



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

LA MUTANTE N16D DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE HUMANO COMO

BLANCO PARA SER IDENTIFICADO POR PROTEÍNAS CON MÓDULOS DE

ANQUIRINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. CERVANTES LÓPEZ MARÍA MERCEDES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ITZHEL GARCÍA TORRES
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, INP.

COMITÉ TUTOR: DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. DIEGO GONZÁLES HALPHEN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. OCTUBRE 2024



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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

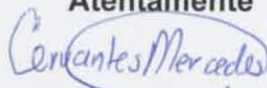
De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**LA MUTANTE N16D DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE HUMANO
COMO BLANCO PARA SER IDENTIFICADO POR PROTEÍNAS CON MÓDULOS
DE ANQUIRINA**

Que presenté para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, es original, de mí autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente



CERVANTES LÓPEZ MARÍA MERCEDES
No de cuenta UNAM: 414008636

(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

LA MUTANTE N16D DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE HUMANO COMO

BLANCO PARA SER IDENTIFICADO POR PROTEÍNAS CON MÓDULOS DE

ANQUIRINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. CERVANTES LÓPEZ MARÍA MERCEDES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ITZHEL GARCÍA TORRES
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, INP.

COMITÉ TUTOR: DR. HÉCTOR RIVEROS ROSAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. DIEGO GONZÁLES HALPHEN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. OCTUBRE 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0578/2024
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **19 de febrero de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **CERVANTES LÓPEZ MARÍA MERCEDES** con número de cuenta **414008636** con la tesis titulada **"LA MUTANTE N16D DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE HUMANO COMO BLANCO PARA SER IDENTIFICADO POR PROTEÍNAS CON MÓDULOS DE ANQUIRINA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ITZHEL GARCÍA TORRES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. GLORIA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA
Vocal: DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES
Vocal: DRA. YALBI ITZEL BALDERAS MARTÍNEZ
Vocal: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
Secretario: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de agosto de 2024.

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/RCHT/EARR/rcht

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de ingresar a la maestría, permitiéndome obtener las herramientas y recursos para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada con No. de CVU: 959646 como parte del programa de becas nacionales de posgrado (maestría).

Al Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil por brindarme el espacio y material necesario para realizar el proyecto de investigación. El proyecto de tesis fue financiado por Recursos Fiscales para Investigación con los proyectos registrados en el Instituto Nacional de Pediatría con los números 062/2019, 072/2019 y 016/2020.

Agradezco a mi comité tutorial, el Dr. Diego González Halphen y el Dr. Héctor Riveros Rosas, por el tiempo dedicado en este proyecto. Sus conocimientos y experiencia ayudaron a mejorar enormemente este trabajo. Gracias por cada consejo y corrección proporcionada.

A mi tutora la Dra. Itzhel García Torres por brindarme el espacio para poder realizar este proyecto, los conocimientos compartidos en todo este tiempo, así como su apoyo y paciencia para poder concluir este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a la Dra. Itzhel por su apoyo y tiempo dedicado a este trabajo, gracias por permitirme conocer a un gran ser humano. Gran parte de la motivación por culminar este trabajo que parecía tan lejano y difícil fue el cariño, respeto y admiración que le tengo, discúlpeme por tardar tanto tiempo.

Agradezco a mis sinodales, la Dra. Gloria Hernández Alcántara, el Dr. Sergio Enríquez Flores, la Dra. Yalbi Itzel Balderas Martínez, el Dr. Luis David Alcaraz Peraza por su valiosa revisión e invaluable comentarios que mejoraron en gran medida la calidad de este trabajo.

Agradezco a mi amigo Diego, amigo y confidente en toda mi etapa de estudiante. Gracias porque hasta la fecha y aún en la distancia siempre estás presente para recibir mis llamadas y platicar cuando lo necesito.

Agradezco a mi esposo Moisés, gracias por toda tu ayuda, por motivarme y confiar en mí aún en los momentos donde yo ya no lo hacía. Yo no sabía que podía lograrlo pero tú nunca lo dudaste. Te amo.

Por último, agradezco a Dios y a la vida, por poder vivir este proceso que me ha hecho más resiliente y me ha permitido ver que sí es posible.

*Esta tesis está dedicada a mí,
tanto en el presente como en el futuro.
Nada es tan difícil como lo parece.*

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO	4
Reconocimiento de blancos específicos.....	4
Origen de las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas.....	5
Diseño de proteínas con repeticiones de anquirina	6
Propiedades de las ARs diseñadas.....	8
Aplicaciones de las ARs diseñadas.....	10
Estrategias utilizadas para detectar blancos utilizando ARs diseñadas.....	14
Interacciones entre proteínas mediante estudios de docking molecular.....	18
Características estructurales de la triosafosfato isomerasa	20
La desamidación como modificación postraducciona l en las proteínas.....	22
Mecanismos de desamidación	23
Factores que controlan la tasa de desamidación	24
La importancia de la desamidación.....	25
La TIM de humano (HsTIM) es susceptible a desamidación; efectos funcionales y estructurales.....	26
5. OBJETIVO	32
Objetivos específicos.....	32
6. METODOLOGÍA.....	33
Selección de Proteínas ARs diseñadas para la interacción con la HsTIM WT y N16D	33
Obtención de modelos de la estructura 3D de las ARs diseñadas	33
Acoplamiento molecular mediante ClusPro	34
Obtención de las ARs seleccionadas para los ensayos de interacción.....	36
Sobreexpresión de las ARs diseñadas.....	36
Sobreexpresión de HsTIM WT y N16D	37
Purificación de las proteínas recombinantes estudiadas.....	38
Ensayos para evaluar la interacción entre las ARs diseñadas seleccionadas y la HsTIM (WT y N16D)	41
Ensayos para evaluar la interacción	41
Análisis de los modelos de acoplamiento molecular	42
7. RESULTADOS	43
Los modelos tridimensionales de proteínas ARs diseñadas demuestran precisión y similitud estructural.....	43
Los experimentos de acoplamiento molecular entre proteínas ARs diseñadas y las estructuras de HsTIM WT y N16D revelan preferencia por su interfase dimérica.....	44

Ensayos para evaluar la interacción entre las ARs diseñadas seleccionadas y la HsTIM (WT y N16D)	48
La sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes revela alta pureza.	48
Los primeros experimentos de interacción entre proteínas ARs diseñadas y HsTIM revelan poco o ningún grado de Interacción con la HsTIM N16D y la HsTIM WT	51
La interacción entre la proteína ARs 55a32 y la HsTIM N16D revela una posible interacción.....	52
La evaluación de la interacción entre la proteína 55-6 y la HsTIM N16D revela interacción con pasos adicionales de purificación.	52
La comparación de la interacción entre las proteínas ARs 55a32 y 55-6 con la HsTIM N16D y HsTIM WT revela diferencias en la interacción entre las variantes.	55
 Los análisis de las interacciones entre anquirinas diseñadas 55-6 y 55a32 con la HsTIM WT y N16D revelan diferencias en el reconocimiento molecular.	56
 8. DISCUSIÓN	64
Interacciones diferenciales	64
El tamaño de las ARs diseñadas y su interacción con el blanco	65
55a32 y 55-6 poseen diferente composición de aminoácidos variables.	67
 Exploración de la interfase de la HsTIM y evaluación de anquirinas diseñadas mediante acoplamiento molecular.	71
 Evaluación de interacciones mediante ensayos pull-down.....	75
 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	77
 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
 11. ANEXOS	85
 Anexo A. Generación de proteínas con una repetición de anquirina diseñadas.	85
Anexo B. Generación de proteínas con dos y tres repeticiones de anquirina diseñadas.	89
Anexo C. Los 10 modelos obtenidos de cada acoplamiento molecular entre las ARs diseñadas con la HsTIM WT y la N16D.....	90

1. RESUMEN

Las proteínas con módulos de anquirina diseñadas han sido utilizadas para la identificación de blancos terapéuticos para distintas enfermedades debido a que pueden variar en tamaño y específicamente en siete residuos de aminoácidos localizados en el módulo de anquirina, logrando obtener interacciones de alta afinidad, además de un bajo costo de producción.

La desamidación de la triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM) está implicada en procesos de envejecimiento proteico y recientemente se ha visto que se acumula en células con cáncer de mama. Es por eso que su identificación puede ser relevante para el diagnóstico de esta enfermedad. Como un símil de la HsTIM desamidada naturalmente, en este trabajo se utilizó la mutante N16D de HsTIM.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar alguna o algunas proteínas con módulos de anquirina que sean capaces de reconocer a la mutante N16D de HsTIM. Para cumplir con el objetivo planteado se seleccionaron anquirinas candidatas, a partir de una biblioteca de anquirinas, por medio de herramientas de acoplamiento molecular (*i.e.*, *Docking*) para realizar ensayos de interacción. Posteriormente se analizaron los modelos de acoplamiento molecular de las anquirinas que interaccionaron con la N16D HsTIM para detallar las posibles causas de la interacción.

Se logró identificar a la anquirina diseñada 55a32 como una candidata para el reconocimiento diferencial entre la HsTIM WT y la N16D debido a su tamaño (1 módulo) y a la composición de sus aminoácidos variables. Además, se vio que el análisis de acoplamiento molecular puede ser una herramienta útil para acotar los objetivos del estudio, aunque no es tan contundente al momento de hacer inferencias sobre las causas de las interacciones.

2. ABSTRACT

Proteins with designed ankyrin modules have been used to identify therapeutic targets for various diseases because they can vary in size and specifically in seven variable amino acid residues achieving high-affinity interactions and low production costs.

HsTIM deamidation is involved in protein aging processes, and recently, it has been observed to accumulate in breast cancer cells. That is why its identification may be relevant for the diagnosis of this disease. As a simile to the naturally deamidated HsTIM, the HsTIM mutant N16D was used in this work.

Therefore, this study aimed to identify one or more ankyrin proteins capable of recognizing the HsTIM N16D mutant. To achieve this goal, candidate ankyrins were selected from a library of ankyrins using molecular *docking* tools (*i.e.*, *Docking*) to perform interaction assays. Subsequently, the molecular *docking* models of the ankyrins that interacted with the N16D HsTIM were analyzed to detail the possible causes of the interaction.

The designed ankyrin 55a32 was identified as a candidate for differential recognition between HsTIM WT and N16D due to its size (1 module) and the composition of its variable amino acids. In addition, it was observed that molecular *docking* analysis could be a valuable tool for defining study objectives. However, it needs to be more conclusive when making inferences about the causes of interactions.

3. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento de blancos proteicos ha sido un campo importante dentro de la biología molecular dado que muchos de éstos suelen estar asociados con enfermedades. Particularmente, dentro del área de la medicina, existen proteínas que pueden sufrir mutaciones, cambios conformacionales o bien modificaciones postraduccionales que conllevan al desarrollo de enfermedades.

Dentro del abanico de herramientas para poder detectar blancos proteicos, se han explorado diversas moléculas desde secuencias de DNA o de RNA de cadena sencilla como los aptámeros, hasta proteínas modulares que forman andamiajes estructurales como las proteínas repetitivas; sin olvidar a los anticuerpos que son por excelencia las moléculas naturales de reconocimiento. Sin embargo, los anticuerpos cuentan con varias limitaciones entre las que se incluyen su compleja producción y la utilización de animales de laboratorio para obtenerlos. Debido a lo anterior, en las últimas décadas se han estudiado otro tipo de herramientas de detección de blancos que pudieran ser más moldeables a diferentes escenarios y cuya producción sea factible y económica. Dentro de estas opciones se incluyen las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas, proteínas modulares que presentan regiones con aminoácidos variables que favorecen la interacción con diferentes blancos. Estas proteínas se han empleado con diferentes enfoques que abarcan desde aplicaciones bioquímicas como “chaperonas” en la cristalización de proteínas hasta en opciones terapéuticas, inhibiendo por ejemplo, al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). De hecho, algunas de las anquirinas diseñadas se encuentran en estudios preclínicos con resultados prometedores.

En un acercamiento para aplicar la tecnología de las anquirinas diseñadas, en este proyecto de investigación se utilizó como objeto de estudio a la triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM) junto con la mutante sencilla HsTIM N16D. Esta proteína juega un rol fundamental

dentro de la glucólisis y su desamidación está implicada en procesos de envejecimiento proteico. Para este fin se implementó un enfoque híbrido utilizando herramientas bioinformáticas y ensayos de interacción *in vitro*. Los ensayos de acoplamiento molecular permitieron hacer una pre-selección de proteínas con repeticiones de anquirina obtenidas previamente en el laboratorio, como candidatas para ser probadas en los ensayos de interacción y así poder validar la eficacia de estas anquirinas para reconocer a la proteína blanco en cuestión.

Cabe remarcar la importancia de los métodos bioinformáticos en el avance hacia la identificación de blancos terapéuticos. Mediante el uso de servidores y programas como I-TASSER y ClusPro es posible acotar las posibilidades y con base a las predicciones dirigir las investigaciones optimizando la obtención de resultados. En este estudio en particular, pudimos determinar el tipo de anquirinas con mayor potencial para interaccionar con el blanco de estudio lo que permitió dirigir el análisis *in vitro* utilizando sólo las mejores candidatas. Por otro lado, los ensayos de acoplamiento aportan información valiosa acerca de las posibles interacciones entre dos proteínas de estudio y en este caso se obtuvo información de las regiones que pudieran ser mejoradas en las anquirinas diseñadas para eficientizar su interacción específica con el blanco molecular propuesto.

4. MARCO TEÓRICO

Reconocimiento de blancos específicos

Los estudios dedicados a la identificación de blancos proteicos han proporcionado una cantidad significativa de información que es fundamental para desarrollar aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Entre estos estudios, los enfoques que se centran en el reconocimiento de la interacción entre proteínas proporcionan una perspectiva más profunda sobre cómo estas

moléculas interaccionan entre sí (Tiede *et al.*, 2014), lo que resulta esencial para el desarrollo de una variedad de aplicaciones en investigación, diagnóstico y terapia.

Los anticuerpos son proteínas multiméricas de alto peso molecular y son las herramientas más utilizadas para el reconocimiento de blancos ya que pueden unirse a prácticamente cualquier blanco determinado con alta afinidad y especificidad (Stumpp *et al.*, 2008); sin embargo, presentan diversas limitaciones: requieren enlaces disulfuro y glicosilación para mantener su estabilidad (Binz *et al.*, 2005), además, suelen ser difíciles de producirse en sistemas bacterianos y, a menudo, son sensibles a temperaturas elevadas. Por tanto, la producción de estas proteínas suele ser generalmente costosa y depende de cultivos de células eucariotas cuya optimización consume mucho tiempo (Skerra, 2007).

Esto ha motivado al desarrollo de alternativas para diseñar proteínas de unión, algunas de las cuales se basan en andamios estructurales similares a las inmunoglobulinas, mientras que otras exploran topologías de proteínas completamente diferentes. Estas alternativas representan atractivos puntos de partida para el diseño de nuevas moléculas de unión con aplicaciones tanto en la investigación clínica como en la básica. Como resultado de este enfoque, se han identificado y caracterizado numerosas proteínas de unión alternativas y actualmente se está evaluando su potencial aplicación en el área de la investigación médica. Entre las estrategias antes mencionadas, el diseño de proteínas con repeticiones de anquirina representa un enfoque innovador que se vislumbra como especialmente prometedor.

Origen de las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas

El diseño de proteínas con repeticiones de anquirina se basa en las proteínas que cuentan con repeticiones de anquirina de origen natural (*i.e.* Ankyrin repeats, ARs), los cuales son uno de los motivos proteicos de repetición más abundantes en la naturaleza (Lopez-Ortiz *et al.*, 2020; Walser *et al.*, 2022). Estas ARs desempeñan un papel crucial en la regulación de numerosas

interacciones proteína-proteína, lo que las convierte en componentes fundamentales de numerosos procesos celulares, como la regulación transcripcional, la inmunidad innata, la transducción de señales y el control del ciclo celular (Walser *et al.*, 2022). Además, se ha observado que las ARs pueden encontrarse tanto intra como extracelularmente, e incluso asociadas a membranas, lo que sugiere su capacidad para adaptarse a diferentes ambientes celulares (Bork, 1993).

Las ARs presentan motivos estructurales repetidos que se apilan formando una estructura estable (Plückthun, 2015). Cada repetición generalmente consta de 33 residuos de aminoácidos que forman un giro β seguido de dos hélices α antiparalelas y terminan en un asa que une al giro β de la siguiente repetición (Fig. 1) (Binz *et al.*, 2003). El número de repeticiones de anquirina presentes en una proteína puede variar desde 1 hasta 33, siendo más comunes las proteínas que contienen seis o menos repeticiones (Mosavi *et al.*, 2004).

Diseño de proteínas con repeticiones de anquirina

Para aprovechar las propiedades de las ARs como moléculas de unión, se han diseñado proteínas específicamente diseñadas con la capacidad de reconocer blancos proteicos. Estas proteínas conocidas como proteínas con repeticiones de anquirina, se construyen utilizando técnicas de ingeniería genética para imitar las estructuras y funciones de las anquirinas naturales.

El desarrollo de estas proteínas se realizó mediante un enfoque de diseño por consenso, siendo el resultado del trabajo realizado por Binz y colaboradores (2003). En ese estudio, se emplearon múltiples alineamientos de proteínas con repeticiones de anquirina de origen natural para diseñar un andamio estructural estable que contenía residuos de interacción variables (Fig. 1). Al igual que las ARs naturales, las proteínas diseñadas presentan una arquitectura característica en la que un número variable de módulos estructurales (módulos de repetición) se organizan

1 10 20 30

DXXGXTPHLAAXXGHLEIVEVLLKHGADVNA

N

Y

7

Otra de las características de las anquirinas diseñadas es la presencia de una región altamente conservada en los módulos de repetición, la cual se denomina el motivo T₆ P₇ L₈ H₉ L₁₀ A₁₁ A₁₂ por los residuos de aminoácidos que la conforman (Fig. 3). En esta región, el residuo T₆ forma múltiples puentes de hidrógeno con el residuo H₉. Además, este último establece contacto mediante puentes de hidrógeno con la cadena principal del aminoácido A₃₂ y con la siguiente repetición. Esta red de puentes de hidrógeno, junto con las interacciones hidrofóbicas, son responsables de mantener la estabilidad en la proteína (Binz *et al.*, 2003).

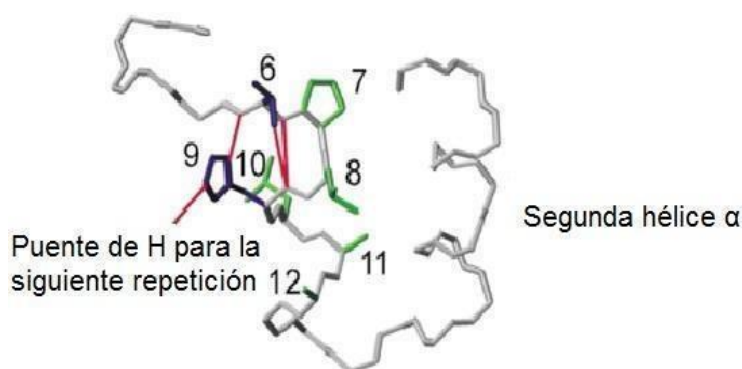


Figura 3. Motivo conservado en los módulos de repetición de las anquirinas. Los residuos de aminoácidos numerados (6-12) corresponden al motivo TPLHLAA en la primera hélice α con su patrón de puentes de hidrógeno característico. Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos y los residuos de alanina (A11 y A12) están coloreados en verde, T6 e H9 están coloreados en azul y los puentes de hidrógeno están coloreados en rojo. Modificado de (Binz *et al.*, 2003).

Propiedades de las ARs diseñadas

La estructura de andamio de las repeticiones de anquirina es muy versátil ya que permite duplicarlas, eliminarlas y/o reorganizarlas (Kobe y Kajava, 2000) lo que conduce a la generación de una mayor superficie de interacción mejorando la afinidad, situación que no suelen alcanzar las proteínas globulares. Además, la plasticidad estructural que le confiere los residuos variables permite que la superficie de unión a una proteína blanco sea modular y

variable, obteniéndose interacciones de alta afinidad y especificidad con las moléculas blanco (Binz *et al.*, 2003; Wild *et al.*, 2022).

La estabilidad térmica de las ARs en general es alta, con temperaturas medias de desnaturalización (T_m) entre 66 y 95.8 °C (Binz *et al.*, 2003). Por ejemplo, las proteínas con más de tres repeticiones son resistentes incluso a la desnaturalización por temperatura o agentes caotrópicos como el clorhidrato de guanidina (Boersma y Plückthun, 2011).

Por otra parte, el peso molecular de una proteína con un módulo de repetición, considerando las cubiertas amino y carboxilo terminal es de ≈ 12 kDa. Estas proteínas que han sido generadas hasta la fecha se componen de dos a seis módulos, con un peso molecular que oscila entre 14 y 21 kDa. Esta masa molecular es aproximadamente una décima parte de la masa molecular de un anticuerpo IgG convencional (≈ 150 kDa), o un tercio del fragmento Fab, que es actualmente el fragmento de anticuerpo más pequeño aprobado para su uso terapéutico (Leader *et al.*, 2008).

La ausencia de residuos de cisteína y en consecuencia, la imposibilidad de formar enlaces disulfuro en las ARs facilita su expresión dentro del ambiente citosólico reductor de las células eucariotas. La inserción deliberada y específica de un sitio de cisteína hace posible diversificar aún más las posibilidades de uso del andamio mediante el acoplamiento químico con compuestos como el PEG, los radionúclidos, las toxinas, las enzimas o colorantes fluorescentes (Wild *et al.*, 2022).

Tomando en cuenta la flexibilidad en tamaño, así como la ausencia tanto de enlaces disulfuro como de modificaciones postraduccionales hace que las ARs diseñadas sean ideales para una rápida y eficientemente producción y a bajo costo en sistemas de expresión simples como *Escherichia coli* (Stumpp *et al.*, 2008), logrando rendimientos de hasta 200 mg por cada litro de proteína purificada en medio de cultivo de la cepa XL1-blue.

Aplicaciones de las ARs diseñadas

Desde su primer diseño en el 2003 (Binz *et al.*, 2003), las proteínas con repeticiones de anquirina, han sido utilizadas como herramientas en diferentes aplicaciones de investigación, diagnóstico y terapia (Para más detalles consultar: (Boersma, 2018; Boersma y Plückthun, 2011; De Meyer *et al.*, 2014; Helma *et al.*, 2015; Muyldermans, 2013; Plückthun, 2015; Stumpp *et al.*, 2008). A continuación, se presentan algunos ejemplos destacados de la utilización de estas proteínas en investigación básica, así como sus aplicaciones en terapia y diagnóstico.

Aplicaciones en investigación básica

Las ARs se han utilizado como herramientas de investigación versátiles para el estudio del comportamiento y la función de las proteínas. Uno de sus usos es como biosensores en células, debido a su diseño que carece de residuos de cisteína, lo cual las hace plenamente funcionales cuando se expresan dentro del citosol. Por esto son ideales como biosensores enfocados en modificaciones postraduccionales (PTM, del inglés Post-translational Modifications) en células (Wild *et al.*, 2022).

Las PTM constituyen un medio importante para regular la actividad, localización, interacciones y vida media del proteoma celular de manera dinámica y, por tanto, son un campo de gran interés y estudio en la investigación básica. Las PTM de proteínas desempeñan un papel fundamental en la transducción de señales en las redes de señalización celulares. Ocurren intracelularmente e incluyen fosforilación, acetilación, ubiquitinación, metilación, glicosilación, y desamidación, entre muchas otras; pueden detectarse mediante espectrometría de masas o anticuerpos monoclonales. Sin embargo, la disponibilidad de anticuerpos específicos para detectar PTM es limitada, lo que ha motivado el uso de andamios moleculares diferentes a las inmunoglobulinas (Ig) (Wild *et al.*, 2022).

Kummer y colaboradores (2012) seleccionaron una ARs diseñada específicamente contra la proteína cinasa ERK2 activada por mitógeno, capaz de discriminar entre su estado inactivo (no fosforilado) y activo (fosforilado) (Kummer *et al.*, 2012). Posteriormente, la cristalografía de rayos X reveló que esta AR diseñada se une a la misma región de la cinasa ERK2, pero solo la molécula de AR diseñada y específica para fosfo-ERK2, reconoce los cambios conformacionales dentro del ciclo de activación inducido por la fosforilación. Estos sensores específicos del estado de activación pudieron precipitar selectivamente la forma afín de la quinasa a partir de los lisados celulares.

Para visualizar la ERK2 activada en células, la AR diseñada específica para fosfo-ERK2 se modificó posteriormente con el colorante solvatocrómico merocianina, cuya fluorescencia aumenta en un entorno más hidrofóbico tras unirse a su blanco. Este biosensor detectó fosfoERK2 endógeno en el núcleo de manera selectiva, es decir, no reconoció otras proteínas cinasas activadas por mitógenos o ERK2 inactiva (Kummer *et al.*, 2013).

Los biosensores específicos se han convertido en herramientas valiosas para estudiar procesos biológicos de manera espaciotemporal en tiempo real. La capacidad de las ARs diseñadas para funcionar como inhibidores alostéricos de cinasas, en contraste con los compuestos pequeños que bloquean exclusivamente el sitio activo, permite una mayor especificidad hacia las conformaciones inactivas de las enzimas farmacéuticamente relevantes (Wild *et al.*, 2022).

Otra aplicación destacada de las ARs diseñadas es su uso en estudios de proteólisis dirigida, particularmente en forma de ubiquicuerpos basados en ARs diseñadas. Estos módulos están conformados por una ligasa de ubiquitina E3 fusionada genéticamente con proteínas de unión sintéticas (es decir, ARs diseñadas) para facilitar la degradación dependiente del proteasoma de las proteínas de interés. La tecnología de edición de proteomas personalizable tiene un gran potencial tanto como herramienta de investigación para el análisis detallado de redes de

señalización celular, como en terapias que permiten degradar selectivamente subpoblaciones de proteínas (Stephens *et al.*, 2021).

Las ARs diseñadas también se han utilizado como chaperonas de cristalización en sistemas biológicos complejos o difíciles de cristalizar. Ejemplo de ello son las proteínas de membrana, ensamblajes multiproteicos, estados conformacionales transitorios y/o proteínas intrínsecamente desordenadas. Al unirse a estas proteínas blanco, las ARs reducen su libertad conformacional facilitando así la cristalización. Un ejemplo destacado de esto es el exportador de múltiples fármacos AcrB, componente de la membrana interna de *E. coli* AcrAB-TolC, principal sistema que contribuye a la resistencia de los fármacos, esto debido a que esta proteína de membrana promueve la salida de fármacos en este organismo, cuya estructura se resolvió en complejo con una ARs diseñada (Mittl *et al.*, 2020; Sennhauser y Grütter, 2008).

Aplicaciones de diagnóstico y terapia

En las últimas dos décadas, las ARs diseñadas han experimentado un notable avance en aplicación médica, tanto terapias como en el diagnóstico. Las ARs diseñadas están dirigidas contra blancos proteicos, que son moléculas relevantes relacionadas con enfermedades y/o están principalmente involucradas en la señalización celular, ya sea como receptores de superficie o como mediadores solubles (Škrlec *et al.*, 2015).

