3.1
					E81	OE1	2.7
				447	E101	OE2	2.7
				449	L106	O	2.7
				458	W71	O	2.8
					C16	O	3.2
				462	N17	OD1	2.7
				475	A77	O	2.7
				483	N17	OD1	2.8
				486	D21	OD2	2.8
					D21	OD1	2.6
				492	L90	O	2.8
				495	T20	O	2.8
				501	D21	OD2	3.6
				502	G80	O	2.8
				503	Q68	N	2.8
				513	V50	O	2.8
					V54	N	3
				514	L105	O	2.8
				516	Y49	OH	2.9
					E81	OE1	2.8
					V82	O	3.4
					V82	N	2.9
				519	H99	NE2	2.9
					N13	ND2	3.1
				535	G18	N	2.9
				540	L106	O	2.9
				544	G18	O	2.9
				550	G75	O	2.9
				555	N13	O	2.9
				557	k15	NZ	2.9
					G75	O	3
				587	A77	N	3
				602	Y49	N	3
				604	N17	ND2	3.1
				606	Q68	O	3.1
					I96	O	3.2
					H99	N	3.1
				617	T20	OG1	3.2
				622	N89	ND2	3.3

Apartado 3B) Se enlistan las aguas localizadas en la interacción residuo-agua.

Solo aquellas distinguidas en color integran la interfaz. En cian () HOHs

CavP y en azul () HOHs fCavP. HOHs ubicadas en el monómero B.