Una aplicación diagnóstica importante es la inmunohistoquímica cuantitativa. Se comparó una ARs diseñada específica para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) con afinidad en el rango de concentraciones picomolares con un anticuerpo monoclonal de conejo aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de Norte América. El estado de amplificación del gen HER2 es un criterio importante para determinar la terapia óptima en el cáncer de mama. La expresión de HER2 se determinó mediante hibridación fluorescente *in situ*. La proteína ARs diseñada detectó un

estado de amplificación de HER2 positivo con una sensibilidad similar pero una especificidad significativamente mayor que el anticuerpo aprobado por la FDA (Plückthun, 2015).

Hasta la fecha, se ha explorado el uso de las ARs diseñadas en una amplia gama de terapias médicas, que abarcan desde oftalmología y oncología hasta enfermedades infecciosas como la virología. Actualmente existen ejemplos de ARs diseñadas que se encuentran en diferentes etapas de evaluación clínica. Por ejemplo, Abicipar pegol es una ARs diseñada que presenta alta afinidad contra el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF-A) (Hussain *et al.*, 2020; Moisseiev y Loewenstein, 2020), se encuentra en fase clínica III para el tratamiento de enfermedades de la retina como la degeneración macular relacionada con la edad (Khurana *et al.*, 2021; Kunimoto *et al.*, 2020), una enfermedad que se caracteriza por la pérdida gradual de la visión.

Abicipar pegol contiene un dominio de unión a VEGF-A conjugado con polietilenglicol (PEG) y presenta una masa molecular de 34 kDa. Esta ARs diseñada, ha demostrado beneficios significativos en entornos clínicos, logrando afinidades de unión por su ligando en el rango picomolar (Rodrigues *et al.*, 2018), lo que ha permitido la administración de dosis mayores (Wild *et al.*, 2022).

Las ARs diseñadas también han sido utilizadas para obtener proteínas de alta afinidad que unen moléculas implicadas en la carcinogénesis. En 2007, esta tecnología se aplicó para obtener proteínas de alta afinidad que se unen al marcador tumoral HER2. Posteriormente se logró la unión de ARs diseñadas a otras moléculas, como EpCAM, EGFR, VEGF, HGF, catepsina B, KRAS, entre otras. Sin embargo, hasta la fecha la mayoría de las ARs diseñadas están dirigidas a HER2 lo que puede explicarse por la importancia terapéutica de este blanco (Shilova y Deyev, 2019).

Estrategias utilizadas para detectar blancos utilizando ARs diseñadas

Para obtener moléculas sintéticas con afinidad específica, es necesario realizar selecciones dirigidas contra el blanco de interés. Las bibliotecas de ARs diseñadas ofrecen la capacidad de seleccionar moléculas de unión específicas para cualquier blanco de estudio. Para monitorear el espacio de secuencias disponible, se pueden seleccionar las ARs de bibliotecas mediante varias técnicas *in vitro*, tales como el despliegue de fagos, el despliegue en superficie de levadura, despliegue en ribosomas y los ensayos *pull-down* (Fig. 4). El éxito de estas selecciones depende en gran medida del diseño, la diversidad funcional de la biblioteca empleada y el rendimiento de la estrategia de selección (Wild *et al.*, 2022).

Técnica de despliegue ribosomal

La técnica de despliegue ribosomal es ampliamente reconocida como la más utilizada para la selección de ARs diseñadas (Boersma, 2018). A través de esta metodología, se han seleccionado ARs diseñadas con constantes de disociación (K_d) de nanomolar a picomolar frente a una variedad de diferentes blancos. Un requisito fundamental para la selección de ligando específicos de las bibliotecas de ARs diseñadas (así como para cualquier enfoque de selección *in vitro*) implica el acoplamiento del fenotipo (es decir, la ARs diseñada funcionalmente capaz de unirse al objetivo deseado) con el genotipo (es decir, la secuencia codificante que codifica esa ARs diseñada). En el despliegue de ribosomas, este vínculo se logra al estabilizar al complejo ternario formado por el ribosoma, el ARNm sin codón de paro que codifica la ARs y la ARs recién sintetizada durante la traducción *in vitro* (Fig. 4-A). En un siguiente paso, estos complejos ribosómicos se exponen al objetivo de interés y se inmovilizan en placa o perlas. Los complejos ternarios no deseados, que contienen moléculas ARs que se unieron de manera inespecíficas (y sus respectivas secuencias codificantes), se eliminan mediante lavados astringentes, mientras que los ARNm retenidos de los complejos que

muestran ARs competentes para la unión se recuperan y amplifican mediante RT-PCR para producir las secuencias que codifican ARs específicas al objetivo (Dreier y Plückthun, 2011).

Técnica de despliegue en fagos

La técnica de despliegue en fagos es una herramienta para seleccionar péptidos o proteínas con propiedades de unión específicas de un gran número de variantes. Su utilidad radica principalmente en la generación de sondas moleculares dirigidas a blancos específicos, así como el análisis y manipulación de interacciones proteína/ligando (Clackson y Lowman, 2004). En su forma más simple, la presentación de fagos implica la expresión de péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpos en la superficie de las partículas de fagos (Hust y Lim, 2017). Esto se logra mediante la incorporación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína a presentar con un gen que codifica una proteína de cubierta de fago en el genoma del fago o fagémido (Fig. 4-B). Esta fusión asegura que a medida que se ensamblan las partículas del fago, la proteína sea expuesta en la superficie del fago maduro, mientras su secuencia codificante permanece contenida dentro de la partícula del fago. Este vínculo físico entre el fenotipo y el genotipo de la proteína expresada y la capacidad replicativa del fago son los pilares de esta técnica (Smith y Petrenko, 1997; Willats, 2002).

Sin embargo, el despliegue de ARs diseñadas en fagos filamentosos ha sido ineficiente utilizando sistemas convencionales a pesar de las buenas propiedades biofísicas de las proteínas. Lo anterior se ha identificado como un problema de translocación ineficiente de las ARs diseñadas en el periplasma debido a su plegamiento prematuro en el citoplasma cuando se usa la vía Sec postraducciona. Sin embargo puede resolverse usando la vía de translocación de partículas de reconocimiento de señales (SRP) para el despliegue de fagos. Steiner y colaboradores (2008) aplicaron con éxito la visualización de fagos SRP para seleccionar ARs

diseñadas específicas con afinidades subnanomolares contra una serie de blancos, incluidos EGFR y HER2 (Boersma, 2018).

En la técnica de despliegue de fagos SRP, las proteínas que se despliegan se dirigen hacia la ruta de translocación SRP cotraduccional de *E. coli* mediante el uso de una secuencia de señal apropiada, a diferencia de la presentación convencional de fagos que emplea la vía de translocación Sec postraduccional. Este simple cambio en el uso de la vía de translocación al cambiar la secuencia señal parece evitar el plegamiento prematuro de proteínas estables y de plegamiento rápido en el citoplasma y, por lo tanto, permite su translocación eficiente y su posterior visualización en partículas de fagos filamentosos. Estos resultados sugieren que el uso del despliegue de fagos SRP puede contribuir significativamente a la generación de bibliotecas de ARs diseñadas con una alta diversidad funcional (Steiner *et al.*, 2006).

Técnica de despliegue en levadura

Recientemente, se ha incorporado la técnica de despliegue en levadura a las herramientas disponibles para la selección de ARs diseñadas. La presentación y exposición de proteínas no pertenecientes en la superficie de la levadura se ha logrado mediante su fusión con proteínas de la pared celular de la levadura. Aunque se utilizan varias cepas de levadura para exhibir una variedad de proteínas y péptidos, el sistema de despliegue en levadura basado en *Saccharomyces cerevisiae* Aga1-Aga2 es el sistema favorito ya que ofrece la recuperación de moléculas con alta afinidad a blancos específicos de grandes bibliotecas con 10⁹ transformantes. El principio de este método se basa en la expresión de una proteína no perteneciente a la levadura que se fusiona con la proteína AGA2 (Subunidad de unión a aglutinina A). La proteína AGA2 se anclada a la membrana celular a través de dos puentes disulfuro con la proteína Aga1 a-aglutinina (subunidad de anclaje de aglutinina A) (Fig. 4-C). Esta conexión forma un complejo covalente en la superficie de la levadura. Se ha determinado

que si las proteínas y los péptidos heterólogos se fusionan al extremo terminal N o C de AGA2p se puede llevar a cabo con éxito dicha fusión (Mahdavi *et al.*, 2022).

Aunque el despliegue en la levadura se limita a tamaños de biblioteca más pequeños, la técnica se puede integrar fácilmente con la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para evaluar propiedades de unión, selectividad o marcadores fluorescentes específicos. Las ARs diseñadas son muy compatibles con el sistema de control de calidad de la levadura del retículo endoplásmico, lo que conduce a altos niveles de visualización (Boersma, 2018).

Ensayos Pull-Down

Los ensayos *Pull-down* son un método *in vitro* utilizado para detectar o confirmar interacciones entre proteínas. Este método implica el uso de una proteína purificada y etiquetada como "anzuelo" que se une a cualquier proteína que logre interactuar con ella.

En detalle, el método consiste en inmovilizar una proteína “anzuelo” etiquetada (por ejemplo con glutatión-S-transferasa o histidinas) mediante un ligando de afinidad específico para la etiqueta. Esto genera un soporte de afinidad que captura otras proteínas, llamadas “presas”, para que interactúen con la proteína “anzuelo”. Una vez que las proteínas presas se han incubado con la proteína de anzuelo inmovilizada, los complejos que interactúan se eluyen utilizando un amortiguador según el ligando de afinidad. Después las fracciones de proteína se analizan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y luego se visualizan mediante tinción en gel o detección por transferencia Western (Fig. 4-D) (Louche *et al.*, 2017). Este método puede ser utilizado con ARs cuando se requieren identificar blancos provenientes de algún sistema en particular, es decir utilizar extractos proteicos provenientes del sistema de estudio o bien cuando un número determinado de ARs se quieren retar contra un blanco proteico ya definido.

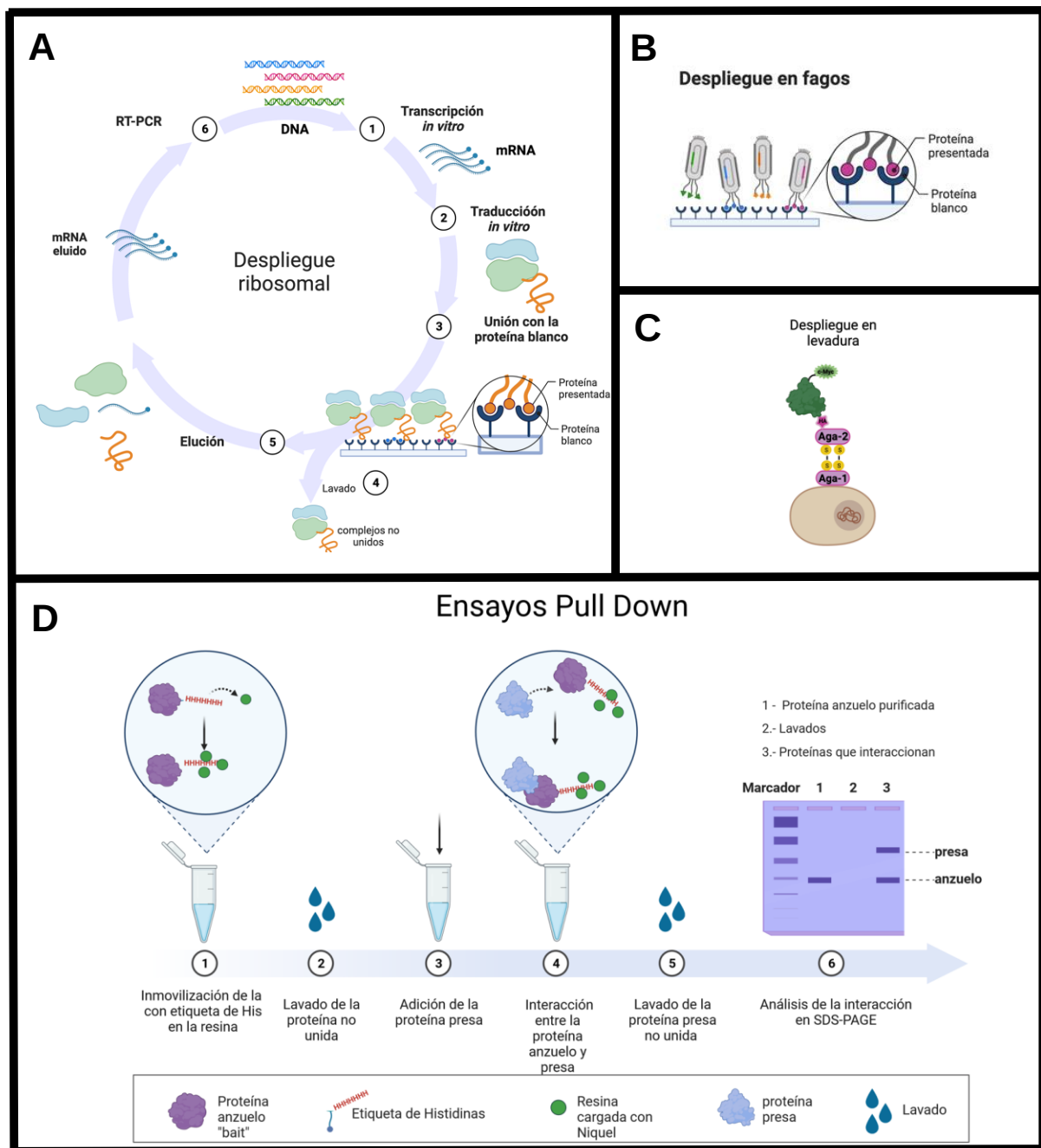


Figura 4. Técnicas utilizadas para detectar blancos utilizando ARs diseñadas. Diagrama de los pasos generales para de las siguientes técnicas: A) Despliegue ribosomal, B) Despliegue en fagos, C) Despliegue en levadura, D) Ensayos Pull Down. Imagen creada en biorender.com.

Interacciones entre proteínas mediante estudios de docking molecular.

El uso de bibliotecas de ARs diseñadas y técnicas *in vitro* de selección de blancos, ofrece la posibilidad de identificar moléculas de unión específicas para una amplia gama de blancos de interés. Sin embargo, un gran desafío se origina en el muestreo físico por la enorme complejidad combinatoria de tales bibliotecas (Wild *et al.*, 2022).

A pesar de los avances en los métodos de selección *in vitro* de blancos de proteínas, la capacidad de estos enfoques para promover la unión a regiones específicas en la superficie de la proteína blanco sigue siendo limitada y altamente dependiente del blanco en cuestión. Esto implica la necesidad de que los subdominios objetivo puedan expresarse individualmente y mantenerse estables durante la selección, así como la disponibilidad de reactivos que pueden enmascarar las superficies no deseadas. Incluso en casos favorables, donde estas condiciones se cumplen, por lo general existen numerosas geometrías de unión posibles, y la identificación del epítipo exacto se debe determinar experimentalmente, generalmente mediante cristalografía de rayos X con líneas de tiempo extremadamente inciertas. Además, estos métodos tienden a ser costosos y lentos. Por tanto, desarrollar un método confiable para predecir el modo de unión de los aglutinantes de proteínas sería un avance significativo que aceleraría el desarrollo de productos bioterapéuticos. Tal método no solo ayudaría a comprender el modo de acción del aglutinante, sino que también facilitaría su diseño racional (Radom *et al.*, 2019).

A pesar de los desafíos persistentes se han desarrollado diversos algoritmos de acoplamiento proteína-proteína, como, ZDOCK, HADDOCK, PIPER, SwarmDock, GRAMM-X, DOCK/PIERR, Hex FFT, ATTRACT y RosettaDock. Sin embargo, el rendimiento de estos algoritmos es objeto de evaluación continua en foros como la Evaluación Crítica de las Interacciones Previstas (CAPRI) (Radom *et al.*, 2019).

Se han propuesto estrategias de modelado que se adaptan individualmente a un solo complejo de interés. Sin embargo, el éxito de estas estrategias suele depender en gran medida de la experiencia en modelado del investigador, con un riesgo inherente de subjetividad en lugar de basarse en procedimientos reproducibles. Dado el rápido crecimiento en el número de aglutinantes seleccionados, el acoplamiento molecular es particularmente valioso dado que supera las limitaciones de la caracterización estructural experimental (Radom *et al.*, 2019).

De acuerdo con lo anteriormente descrito, en este proyecto de maestría se utilizaron proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas como herramienta para el reconocimiento de una mutante de la triosafosfato isomerasa de humano, proteína de importancia médica y que a continuación se detallarán sus características.

Características estructurales de la triosafosfato isomerasa

Dentro del estudio de las proteínas, hay algunas que destacan debido a su papel crucial en problemáticas de salud pública a nivel mundial debido a su participación en el desarrollo de diversas enfermedades. Dentro de este grupo de proteínas se encuentra la triosafosfato isomerasa (TIM o TPI), enzima glucolítica importante que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) mediante una reacción de isomerización (Fig. 5) (Wierenga *et al.*, 2010). Se ha descrito que la enzima TIM posee una actividad catalítica casi perfecta estando limitada únicamente por la difusión de sus sustratos en el medio (Orosz *et al.*, 2006).

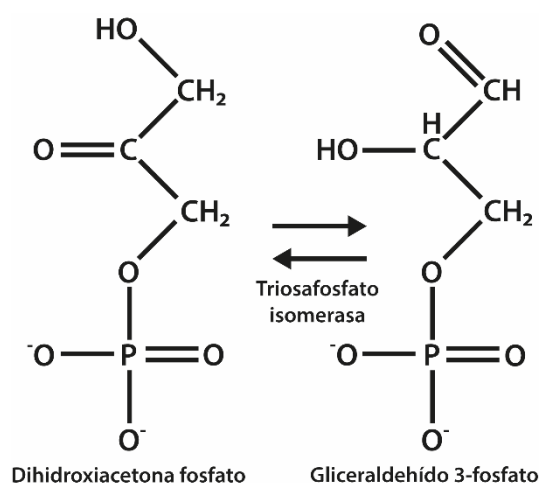


Figura 5. Reacción enzimática catalizada por la triosafosfato isomerasa. La TIM cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Modificada de Wierenga *et al.* (2010).

La estructura primaria de todas las TIMs conocidas consta de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos que conforman las subunidades monoméricas, dispuestas en homodímeros u

homotetrámeros (López-Velázquez *et al.*, 2004; Rodríguez-Almazán *et al.*, 2008). La TIM presenta un plegamiento tipo $(\beta-\alpha)_8$, que consiste en 8 láminas β rodeadas por 8 hélices α unidas por asas (Fig. 6-A), formando el distintivo barril $(\beta-\alpha)_8$ o barril TIM. Se sabe que este tipo de plegamiento es de los más frecuentes en las enzimas. El sitio activo está ubicado en el extremo C-terminal del barril y en la catálisis participan 3 residuos aminoácidos principales: Lys13 (asa-1), His95 (asa-4) y Glu165 (asa-6), los cuales se encuentran situados en la región central del barril (Orosz *et al.*, 2006);(Olivares-Illana *et al.*, 2017; Orosz *et al.*, 2006).

El asa 6, denominada asa catalítica, experimenta una transición conformacional desde una conformación no unida, preferentemente abierta (estabilizada por el asa-5) hacia una conformación unida, preferentemente cerrada (estabilizada por el asa-7). Además del asa 6, que desempeña un papel crucial en la catálisis, el asa-3 participa de manera indirecta en la estabilización del sitio activo y la interfase del dímero. La mayoría de los contactos de la interfase entre monómeros son mediados por el asa-3, que se extiende desde un monómero hasta una cavidad cercana al centro catalítico de la segunda subunidad (Fig. 6-B) (Wierenga *et al.*, 2010).

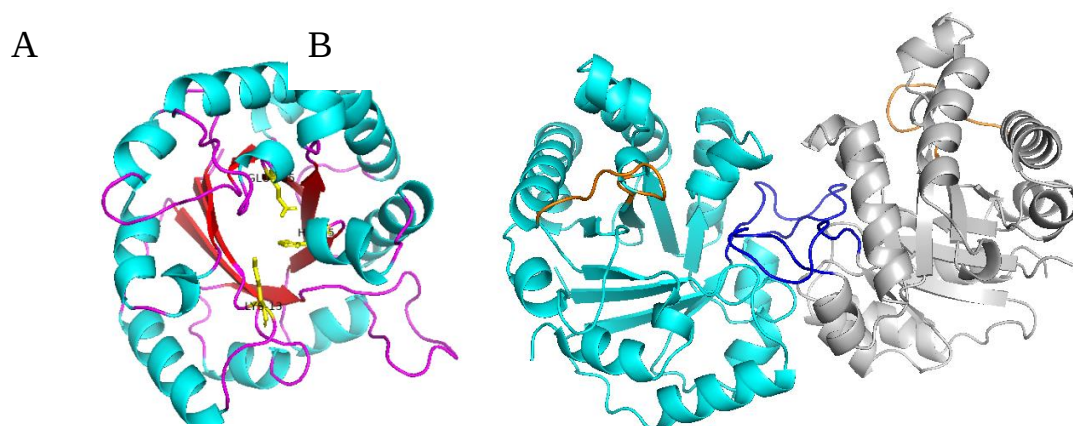


Figura 6. Estructura tridimensional de la TIM. A) Estructura terciaria de un monómero de la TIM; en color cian se muestran las hélices α , en rojo las láminas β , en rosa las asas y en amarillo se muestran los residuos catalíticos Lys13, His95 y Glu165 (numeración de la TIM de *Homo sapiens*). B) Estructura tridimensional del dímero activo en la TIM. En cian y gris se muestran los monómeros, en anaranjado se señalan las asas 6 y en azul se indican las asas 3. PDB ID: 2JK2. Figuras generadas con el programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015).

En la mayoría de los casos presentes en la naturaleza, la forma biológica predominante de la TIM es el dímero, aunque en los organismos *Pyrococcus woesei*, *Thermoproteus tenax* y *Giardia lamblia*, también se ha identificado que pueden formar tetrámeros de diversa naturaleza (López-Velázquez *et al.*, 2004; Walden *et al.*, 2001, 2004). La TIM de humano (HsTIM) es un dímero que consta de dos cadenas polipeptídicas idénticas con 248 residuos de aminoácidos y una masa molecular por subunidad de 26.750 kDa (Lu *et al.*, 1984). Esta estructura conservada pero flexible de la TIM en diferentes especies subraya su importancia funcional y su capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y metabólicas.

La desamidación como modificación postraducciona en las proteínas.

La desamidación es una PTM observada en péptidos y proteínas (Bornstein y Balian, 1970; Robinson *et al.*, 1973). Esta modificación puede llevarse a cabo por catálisis enzimática (en bacterias o virus) o bien ser catalizada químicamente, e incluso extracelularmente. En este último caso, la desamidación se clasifica como una PTM espontánea (Boudier-Lemosquet *et al.*, 2022). Dentro de los 20 aminoácidos que conforman a las proteínas, se ha demostrado que los residuos de asparagina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q) son propensos a la desamidación. Este fenómeno involucra la hidrólisis del grupo amida de la cadena lateral de los residuos de Asn y Gln, para posteriormente generar residuos de ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu), respectivamente o sus isoformas (isoAsp e isoGlu) (Manning *et al.*, 2018).

Los fenómenos químicos asociados a la desamidación han sido objeto de estudio durante aproximadamente 90 años. Los primeros trabajos comenzaron alrededor de 1935, cuando se investigaron las tasas de degradación de la glutamina, ya sea como aminoácido individual o como residuo carboxiterminal en dipéptidos o tripéptidos. Se observó rápidamente que este proceso estaba influenciado por factores como la temperatura, el pH y la fuerza iónica (Boudier-Lemosquet *et al.*, 2022). Los primeros experimentos específicos sobre la

desamidación de asparagina y glutamina fueron realizados por Robinson y Rudd (1974). Estos estudios pioneros sentaron las bases para una comprensión más profunda de los mecanismos y las implicaciones biológicas de la desamidación en los aminoácidos, un proceso que desempeña un papel crucial en una variedad de contextos fisiológicos y patológicos.

Mecanismos de desamidación

Los residuos de Asn y Gln pueden perder el grupo amino en su cadena lateral por dos mecanismos distintos. 1) hidrólisis directa que implica una catálisis ácido base, 2) formación de un intermediario cíclico, conocido como succinimida para Asn (Fig. 7) o glutarimida para Gln, que son anillos de cinco y seis miembros respectivamente. Se ha determinado que la formación de estas imidas cíclicas es el paso limitante de la reacción. Una vez formado, este intermediario es inestable y la hidrólisis rápidamente abre el anillo en dos sitios potenciales, dando lugar a la formación de L-Asp con enlace α o L-IsoAsp con enlace β (o L-Glu y L-IsoGlu).

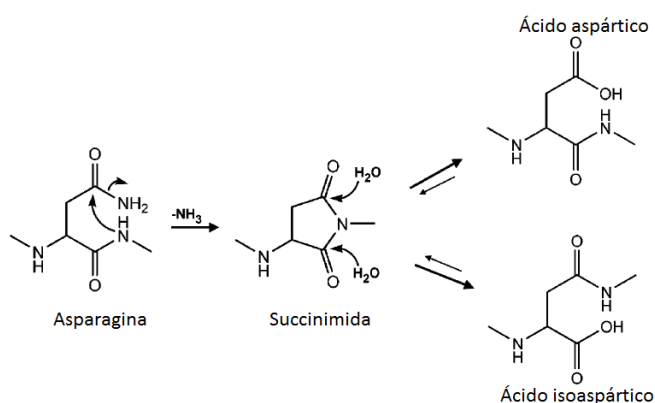


Figura 7. Modelo estándar del mecanismo de desamidación de la asparagina. Primero, el carbono carbonílico de la cadena lateral de la asparagina es atacado por el átomo de nitrógeno de la amida de la cadena principal del primer residuo adyacente al extremo C-terminal de Asn, rompiendo el grupo amida (desamidación) y formando el intermediario de tipo succinimida. En el segundo paso la hidrólisis de la succinimida produce ácido aspártico o ácido isoaspártico. Modificada de (Cournoyer *et al.*, 2006).

Los estudios sobre la formación de la imida cíclica indican que es termodinámicamente menos favorable para la Gln que para la Asn. Esta disparidad explica por qué la desamidación de la

Gln es más lenta y, por tanto, se identifica con menos frecuencia que la de Asn. Por ejemplo, se han determinado las tasas de desamidación en pentapéptidos en condiciones de 150 mM de Tris-HCl, pH 7,4 a 37°C y estas oscilan entre 500 y 17,900 días para los residuos de Gln, mientras que para los residuos de Asn oscilan entre 1 y 500 días (Robinson *et al.*, 2004). Este contraste en las tasas de desamidación refleja las diferencias en la estabilidad termodinámica de las imidas cíclicas formadas a partir de Gln y Asn, lo que puede tener implicaciones en diversos procesos biológicos donde la desamidación de aminoácidos desempeña un papel crucial.

Factores que controlan la tasa de desamidación

La desamidación es influenciada esencialmente por dos conjuntos de criterios: los internos, relacionados con el entorno estructural de los residuos de Asn o Gln, y los externos, asociados con las propiedades físicas y químicas del medio circundante.

En cuanto a los criterios internos, se ha observado que la probabilidad de desamidación aumenta cuando los residuos de Asn o Gln están ubicados en un entorno pobremente estructurado y cuando el residuo n+1 es pequeño. Estudios realizados por Robinson *et al.* (1973) y Robinson y Robinson (2001) proporcionaron evidencia sólida de que la desamidación se favorece cuando el residuo n + 1 es pequeño. Además, se identificaron "puntos calientes" o "motivos canónicos" de desamidación en secuencias, con los siguientes pares de residuos de aminoácidos NG > NS > NN > NT > NH (Robinson y Robinson, 2001).

En cuanto a los criterios externos, las propiedades físicas y químicas del medio circundante también afectan la velocidad de desamidación. Se ha demostrado que la desamidación se acelera a altas temperaturas, pH bajo o alto, y que la velocidad catalítica depende de la fuerza iónica y del tipo de amortiguadores presentes (Robinson *et al.*, 2004). Estudios adicionales han demostrado que las tasas de desamidación son más bajas en un rango de pH de 4.0 a 6.0, pero

aumentan significativamente fuera de este rango. Además, la fuerza iónica también afecta la tasa de desamidación, siendo más alta a una fuerza iónica de $I = 1.4$ en comparación con $I = 0.2$, y la temperatura también influye, siendo más alta a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ que a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se ha observado que el fosfato y el NH_4OH son mejores catalizadores que otros iones para la desamidación (Boudier-Lemosquet *et al.*, 2022). Estos hallazgos destacan la complejidad de los factores que regulan la desamidación de los residuos de Asn y Gln y su importancia en la modulación de la estabilidad y la función de las proteínas.

La importancia de la desamidación

La desamidación de Asn y Gln no sólo altera la composición de las proteínas, sino también su estructura y función, lo que puede tener diversas consecuencias biológicas. Por ejemplo, puede acortar la vida media de la proteína al aumentar su susceptibilidad a la proteólisis (tal es el caso de las proteínas del cristalino, la TIM o la ACTH), alterar la localización subcelular, modificar interacciones proteína-proteína, afectar la actividad enzimática (como en el citocromo c), cambiar la disposición supramolecular de las subunidades (como se ha identificado en la TIM), o inducir la formación de agregados proteicos (identificado en las proteínas del cristalino) (Boudier-Lemosquet *et al.*, 2022). Se ha observado aumento en la cantidad de proteínas desamidadas en algunos tejidos envejecidos y enfermos, como las cataratas del cristalino humano y las placas de Alzheimer (Kato *et al.*, 2020).

La hipótesis de que la desamidación de los residuos de Gln y Asn puede servir como “temporizador molecular” de procesos biológicos como el recambio proteico, el desarrollo y envejecimiento, fue propuesta por primera vez por Robinson y colaboradores (1970). El fundamento de esta hipótesis está basado en diversos estudios (Robinson, 1979; Robinson, 2002; Robinson y Robinson, 2008), donde se ha sugerido que la facilidad con la que se puede regular genéticamente la tasa de desamidación no enzimática de una proteína, así como la

distribución común de estos residuos de aminoácidos en proteínas, hacen que puedan servir como cronómetros moleculares y reguladores de procesos biológicos, como en el recambio de las proteínas, el desarrollo del organismo y el envejecimiento de los tejidos y del organismo.

Actualmente, la desamidación de proteínas se ha ampliado más allá del interés biológico en determinar las consecuencias funcionales en las proteínas y en las células. La espectrometría de masas de alta resolución ha permitido explorar la desamidación desde diferentes perspectivas y emplearla como herramienta en diversos estudios. Por ejemplo, se ha empleado en la datación de muestras, en el mantenimiento de las proteínas en su estado original (por ejemplo, en el control de calidad en biotecnología), y debido a que la desamidación puede ocurrir incluso fuera de las células y tardar años o siglos en completarse, también se ha utilizado en arqueología y medicina forense (Boudier-Lemosquet *et al.*, 2022). Estas aplicaciones muestran el alcance diverso y multifacético de la desamidación en la investigación científica e incluso más allá.

La TIM de humano (HsTIM) es susceptible a desamidación; efectos funcionales y estructurales.

Hoy en día, se conoce que la desamidación ocurre en una amplia variedad de proteínas entre ellas la triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM). La desamidación en la HsTIM ha sido estudiada desde hace varias décadas. Se tiene evidencia desde hace cuatro décadas que esta enzima aislada de diversos tejidos presentaba isoformas ácidas que se acumulaban durante el envejecimiento (Yuan *et al.*, 1981).

En 1981 mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, se demostró que las isoformas ácidas de la triosafosfato isomerasa son el resultado de la desamidación de dos asparaginas específicas (Asn-15 y Asn-71) (Yuan *et al.*, 1981). Estas asparaginas se ubican en los sitios de contacto entre subunidades y su desamidación introduce un total de cuatro cargas negativas nuevas en estos sitios. Por su ubicación, los nuevos residuos de ácido aspártico (Asp) quedan

yuxtapuestos (el Asp-16 de una subunidad se yuxtapone con el Asp-71 de la subunidad contigua), creándose repulsiones carga-carga que promueven que la enzima dimérica se disocie más fácilmente (Yuan *et al.*, 1981).

En 1986, Yuan y colaboradores investigaron los efectos del pH, la temperatura, la fuerza iónica, el tipo de ion, la concentración de proteína y el sustrato en la desamidación *in vitro* de las triosafosfato isomerasa. Las tasas de desamidación aumentaron con el incremento del pH y la temperatura, y aún más con la presencia de sustrato de forma dependiente de la concentración. Los resultados de este estudio sugirieron que tanto la estructura primaria como los cambios en la estructura terciaria y la interacción entre las subunidades influyen en la desamidación de la TIM (Yüksel y Gracy, 1986).

Estudios fisicoquímicos posteriores revelaron que las desamidaciones de N15 y N71 alteran sustancialmente la estructura general de la enzima (Sun *et al.*, 1995). Adicionalmente en estudios con dicroísmo circular, demostraron la exposición de los residuos de triptófano a un entorno más polar. El aumento de la unión de la sonda hidrofóbica fluorescente 1,1'-bis(4-anilino)-naftalina-5,5'-ácido disulfónico a la enzima desamidada corroboró estas observaciones espectrales y también sugiere que los residuos hidrofóbicos en la interfase de la subunidad están expuestos como resultado de la desamidación. Estos cambios estructurales se asociaron con una menor estabilidad térmica (3.1 °C menos T_m) y una mayor susceptibilidad a la disociación con urea. Estos estudios son consistentes con la propuesta de que las desamidaciones específicas en la interfase de la subunidad provocan cambios estructurales significativos que conducen a la degradación de la proteína (Sun *et al.*, 1995).

La desamidación en las proteínas se favorece cuando el residuo $n + 1$ es pequeño, y la presencia de pares asparagina-glicina promueve la desamidación (Robinson y Robinson, 2001). Además,

los ciclos catalíticos continuos también aumentan la desamidación (Robinson y Robinson, 2001; Decker y Mohrenweiser, 1985) (Decker y Mohrenweiser, 1985).

Para profundizar en los efectos de la desamidación de la HsTIM, De la Mora-De la Mora y sus colaboradores en el 2015, realizaron mutantes recombinantes (N15D, N71D y N15D/N71D) de HsTIM para imitar a la TIM naturalmente desamidada (de la Mora-de la Mora *et al.*, 2015). Sus resultados mostraron que la mutante N71D es estructural y funcionalmente similar a la enzima WT. Por el contrario, en la mutante N15D se evidenciaron todos los efectos perjudiciales relacionados con la desamidación. La mutante N15D/N71D mostró efectos adicionales menores, lo que sugiere que la desamidación de N71 induce efectos insignificantes. Las estructuras cristalográficas revelaron que, a diferencia de la mutante N71D, la mutante N15D forma nuevas interacciones que perturban la estructura del asa 1 y el asa 3, ambos componentes críticos del sitio catalítico y la interfase de HsTIM. Lo anterior denota que no es necesario que ambos residuos de Asn (15 y 71) se sometan a la desamidación para provocar los efectos de una TIM desamidada; la desamidación de N15 es suficiente para provocarlos (de la Mora-de la Mora *et al.*, 2015).

Es importante aclarar que en este trabajo se tomará en cuenta la estructura primaria de la HsTIM para numerar las posiciones de sus aminoácidos (NCBI, Ref. Seq.: CAG46503.1). A diferencia del trabajo de De la Mora-De la Mora (2015), en el que se utilizó la numeración de los residuos aminoácidos sin considerar la metionina inicial. Esta distinción en la numeración es relevante ya que ayuda a garantizar la consistencia y la comparabilidad de los resultados entre diferentes investigaciones. Al utilizar la estructura primaria de la proteína como referencia, se asegura que los residuos aminoácidos sean identificados de manera uniforme, lo que facilita la interpretación y la comunicación de los hallazgos científicos. Por tanto en esta tesis se nombran a las asparaginas susceptibles de desamidación como N16 y N72 (Fig.8).

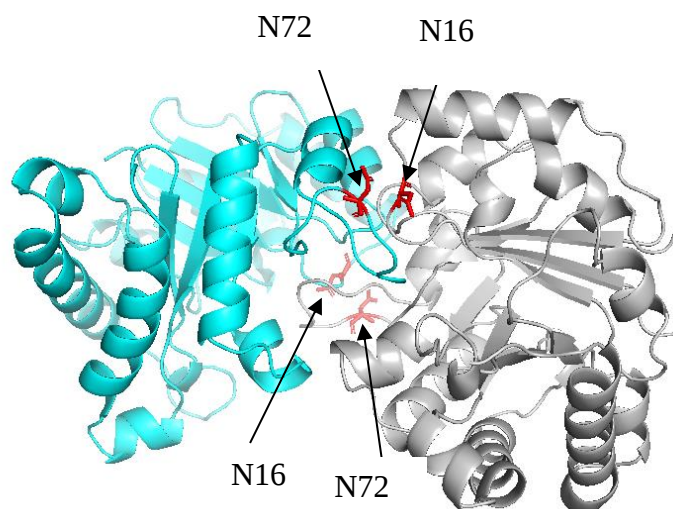


Figura 8. Localización de los residuos de asparagina propensos a la desamidación en la HsTIM. Estructura tridimensional del dímero activo en la HsTIM. En cian y gris se muestran los monómeros, en rojo se señalan las asparaginas 16 y 72 de cada monómero. PDB ID: 2JK2. Figuras generadas con el programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015).

Para la HsTIM se ha reportado que la desamidación en N16 provoca cambios estructurales significativos, incluyendo la inestabilidad de la interfase y un mayor acceso a la porción interna de la proteína. Esto se debe a la pérdida de interacciones intermoleculares que perturban la estructura del asa 1 y asa 3, ambos componentes críticos del sitio catalítico y de la interfase de HsTIM. Como consecuencia se observa una perturbación de las propiedades catalíticas de la enzima (de la Mora-de la Mora *et al.*, 2015; Enríquez-Flores, Flores-López, *et al.*, 2022).

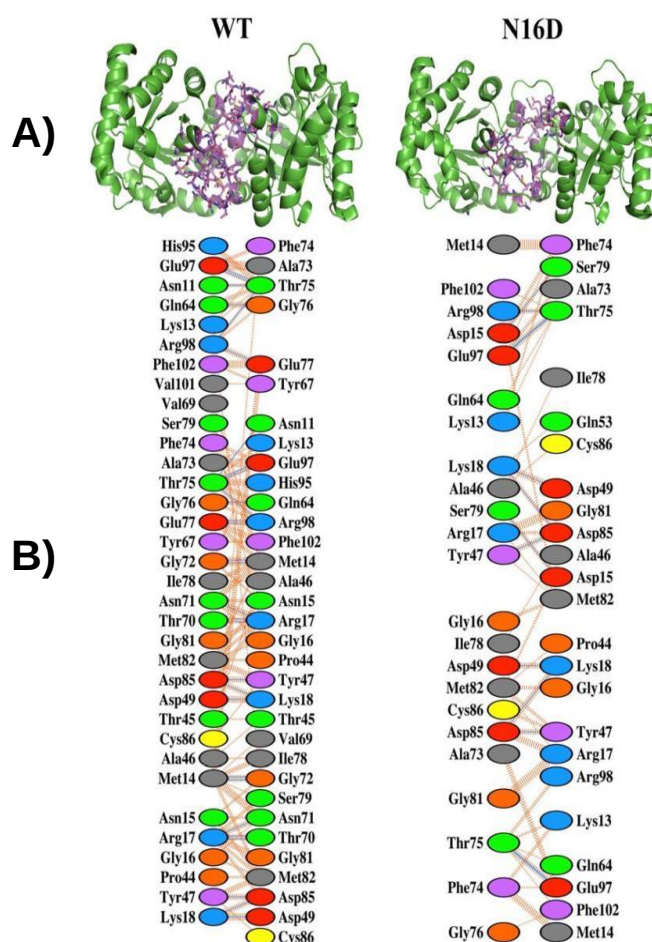


Figura 9. Disminución de contactos interatómicos en la interfase de HsTIM N16D debido a la desamidación. Tomada de (Enríquez-Flores *et al.*, 2020). Interacciones no covalentes en las interfases de la HsTIM WT y N16D en función de sus estructuras cristalográficas. A) La caricatura verde son ambas subunidades (dímero) de WT y N16D HsTIM. Los aminoácidos involucrados en las interacciones no covalentes en las interfases se muestran en barras moradas. B) Los aminoácidos y sus contactos interatómicos se representan en las interfaces de ambas subunidades. En B), el código de color de los óvalos representa las propiedades de la cadena lateral de los aminoácidos: positivo (azul); negativo (rojo); neutro (verde); alifático (gris); aromático (violeta); prolina (anaranjado) y cisteína (amarillo).

La desamidación de la N16D ocurre cerca de la interfase (sitio de contacto entre las dos subunidades) (Fig. 9), lo que provoca un menor número de contactos interatómicos, con una disminución del 48.5%. Consecuentemente se observa una pérdida del 27.48% del área de contacto entre ambas subunidades en comparación con la HsTIM WT. Estos resultados indican que la incorporación de cargas negativas *de novo* en la HsTIM conduce a importantes alteraciones estructurales en la red interatómica de contactos en la interfase de la enzima.

La desamidación de la HsTIM también provoca efectos al perturbar las interacciones no covalentes de los aminoácidos. En consecuencia, se ha demostrado una alta permeabilidad en la estructura de la HsTIM N16D, lo que sugiere una mayor accesibilidad del solvente y de moléculas pequeñas al núcleo hidrofóbico de la proteína. Esto se ilustra mediante la capacidad del 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para penetrar en la estructura de la HsTIM N16D, como se observa en la Figura 10. Estos hallazgos indican que la desamidación de la HsTIM no solo afecta las interacciones interatómicas en la interfase de la enzima, sino que también perturba la estructura interna de la proteína, lo que aumenta su permeabilidad y accesibilidad a moléculas pequeñas. Esta mayor permeabilidad y accesibilidad pueden tener implicaciones significativas en la función y regulación de la HsTIM, así como en su capacidad para interactuar con otros componentes celulares y llevar a cabo sus actividades biológicas de manera efectiva.

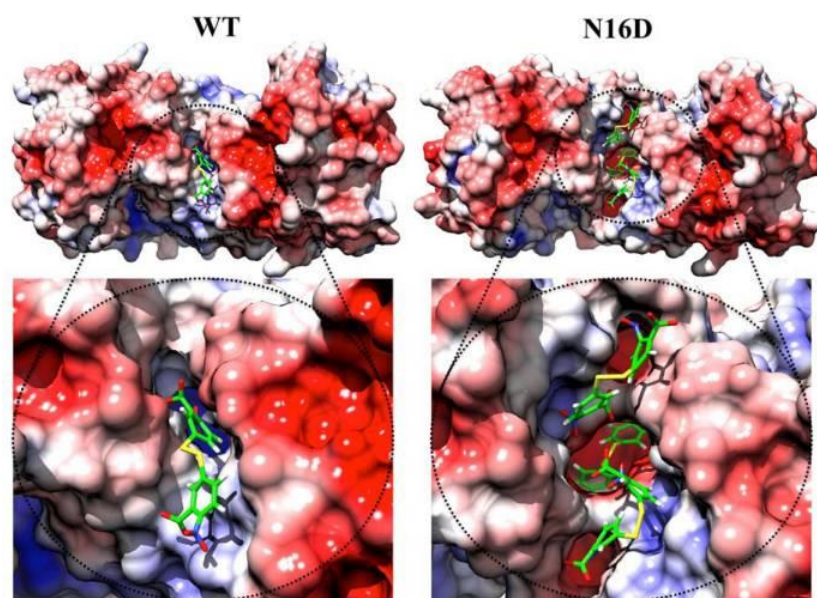


Figura 10. Acoplamiento de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) y superficie de potencial electrostático de las estructuras HsTIM WT y N16D. Tomada de Enríquez-Flores y colaboradores (2020). Como se ve en HsTIM WT, DTNB se incorporó superficialmente en la interfase de esta estructura, mientras que en N16D tres moléculas de DTNB se acoplaron en la misma región. Además, en la zona más interna de la interfase en N16D HsTIM, se observa una mayoría de cargas negativas a diferencia de la zona más interna de la interfase en la HsTIM WT. Los códigos de color representan los valores de energía superficial potencial electrostático de $-5,0$ (color rojo) y $+5,0$ (color azul).

En conclusión, la desamidación en las proteínas incluyendo a la HsTIM, provoca la introducción de cargas negativas donde antes no había y, en muchos casos, esta modificación induce cambios conformacionales que afectan su función, estructura y estabilidad (Yüksel y Gracy, 1986). Por ello se ha propuesto que los procesos de desamidación podrían utilizarse como relojes moleculares para regular procesos biológicos como el recambio proteico, el desarrollo y el envejecimiento celular (Robinson y Robinson, 2001). Además, se ha observado que la HsTIM desamidada se acumula en una línea celular de cáncer de mama, pero no en su contraparte no cancerosa (Enríquez-Flores *et al.*, 2021; Enríquez-Flores, Flores-López, *et al.*, 2022). Por lo cual se plantea la utilidad de la HsTIM desamidada como blanco para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer y otras patologías en las que se acumula esta proteína modificada postraduccionalmente. Estos hallazgos resaltan el potencial de la desamidación como un evento regulador importante en la biología celular y sugieren que comprender sus efectos en proteínas específicas podría conducir al desarrollo de terapias innovadoras y dirigidas contra enfermedades relacionadas con la acumulación de proteínas desamidadas.

5. OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es identificar alguna o algunas proteínas con módulos de anquirina que sean capaces de reconocer específicamente a la mutante sencilla N16D de HsTIM.

Objetivos específicos

- Realizar ensayos de acoplamiento molecular (*i.e. docking*) entre las triosafosfato isomerasas de humano (WT y N16D) y las diferentes proteínas con uno, dos y tres módulos de anquirina con el fin de seleccionar proteínas candidatas para realizar ensayos de interacción.
- Realizar experimentos de interacción entre las proteínas con módulos de anquirina preseleccionadas y las triosafosfato isomerasas de humano (WT y N16D).

6. METODOLOGÍA

Selección de Proteínas ARs diseñadas para la interacción con la HsTIM WT y N16D

Las proteínas con módulos de anquirina utilizadas en este trabajo provienen de una biblioteca obtenida previamente en el laboratorio. El diseño y obtención de dicha biblioteca se describen en los anexos A y B. En un primer acercamiento, se decidió analizar anquirinas con uno, dos y tres módulos de repetición para evaluar la posible interacción con la mutante y la proteína silvestre de HsTIM por medio de ensayos de acoplamiento molecular (*docking*). De acuerdo con los hallazgos obtenidos en esta primera etapa, se decidió realizar estudios *in vitro* de interacción con proteínas con un módulo de repetición de anquirina.

Obtención de modelos de la estructura 3D de las ARs diseñadas

Las proteínas con módulos de anquirina utilizadas en este trabajo no cuentan con estructuras cristalográficas que permita conocer su estructura tridimensional, por lo que fueron modeladas a través del servidor I-TASSER (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Zhang, 2008), una plataforma que permite generar predicciones de modelos de alta calidad de la estructura 3D a partir de sus secuencias de aminoácidos.

I-TASSER genera modelos atómicos tridimensionales a partir de múltiples alineamientos de enhebrado (*threading*). El método de modelado por enhebrado, o de reconocimiento de plegamientos, consiste en enhebrar fragmentos de la secuencia de aminoácidos con una conformación 3D conocida contenida en el Protein Data Bank (PDB). I-TASSER proporciona una medida de la precisión de las predicciones obtenidas mediante el puntaje de confianza del modelado, cuyos valores van de -5 a 2, donde un valor mayor indica un modelo con una confianza alta. El formato de entrada es tipo *FASTA* y contiene la secuencia de aminoácidos de cada proteína, los modelos generados se obtienen en formato *pdb* que contiene las coordenadas

de la estructura 3D modelada. Las proteínas que se modelaron cuentan con una, dos y tres repeticiones de anquirina cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 1.

Acoplamiento molecular mediante ClusPro

Por medio del servidor de acoplamiento molecular ClusPro 2.0 (Desta *et al.*, 2020; Kozakov *et al.*, 2013, 2017; Vajda *et al.*, 2017) se estudiaron posibles sitios de acoplamiento entre la HsTIM (WT y N16D) y las diferentes proteínas con módulos de anquirina diseñadas.

Tabla 1. Proteínas ARs diseñadas. Secuencia de aminoácidos que conforman a las proteínas ARs diseñadas, las posiciones en color rojo representan las posiciones variables en cada proteína.

Número de repeticiones	ARs diseñadas	Secuencia de aminoácidos
Una	55-6	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNA LDVKGL TPLHL AA VL GHLEIVEVLLK NG ADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLA EILQGS
	5834	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNA IDDEGH TPLHL AA EV GHLEIVEVLLK HG ADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLA EILQGS
	55a32	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNA TDGRGT TPLHL AA ARGH LEIVEVLLK HG ADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLA EILQGS
Dos	D2	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNA SDLFGH TPLHL AA YF GHLEIVEVLLK AG ADVNA VD SAGW TPLHLAA KS GHLEIV EVLLK NG ADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQGS
Tres	D3	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNA ADNDGY TPLHL AA KW GHLEIVEVLLK HG ADVNA KDVTGD TPLHLAA FY GHLEI VEVLLK NG ADVNA TDESGF TPLHLAA FS GHLEIVEVLLK AG AD VNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQGS

ClusPro es un servidor web para el acoplamiento molecular proteína-proteína desarrollado por el Departamento de Matemáticas Aplicadas y Estadísticas de la Stony Brook University de Nueva York, en el año 2004 (Comeau *et al.*, 2004b). Realiza tres pasos computacionales: (1) acoplamiento de cuerpo rígido mediante muestreo de millones de conformaciones, (2)

agrupación basada en la desviación cuadrática media (RMSD) de las 1000 estructuras de energía más bajas generadas con el fin de encontrar los grupos más grandes que representarán los modelos con mayor probabilidad de ocurrencia en el complejo y, (3) el refinamiento de estructuras seleccionadas usando como parámetro la minimización de energía en el complejo (Comeau *et al.*, 2004a).

Como resultado se obtiene una lista de complejos putativos clasificados según sus propiedades de agrupamiento principales. La puntuación se basa únicamente en la complementariedad de la superficie entre las dos estructuras. Se evalúan más de 2.7×10^{10} estructuras, conservando 20,000 estructuras con los mejores puntajes de complementariedad de superficie, que luego se someten a un algoritmo empírico de filtrado de energía libre. Las 2000 principales estructuras energéticamente favorables se agrupan con base en un criterio de desviación cuadrática media de la raíz del sitio de unión por pares (RMSD) con el fin de seleccionar el mejor modelo del complejo. Para esto, se forman grupos en función del ligando que tiene la mayor cantidad de vecinos por debajo de un radio de agrupamiento de 9 Å; el ligando con más vecinos es el centro del grupo y es la estructura representativa del grupo. Para cada grupo, ClusPro muestra el tamaño (*i.e.*, el número de estructuras acopladas), la energía del centro del grupo (*i.e.*, la estructura que tiene el mayor número de estructuras vecinas en el grupo) y la estructura energética con la más baja energía del cluster.

El formato de los archivos de entrada es PDB, tanto para el ligando (las coordenadas de las estructuras 3D modeladas a través de I-TASSER) como para el receptor (las coordenadas atómicas de WT y N16D HsTIM, código PDB: 2JK2 y 4UNK, respectivamente). Los archivos de salida se obtienen en formato PDB y contiene las coordenadas 3D de las mejores conformaciones del ligando y del receptor.

A partir de los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular por ClusPro se analizaron los 10 modelos en donde el agrupamiento (*i.e.*, *cluster*) principal tuvo la mayor cantidad de miembros, tanto para HsTIM WT como para la N16D. Los modelos fueron visualizados con PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015).

Se seleccionaron las proteínas con un módulo de anquirina que obtuvieron un mayor número de acoplamientos orientados hacia la interfase de la mutante de HsTIM N16D. En contraste con las proteínas con dos y tres repeticiones, las cuales se unieron en su mayoría fuera de la interfase de la N16D.

Obtención de las ARs seleccionadas para los ensayos de interacción.

Sobreexpresión de las ARs diseñadas

La purificación y los ensayos de interacción se llevaron a cabo sólo entre las anquirinas diseñadas seleccionadas mediante el acoplamiento molecular y las HsTIM (WT o N16D).

Los ADNs de las ARs diseñadas seleccionadas fueron previamente obtenidos y subclonados en el plásmido de expresión pET3a-HisTEVp (Anexo A). Se utilizaron 200 ng de ADN para transformar células competentes de la cepa de expresión correspondiente (Tabla 2) mediante la técnica de choque térmico.

Tabla 2. Condiciones de sobreexpresión para cada ARs diseñada.

ARs	55-6	5834	55a32
Cepa	BL21-Rosetta	BL21(DE3) pLysS	BL21(DE3) pLysS
Concentración del inductor	0.4 mM IPTG	0.5 mM IPTG	0.5 mM IPTG
Temperatura de inducción	18 °C	30 °C	30 °C
Antibióticos	Ampicilina (100 µg/mL) Cloranfenicol (50 µg/mL)	Ampicilina (100 µg/mL)	Ampicilina (100 µg/mL)

A partir de las colonias transformantes que contienen los genes que codifican para cada una de las ARs diseñadas, se realizó un precultivo con 20 mL de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) (Tabla 2). El precultivo se incubó a 37°C por 12 horas en agitación constante. Después del tiempo de incubación se cosecharon las células mediante centrifugación a 924 g durante 15 minutos. La pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de medio LB nuevo y se utilizó para inocular 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0.8, en este momento se indujo la expresión de la proteína adicionando isopropil-β-D- 1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubando durante toda la noche en agitación constante utilizando las condiciones especificadas en la tabla 3.