Base de datos general

EuTIMs																		
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	No. aa.	TIM	Cadenas	aa. Interfaz	Área interfaz	% área polar	% área no polar	HOHs Int	CavP	fCavP	Vol SM	Área SM	Aberturas	Área abertura	No. cavidades
1	<i>Arabidopsis thaliana citosolica</i>	4OBT	1.6	257	At(cit)TIM	AJB	39 39	1478.2	38.4	61.5	25	13	12	552.9	465.6	1	86.7	1
2	<i>Arabidopsis thaliana cloroplasto</i>	4OHQ	2.15	256	At(clo)TIM	AJB	39 40	1597.7	48.71	51.3	27	9	18	473.3	465.4	1	88.8	1
3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1M00	1.7	275	CeTIM	AJB	40 42	1557.2	35.89	64.1	26	22 [1]	4	853.6	817.6	2	70.3	1
4	<i>Cryptosporidium Parvum</i>	3KRS	1.55	271	CpavTIM	AJB	43 44	1592.6	57.14	42.9	55	37[6]	18	1194.5	1095.9	2	95.7	1
5	<i>Coccidioides immitis</i>	356D	2.2	310	CI TIM	AJA	43 43	1783.4	44.18	55.9	35	12	23	556.2	484.1	2	37.5	1
6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4MKN	1.1	270	CrTIM	AJA	40 40	1615.9	45	55	33	14	19	601.9	569.1	1	118.6	2
7	<i>Entamoeba histolytica</i>	1M6J	1.5	261	EhTIM	AJB	40 41	1580.4	42.5	57.5	28	19	9	743	710	3	94.1	2
8	<i>Fasciola hepatica</i>	6R8H	1.9	250	FhTIM	FJE	41 43	1642.2	46.34	53.65	22	8	14	545	545.5	2	70.5	1
9	<i>Callus gallus</i>	1TPH	1.8	247	CgTIM	AJB	45 42	1635.9	44.44	55.55	25	19	6	884.4	802.8	2	77.7	1
10	<i>Homo sapiens</i>	4POC	1.6	254	HsTIM	AJB	45 43	1705.2	46.66	53.3	32	23[2]	9	680	602.3	2	81.5	1
11	<i>Leishmania siamensis</i>	5CG7	1.88	271	LsTIM	AJA	37 37	1458.5	45.94	54	31	17	14	604	575.4	1	120.9	2
12	<i>Leishmania mexicana</i>	1AMK	1.83	251	LmTIM	AJA	37 38	1467.8	45.94	54	29	15	14	741.9	561.8	3	249.4	1
13	<i>Opisthorchis viverrini</i>	5ZFX	1.75	272	OvTIM	DJC	42 42	1646.2	45.23	54.8	33	29[1]	4	793.8	878	2	31.8	2
14	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1RZR	1.5	248	OcTIM	BJA	45 44	1708.7	46.66	53.3	33	19[2]	14	694.2	598.3	2	82.7	1
15	<i>Penaeus vannamei</i>	5EYW	1.7	249	PvTIM	AJB	41 40	1607.6	43.9	56	24	15	9	552.3	540.9	2	78.5	2
16	<i>Plasmodium falciparum</i>	1LYX	1.9	248	PfTIM	AJA	45 45	1660.1	53.33	46.7	41	28	13	1151	1013.1	2	36.3	1
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1NEY	1.2	247	ScTIM	AJB	43 43	1625.9	53.48	46.5	33	20	13	681.5	596.6	1	111.4	1
18	<i>Schistosoma mansoni</i>	600I	2.14	256	SmTIM	DJC	40 41	1554.7	50	50	30	24[2]	6	806.5	768.3	2	75.3	1
19	<i>Taenia solium</i>	600C	2.02	253	TsTIM	AJA	39 40	1501.4	41.02	59	28	22	6	834.1	766.4	2	73.4	1
20	<i>Trichomonas vaginalis</i>	3QST	1.75	255	TvTIM	AJA	43 43	1634.7	41.86	54	24	12	12	686.2	655.6	2	127.4	2
21	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1TCD	1.83	249	TcTIM	AJB	37 40	1480.5	45.94	54	25	12	13	843.3	685.6	1	171.5	2
22	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	3Q37	1.65	251	TbbTIM	CJD	38 37	1602.4	47.36	60.5	28	11	17	478.2	506.1	2	70.8	3
23	<i>Zea mays</i>	6CG9	1.8	256	ZmTIM	AJB	38 38	1491.6	39.47	61.4	26	14	12	477.4	475.9	2	83.1	2
24	<i>Ancestro reconstruido de TIM</i>	6NEE	1.9	252	An(eu)TIM	BJA	44 44	1619.3	38.63	61.36	29	23	6	977	990.1	2	99.5	1
BacTIMs																		
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	No. aa.	TIM	Cadenas	aa. Interfaz	Área interfaz	% aa polares	% aa No polares	HOHs Int	CavP	fCavP	Vol SM	Área SM	Aberturas	Área abertura	No. cavidades
25	<i>Bartonella henselae</i>	3KXQ	1.6	275	BhTIM	BJA	40 41	1495.3	52.5	47.5	41	27[3]	14	920.1	907.7	2	74.2	2
26	<i>Bruceella melitensis</i>	4NVT	2.1	262	BmTIM	DJA	40 39	1536.1	65	35	45	31[2]	14	1241.4	1083.8	2	113.5	1
27	<i>Clostridium perfringens</i>	4YBF	1.54	251	CpTIM	AJA	40 40	1708	52.5	47.5	32	19	13	674.3	451.9	2	41.6	3
28	<i>Deinococcus radiodurans</i>	4Y90	2.1	247	DrTIM	DJC	40 40	1484.2	52.5	47.5	29	21	8	1121.8	894.2	3	152	1
29	<i>Escherichia coli</i>	4MVA	1.43	279	EcTIM	BJA	39 39	1603.8	58.97	41.02	53	37	16	1368.9	952.5	1	170	1
30	<i>Gemmata obscuriglobus</i>	4Y96	1.58	255	GoTIM	BJB	40 40	1535.5	47.5	52.5	25	13[1]	12	493.8	456.6	1	42.8	1
31	<i>Helicobacter pylori</i>	2JQC	2.3	233	HpTIM	BJA	44 42	1613.5	43.18	56.81	35	15	20	497.1	544.3	3	26.5	1
32	<i>Leptospira interrogans serovar</i>	4YMZ	1.87	251	LisTIM	BJA	43 43	1751.9	55.81	44.18	30	17[1]	13	665.4	750.5	2	30.2	2
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3TA6	1.41	267	MtTIM	BJA	42 42	1683.7	57.14	42.87	47	26[2]	21	779.1	642.5	2	137.3	1
34	<i>Staphylococcus aureus</i>	3M9Y	1.9	254	SaTIM	BJA	43 43	1614.8	55.81	44.18	40	32[1]	8	1261.9	1317.2	4	44.4 20.9	4
35	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6W4U	1.7	259	SmaTIM	BJA	40 42	1492.9	47.5	52.5	47	36[4]	11	1606.6	964.5	1	185.3	1
36	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5IBX	1.65	255	SpTIM	CJD	40 41	1580.1	55	45	50	43	7	1294.9	1369.8	4	283 66.9	2
37	<i>Streptomyces coelicolor</i>	4Y9A	2.29	261	ScoeTIM	BJA	43 43	1662.8	53.48	46.51	22	8	14	886.1	738.1	4	131.8	1
38	<i>Synechocystis sp.</i>	6BVE	1.78	245	SspTIM	BJA	43 43	1689.1	53.69	46.34	29	15	14	414.2	490.5	2	13.75	3
39	<i>Thermus thermophilus</i>	1YYA	1.6	250	TtherTIM	BJA	40 42	1630.7	52.5	47.5	44	29[2]	15	773.4	650.3	3	104.7	1
ArcTIM																		
Ejemplar	Especie	PDB	Resolución (Å)	No. aa.	TIM	Cadenas	aa. Interfaz	Área interfaz	% aa polares	% aa No polares	HOHs Int	CavP	fCavP	Vol SM	Área SM	Aberturas	Área abertura	No. cavidades
40	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	5CSR	1.94	226	TaTIM	CJB	37 35	1473.1	51.35	48.64	16	2	14	139.8	131.7	2	27.1	1