Sobreexpresión de HsTIM WT y N16D

Los genes HsTIM WT y de la mutante desamidada HsTIM N16D, fueron previamente contruidos y clonados en el vector pET3a-HisTEVp (de la Mora-de la Mora *et al.*, 2015). Se utilizaron 200 ng de los plásmidos (pET3a-HisTEV-WT y pET3a-HisTEV-N16D) para transformar la cepa *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL mediante la técnica de choque térmico.

Posteriormente, se inocularon 20 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL) y una alícuota de las cepas *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL transformadas con los genes HsTIM WT y N16D. Los precultivos se incubaron a 37°C por 12 horas en agitación constante. Después del tiempo de incubación se cosecharon las células mediante centrifugación a 924 g durante 15 minutos. La pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de medio LB nuevo y se utilizó para inocular 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol. El cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0.8, en este momento se indujo la expresión de la proteína adicionando al medio de cultivo

isopropil- β -D- 1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4 mM y se incubó a 30°C durante toda la noche con agitación constante.

Purificación de las proteínas recombinantes estudiadas

Purificación de ARs diseñadas

La purificación de todas las proteínas utilizadas en este trabajo se realizó mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) utilizando la resina de afinidad a níquel Profinity™ (IMAC Ni- Charged resin, Bio-rad). Las células se cosecharon por centrifugación a 2717 g por 20 minutos. La ruptura celular se llevó a cabo por sonicación utilizando un sonicador Branson 450 (VWR Scientific), y se realizó en 30 mL de amortiguador de lisis (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8) suplementado con 2 mM de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO). La lisis de las células que expresaban las proteínas 55-6 y 55a32 se realizó mediante 10 ciclos de sonicación de 45 s con descansos de 2 min y 30 s entre cada ciclo, en el caso de las células que expresaba la proteína 5834 se lisaron mediante 12 ciclos de sonicación de 45 s con descansos de 2 min y 30 s entre cada ciclo.

La suspensión resultante se centrifugó a 7547 g por 40 minutos y el sobrenadante se puso en contacto en una columna con 7 mL de resina de afinidad acoplada con níquel Profinity™ (IMAC Ni- Charged resin, Bio-rad), previamente equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador de lisis (Tris 50 mM y NaCl 100 mM, pH 8), manteniendo en incubación por 30 minutos en agitación constante. Después se realizaron 2 lavados con 30 mL de amortiguador (Tris 50 mM y NaCl 50 mM, pH 8) en agitación constante por 30 minutos. Posteriormente, se eluyó la proteína con 30 mL de amortiguador (Tris 50 mM, NaCl 50 mM e imidazol 250 mM, pH 8) manteniendo la columna en agitación constante por 30 minutos. Finalmente, el eluido se concentró y dializó con amortiguador (trietanolamina 100 mM, pH 7.4) por medio de un tubo Centricon con corte

de 10 kDa (Amicon Ultra, Merck Millipore), a través de centrifugación a 924 g hasta un volumen de 3 mL.

Las proteínas purificadas, así como las fracciones intermedias se analizaron mediante geles SDS-PAGE al 16% y fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal.

Purificación de HsTIM WT y N16D

El cultivo inducido para la sobreexpresión de la HsTIM WT y N16D se centrifugó a 2717 g por 20 minutos con la finalidad de cosechar las células y concentrarlas. La pastilla bacteriana se lisó mediante sonicación utilizando un sonicador Branson 450 (VWR Scientific). La sonicación se realizó en 30 mL de amortiguador de lisis (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0) suplementado con 2mM de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO). Para ambas proteínas, HsTIM WT y N16D, se realizaron 8 ciclos de 45 s de sonicación con descansos de 2 min 30 s entre cada ciclo.

La suspensión resultante se centrifugó a 7547 g por 40 minutos y el sobrenadante se puso en contacto con 7 mL de resina de afinidad a níquel Profinity™ (IMAC Ni- Charged resin, Bio-rad), previamente equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador de lisis (Tris 50 mM y NaCl 100 mM, pH 8.0), incubando por 30 minutos en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con 30 mL de amortiguador (Tris 50 mM y NaCl 100 mM, pH 8.0) en agitación constante por 30 minutos. Después, se eluyó la proteína con 30 mL de amortiguador (Tris 50 mM, NaCl 100 mM e imidazol 250 mM a pH 8.0), manteniendo la columna en agitación por 30 minutos. Finalmente, el eluido se concentró y dializó con amortiguador (trietanolamina 100 mM, pH 8) por medio de un tubo Centricon con corte de 30 kDa (Amicon Ultra, Merck Millipore), a través de centrifugación a 924 g hasta un volumen de 3 mL.

Las proteínas purificadas, así como las fracciones intermedias se analizaron mediante geles SDS-PAGE al 16% y fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal.

Cuantificación de las proteínas purificadas.

Para las proteínas con repeticiones de anquirina se utilizó el método de cuantificación por ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Se realizó una curva patrón utilizando como estándar la proteína albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/mL. La concentración de las proteínas HsTIM WT y N16D se determinó por su absorbancia a 280 nm. El coeficiente de absortividad molar (ϵ_{280}) utilizado para la medición fue un valor teórico ($\epsilon = 33.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtenido mediante el servidor ProtParam (Wilkins *et al.*, 1999), en el cual se considera la secuencia de aminoácidos de la proteína, así como las cisteínas en su forma reducida.

Digestión de la etiqueta de histidinas con la proteasa del virus del tabaco (TEVp).

Para evaluar la interacción entre las ARs diseñadas seleccionadas y las HsTIM (WT y N16D), fue necesario remover la etiqueta de histidinas a las proteínas HsTIM WT y N16D. Esto se realizó mediante incubación en presencia de la proteasa del virus del tabaco (TEVp) (Enríquez-Flores *et al.*, 2022), a una relación de 25:1 (proteína HsTIM: TEVp), durante 12 horas a temperatura ambiente, en presencia de ditioneitol (DTT) 1mM y en amortiguador de digestión (Tris 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.0). Posterior a la incubación, la mezcla de digestión se diluyó en 14 mL de amortiguador de trietanolamina (trietanolamina 100 mM pH 7.4); la etiqueta de histidinas y la TEVp se separaron de la proteína mediante IMAC utilizando una resina acoplada a níquel, previamente equilibrada en amortiguador de trietanolamina 100 mM, pH 7.4. Posteriormente, se concentró la proteína por medio de un tubo Centricón con corte de 30 kDa (Amicon Ultra, Merck Millipore), por medio de centrifugación a 924 g hasta un volumen de 1 mL.

Ensayos para evaluar la interacción entre las ARs diseñadas seleccionadas y la HsTIM (WT y N16D)

Ensayos para evaluar la interacción

Se realizaron ensayos con el objetivo de probar la posible interacción entre las proteínas con módulos de anquirina y HsTIM WT y N16D. Cada uno de los experimentos de interacción estuvo conformado por dos etapas:

Primero, se equilibró 1 mL de resina Profinity™ (IMAC Ni- Charged resin, Bio-rad) con 10 mL de amortiguador de trietanolamina 100 mM pH 7.4 y se unió 1 mg de la proteína con repetición de anquirina de interés manteniendo en agitación constante por 2 h a temperatura ambiente, esto se realizó por medio de la etiqueta de 6 residuos de histidina presente en el extremo amino-terminal de las proteínas. Una vez adherida la proteína con repetición de anquirina a la resina, se hicieron 2 lavados con 4 mL de amortiguador (trietanolamina 100 mM pH 7.4) eliminando así la proteína no unida.

Segundo, para probar la interacción entre la proteína con repeticiones de anquirina previamente adherida a la resina de afinidad y HsTIM WT o N16D. Se incubaron 1.5 mg de HsTIM WT o N16D sin etiquetas de histidinas (experimentos independientes) durante 2 horas en agitación constante a temperatura ambiente. Después de la incubación, se centrifugó y se recolectó el sobrenadante, que constituye la fracción no unida de la interacción. Posteriormente se realizaron dos lavados con 4 mL de amortiguador (trietanolamina 100 mM pH 7.4) en agitación constante por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1887 g por 10 minutos, enseguida se recolectó el sobrenadante (fracción de lavado de la interacción). Después, se eluyó con 4 mL de amortiguador (trietanolamina 100 mM e imidazol 200 mM) manteniendo en agitación constante por 30 minutos, para finalizar se recolectó el sobrenadante y se concentró por medio de un tubo Centricon con corte de 10 kDa (Amicon Ultra 0.5, Merck Millipore), por

medio de centrifugación a 924 g hasta un volumen de 0.5 mL (eluido de la interacción). Los pasos de la interacción se monitorearon mediante una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) al 16% (Laemmli, 1970), teñidos con azul de Coomassie coloidal.

Análisis de los modelos de acoplamiento molecular

De las proteínas que mostraron una posible interacción en los ensayos anteriores, se analizaron los 10 mejores modelos en LigPlot+ v. 2.2 que se obtuvieron en el acoplamiento molecular mediante ClusPro. Para ello se utilizó el programa LigPlot+ v. 2.2 (Wallace *et al.*, 1995), el cual genera de forma automática diagramas de interacción proteína-ligando en dos dimensiones a partir de la entrada de un archivo en formato PDB. El archivo de salida ofrece una representación simple e informativa de las interacciones intermoleculares, incluidos los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y los puentes salinos.

De este análisis se recopilieron todas las interacciones entre los aminoácidos de las posiciones variables de las anquirinas (posiciones: 32, 34, 35, 37, 45, 46, 58) con la HsTIM (WT y N16D), se contó el número de interacciones y se clasificaron según el tipo de interacción (*i.e.* puente de hidrógeno, hidrofóbica y puentes salinos) y el sitio donde se encuentra el aminoácido que se une a la HsTIM (*i.e.* interfase u otro sitio). Con estos datos se elaboraron tablas de contingencia.

Con el fin de comparar las interacciones antes registradas de las anquirinas con la HsTIM N16D y WT se realizaron las siguientes pruebas de hipótesis. Para comparar el número de interacciones promedio de los aminoácidos variables de las anquirinas para cada par de interacciones (N16D y WT) se realizó una prueba de *t* para dos muestras con varianzas no homogéneas. Para comparar el número de interacciones por aminoácido variable para ambas parejas de interacciones (N16D y WT) y el número de interacciones por sitio de ocurrencia y tipo de interacciones se realizaron pruebas de χ^2 de homogeneidad.

7. RESULTADOS

Los modelos tridimensionales de proteínas ARs diseñadas demuestran precisión y similitud estructural.

Las proteínas ARs diseñadas utilizadas en este proyecto provienen de una biblioteca previamente obtenida en el laboratorio (ver Anexo A). Hasta el momento no se ha logrado determinar sus estructuras cristalográficas para conocer su disposición tridimensional, por lo que fue necesario generar modelos tridimensionales (3D) utilizando el servidor I-TASSER.

La precisión de los modelos de estructura de I-TASSER se estima mediante el cálculo del puntaje de confianza (puntaje C) como lo describe Yang *et al.*, 2015. Este puntaje C proporciona una estimación de la calidad de los modelos predichos por el algoritmo, con valores en el intervalo de $[-5, 2]$, donde los valores altos indican una mayor confianza del modelo. Una vez obtenidas las estructuras 3D, los modelos arrojaron un puntaje $C \geq 0.9$ (Fig. 11), lo que sugiere que las estructuras cuentan con una alta confianza en su precisión y validez. Actualmente, existen servidores (por ejemplo, D-I-TASSER) que utilizan la inteligencia artificial y el *deep learning* para generar modelos tridimensionales de proteínas.

Por otra parte, la puntuación de modelado de plantilla o puntuación TM, evalúa la similitud de dos estructuras proteicas. Esta puntuación varía en el intervalo $[0, 1]$, donde los valores más cercanos a la unidad indican modelos muy parecidos. Estadísticamente, una puntuación $TM \leq 0.17$ indica que las dos estructuras proteicas comparadas no comparten similitud estructural. Por otro lado una puntuación $TM > 0.5$ corresponde una topología similar entre las dos estructuras. En los modelos 3D generados de todas las ARs diseñadas tanto de uno, como dos y tres módulos de anquirina, se obtuvieron puntuaciones TM mayores a 0.8. Esto sugiere que los modelos resultantes presentan una topología adecuada y comparten similitud estructural significativa.

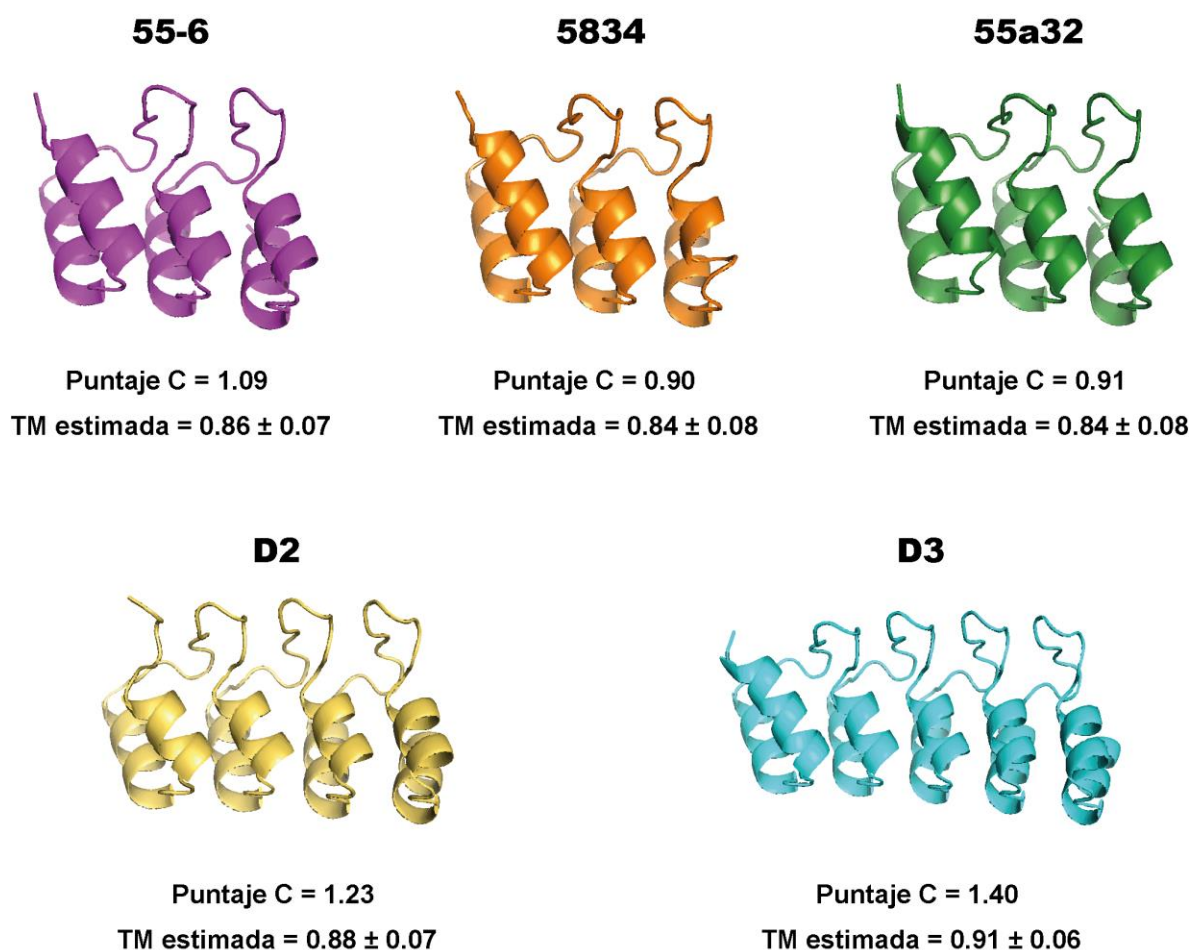


Figura 11. Modelos 3D de las proteínas ARs diseñadas. En color magenta, anaranjado y verde se observan los modelos de las proteínas ARs con una repetición de anquirina (55-6, 5834 y 55 a32 respectivamente), en color amarillo se observa el modelo de la proteína ARs con dos repeticiones de anquirina (D2) y en cian la proteína ARs con tres repeticiones de anquirina (D3). Los modelos fueron generados a través del servidor I-TASSER (Zhang, 2008) y las figuras generadas con el programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015).

Los experimentos de acoplamiento molecular entre proteínas ARs diseñadas y las estructuras de HsTIM WT y N16D revelan preferencia por su interfase dimérica.

Una vez obtenidos los modelos 3D de las proteínas ARs diseñadas, se llevaron a cabo acoplamientos moleculares con las estructuras de la HsTIM WT y la N16D utilizando el servidor en línea ClusPro.

Como resultado de los acoplamientos moleculares se seleccionaron los 10 modelos con el agrupamiento principal (*cluster*) en el que se obtuvo la mayor cantidad de complejos tanto para

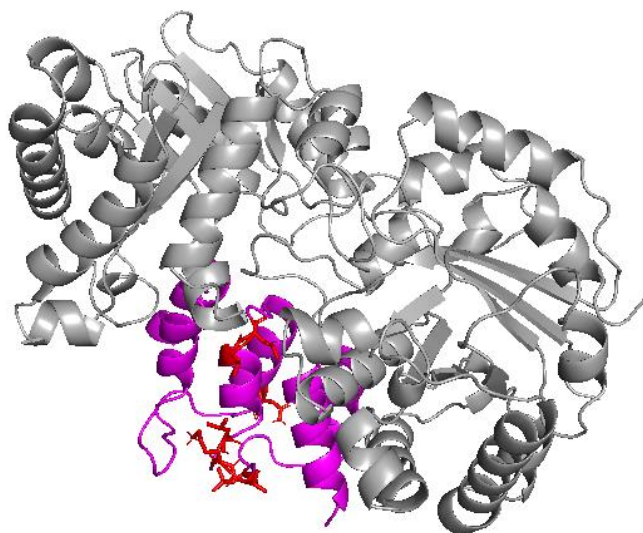
HsTIM WT como para la N16D. Este trabajo se basa únicamente en el modelo 0, considerado el modelo principal según la clasificación de ClusPro, mientras que los modelos del 1 al 9 se detallan en el Anexo C. Es importante mencionar que el término *cluster* hace referencia a la posición del ligando en la cual tiene la mayor cantidad de miembros en un radio de 9 Å (angstroms) con respecto al receptor.

De manera general, en los modelos de acoplamiento molecular revelaron una clara tendencia de las proteínas ARs con una repetición de anquirina a acoplarse hacia la interfase dimérica tanto de la HsTIM WT como de la N16D (Fig. 12 a 14). Por el contrario, las proteínas ARs con dos y tres módulos de repetición (D2 y D3, respectivamente) mostraron acoplamientos en regiones alejadas de la interfase (Fig. 15 y 16).

En el acoplamiento molecular de las ARs 55-6 y 55a32 con la HsTIM WT y N16D (Fig. 12 a 14), se observó una asociación cercana a la interfase de las TIMs con ambas. Sin embargo, con la WT la mayoría de los residuos aminoácidos variables de ambas ARs se localizaron en dirección opuesta a su interfase. En contraste, en el acoplamiento con la N16D, se observó que los aminoácidos variables de las ARs se orientaron hacia la interfase de la TIM. Por otro lado, la ARs 5834 (Fig. 13), se acopló en regiones distantes de la interfase tanto en la WT como en la N16D.

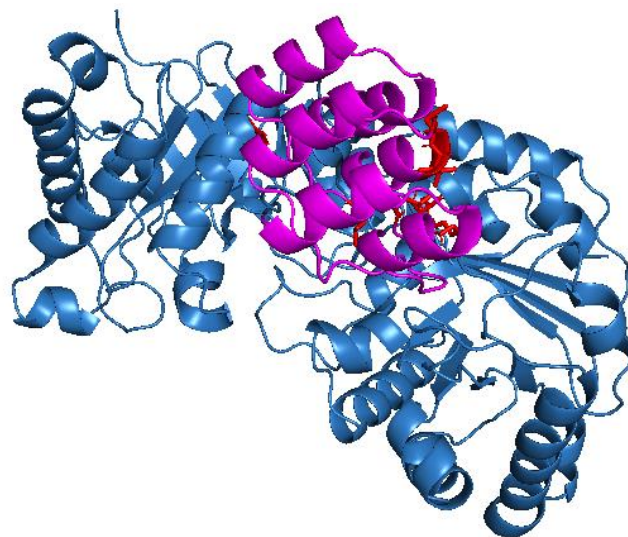
Con base en los resultados de acoplamiento molecular y en la tendencia de las proteínas con una repetición a acoplarse cerca de la interfase de la HsTIM, se llevaron a cabo ensayos experimentales para evaluar la interacción exclusivamente con las proteínas de un solo módulo (55-6, 5834 y 55a32).

Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre 55-6 y HsTIM WT



Modelo= 0
Miembros= 107

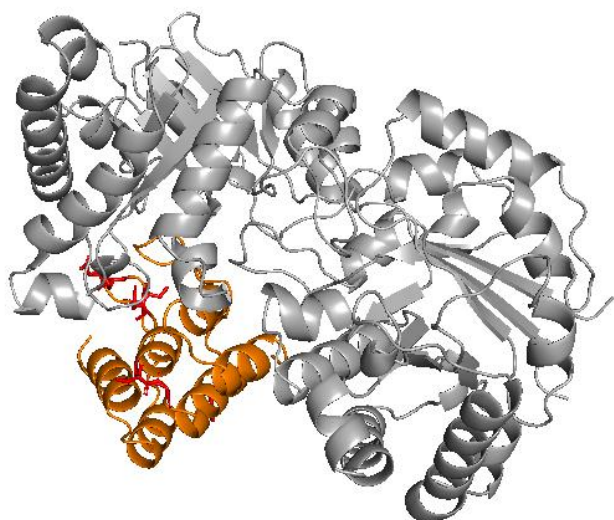
Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre 55-6 y HsTIM N16D



Modelo= 0
Miembros= 76

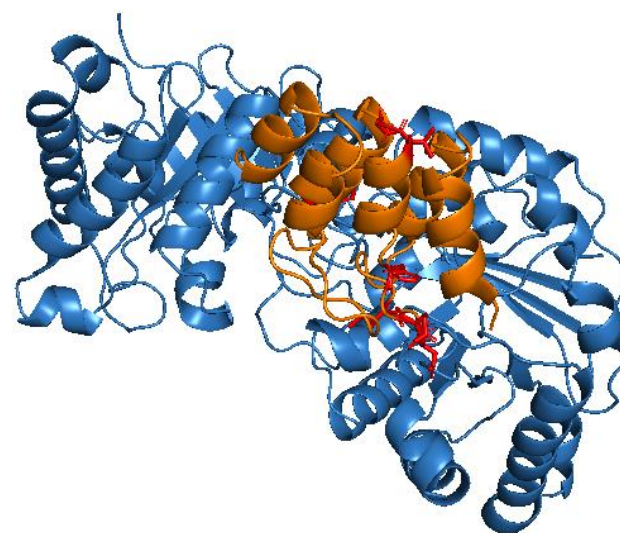
Figura 12. Modelo 0 del acoplamiento molecular entre 55-6 y HsTIM WT y N16D. En color magenta se señala la proteína ARs diseñada con una repetición de anquirina denominada 55-6 y en color rojo los residuos de aminoácidos variables, en color gris se observa la HsTIM WT y en color azul la HsTIM N16D. Los modelos fueron obtenidos a través de ClusPro y las imágenes fueron generadas con el programa PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre 5834 y HsTIM WT



Modelo= 0
Miembros= 246

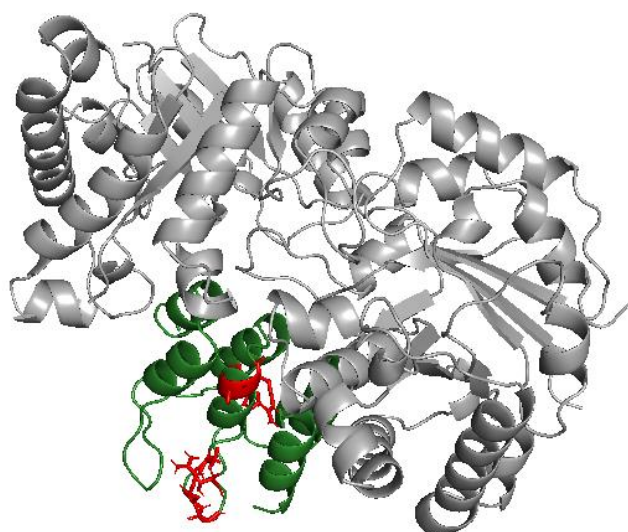
Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre 5834 y HsTIM N16D



Modelo= 0
Miembros= 119

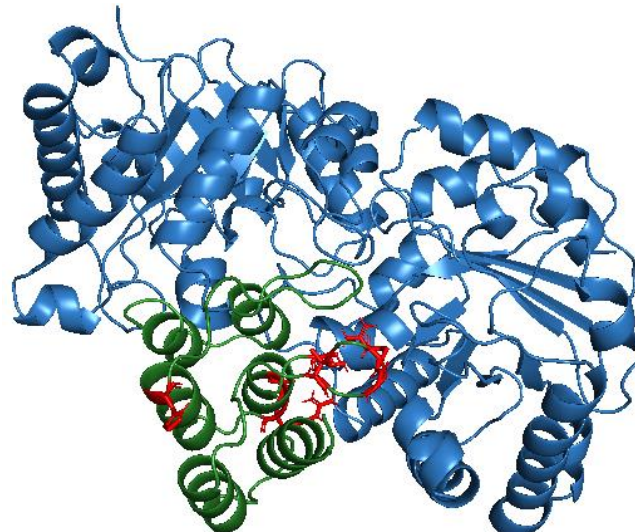
Figura 13. Modelo 0 del acoplamiento molecular entre 5834 y HsTIM WT y N16D. En color anaranjado se señala la proteína ARs diseñada con una repetición de anquirina denominada 5834 y en color rojo los residuos de aminoácidos variables, en color gris se observa la HsTIM WT y en color azul la HsTIM N16D. Los modelos fueron obtenidos a través de ClusPro y las imágenes fueron generadas con el programa PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre 55a32 y HsTIM WT



Modelo= 0
Miembros= 124

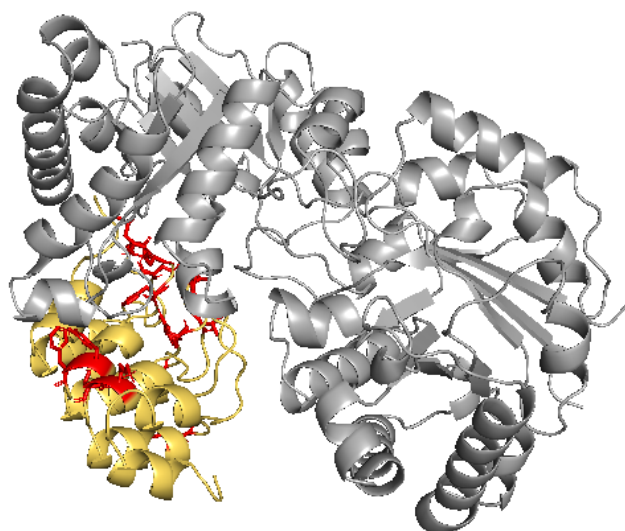
Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre 55a32 y HsTIM N16D



Modelo= 0
Miembros= 103

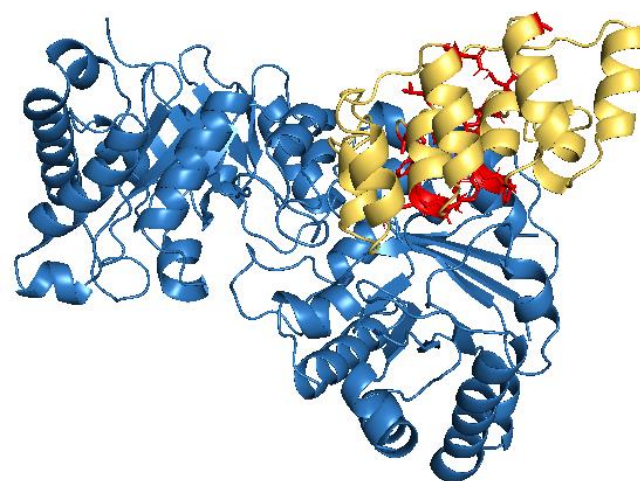
Figura 14. Modelo 0 del acoplamiento molecular entre 55a32 y HsTIM WT y N16D. En color verde se señala la proteína ARs diseñada con una repetición de anquirina denominada 55a32 y en color rojo los residuos de aminoácidos variables, en color gris se observa la HsTIM WT y en color azul la HsTIM N16D. Los modelos fueron obtenidos a través de ClusPro y las imágenes fueron generadas con el programa PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre D2 y HsTIM WT



Modelo= 0
Miembros= 83

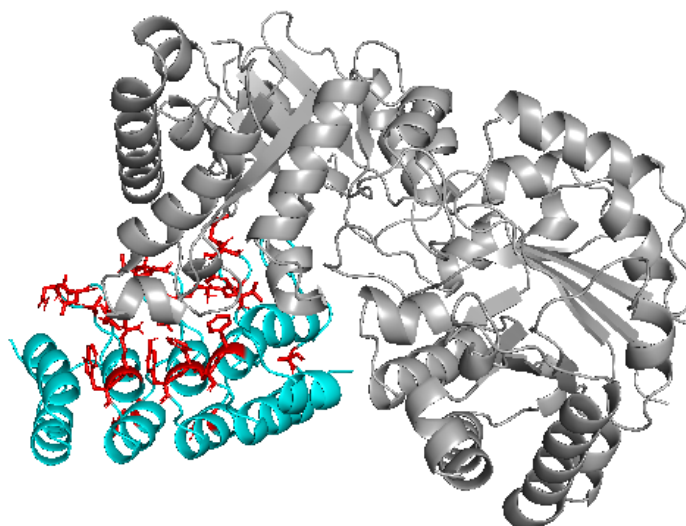
Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre D2 y HsTIM N16D



Modelo= 0
Miembros= 81

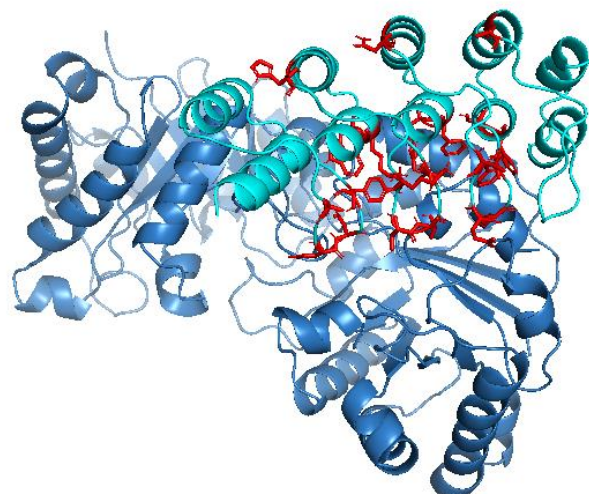
Figura 15. Modelo 0 del acoplamiento molecular entre D2 y HsTIM WT y N16D. En color amarillo se señala la proteína ARs diseñada con dos repeticiones de anquirina denominada D2 y en color rojo los residuos de aminoácidos variables, en color gris se observa la HsTIM WT y en color azul la HsTIM N16D. Los modelos fueron obtenidos a través de ClusPro y las imágenes fueron generadas con el programa PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre D3 y HsTIM WT



Modelo= 0
Miembros= 93

Modelo (agrupamiento) 0 del acoplamiento molecular entre D3 y HsTIM N16D



Modelo= 0
Miembros= 59

Figura 16. Modelo 0 del acoplamiento molecular entre D3 y HsTIM WT y N16D. En color cian se señala la proteína ARs diseñada con tres repeticiones de anquirina denominada D3 y en color rojo los residuos de aminoácidos variables, en color gris se observa la HsTIM WT y en color azul la HsTIM N16D. Los modelos fueron obtenidos a través de ClusPro y las imágenes fueron generadas con el programa PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC.

Ensayos para evaluar la interacción entre las ARs diseñadas seleccionadas y la HsTIM (WT y N16D)

La sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes revela alta pureza.

Para llevar a cabo las interacciones, se sobre-expresaron y purificaron tanto las tres proteínas recombinantes de un módulo de anquirina (5834, 55-6 y 55a32), como las HsTIM WT y N16D. Se presentan las fracciones correspondientes a los diferentes pasos de purificación para la HsTIM WT, la HsTIM N16D y las anquirinas 5834, 55a32 y 55-6 (Figs. 17 a 21, respectivamente). En general, se obtuvo cada proteína con alta pureza, los rendimientos de cada purificación se señalan en la tabla 3.

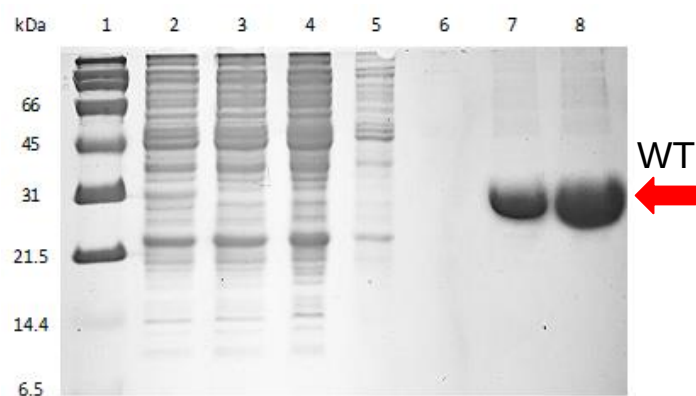


Figura 17. Purificación de HsTIM WT. Fracciones colectadas durante la purificación y visualizadas por SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); 2. Lisado celular; 3. Fracción celular soluble; 4. Fracción que no fue adherida a la resina; 5. Fracción de lavado; 6. Vacío; 7. Proteína HsTIM WT (20 µg); 8. Proteína HsTIM WT (30 µg).

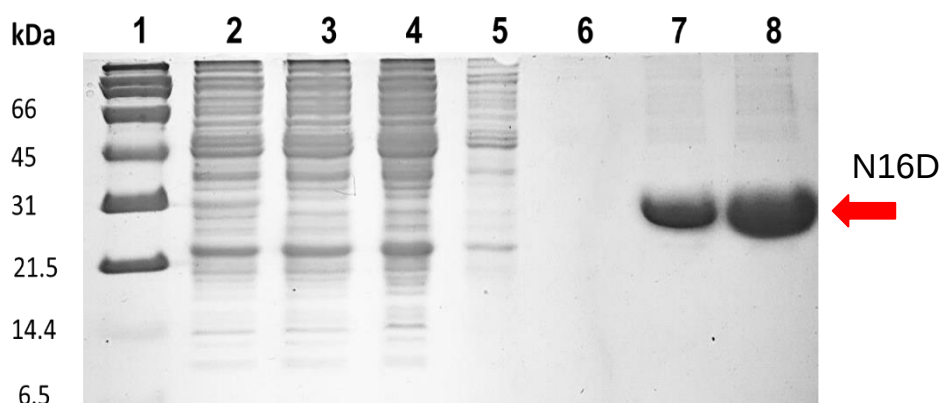


Figura 18. Purificación de HsTIM N16D. Fracciones colectadas durante la purificación y visualizadas por SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); 2. Lisado celular; 3. Fracción celular soluble; 4. Fracción que no fue adherida a la resina; 5. Fracción de lavado; 6. Vacío; 7. Proteína HsTIM N16D (15 µg); 8. Proteína HsTIM N16D (30 µg).

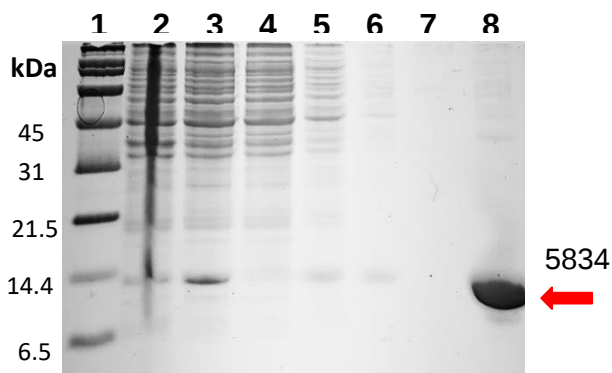


Figura 19. Purificación de proteína con un módulo de anquirina (5834). Fracciones colectadas durante la purificación y visualizadas por SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); 2. Lisado celular; 3. Fracción celular soluble; 4. Fracción que no fue adherida a la resina; 5 y 6. Fracciones de lavados; 7. Vacío; 8. Proteína 5834 (30 µg).

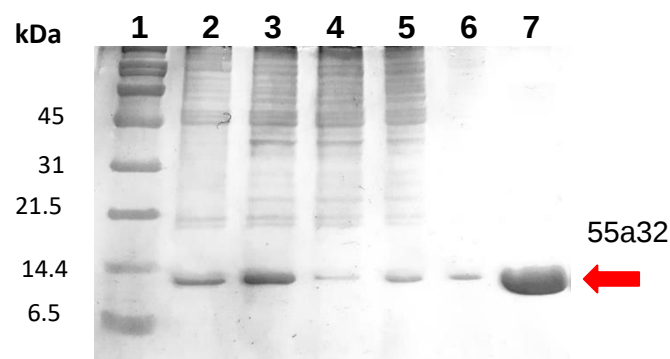


Figura 20. Purificación de proteína con un módulo de anquirina (55a32). Fracciones colectadas durante la purificación y visualizadas por SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); 2. Lisado celular; 3. Fracción celular soluble; 4. Fracción que no fue adherida a la resina; 5 y 6. Fracciones de lavados; 7. Proteína 55a32 (30 µg).

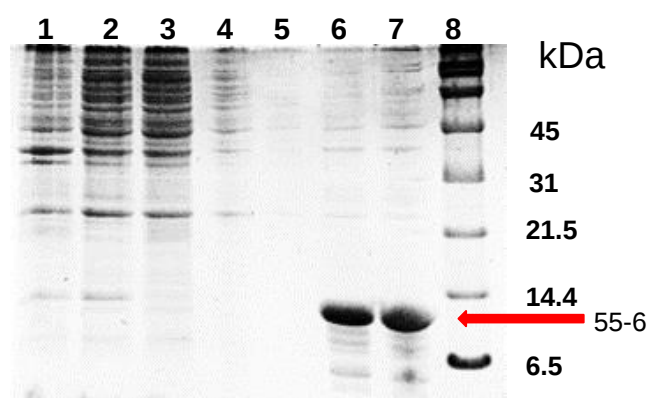


Figura 21. Purificación de proteína con un módulo de anquirina (55-6). Fracciones colectadas durante la purificación y visualizadas por SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Lisado celular; 2. Fracción celular soluble; 3. Fracción que no fue adherida a la resina; 4 y 5. Fracciones de lavados; 6 y 7. Proteína 55-6 (30 µg); 8. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad).

Tabla 3. Rendimiento de las purificaciones.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Rendimiento (mg de proteína/L de cultivo)
HsTIM WT	~ 27 por subunidad	24.9
HsTIM N16D		17
55a32	12.1	16
5834	12.2	15
55-6	12.1	18

Los primeros experimentos de interacción entre proteínas ARs diseñadas y HsTIM revelan poco o ningún grado de Interacción con la HsTIM N16D y la HsTIM WT

Una vez que purificadas fueron las proteínas, se llevaron a cabo ensayos de interacción entre las ARs y las HsTIM (WT y N16D). En un paso inicial se realizaron los ensayos de interacción de las ARs con la HsTIM N16D. Posteriormente, al obtener evidencia experimental de una posible interacción, se llevaron a cabo experimentos de interacción con la HsTIM WT. Cada experimento de interacción constó de dos etapas. 1) la AR de interés que contenía etiqueta His en el extremo N-terminal, se unió a la resina de afinidad acoplada a níquel; 2) las ARs previamente adheridas a la resina IMAC, se incubaron con HsTIM WT o con la N16D durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se eluyeron con 200 mM de imidazol, con la finalidad de recuperar la anquirina unida a la resina con la proteína que posiblemente interacciona.

La primera ARs diseñada con la que se experimentó fue la 5834. Primero se hizo el ensayo con 5834 y N16D. Los resultados (Fig. 22) revelaron que en el carril 10 solo está presente la banda perteneciente a la proteína 5834 (flecha negra), mientras que la N16D no estaba presente, por lo que este ensayo sugiere que no hay interacción. Por otro lado, en la fracción que no se adhirió a la resina (carril 3), se observó que gran parte de la proteína 5834 se encontraba ahí, esto nos llevó a realizar el ensayo una segunda vez modificando el tiempo de incubación de 1 a 2 horas. A pesar de los cambios realizados, los resultados finales del segundo ensayo no cambiaron.

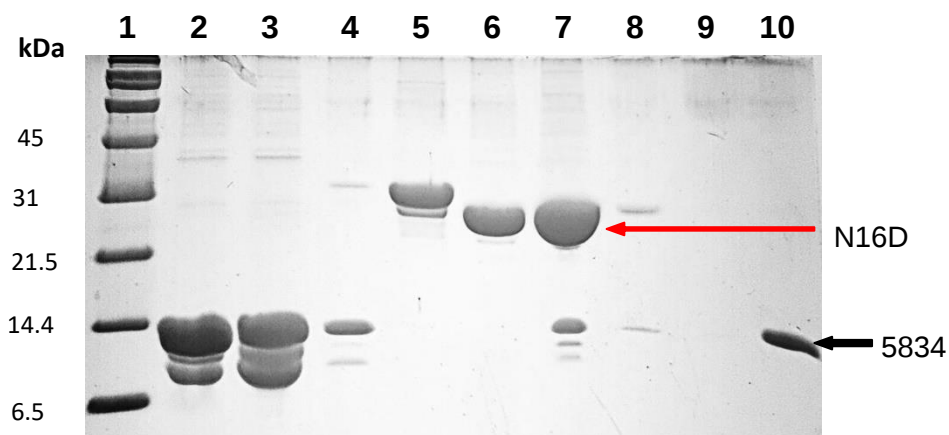


Figura 22. Ensayo de interacción entre la proteína 5834 y N16D. Gel SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad). 2. 5834 (30 µg); 3. Fracción de 5834 que no se adhirió a la resina; 4. Lavado de la unión 5834-resina; 5. N16D con etiqueta de histidinas (30 µg); 6. N16D sin etiqueta de histidinas (10 µg); 7. Fracción que no se adhirió a la resina después de la interacción 5834/N16D; 8 y 9. Fracción de lavado después de la interacción 5834/N16D; 10. Eluido de la interacción entre 5834/N16D.

La interacción entre la proteína ARs 55a32 y la HsTIM N16D revela una posible interacción.

Otra de las proteínas ARs diseñadas que se evaluó para su interacción con la N16D fue la 55a32. En la Fig. 23, se presentan las diferentes fracciones colectadas a lo largo del experimento. En el carril 10, que contiene el eluido de la interacción, se observa una banda correspondiente a 55a32 (flecha negra), junto con una banda tenue de peso molecular similar a N16D (flecha roja). Se llevaron a cabo tres repeticiones de este experimento, y uno de estos ensayos adicionales se muestra en la Figura 24.

La evaluación de la interacción entre la proteína 55-6 y la HsTIM N16D revela interacción con pasos adicionales de purificación.

En los ensayos de interacción entre la proteína 55-6 y la N16D (Fig. 25), se observa en el carril 10 (eluido de la interacción) una banda tenue con un peso molecular aproximado de 27 kDa, que puede ser atribuido a la N16D, además de la banda que corresponde a la 55-6. Esto sugiere una probable una interacción entre las proteínas. Sin embargo, la interpretación de los resultados se ve comprometida debido a que la proteína 55-6 presenta varias bandas contaminantes aún después de su purificación (carril 2).

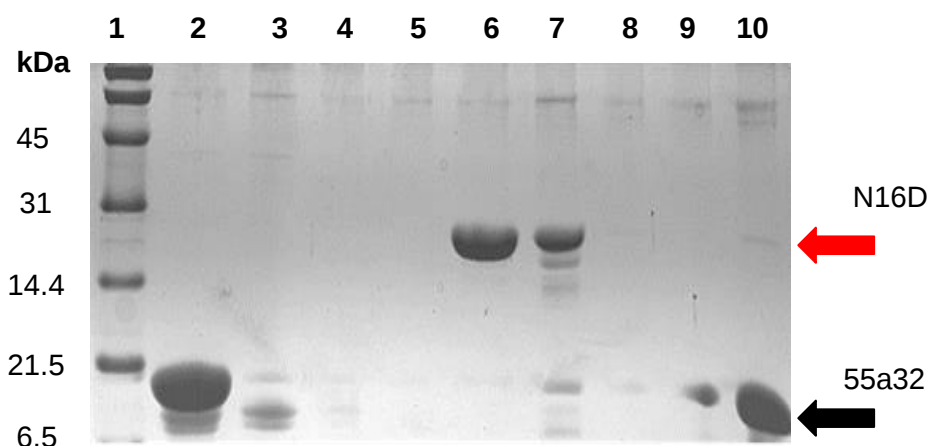


Figura 23. Ensayo de interacción entre la proteína 55a32 y N16D. Gel SDS-PAGE al 16%. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); **2.** 55a32 (30 µg); **3.** Fracción de 55a32 que no se adhirió a la resina; **4 y 5.** Fracción de lavado de la unión 55a32-resina; **6.** N16D sin etiqueta de histidinas (20 µg); **7.** Fracción que no se adhirió a la resina después de la interacción 55a32/N16D; **8 y 9.** Fracción de lavado después de la interacción 55a32/N16D; **10.** Eluido de la interacción entre 55a32/N16D.

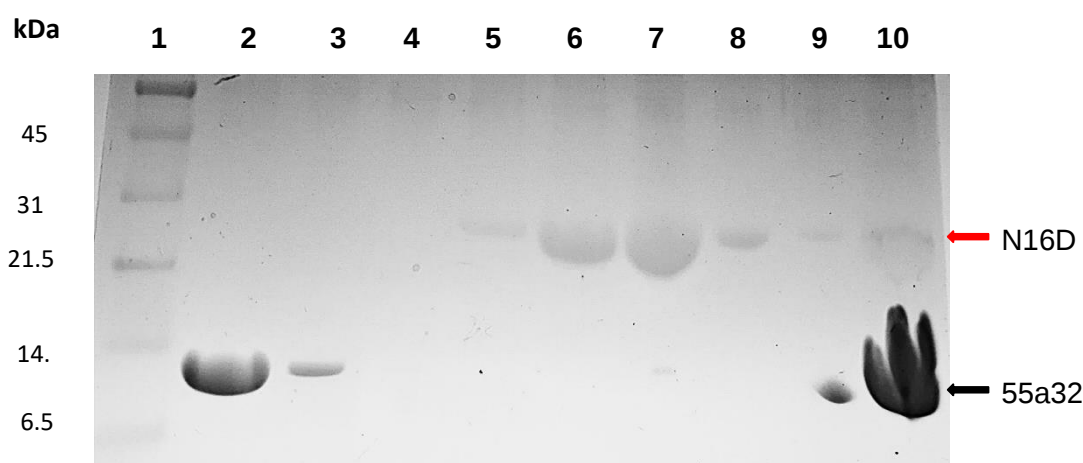


Figura 24. Ensayo de interacción entre la proteína 55a32 y N16D. Gel SDS-PAGE al 16%. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); **2.** 55a32 (15 µg); **3.** Fracción de 55a32 que no se adhirió a la resina; **4.** Lavado de la unión 55a32-resina; **5.** N16D con etiqueta de histidinas (15 µg); **6.** N16D sin etiqueta de histidinas (15 µg); **7.** Fracción que no se adhirió a la resina después de la interacción 55a32/N16D; **8 y 9.** Fracción de lavado después de la interacción 55a32/N16D; **10.** Eluido de la interacción entre 55a32/N16D.

Por lo anterior, se llevaron a cabo algunos pasos adicionales en la purificación de la proteína 55-6 que se resumen a continuación. Una vez que la proteína fue concentrada, se diluyó con 30 mL de amortiguador (trietanolamina 100 mM, pH 7.4) y se filtró por medio de centrifugación a través de un Centricon de paso de corte de 30 kDa (Amicon Ultra, Merck Millipore), el eluido

se volvió a pasar para su concentración en un tubo Centricon de paso de corte de 10 kDa. La proteína concentrada se utilizó en un segundo ensayo para evaluar la interacción (Fig. 26), en el que también se observó en el carril del eluido de la columna (carril 10) una banda tenue con un peso molecular aproximado de 27 kDa (flecha roja), que corresponde al peso molecular de la N16D, además de la banda de 55-6 (flecha negra), estos resultados sugieren una probable interacción entre la ARs 55-6 y la N16D.

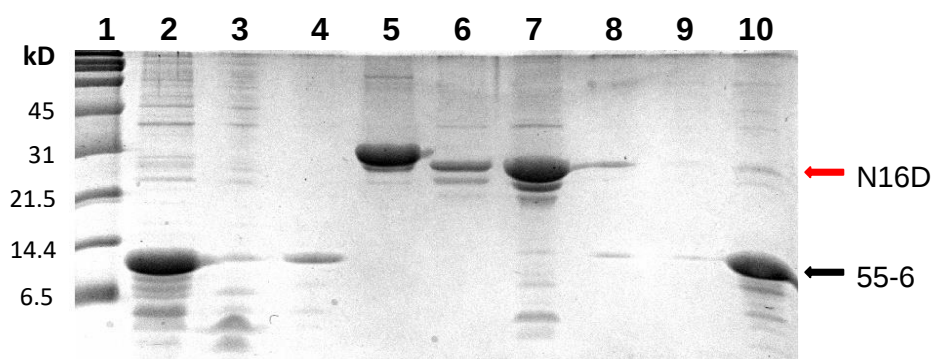


Figura 25. Ensayo de interacción entre la proteína 55-6 y N16D. Gel SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); 2. 55-6 (30 µg); 3. Fracción de 55-6 que no se adhirió a la resina; 4. Lavado de la unión 55-6-resina; 5. N16D con etiqueta de histidinas (30 µg); 6. N16D sin etiqueta de histidinas (10 µg); 7. Fracción que no se adhirió a la resina después de la interacción 55-6/N16D; 8 y 9. Fracción de lavado después de la interacción 55-6/N16D; 10. Eluido de la interacción entre 55-6/N16D.

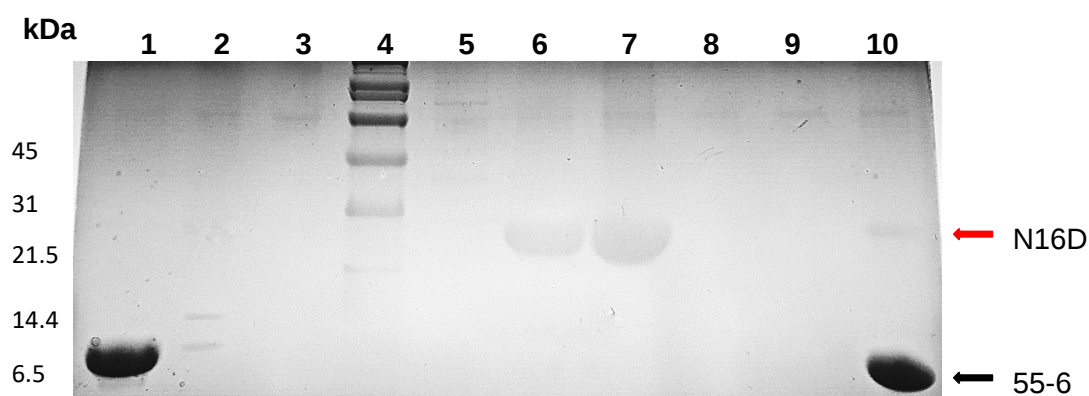


Figura 26. Ensayo de interacción entre la proteína 55-6 y N16D. Gel SDS-PAGE al 16%. Carriles: 1. 55-6 (30 µg); 2. Fracción de 55-6 que no se adhirió a la resina; 3. Lavado de la unión 55-6-resina; 4. Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); 5. Vacío; 6. N16D sin etiqueta de histidinas (20 µg); 7. Fracción que no se adhirió a la resina después de la interacción 55-6/N16D; 8 y 9. Fracción de lavado después de la interacción 55-6/N16D; 10. Eluido de la interacción entre 55-6/N16D.

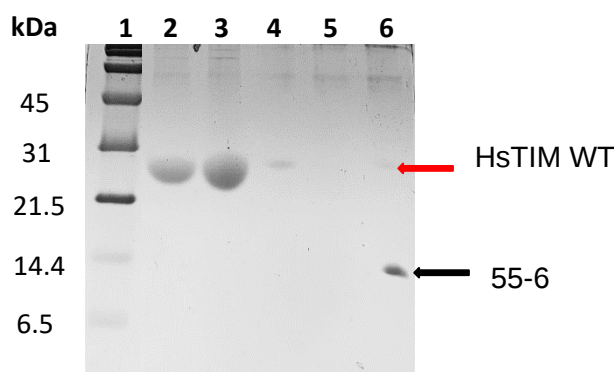


Figura 28. Ensayo de interacción entre la proteína 55-6 y HsTIM WT. Gel SDS-PAGE al 16%. Carriles: **1.** Marcador de peso molecular en kDa (Broad Range, Bio-Rad); **2.** HsTIM WT (WT) sin etiqueta de histidinas (20 µg); **3.** Fracción que no se adhirió a la resina después de la interacción 55-6/WT; **4 y 5.** Fracción de lavado después de la interacción 55-6/WT; **6.** Eluido de la interacción entre 55-6/WT.

Las proteínas 55-6 y 55a32 mostraron una posible interacción con la HsTIM N16D, sin embargo, solo la proteína 55a32 no interaccionó con la HsTIM WT.

Los análisis de las interacciones entre anquirinas diseñadas 55-6 y 55a32 con la HsTIM WT y N16D revelan diferencias en el reconocimiento molecular.

Las anquirinas diseñadas 55-6 y 55a32 mostraron una posible interacción con la HsTIM N16D, destacando la 55a32 la proteína que parece identificar de forma selectiva a la N16D. Por ello, se llevaron a cabo análisis de los 10 modelos de acoplamiento molecular de ambas anquirinas diseñadas con la HsTIM WT y N16D obtenidos de ClusPro. El objetivo fue determinar si los modelos sugieren posibles explicaciones del reconocimiento diferencial y evaluar los aminoácidos involucrados en dicha interacción.

Para cada uno de los modelos se recopilaban todas las interacciones entre los aminoácidos de las posiciones variables de las anquirinas con la HsTIM WT y N16D. Luego se determinó el número y tipo de interacciones y se clasificaron según el tipo de interacción (puente de hidrógeno, hidrofóbica y puentes salinos), así como la ubicación del aminoácido involucrado en la interacción con la HsTIM (interfase u otro sitio). A continuación se muestran los resultados de este análisis (Tablas 5-8).

Tablas 5-8. Frecuencias de las interacciones establecidas entre las anquirinas diseñadas 55-6 y 55a32 con la HsTIM WT y N16D. En cada una de las tablas se muestran el número de interacciones establecidas entre cada uno de los aminoácidos variables de la 55-6 y 55a32 con aminoácidos de la HsTIM N16D y WT. Asimismo, se clasifican por el sitio en donde se establece la interacción (interfase u otro sitio de la HsTIM) y el tipo de interacción establecida (puente de hidrógeno o interacción hidrofóbica). * Residuos de aminoácidos que presentaron diferencias significativas.

Tabla 5. Interacciones entre la 55a32 y la HsTIM WT.

Aminoácido variable de AR	Interfase		Otro Sitio		Total
	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	
T ₃₂	0	0	0	3	3*
G ₃₄	0	3	0	6	9*
R ₃₅	1	5	2	9	17
T ₃₇	0	0	0	1	1
A ₄₅	0	1	1	3	5
R ₄₆	1	6	13	13	33*
H ₅₈	1	6	0	0	26
Total	3	21	16	35	75

Tabla 6. Interacciones entre la 55a32 y la HsTIM N16D.

Aminoácido variable de AR	Interfase		Otro Sitio		Total
	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	
T ₃₂	4	13	0	2	19*
G ₃₄	0	8	1	12	21*
R ₃₅	0	1	3	15	19
T ₃₇	0	0	0	2	2
A ₄₅	0	0	0	3	3
R ₄₆	0	0	5	9	14*
H ₅₈	0	2	1	4	7
Total	4	24	10	47	85

Tabla 7. Interacciones entre la 55-6 y la HsTIM WT.

Aminoácido variable de AR	Interfase		Otro Sitio		Total
	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	
L ₃₂	1	7	4	10	22*
V ₃₄	1	3	2	13	19
K ₃₅	0	0	2	16	18
L ₃₇	0	0	0	0	0*
V ₄₅	1	4	0	3	8
L ₄₆	1	12	0	1	14
N ₅₈	0	0	0	2	2
Total	4	26	8	45	83

Tabla 8. Interacciones entre la 55-6 y la HsTIM N16D.

Aminoácido variable de AR	Interfase		Otro Sitio		Total
	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas	
L ₃₂	0	6	1	1	8*
V ₃₄	0	5	1	6	12
K ₃₅	2	4	2	9	17
L ₃₇	0	3	0	3	6*
V ₄₅	1	4	1	5	11
L ₄₆	1	8	0	2	11
N ₅₈	0	0	0	0	0
Total	4	30	5	26	65

En resumen, para todos los modelos analizados, se observó un mayor número de interacciones hidrofóbicas que puentes de hidrógeno, mientras que no se contabilizaron puentes salinos. Los residuos aminoáciles N16 y D16 (para la WT y N16D, respectivamente), no presentaron ningún tipo de interacción con los residuos variables de ambas anquirinas.

En el caso de la 55a32 (Tablas 5 y 6), se observó un mayor número de interacciones con N16D ($n = 85$) que con la WT ($n = 75$), sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número promedio de interacciones ($t = 0.2756$, g.l. = 10.94, $p = 0.78$). Asimismo, al comparar la cantidad de interacciones por sitio (interfase u otro) y por tipo (puente de hidrógeno o interacción hidrofóbica) entre WT y N16D, no se hallaron diferencias significativas ($\chi^2 = 2.8698$, g.l. = 3, $p = 0.4121$). Finalmente, al analizar el número de interacciones por aminoácido variable, se encontraron diferencias significativas en tres aminoácidos variables ($\chi^2 = 24.532$, g.l. = 6, $p = 4.16 \times 10^{-4}$), específicamente en T32, G34 y R46.

La T₃₂ mostró un mayor número de interacciones con la N16D ($n=19$) en comparación con la WT ($n= 3$) (Tablas 5 y 6). Además, en el caso de la N16D, 17 de las 19 interacciones se localizaron en la interfase, por el contrario, en la WT las 3 interacciones se encontraron en sitio diferente a la interfase. Las figuras 29 y 30 presentan dos de los diez modelos obtenidos del acoplamiento molecular entre la 55a32 y la N16D, resaltando los puentes de hidrógeno entre la T₃₂ de la AR diseñada y algunos residuos de aminoácidos de la N16D. En la figura 29 se observa un puente de hidrógeno entre la T₃₂ y la N₇₁ del modelo 1 del acoplamiento entre la 55a32 y la N16D. En la figura 30 se observan 3 puentes de hidrógeno entre la T₃₂ y la T₇₀ del modelo 6 del acoplamiento entre la 55a32 y la N16D. En total se formaron 4 puentes de hidrógenos en los acoplamientos entre la 55a32 y la N16D que no se encontraron en la WT.

La G₃₄ también tuvo un mayor número de interacciones con la N16D ($n= 21$) que con la WT ($n= 9$) (Tablas 5 y 6). Casi todas las interacciones establecidas entre la G₃₄ y la HsTIM (WT y

N16D) fueron de tipo hidrofóbicas. En la WT, 3 de las 9 interacciones se localizaron en la interfase. Mientras que en la N16D, 8 de las 21 interacciones se localizaron en la interfase. En la figura 31 se observan 6 de los 10 modelos obtenidos del acoplamiento molecular entre la 55a32 y la N16D, resaltando 8 interacciones hidrofóbicas entre la G₃₄ de la AR y la interfase de la N16D (modelos 1, 4, 6, 7 8 y 9). Los residuos de aminoácidos con los cuales la G₃₄ estableció interacciones hidrofóbicas fueron: E₉₇ (modelo1), K₁₃ (modelo 4), F₇₄ (modelo 4), V₆₉ (modelo 6), V₆₉ (modelo 7), K₁₃ (modelo 8), F₇₄ (modelo 8) y V₁₀₁ (modelo 9).

Al contrario que T₃₂ y G₃₄, la R₄₆ presentó un mayor número de interacciones establecidas con la WT (n= 33) a diferencia de la N16D (n=14) (Tablas 5 y 6). En la WT, 26 de las 33 interacciones se encontraron en un sitio diferente a la interfase, así como en la N16D donde ocurrió lo mismo para las 14 interacciones establecidas.

Para la 55-6 (Tablas 7 y 8), se observó un mayor número de interacciones con la WT (n = 83), a diferencia de la N16D (n = 65). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número promedio de interacciones ($t = 0.6691$, $g.l. = 9.99$, $p = 0.5186$), ni en la cantidad de interacciones por sitio y por tipo de interacción ($\chi^2 = 3.9315$, $g.l. = 3$, $p = 0.269$) entre WT y N16D. Al comparar el número de interacciones por aminoácido variable se encontró que sí hubo diferencia significativa en dos aminoácidos variables ($\chi^2 = 15.009$, $g.l. = 6$, $p = 0.0202$). La L₃₂ tuvo un mayor número de interacciones con la WT y la L₃₇ tuvo un mayor número de interacciones con la N16D (Tablas 7 y 8).

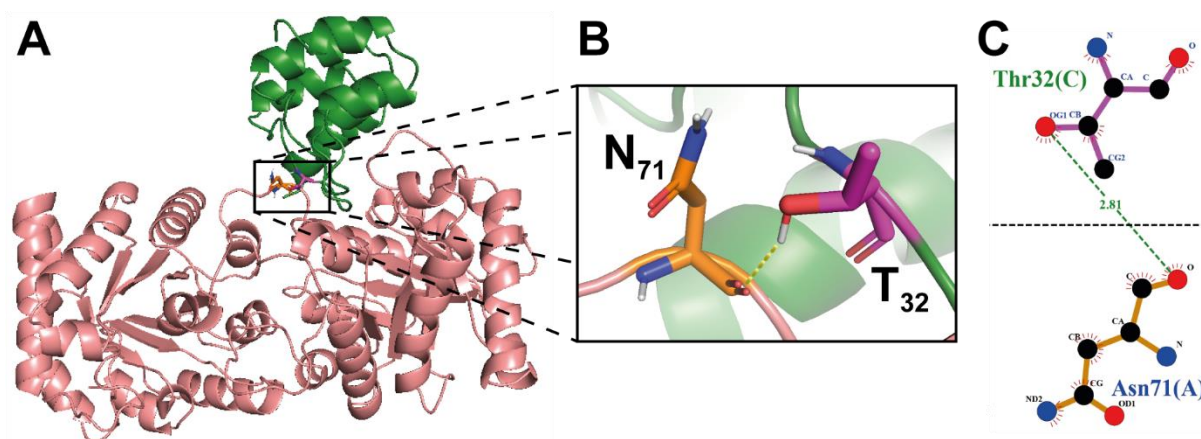


Figura 29. Modelo 1 del acoplamiento molecular entre la 55a32 y la N16D. A) Panorama general del acoplamiento entre 55a32 (verde) y la N16D (salmón). B) Acercamiento a la interacción entre T₃₂ (magenta) y N₇₁ (anaranjado) y el puente de hidrógeno (amarillo). En ambos residuos se muestran los átomos de oxígeno en rojo, nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco. C) Puente de hidrógeno establecido entre la T₃₂ y la N₇₁. A y B realizadas en PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015), C obtenida de LigPlot+ (Wallace *et al.*, 1995).

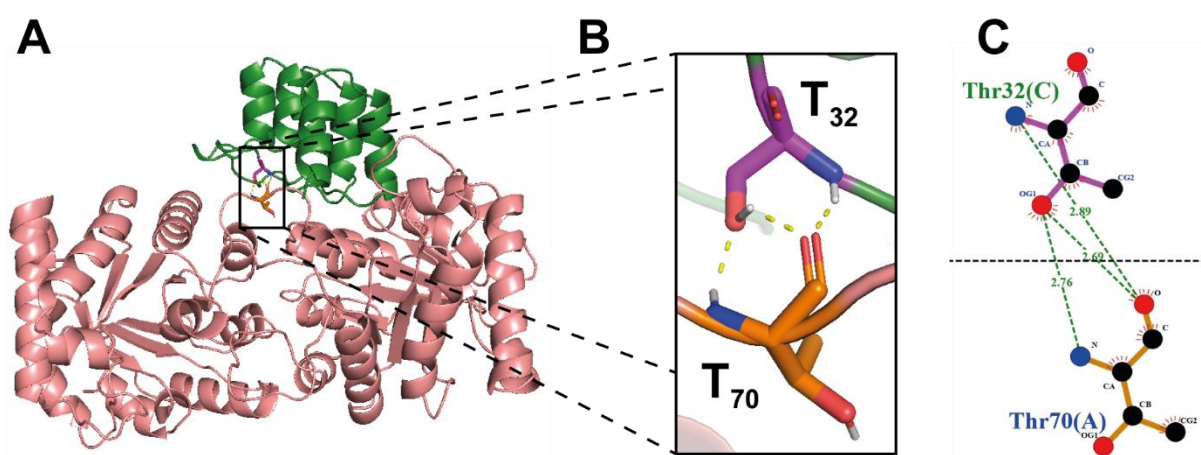


Figura 30. Modelo 6 del acoplamiento molecular entre la 55a32 y la N16D. A) Panorama general del acoplamiento entre 55a32 (verde) y la N16D (salmón). B) Acercamiento a la interacción entre T₃₂ (magenta) y T₇₀ (anaranjado) y los tres puentes de hidrógeno (amarillo). En ambos residuos se muestran los átomos de oxígeno en rojo, nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco. C) Puentes de hidrógeno establecidos entre la T₃₂ y la T₇₀. A y B realizadas en PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015), C obtenida de LigPlot+ (Wallace *et al.*, 1995).

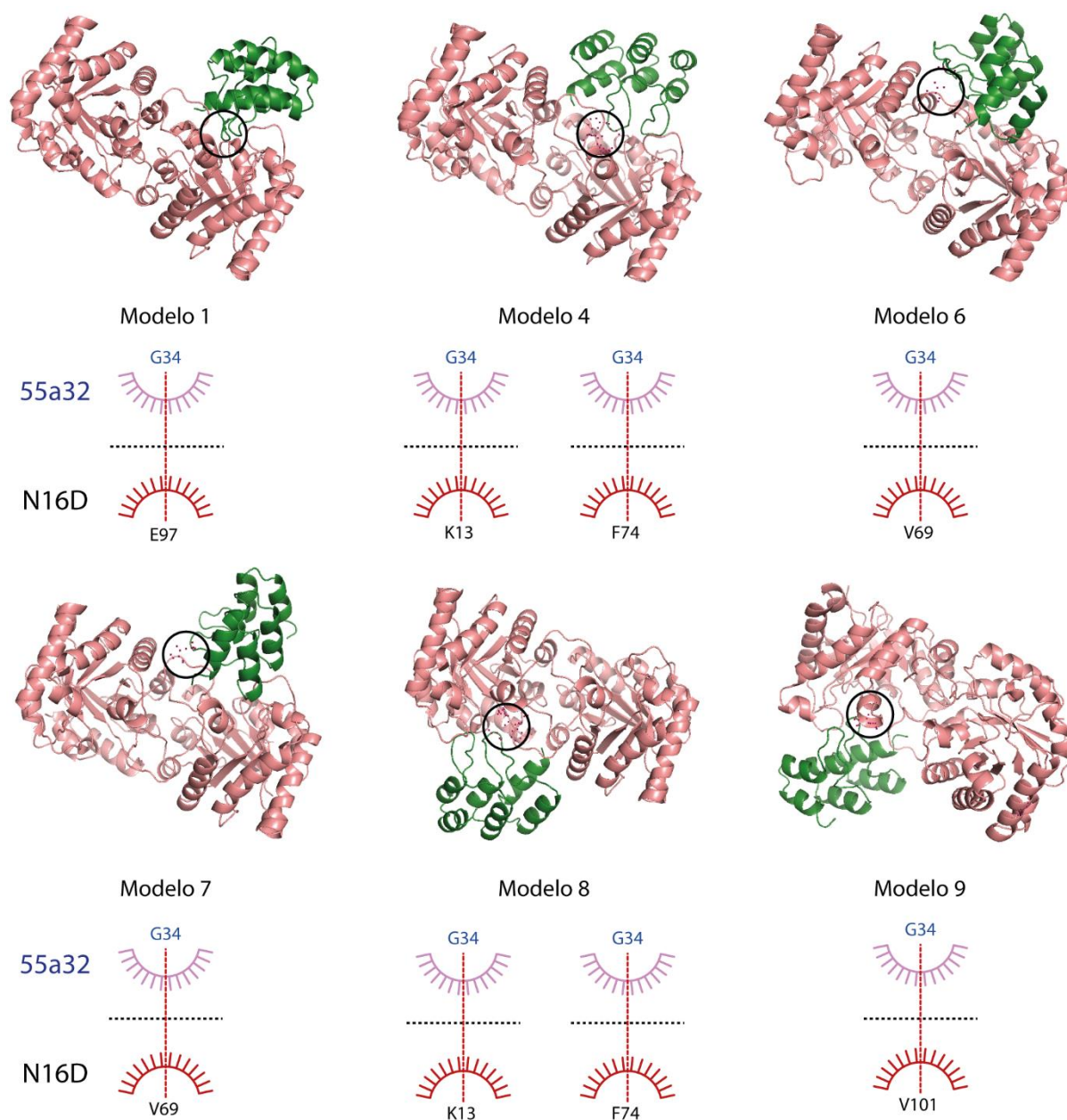


Figura 31. Interacciones hidrofóbicas entre la G₃₄ de la 55a32 y la interfase de la N16D. Parte superior: se observan los seis modelos en 3D del acoplamiento molecular donde se encontraron interacciones hidrofóbicas entre la 55a32 (verde) y la N16D (salmón) delimitadas por un círculo negro. Parte inferior: Representaciones 2D de las interacciones hidrofóbicas entre la G₃₄ y residuos de la interfase de la N16D. Modelos 3D realizados en PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015), modelos 2D obtenidos de LigPlot+ (Wallace *et al.*, 1995).

La L₃₂ tuvo un mayor número de interacciones con la WT (n = 22) que con la N16D (n = 8) (Tablas 7 y 8). De las interacciones establecidas entre la L₃₂ y WT, 14 de ellas se localizaron en otro sitio diferente a la interfase (10 hidrofóbicas y 4 puentes de hidrógeno) y 8 en la interfase (7 hidrofóbicas y 1 puente de hidrógeno). Por otro lado, las 8 interacciones establecidas entre la L₃₂ y la N16D, 6 se localizaron en la interfase (hidrofóbicas) y 2 en otro sitio (1 hidrofóbica y 1 puente de hidrógeno).

Al contrario, la L₃₇, tuvo un mayor número de interacciones con la N16D (n= 6) que con la WT (n= 0). Todas las interacciones, establecidas entre la L₃₇ y la N16D fueron de tipo hidrofóbicas, tres de éstas se establecieron en la interfase y tres en otro sitio.

8. DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue identificar proteínas con módulos de anquirina capaces de reconocer de manera selectiva a la mutante N16D de HsTIM. Este objetivo se cumplió ya que se identificaron dos proteínas con módulos de anquirina, denominadas 55-6 y 55a32, que mostraron capacidad para reconocer a la HsTIM N16D. Sin embargo, la 55a32 demostró mayor potencial al no interactuar con la enzima silvestre (HsTIM WT).

Inicialmente se hizo una pre-selección de anquirinas diseñadas disponibles en el laboratorio mediante estudios de acoplamiento molecular. Entre estas, las proteínas con un módulo de anquirina (55-6, 5834 y 55a32) surgieron como las mejores candidatas para ensayos de interacción. Aunque tanto las anquirinas 55-6 como 55a32 mostraron posibles interacciones, sólo esta última interactuó de manera diferencial con la proteína desamidada, sin detectar interacción con la enzima silvestre, lo que resalta su potencial para el reconocimiento de la esta enzima modificada post-traduccionamente.

A continuación, se discutirán las características bioquímicas que podrían haber favorecido la interacción de estas dos ARs con la HsTIM WT y N16D, centrándose en el efecto del tamaño de las ARs y las interacciones de sus aminoácidos variables con la interfase de la proteína blanco. Además, se analizarán las ventajas y desventajas de los ensayos *pull-down* para la detección de interacciones entre moléculas AR y blancos proteicos. Finalmente, se discutirá el uso del acoplamiento molecular (*docking*) como una herramienta para evaluar *a priori* interacciones de interés.

Interacciones diferenciales

Se ha demostrado que la desamidación de un residuo de Asparagina (N16) en la HsTIM es suficiente para que ocurran cambios funcionales y estructurales en esta enzima. De la Mora y colaboradores (2015) utilizaron como modelo de estudio a la enzima recombinante HsTIM

N16D que mimetiza la desamidación de la N16. Mediante el análisis de su estructura cristalográfica se pudo determinar que la desamidación altera de manera significativa la interfase dimérica de la enzima. Esto se evidenció por una disminución en el número de contactos interatómicos resultando en la disminución del área de contacto en la interfase de las subunidades (de la Mora-de la Mora *et al.*, 2015). Estudios posteriores *in silico* confirmaron que la desamidación de la proteína resultó en una disminución de contactos interatómicos del 48.5%, causando la pérdida del 27.5% del área de contacto entre las subunidades con respecto a lo observado en la enzima silvestre (Enríquez Flores *et al.*, 2020).

Asimismo, demostraron que la desamidación de la HsTIM en la asparagina 16, afectó las interacciones no covalentes al interior de la proteína, ya que la enzima desamidada presenta un mayor número de cavidades o túneles en su estructura (14 y 36 para la WT y N16D, respectivamente), además, estas cavidades son mayores en la enzima desamidada (Enríquez-Flores *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren una alta permeabilidad en la estructura de la N16D HsTIM, lo que implica una mayor accesibilidad al solvente y a moléculas pequeñas en el centro de la proteína.

Estos cambios estructurales derivados de la desamidación del residuo en la posición 16, sugieren la posibilidad de que las anquirinas diseñadas interaccionen de manera específica con la HsTIM N16D en sitios donde existen alteraciones como la interfase localizada entre las subunidades.

El tamaño de las ARs diseñadas y su interacción con el blanco

Uno de los factores que puede permitir que haya interacción entre los sitios de unión de proteínas y ligandos es la complementariedad espacial entre estos (Oliveira *et al.*, 2014). Lo anterior depende del tamaño de la molécula que reconoce y su accesibilidad hacia zonas de contacto con el blanco (Henrich *et al.*, 2009).

Para contar con información relevante de la probable interacción entre las ARs diseñadas y el blanco propuesto, se realizaron estudios de acoplamiento molecular los cuales revelaron que las proteínas de dos y tres módulos de repetición (13.1 y 16.6 kDa respectivamente) se orientaron en general hacia zonas que no eran la interfase (Fig. 14 y 15), mientras que las proteínas con una repetición de anquirina (~12 kDa) tendían a acoplarse hacia la interfase, tanto de la HsTIM WT como de la N16D (Fig. 12 a 14). Esto sugiere que las proteínas de un módulo, al ser más pequeñas, pueden acceder más fácilmente a la interfase de la HsTIM.

Análisis previos de acoplamiento molecular entre las proteínas desamidada y no desamidada con el DTNB, (reactivo de grupo sulhidrilo de bajo peso molecular), revelaron que la proteína desamidada presentó muchos sitios de unión para este compuesto, a diferencia de los encontrados en la enzima WT. De esta forma, se sugirió que pequeñas moléculas pueden alcanzar las zonas internas de la proteína e interactuar con aminoácidos que originalmente se encuentran ocultos en la enzima silvestre (Enríquez- Flores *et al.*, 2020). Recientemente, un trabajo en donde se aborda la HsTIIM desamidada como blanco en cáncer de mama, reveló que fármacos de bajo peso molecular como la auranofina y el rabeprazol, se acoplan de forma diferencial en la HsTIM desamidada presentando más sitios de unión en la interfase con respecto a la HsTIM no desamidada (Enríquez-Flores *et al.*, 2022). Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observó que las anquirinas diseñadas de menor peso molecular (~12 kDa), con un solo módulo de repetición, se ubican en zonas cercanas a la interfase, probablemente en las cavidades generadas por el nuevo arreglo estructural causado por la desamidación de la asparagina de la posición 16.

Con base en esta información, el tamaño de las ARs diseñadas emerge como un factor crítico que podría influir en su capacidad de interactuar con su blanco. Los hallazgos de este estudio sugieren que las ARs de una sola repetición se vieron favorecidas por su menor tamaño, lo que

implica que esta característica puede ser importante para el reconocimiento diferencial de la HsTIM desamidada sobre la enzima silvestre.

Estos resultados son novedosos ya contrastan con los estudios anteriores de las ARs diseñadas, los cuales se centran mayoritariamente en el uso de anquirinas de dos o más módulos de repetición (Kunimoto *et al.*, 2020; Rothenberger *et al.*, 2022). Esta diferencia se debe a que la mayoría de las ARs en la naturaleza poseen este número de repeticiones (Binz, 2003) Sin embargo, este estudio destaca la importancia de considerar también a las ARs diseñadas de un solo módulo, ya que muestran un potencial significativo en el reconocimiento diferencial de la HsTIM desamidada sobre la enzima silvestre. Esto sugiere que el enfoque en ARs de un solo módulo puede ofrecer nuevas perspectivas y oportunidades en el diseño de agentes de reconocimiento molecular.

55a32 y 55-6 poseen diferente composición de aminoácidos variables.

Los modelos del acoplamiento molecular mostraron que hay aminoácidos en ambas anquirinas (55-6 y 55a32) que pueden estar participando en el reconocimiento de la HsTIM, tanto de la WT como de la N16D. El acoplamiento molecular nos permite conocer la naturaleza de las interacciones establecidas entre las proteínas, pero no permite predecir la forma en que estas se darán en los ensayos de interacción.

La proteína con una repetición de anquirina 55-6 (Fig. 32) cuenta con los aminoácidos en las posiciones variables: L₃₂, V₃₄, K₃₅, L₃₇, V₄₅, L₄₇ y N₅₈ (Tabla 1) donde 5 de 7 son alifáticos (no polares). Al contar con naturaleza no polar, se sugiere que puede establecer, en su mayoría, interacciones hidrofóbicas con el blanco (Davis y Teague, 1999; Patil *et al.*, 2010). Al analizar mediante LigPlot las interacciones de los modelos obtenidos del acoplamiento molecular de 55-6 con ambos blancos (Tabla 7 y 8, respectivamente), se observó más del 85% de interacciones hidrofóbicas. Esto evidenció diferencias significativas en los residuos de

aminoácidos L₃₂ y L₃₇. Particularmente la L₃₂ estableció en promedio 6.5 interacciones hidrofóbicas con aminoácidos de la interfase en ambas proteínas, por lo que esta anquirina interacciona con ambas proteínas sin lograr discriminarlas.

Ambos resultados (ensayos de interacción y acoplamiento molecular) concuerdan con lo reportado por Seeger y colaboradores (2013), quienes mencionan que las ARs diseñadas con múltiples residuos no polares son muy propensas a establecer interacciones inespecíficas por medio de interacciones hidrofóbicas. Lo anterior confirma los resultados de la ARs 55-6 en los ensayos de interacción donde se demostró que interacciona indistintamente con la WT y la N16D (Figuras 25, 26 y 28).

Además, se observó un comportamiento singular de esta anquirina desde su purificación, ya que al finalizar el proceso aún se observaban bandas de proteínas contaminantes. Esto probablemente se deba a que esta proteína interaccionó con proteínas de *E. coli* durante el proceso de expresión y purificación. Seeger y colaboradores (2013) mencionan que las ARs diseñadas con residuos no polares en las posiciones aleatorias son propensos a formar agregados solubles durante la expresión y purificación. Esta cualidad sugiere que la proteína 55-6 interaccionó con otras proteínas y que posiblemente está interaccionando con ambas formas de la HsTIM (WT Y N16D).

Por otro lado, la proteína 55a32 cuenta con aminoácidos en las posiciones variables: T₃₂, G₃₄, R₃₅, T₃₇, A₄₅, R₄₆ y H₅₈ (Fig. 32), y de éstos, 3 son aminoácidos con carga positiva. De acuerdo con lo reportado por Enríquez-Flores y colaboradores (2020) (Fig. 10) que analizaron la estructura cristalográfica de la HsTIM N16D, hay una diferencia en el potencial electrostático superficial en las interfases de la WT y la N16D. Específicamente la N16D tiene una mayor cantidad de cargas negativas que se exponen en el área de la interfase. Ambas premisas sugieren que la 55a32 podría establecer interacciones electrostáticas con la interfase de la N16D

(Shipunova *et al.*, 2020). Sin embargo, el análisis de acoplamiento molecular no predijo interacciones electrostáticas, solamente interacciones de tipo hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

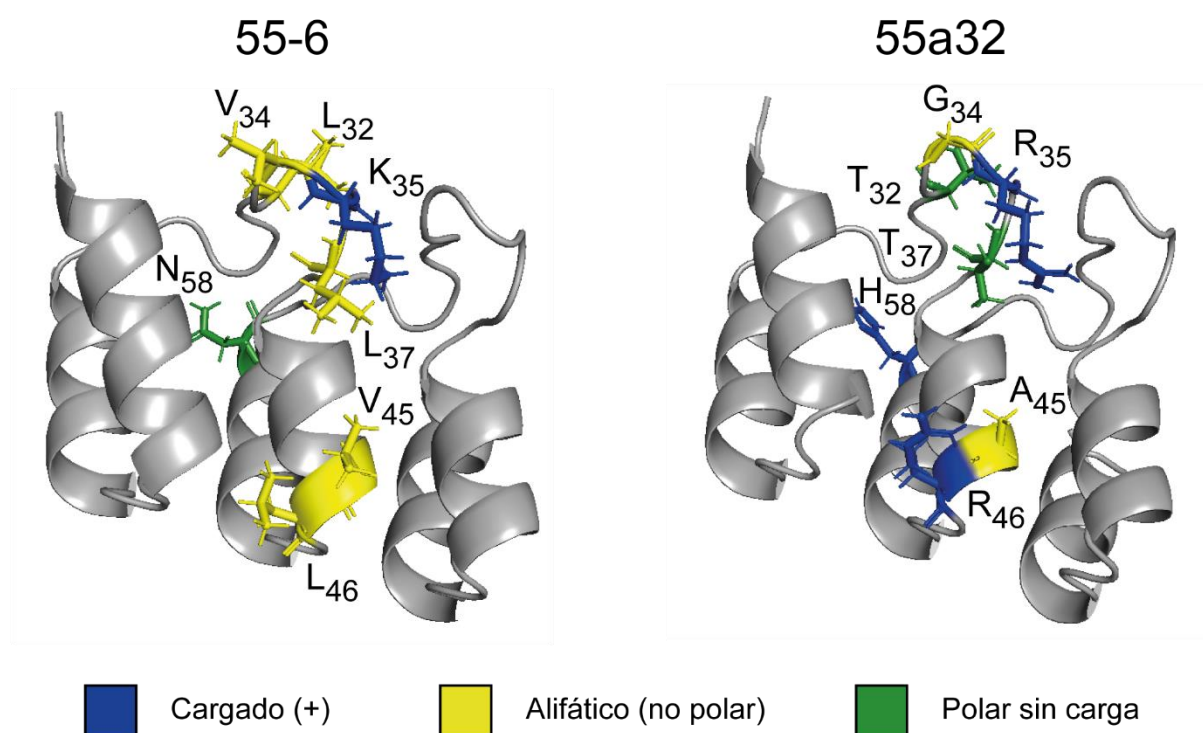


Figura 32. Proteínas con una repetición de anquirina 55-6 y 55a32. En color azul, amarillo y verde se muestran los aminoácidos situados en las posiciones variables.

Al comparar el número de interacciones por aminoácido variable obtenidas del acoplamiento molecular, se encontró que sí hubo una diferencia significativa en tres aminoácidos variables: T₃₂, G₃₄ y R₄₆. La T₃₂ y la G₃₄ tuvieron un mayor número de interacciones en la N16D, de las cuales T₃₂ presentó la mayoría en la interfase y G₃₄ en otro sitio (tabla 9). La T₃₂ estableció principalmente interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno con 10 aminoácidos localizados en la interfase de la HsTIM N16D, por lo que podríamos esperar que este aminoácido tuviera una mayor participación estableciendo interacciones con la N16D.

Tabla 9. Interacciones de la T₃₂ y la G₃₄ de la anquirina 55a32 con residuos específicos de la HsTIM N16D.

T ₃₂			G ₃₄		
Residuo de aminoácido en la N16D	Cantidad	Tipo de interacción	Residuo de aminoácido en la N16D	Cantidad	Tipo de interacción
*V ₆₉	1	Hidrofóbica	*K ₁₃	2	Hidrofóbica
*T ₇₀	2	Hidrofóbica	*V ₆₉	2	Hidrofóbica
*N ₇₁	3	Hidrofóbica	*F ₇₄	2	Hidrofóbica
*G ₇₂	4	Hidrofóbica	S ₉₆	1	Hidrofóbica
*F ₇₄	2	Hidrofóbica	*E ₉₇	1	Hidrofóbica
*V ₁₀₁	1	Hidrofóbica	H ₁₀₀	1	Hidrofóbica
T ₁₇₂	1	Hidrofóbica	*V ₁₀₁	2	Hidrofóbica
G ₁₇₃	1	Hidrofóbica	L ₁₃₁	1	Hidrofóbica
*T ₇₀	3	Puente de hidrógeno	D ₁₃₂	2	Hidrofóbica
*N ₇₁	1	Puente de hidrógeno	D ₁₃₂	1	Puente de hidrógeno
			I ₁₇₀	1	Hidrofóbica
			G ₁₇₁	1	Hidrofóbica
			T ₁₇₂	2	Hidrofóbica
			G ₂₃₃	2	Hidrofóbica

* Residuos de aminoácidos que están presentes en la interfase de la HsTIM.

Por otro lado, es importante mencionar que los residuos de aminoácidos de la HsTIM N16D con los que tuvo interacción la T₃₂ (tabla 9), en específico V₆₉, T₇₀, N₇₁, G₇₂ y V₁₀₁, son residuos que perdieron interacciones en la interfase que sí se encontraban en la enzima WT (Enríquez-Flores *et al.*, 2020), y que favorecieron interacciones con la anquirina. Por lo tanto, este cambio en la estructura está facilitando la accesibilidad para que la T₃₂ interactúe con éstos. Por ejemplo, los puentes de hidrógeno que estableció la T₃₂ (4) con T₇₀ (3) y N₇₁ (1) en la mutante

N16D no están presentes en la WT, a pesar de que estos aminoácidos forman parte de la interfase en la WT.

El aminoácido G₃₄ también mostró un mayor número de interacciones en la N16D y la gran mayoría fueron interacciones hidrofóbicas establecidas con aminoácidos localizados fuera de la interfase. Resalta que los aminoácidos V₆₉, F₇₄ y V₁₀₁ de la HsTIM N16D con los que interaccionó G₃₄, también son parte de los aminoácidos que perdieron interacciones en la interfase en esta mutante.

Contrario a T₃₂ y G₃₄, la R₄₆ tuvo un mayor número de interacciones en la WT (tabla 5). En general éstas se dieron en otro sitio diferente a la interfase y en su mayoría fueron interacciones hidrofóbicas. El residuo R₄₆, en ninguno de los modelos analizados, estableció alguna interacción con residuos de aminoácidos de la interfase de N16D. Birtalan y colaboradores (2010) reportó que la arginina (R) tiene una capacidad limitada para mediar el reconocimiento molecular y fue el principal contribuyente a las interacciones no específicas.

Es importante señalar que la diferencia significativa de la interacción que presentaron estos aminoácidos no implica que los demás aminoácidos variables no tengan un efecto conjunto sobre la interacción de la 55a32 con la HsTIM. Esto se podría comprobar con estudios más específicos como la obtención de la estructura cristalográfica del complejo anquirina-HsTIM N16D.

Exploración de la interfase de la HsTIM y evaluación de anquirinas diseñadas mediante acoplamiento molecular.

La proteína blanco de este estudio fue la mutante N16D de HsTIM cuya estructura tridimensional se ha estudiado a profundidad en trabajos anteriores (de la Mora-de la Mora *et al.*, 2015; Enríquez-Flores *et al.*, 2020; Enríquez-Flores *et al.*, 2022). Este conocimiento previo nos condujo a centrar la atención en la interfase entre las subunidades de la HsTIM mutante,

debido a que la desamidación de la asparagina 16 provoca cambios estructurales importantes que afectan su funcionalidad. Por tanto, la búsqueda de anquirinas diseñadas que pudieran interactuar diferencialmente con la HsTIM N16D, se centró en las diferencias encontradas en la interfase y en el tamaño y naturaleza de las cavidades generadas debido a la mutación. Debido a que en el laboratorio se cuentan con anquirinas diseñadas de 1-3 módulos de repetición, se decidió como un primer acercamiento realizar ensayos de acoplamiento molecular (*docking*) para evaluar si el número de módulos de anquirina definía la posibilidad de interaccionar en la interfase de la HsTIM mutante sin reconocer a la enzima silvestre. Esta herramienta nos permitió acotar el número de proteínas estudiadas ya que nos indicó cuáles de ellas tenían más probabilidades de interaccionar en la interfase de la mutante N16D HsTIM.

Los métodos de acoplamiento molecular tienen, hoy en día, una participación importante en varios campos como el desarrollo de nuevos fármacos y del reconocimiento molecular (Paiva *et al.*, 2022). En la actualidad, el acoplamiento molecular se utiliza como herramienta para obtener información estructural, así como para guiar o minimizar la cantidad de experimentos adicionales (Jones *et al.*, 2022, Erickson *et al.* 2004).

Para los estudios de acoplamiento entre proteínas, se han publicado múltiples trabajos en los que destacan los que promueven servidores web. Esto permite que las simulaciones se ejecuten remotamente de manera sencilla y eficiente generando simulaciones robustas. Además, la calidad de estos servidores ha aumentado con el tiempo debido a iniciativas como CAPRI (Critical Assessment of Prediction of Interactions), la cual presenta una evaluación de las técnicas para la predicción de las estructuras de complejos proteína-proteína (Janin, 2005).

Algunos de los servidores actualmente disponibles para acoplamiento molecular proteína-proteína son: ClusPro, pepATTRACT, HDock y ZDOCK, y HADDOCK. Cada uno de los servidores tienen bondades y limitaciones. ClusPro es un servidor web que presenta

actualizaciones frecuentes y tiene validación CAPRI. Como limitantes, solo admite formato PDB y se ha reportado que su función de puntuación puede llegar a ser limitada en comparación con métodos de acoplamiento molecular más flexibles como SwarmDock y HADDOCK (Desta *et al.*, 2020). Una de las razones es que a menudo los modelos que están presentes en las predicciones top 5 o top 10 se pierden cuando sólo se toma a consideración un modelo principal. En este trabajo se tomó en cuenta este detalle y para la evaluación de interacciones se tomaron en cuenta los 10 mejores modelos.

Los servidores de acoplamiento molecular como ClusPro parten de una estructura proteica obtenida generalmente por métodos experimentales. Sin embargo, eso puede ser una limitante ya que no siempre se cuenta con la estructura 3D de las proteínas que se emplearán, como es el caso de las proteínas ARs diseñadas.

Para solucionar esta limitante existen servidores como I-Tasser, que ayudan a predecir mediante modelado molecular, las potenciales estructuras de proteínas. Los modelos obtenidos por medio de I-Tasser toman como base estructuras cristalográficas reportadas, en el caso de las anquirinas diseñadas ya se cuenta con diversas estructuras reportadas, lo cual permitió generar modelos por homología confiables.

Se clasificó I-TASSER (como 'Zhang-Server') como el servidor de predicción de estructuras de proteínas número uno en el 14° experimento CASP (evaluación crítica de la predicción de la estructura) y una versión actualizada de I-TASSER, D-I-TASSER (como 'UM-TBM' y 'Zheng'), fue clasificada como el servidor/predictor número 1 en las tres categorías de predicciones de estructura de proteínas en el 15° experimento CASP. Durante la realización de esta tesis se hizo público el algoritmo Alphafold2 (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022), el cual ha ido aumentando en popularidad y se deja como sugerencia utilizarlo en futuros análisis de modelado de proteínas.

En numerosos estudios, la selección de anquirinas diseñadas con potencial para interactuar con algún blanco proteico se ha llevado a cabo mediante técnicas de selección de alto rendimiento (*high throughput*), en los cuales se utilizan bibliotecas de anquirinas diseñadas para evaluar una posible interacción mediante ensayos de despliegue del ribosoma (Shilova y Deyev, 2019; Khurana *et al.*, 2021; Kunimoto *et al.*, 2020; Wild *et al.*, 2022). En el presente proyecto de maestría se decidió evaluar anquirinas con diferentes módulos de repetición para interactuar, no sólo con un blanco seleccionado, si no con una región específica de la proteína de estudio (la interfase), por lo que se pensó que evaluar la posible interacción mediante ensayos de acoplamiento molecular en dónde se pudiera analizar la región de unión de las anquirinas a la HsTIM desamidada, resultaba una opción factible.

Radom y colaboradores (2019) mencionan que los métodos de selección a gran escala son útiles para seleccionar anquirinas diseñadas que reconozcan blancos proteicos, pero que para saber la forma en la que interactúan dichas proteínas se debe obtener la estructura cristalográfica de los complejos y que en algunos casos puede llevar mucho tiempo, por lo que proponen ensayos de acoplamiento molecular partiendo de modelos de las proteínas participantes en la interacción (Radom *et al.*, 2019). Esta propuesta nos alentó a utilizar el acoplamiento molecular como la etapa inicial de selección de las anquirinas diseñadas para el reconocimiento selectivo de la mutante de HsTIM N16D. La accesibilidad a los métodos de acoplamiento y dinámica molecular ha permitido utilizar estas estrategias para robustecer el conocimiento de las interacciones proteína-proteína para direccionar el diseño de anquirinas diseñadas a sitios y blancos proteicos específicos (Interlandi *et al.*, 2008; Nimmanpipug *et al.*, 2011; Epa *et al.*, 2013., Gautam *et al.*, 2021)

En la mayoría de los casos, se recomienda complementar los hallazgos obtenidos del acoplamiento molecular con experimentos *in vitro* o *in vivo* para validar sus resultados. En este trabajo de investigación, el acoplamiento molecular se consideró como una herramienta inicial

que ayudó a detectar posibles interacciones, pero no necesariamente las causas de éstas, por lo que se desarrollaron experimentos para evaluar la interacción que se discuten a continuación.

Evaluación de interacciones mediante ensayos pull-down.

Los experimentos de interacción se realizaron por medio de ensayos *pull-down*, una herramienta alternativa para evaluar posibles interacciones entre proteínas ARs diseñadas y la HsTIM WT y N16D. Además de los ensayos *pull-down*, existe un repertorio de técnicas que se utilizan para analizar interacciones proteína-proteína como lo son: el despliegue ribosomal, el despliegue de fagos, el despliegue de levaduras, entre otras. Su implementación posee ventajas como la simplicidad del método, *i.e.* que se puede estandarizar en cualquier laboratorio. Estos ensayos se utilizan a menudo para el aislamiento de cantidades bajas (μg) de complejos con el fin de identificar sus componentes. Una ventaja de realizar un ensayo *pull-down* con proteínas purificadas es que cualquier interacción detectada por este método es directa, lo que significa que no requiere ayudantes y/o intermediarios (Louche *et al.*, 2017; Wysocka, 2006).

El ensayo también tiene algunas limitaciones que se relacionan principalmente con la afinidad de la interacción, ya que solo las interacciones de afinidad relativamente alta son detectadas debido a los diversos lavados necesarios para eliminar las uniones inespecíficas. Esto último puede verse como un arma de doble filo ya que, al realizarse múltiples lavados, se asegura que la interacción entre las proteínas participantes sea probablemente una interacción altamente específica, pero el rendimiento de las proteínas que se unen puede disminuir drásticamente. También se requiere que las proteínas que se van a evaluar, en este caso, las ARs y las proteínas blanco, se puedan aislar con niveles de pureza relativamente altos para descartar contaminantes al realizar los ensayos (Bell *et al.*, 2013).

En este proyecto se utilizaron como proteínas “anzuelo” las anquirinas con etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal, esto facilitó su unión a la resina acoplada con níquel para evaluar su interacción con las proteínas blanco. De esta forma, para eluir los complejos de interacción se utilizaron concentraciones de 200-250 mM de imidazol. En este sentido, se ha reportado que la elución con imidazol en altas concentraciones elimina iones metálicos de una variedad de proteínas, dejándolas inactivas y posiblemente alterando la naturaleza de sus interacciones proteína-proteína (Bell *et al.*, 2013). Sin embargo, en este ensayo ni las anquirinas ni la TIM requieren cofactores, por lo tanto, el imidazol no debería afectar una posible interacción entre ambas proteínas.

Como evaluación *a posteriori*, los ensayos *pull-down* llevados a cabo nos permitieron tener un método simple para identificar la interacción entre la proteína 55a32 y la N16D. Se tiene a consideración las limitaciones que los ensayos presentan, sin embargo, para fines de este trabajo los ensayos cumplieron con su finalidad, ya que a pesar de que se evaluó la interacción con la mutante N16D con 3 anquirinas diseñadas, sólo con la anquirina diseñada 55a32 la interacción detectada se lleva a cabo de manera diferencial con respecto a la HsTIM silvestre. Si bien, la cantidad detectada de HsTIM N16D en los geles desnaturizantes es muy poca, se puede sugerir que la interacción entre esta anquirina y la proteína mutante se lleva a cabo debido a que se hicieron lavados exhaustivos antes de eluir el complejo hasta que no se detectó proteína no unida en estas fracciones. Para fortalecer los resultados, se sugiere que, en trabajos posteriores, la reacción de interacción se lleve a cabo en tiempos más cortos y que los lavados sean exhaustivos pero rápidos para minimizar el cambio en el equilibrio entre el estado unido y no unido de las proteínas que establecen la interacción como lo sugiere Perry y colaboradores (2019). Además, se planea que en experimentos posteriores se utilicen diferentes formas de interrumpir la interacción eluyendo por medio de un cambio de pH, o bien cambiando la fuerza iónica, para graduar la severidad del amortiguador con el cual se eluye que nos permita tener

más información acerca de la naturaleza de la interacción entre la anquirina diseñada 55 a32 y la HsTIM desamidada.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se identificó a la proteína diseñada 55a32 como una candidata para el reconocimiento diferencial entre la HsTIM WT y la N16D. Este comportamiento puede deberse a que cuenta con un módulo de repetición de anquirina y a la composición de aminoácidos en sus posiciones variables. Se destacaron dos residuos de aminoácidos T₃₂ y T₃₄, que pueden estar jugando un papel importante en este reconocimiento diferencial. Por un lado, se encontró que la T₃₂ establece una mayor cantidad de puentes de hidrógeno con la N16D, a diferencia de la WT, y por otro, la G₃₄ interaccionó de forma diferencial con la N16D por medio de interacciones hidrofóbicas. Los ensayos de interacción concuerdan con los resultados del acoplamiento molecular, pero para una validación más completa, se podría realizar un ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo específico para la HsTIM.

Finalmente, de forma más detallada, se podría obtener la estructura cristalográfica de la interacción establecida y así poder estudiar los aminoácidos involucrados en dicha interacción. Además de ampliar el estudio de la interacción entre la 55a32 y la HsTIM, como se mencionó anteriormente, también se podría rediseñar una nueva ARs que en conjunto presente un mejor perfil relacionado con todas las características descubiertas en este trabajo, mejorando su afinidad hacia la N16D y conservando su no interacción con la HsTIM WT. Esto podría tener implicaciones positivas en estudios futuros *in vivo* con la HsTIM desamidada.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A., y Strickler, J. E. (2013). To fuse or not to fuse: What is your purpose?. *Protein Science* 22 (11), 1466–1477. <https://doi.org/10.1002/pro.2356>
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grütter, M. G., y Plückthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nature Biotechnology*, 22(5), 575–582. <https://doi.org/10.1038/nbt962>
- Binz, H. K., Amstutz, P., y Plückthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nature Biotechnology*, 23(10), 1257–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt1127>
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P., y Plückthun, A. (2003). Designing Repeat Proteins: Well-expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 332(2), 489–503. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00896-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00896-9)
- Birtalan S., Fisher, R. D. y Sidhu, S. S. (2010). The functional capacity of the natural amino acids for molecular recognition. *Molecular BioSystems*, 6(7), 1186 – 1194. <https://doi.org/10.1039/B927393J>
- Boersma, Y.L. (2018). Advances in the Application of Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs) as Research Tools and Protein Therapeutics. En Udit, A. (eds) Protein Scaffolds. *Methods in Molecular Biology* (vol. 1798). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7893-9_23
- Boersma, Y. L., y Plückthun, A. (2011). DARPs and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Current Opinion in biotechnology* 22(6), 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.004>
- Bork, P. (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: Mobile modules that cross phyla horizontally?. *Proteins*, 17(4), 363–374. <https://doi.org/10.1002/prot.340170405>
- Bornstein, P., y Balian, G. (1970). The specific nonenzymatic cleavage of bovine ribonuclease with hydroxylamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(18), 4854–4856. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62873-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62873-X)
- Boudier-Lemosquet, A., Mahler, A., Bobo, C., Dufossée, M., y Priault, M. (2022). Introducing protein deamidation: Landmark discoveries, societal outreach, and tentative priming workflow to address deamidation. *Methods*, 200, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.11.012>
- Capasso, S., y Salvadori, S. (1999). Effect of the three-dimensional structure on the deamidation reaction of ribonuclease A. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, 54(5), 377–382. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.1999.00111.x>
- Clackson, T., y Lowman, H. B. (2004). *Phage Display: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., y Camacho, C. J. (2004a). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20(1), 45–50. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371>
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., y Camacho, C. J. (2004b). ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), W96–W99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh354>
- Cournoyer, J. J., Lin, C., y O'Connor, P. B. (2006). Detecting deamidation products in proteins by electron capture dissociation. *Analytical Chemistry*, 78(4), 1264–1271. <https://doi.org/10.1021/ac051691q>
- Davis A. M. y Teague S. J. (1999) Hydrogen bonding, Hydrophobic Interactions, and Failure of the Rigid Receptor hypothesis. *Angewandte Chemi (International ed. In English)*, 38 (6): 736–749. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990315\)38:6<736::AID-ANIE736>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990315)38:6<736::AID-ANIE736>3.0.CO;2-R)
- Decker, R. S., y Mohrenweiser, H. W. (1985). Cell proliferation-associated expression of a recently evolved isozyme of triosephosphate isomerase. *Biochemical genetics*, 23(3-4), 267–280. <https://doi.org/10.1007/BF00504324>
- de la Mora-de la Mora, I., Torres-Larios, A., Enríquez-Flores, S., Méndez, S.-T., Castillo-Villanueva, A., Gómez-Manzo, S., López-Velázquez, G., Marcial-Quino, J., Torres-Arroyo, A., García-Torres,

- I., Reyes-Vivas, H., y Oria-Hernández, J. (2015). Structural effects of protein aging: terminal marking by deamidation in human triosephosphate isomerase. *PloS One*, 10(4), e0123379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123379>
- De Meyer, T., Muyldermans, S., y Depicker, A. (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 32(5), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.001>
- Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D., y Vajda, S. (2020). Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*, 28(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>
- Dreier, B., y Plückthun, A. (2011). Ribosome display: a technology for selecting and evolving proteins from large libraries. *Methods in Molecular biology*, 687, 283–306. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4_21
- Enríquez-Flores, S., De la Mora-De la Mora, J. I., Flores-López, L. A., Cabrera, N., Fernández-Lainez, C., Hernández-Alcántara, G., Guerrero-Beltrán, C. E., López-Velázquez, G., y García-Torres, I. (2022). Improved yield, stability, and cleavage reaction of a novel tobacco etch virus protease mutant. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(4), 1475–1492. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11786-5>
- Enríquez-Flores, S., Flores-López, L. A., De la Mora-De la Mora, I., García-Torres, I., Gracia-Mora, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Fernández-Lainez, C., Martínez-Pérez, Y., Olaya-Vargas, A., de Vos, P., y López-Velázquez, G. (2022). Naturally occurring deamidated triosephosphate isomerase is a promising target for cell-selective therapy in cancer. *Scientific reports*, 12(1), 4028. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08051-0>
- Enríquez-Flores, S., Flores-López, L. A., García-Torres, I., de la Mora-de la Mora, I., Cabrera, N., Gutiérrez-Castrellón, P., Martínez-Pérez, Y., y López-Velázquez, G. (2020). Deamidated Human Triosephosphate Isomerase is a Promising Druggable Target. *Biomolecules*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/biom10071050>
- Enríquez-Flores, S., Flores- López, L. A., Mora-De la Mora, I. D. la, García-Torres, I., Gracia-Mora, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Fernández-Lainez, C., Martínez-Pérez, Y., Olaya-Vargas, A., de Vos, P., y López-Velázquez, G. (2021). *Deamidated TPI is an efficacious target for cell-selective therapy in triple-negative breast cancer*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.11.09.467888>
- Enríquez-Flores, S., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Alcántara, G., Oria-Hernández, J., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Hernández, G., de la Mora-de la Mora, I., Castillo-Villanueva, A., García-Torres, I., Méndez, S. T., Gómez-Manzo, S., Torres-Arroyo, A., López-Velázquez, G., y Reyes-Vivas, H. (2011). Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins*, 79(9), 2711–2724. <https://doi.org/10.1002/prot.23100>
- Erickson J. A., Jalaie M., Robertson D. H., Lewis R. A., & Vieth M. (2004). Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(1), 45–55. <https://doi.org/10.1021/jm030209y>
- Epa, V. C., Dolezal, O., Doughty, L., Xiao, X., Jost, C., Plückthun, A., y Adams, T. E. (2013). Structural model for the interaction of a designed Ankyrin Repeat Protein with the human epidermal growth factor receptor 2. *PloS one*, 8(3), e59163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059163>
- Gautam, V., Nimmanpipug, P., Zain, S. M., Rahman, N. A., & Lee, V. S. (2021). Molecular Dynamics Simulations in Designing DARPins as Phosphorylation-Specific Protein Binders of ERK2. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15), 4540. <https://doi.org/10.3390/molecules26154540>
- Helma, J., Cardoso, M. C., Muyldermans, S., y Leonhardt, H. (2015). Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *The Journal of Cell Biology*, 209(5), 633–644. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409074>
- Hussain, R. M., Weng, C. Y., Wykoff, C. C., Gandhi, R. A., y Hariprasad, S. M. (2020). Abicipar pegol for neovascular age-related macular degeneration. *Expert opinion on biological therapy*, 20(9), 999–1008. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1782379>
- Hust, M., y Lim, T. S. (2017). *Phage Display: Methods and Protocols*. New York: Humana Press.
- Interlandi, G., Wetzel, S. K., Settanni, G., Plückthun, A., y Caflisch, A. (2008). Characterization and further stabilization of designed ankyrin repeat proteins by combining molecular dynamics simulations and experiments. *Journal of molecular biology*, 375(3), 837–854.

- <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.042>
- Janin, J. (2005). Assessing predictions of protein-protein interaction: the CAPRI experiment. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 14(2), 278–283. <https://doi.org/10.1110/ps.041081905>
- Jones, G., Jindal, A., Ghani, U., Kotelnikov, S., Egbert, M., Hashemi, N., Vajda, S., Padhorny, D., y Kozakov, D. (2022). Elucidation of protein function using computational docking and hotspot analysis by ClusPro and FTMap. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, 78(Pt 6), 690–697. <https://doi.org/10.1107/S2059798322002741>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kato, K., Nakayoshi, T., Kurimoto, E., y Oda, A. (2020). Mechanisms of Deamidation of Asparagine Residues and Effects of Main-Chain Conformation on Activation Energy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197035>
- Khurana, R. N., Kunimoto, D., Yoon, Y. H., Wykoff, C. C., Chang, A., Maturi, R. K., Agostini, H., Souied, E., Chow, D. R., Lotery, A. J., Ohji, M., Bandello, F., Belfort, R., Jr, Li, X.-Y., Jiao, J., Le, G., Kim, K., Schmidt, W., Hashad, Y., y CEDAR and SEQUOIA Study Groups. (2021). Two-Year Results of the Phase 3 Randomized Controlled Study of Abicipar in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 128(7), 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.11.017>
- Kobe, B., y Kajava, A. V. (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 509–515. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01667-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01667-4)
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., y Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking?. *Proteins*, 81(12), 2159–2166. <https://doi.org/10.1002/prot.24403>
- Kummer, L., Hsu, C.-W., Dagliyan, O., MacNevin, C., Kaufholz, M., Zimmermann, B., Dokholyan, N. V., Hahn, K. M., y Plückthun, A. (2013). Knowledge-based design of a biosensor to quantify localized ERK activation in living cells. *Chemistry y Biology*, 20(6), 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.016>
- Kummer, L., Parizek, P., Rube, P., Millgramm, B., Prinz, A., Mittl, P. R. E., Kaufholz, M., Zimmermann, B., Herberg, F. W., y Plückthun, A. (2012). Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), E2248–E2257. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205399109>
- Kunimoto, D., Yoon, Y. H., Wykoff, C. C., Chang, A., Khurana, R. N., Maturi, R. K., Agostini, H., Souied, E., Chow, D. R., Lotery, A. J., Ohji, M., Bandello, F., Belfort, R., Jr, Li, X.-Y., Jiao, J., Le, G., Schmidt, W., Hashad, Y., y CEDAR and SEQUOIA Study Groups. (2020). Efficacy and Safety of Abicipar in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: 52-Week Results of Phase 3 Randomized Controlled Study. *Ophthalmology*, 127(10), 1331–1344. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.03.035>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Leader, B., Baca, Q. J., y Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(1), 21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>
- Lopez-Ortiz, C., Peña-García, Y., Natarajan, P., Bhandari, M., Abburi, V., Dutta, S. K., Yadav, L., Stommel, J., Nimmakayala, P., y Reddy, U. K. (2020). The ankyrin repeat gene family in Capsicum spp: Genome-wide survey, characterization and gene expression profile. *Scientific Reports*, 10(1), 4044. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61057-4>
- López-Velázquez, G., Molina-Ortiz, D., Cabrera, N., Hernández-Alcántara, G., Peon-Peralta, J., Yépez-Mulia, L., Pérez-Montfort, R., y Reyes-Vivas, H. (2004). An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins*, 55(4), 824–834. <https://doi.org/10.1002/prot.20097>

- Louche, A., Salcedo, S. P., y Bigot, S. (2017). Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods in Molecular Biology*, 1615, 247–255. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_20
- Lu, H. S., Yuan, P. M., y Gracy, R. W. (1984). Primary structure of human triosephosphate isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(19), 11958–11968. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)71304-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)71304-9)
- Mahdavi, S. Z. B., Oroojalian, F., Eyvazi, S., Hejazi, M., Baradaran, B., Pouladi, N., Tohidkia, M. R., Mokhtarzadeh, A., y Muyldermans, S. (2022). An overview on display systems (phage, bacterial, and yeast display) for production of anticancer antibodies; advantages and disadvantages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 421–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.113>
- Manning, M. C., Liu, J., Li, T., y Holcomb, R. E. (2018). Rational Design of Liquid Formulations of Proteins. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 112, 1–59. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.01.005>
- McKerrow, J. H., y Robinson, A. B. (1971). Deamidation of asparaginy residues as a hazard in experimental protein and peptide procedures. *Analytical biochemistry*, 42(2), 565–568. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90074-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90074-1)
- Mittl, P. R., Ernst, P., y Plückthun, A. (2020). Chaperone-assisted structure elucidation with DARPins. *Current opinion in structural biology*, 60, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.12.009>
- Moisseiev, E., y Loewenstein, A. (2020). Abicipar pegol-a novel anti-VEGF therapy with a long duration of action. *Eye*, 34(4), 605–606. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0584-y>
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., y Peng, Z.-Y. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 13(6), 1435–1448. <https://doi.org/10.1110/ps.03554604>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry*, 82, 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Nimmanpipug, P., Khampa, C., Lee, V. S., Nangola, S., y Tayapiwatana, C. (2011). Identification of amino acid residues of a designed ankyrin repeat protein potentially involved in intermolecular interactions with CD4: analysis by molecular dynamics simulations. *Journal of molecular graphics & modelling*, 31, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.09.003>
- Olivares-Illana, V., Riveros-Rosas, H., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., y Gómez-Puyou, A. (2017). A guide to the effects of a large portion of the residues of triosephosphate isomerase on catalysis, stability, druggability, and human disease. *Proteins*, 85(7), 1190–1211. <https://doi.org/10.1002/prot.25299>
- Orosz, F., Oláh, J., y Ovádi, J. (2006). Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life*, 58(12), 703–715. <https://doi.org/10.1080/15216540601115960>
- Paiva, V. de A., Gomes, I. de S., Monteiro, C. R., Mendonça, M. V., Martins, P. M., Santana, C. A., Gonçalves-Almeida, V., Izidoro, S. C., Melo-Minardi, R. C. de, y Silveira, S. de A. (2022). Protein structural bioinformatics: An overview. *Computers in biology and medicine*, 147, 105695. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.105695>
- Patil R., Das S., Stanley A., Yadav L., Sudhakar A., Varma A. K. (2010). Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. *PLoS one* 5(8): e12029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>
- Perry, N. A., Zhan, X., Gurevich, E. V., Iverson, T. M., y Gurevich, V. V. (2019). Using In Vitro Pull-Down and In-Cell Overexpression Assays to Study Protein Interactions with Arrestin. *Methods in molecular biology*, 1957, 107–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9158-7_7
- Plückthun, A. (2015). Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 55, 489–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654>
- Radom, F., Paci, E., y Plückthun, A. (2019). Computational Modeling of Designed Ankyrin Repeat Protein Complexes with Their Targets. *Journal of molecular biology*, 431(15), 2852–2868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.005>
- Robinson, A.B., McKerrow, J.H., Cary, P. (1970). Controlled deamidation of peptides and proteins: an experimental hazard and a possible biological timer. *Proceeding of National Academy of Sciences* 66 (3) 753–757. <https://doi.org/10.1073/pnas.66.3.753>

- Robinson, A. B., y Rudd, C. J. (1974). Deamidation of glutaminy and asparaginy residues in peptides and proteins. *Current topics in cellular regulation*, 8(0), 247–295. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-152808-9.50013-4>
- Robinson, A. B., Scotchler, J. W., y McKerrow, J. H. (1973). Rates of nonenzymic deamidation of glutaminy and asparaginy residues in pentapeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 95(24), 8156–8159. <https://doi.org/10.1021/ja00805a032>
- Robinson, A. B. (1979). Molecular clocks, molecular profiles, and optimum diets: Three approaches to the problem of aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 9 (3-4), 225-236. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(79\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0047-6374(79)90101-5)
- Robinson, N. E. (2002). Protein deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5283–5288. <https://doi.org/10.1073/pnas.082102799>
- Robinson, N. E., y Robinson, A. B. (2001). Deamidation of human proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12409–12413. <https://doi.org/10.1073/pnas.221463198>
- Robinson, N. E., Robinson, Z. W., Robinson, B. R., Robinson, A. L., Robinson, J. A., Robinson, M. L., y Robinson, A. B. (2004). Structure-dependent nonenzymatic deamidation of glutaminy and asparaginy pentapeptides. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society*, 63(5), 426–436. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00151.x>
- Robinson, N.E. and Robinson, A.B. (2008), Use of Merrifield solid phase peptide synthesis in investigations of biological deamidation of peptides and proteins. *Biopolymers*, 90: 297-306. <https://doi.org/10.1002/bip.20852>
- Rodrigues, G. A., Mason, M., Christie, L.-A., Hansen, C., Hernandez, L. M., Burke, J., Luhrs, K. A., y Hohman, T. C. (2018). Functional Characterization of Abicipar-Pegol, an Anti-VEGF DARPIn Therapeutic That Potently Inhibits Angiogenesis and Vascular Permeability. *Investigative ophthalmology y visual Science*, 59(15), 5836–5846. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25307>
- Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., de Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A., y Torres-Larios, A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *The Journal of biological chemistry*, 283(34), 23254–23263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802145200>
- Rothenberger, S., Hurdiss, D. L., Walser, M., Malvezzi, F., Mayor, J., Ryter, S., Moreno, H., Liechti, N., Bosshart, A., Iss, C., Calabro, V., Cornelius, A., Hospodarsch, T., Neculcea, A., Looser, T., Schlegel, A., Fontaine, S., Villemagne, D., Paladino, M., ... Trimpert, J. (2022). The trispesific DARPIn ensovibep inhibits diverse SARS-CoV-2 variants. *Nature biotechnology*, 40(12), 1845–1854. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01382-3>
- Roy, A., Kucukural, A., y Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- The PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.8 Schrödinger, LLC.
- Seeger, M. A., Zbinden, R., Flütsch, A., Gutte, P. G. M., Engeler, S., Roschitzki-Voser, H. and Grütter, M. G. (2013), Design, construction, and characterization of a second-generation DARPIn library with reduced hydrophobicity. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 22(9), 1239-1257. <https://doi.org/10.1002/pro.2312>
- Sennhauser, G., y Grütter, M. G. (2008). Chaperone-assisted crystallography with DARPins. *Structure*, 16(10), 1443–1453. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.08.010>
- Shilova, O. N., y Deyev, S. M. (2019). DARPins: Promising Scaffolds for Theranostics. *Acta Naturae*, 11(4), 42–53. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-42-53>
- Shipunova, V. O., Shramova, E. I., Schulga, A. A., Shilova M. V., Deyev S. M. y Proshkina G. M. (2020) Delivery of Barnase to Cells in Liposomes Functionalized by Her2-Specific DARPIn Module. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 46, 1156–1161. <https://doi.org/10.1134/S1068162020060308>
- Simon, M., Zangemeister-Wittke, U., y Plückthun, A. (2012). Facile double-functionalization of designed ankyrin repeat proteins using click and thiol chemistries. *Bioconjugate chemistry*, 23(2), 279–286. <https://doi.org/10.1021/bc200591x>
- Skerra, A. (2007). Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Current opinion in*

- biotechnology*, 18(4), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.010>
- Škrlec, K., Štrukelj, B., y Berlec, A. (2015). Non-immunoglobulin scaffolds: a focus on their targets. *Trends in biotechnology*, 33(7), 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.012>
- Smith, G. P., y Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chemical reviews*, 97(2), 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., y Klenk, D. C. (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Steiner, D., Forrer, P., y Plückthun, A. (2008). Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *Journal of Molecular Biology*, 382(5), 1211–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085>
- Steiner, D., Forrer, P., Stumpp, M. T., y Plückthun, A. (2006). Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nature biotechnology*, 24(7), 823–831. <https://doi.org/10.1038/nbt1218>
- Stephens, E. A., Ludwicki, M. B., Meksiriporn, B., Li, M., Ye, T., Monticello, C., Forsythe, K. J., Kummer, L., Zhou, P., Plückthun, A., y DeLisa, M. P. (2021). Engineering Single Pan-Specific Ubiquibodies for Targeted Degradation of All Forms of Endogenous ERK Protein Kinase. *American Chemical Society Synthetic Biology*, 10(9), 2396–2408. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00357>
- Stumpp, M. T., Binz, H. K., y Amstutz, P. (2008). DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug discovery today*, 13(15-16), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.04.013>
- Sun, A. Q., Yüksel, K. U., y Gracy, R. W. (1995). Terminal marking of triosephosphate isomerase: consequences of deamidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 322(2), 361–368. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1142>
- Tiede, C., Tang, A. A. S., Deacon, S. E., Mandal, U., Nettleship, J. E., Owen, R. L., George, S. E., Harrison, D. J., Owens, R. J., Tomlinson, D. C., y McPherson, M. J. (2014). Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications. *Protein engineering, design y selection: PEDS*, 27(5), 145–155. <https://doi.org/10.1093/protein/gzu007>
- Tyler-Cross, R., y Schirch, V. (1991). Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. *The Journal of biological chemistry*, 266(33), 22549–22556. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54607-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54607-X)
- Vajda, S., Yueh, C., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., y Kozakov, D. (2017). New additions to the C l u s P r o server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/prot.25219>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R., y Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *Journal of molecular biology*, 306(4), 745–757. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4433>
- Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., Knura, T., Stubbe, K., Tjaden, B., y Hensel, R. (2004). Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *Journal of molecular biology*, 342(3), 861–875. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.067>
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., y Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering*, 8(2), 127–134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
- Walser, M., Mayor, J., y Rothenberger, S. (2022). Designed Ankyrin Repeat Proteins: A New Class of Viral Entry Inhibitors. *Viruses*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/v14102242>
- Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G., y Venkatesan, R. (2010). Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(23), 3961–3982.

- <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0473-9>
- Wild, P., Eapen, R., Forrer, P., y Jost, C. (2022). *The DARPIn encyclopedia: From basic research towards therapeutics*. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202206.0147.v3>
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., y Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology*, 112, 531–552. <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>
- Willats, W. G. T. (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant molecular biology*, 50(6), 837–854. <https://doi.org/10.1023/a:1021215516430>
- Wysocka, J. (2006). Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. *Methods*, 40(4), 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.028>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., y Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yuan, P. M., Talent, J. M., y Gracy, R. W. (1981). Molecular basis for the accumulation of acidic isozymes of triosephosphate isomerase on aging. *Mechanisms of ageing and development*, 17(2), 151–162. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(81\)90081-6](https://doi.org/10.1016/0047-6374(81)90081-6)
- Yüksel, K. U., y Gracy, R. W. (1986). In vitro deamidation of human triosephosphate isomerase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 248(2), 452–459. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90498-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90498-4)
- Zhang, Y. (2007). Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins*, 69 (S8), 108–117. <https://doi.org/10.1002/prot.21702>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

11. ANEXOS

Anexo A. Generación de proteínas con una repetición de anquirina diseñadas.

La generación de proteínas con un módulo de anquirina se realizó previamente en el laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría. Para generar proteínas con un módulo de anquirina, se utilizó un plásmido denominado pET3aΔ/cubiertas amino-carboxilo, el cual contiene las secuencias que codifican para las cubiertas amino-carboxilo terminales flanqueadas por los sitios para las enzimas de restricción (*NdeI* y *BamHI*) respectivamente. Además, entre la secuencia que codifica para los extremos amino y carboxilo terminal de las anquirinas diseñadas, se encuentran las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *BpiI* y *BsaI*, esto con el fin de insertar posteriormente la secuencia que codifica para el módulo variable. Así mismo, este plásmido se denominó pET3aΔ debido a que todos los sitios de restricción para las enzimas *BpiI* y *BsaI* fueron mutados (comercialmente por la empresa Genscript, Piscataway, NJ, EE. UU.) con la finalidad de que exista un solo sitio para ambas enzimas y que corresponda al sitio de inserción de la secuencia que codifica para el módulo variable (Fig. A-1).

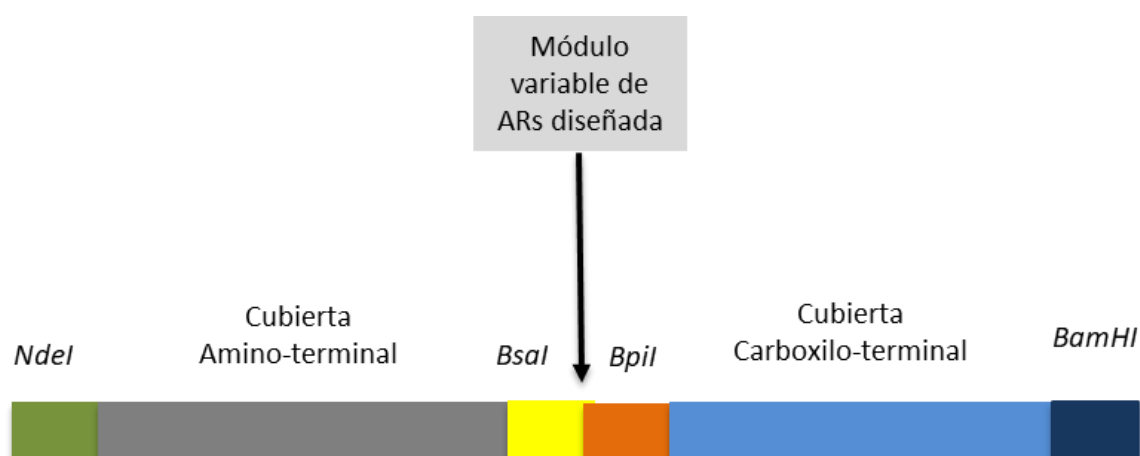


Figura A-1. Esquema representativo del plásmido pET3aΔ/cubiertas amino-carboxilo. Este plásmido contiene las secuencias que codifican para las cubiertas amino y carboxilo terminales. Se muestran algunos de sus sitios de restricción. La flecha negra, ejemplifica la posterior inserción de la secuencia codificante para el módulo variable de la ARs diseñada.

Por otra parte, la secuencia que codifica para el módulo variable se obtuvo por medio del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ensamble utilizando tres oligonucleótidos degenerados que se muestran en la tabla 2. Los oligonucleótidos Int 1 e Int 3 poseen en sus extremos los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *BpiI* y *BsaI*, respectivamente (Tabla A-1). Estas reacciones de PCR se hicieron a diferentes temperaturas de alineamiento (Tabla A-2) para favorecer que se incorporaran distintas bases en las posiciones variables gracias a los oligonucleótidos degenerados.

Tabla A-1. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR de ensamble para la obtención del módulo variable. Las posiciones en color rojo representan las posiciones variables, en donde el triplete de nucleótidos puede codificar para cualquier aminoácido excepto Glicina, Prolina y Cisteína. En el oligonucleótido Int 3 se representa en color azul la posición variable, en la cual el triplete de nucleótidos puede codificar únicamente los siguientes aminoácidos: Asparagina, Histidina y Tirosina. Para las posiciones degeneradas se usó el siguiente código: N= A+G+C+T, W= A+T, B= G+T+C, R=A+G, S=G+C, y D=G+A+T.

Oligonucleótido	Secuencia
Int 1	5' T CAT ATG CTA GGA AGA CCT GAC GTT AAC GCT NWB GAC NWB NWB GGT NWB ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT 3'
Int 1 a	5' T CAT ATG CTA GGA AGA CCT GAC GTT AAC GCT RSR GAC RSR RSR GGT RSR ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT 3'
Int 1 b	5' T CAT ATG CTA GGA AGA CCT GAC GTT AAC GCT TSG GAC TSG TSG GGT TSG ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT 3'
Int 2	5' ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT NWB NWB GGT CAC CTG GAA ATC GTT GAA 3'
Int 2 a	5' ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT RSR RSR GGT CAC CTG GAA ATC GTT GAA 3'
Int 2 b	5' ACT CCG CTG CAC CTG GCT GCT TSG TSG GGT CAC CTG GAA ATC GTT GAA 3'
Int 3	5' GGT CAC CTG GAA ATC GTT GAA GTT CTG CTG AAG DAC GGA GCT GAC GTG AGA CCT TAG GGA TCC CCC AAA 3'

Tabla A-2. Temperaturas y combinaciones de oligonucleótidos utilizados para la obtención del módulo variable.

Temperatura de alineamiento (°C)	Oligonucleótidos (Int)
45 °C	1a, 2a, 3
55 °C	1,2,3
55 °C	1a, 2a, 3
55 °C	1b, 2b, 3
56 °C	1,2, 3
57 °C	1, 2, 3
57 °C	1a, 2a, 3
57 °C	1b, 2b, 3
58 °C	1,2, 3

Una vez obtenidos los amplicones a distintas temperaturas de alineamiento, estos fueron purificados y digeridos con las enzimas de restricción BsaI y BpiI, con la finalidad de insertarlos en el plásmido de expresión pET3aΔ/cubiertas amino-carboxilo mediante una reacción de ligación utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (*Thermo Scientific*). Posterior a la ligación se realizó la transformación en células competentes *E. coli* (Top 10), se extrajo ADN plasmídico y mediante PCR utilizando los oligonucleótidos universales T7 Promotor y T7 Terminador se corroboró la presencia del inserto en las clonas transformantes.

Con el fin de purificar las anquirinas diseñadas mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), el ADN codificante para cada una de estas proteínas se subclonó en el plásmido de expresión pET3aHisTEVp (Fig. A-2) (Enríquez-Flores *et al.*, 2011) el cual contiene una etiqueta de 6 residuos de histidina que se localiza en el extremo amino terminal de la proteína de interés. Así mismo, este plásmido posee una secuencia de reconocimiento para la proteasa del virus del tabaco (TEVp). Para realizar la subclonación se digirió el

plásmido pET3a Δ /cubiertas amino-carboxilo/anquirina diseñada con las enzimas de restricción NdeI y BamHI; de esta forma se liberó el gen que codifica para la proteína de interés y se clonó en el plásmido pET3aHisTEVp (digerido previamente con las mismas enzimas de restricción), la reacción de ligación se realizó utilizando la enzima ADN ligasa T4.

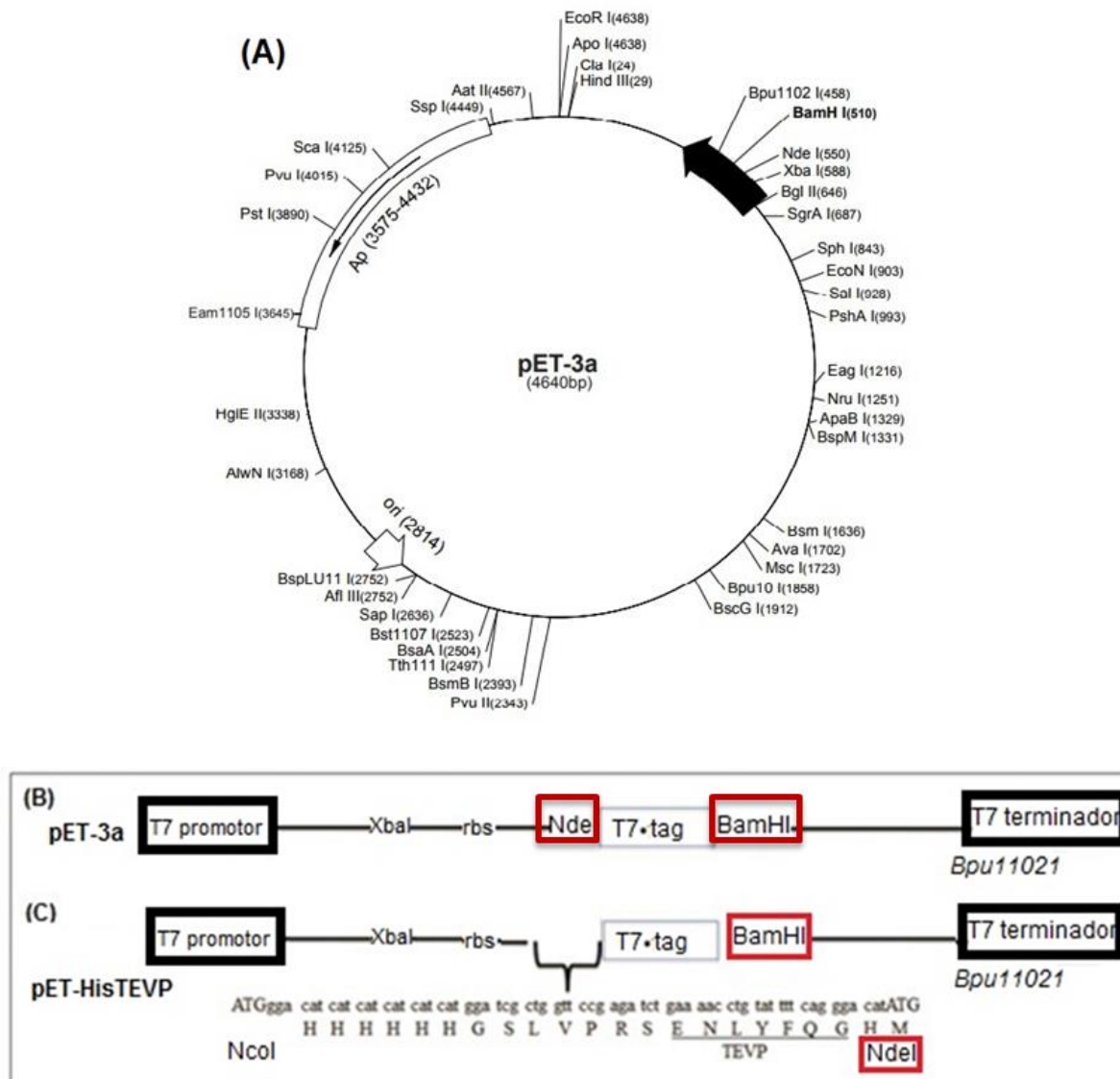


Figura A-2. Esquema representativo de los vectores pET3a y pET3aHisTEVp. A) Esquema del plásmido pET3a, Novagen. B) Esquema del plásmido pET3a, en donde se muestran algunos de sus sitios de restricción. C) Esquema del plásmido pET3aHisTEVp, se observa la inserción de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas y el sitio de reconocimiento de la TEVp. En recuadros rojos se señalan las enzimas de restricción que se utilizaron para la subclonación del gen de la anquirina 5834. Fuente: tomado y modificado de (Enríquez-Flores *et al.*, 2011).

Anexo B. Generación de proteínas con dos y tres repeticiones de anquirina diseñadas.

Las proteínas con dos y tres repeticiones de anquirina fue un trabajo realizado por Basurto, (2018), en donde se diseñó una secuencia consenso a partir de anquirinas sintéticas depositadas en la base de datos del Protein Data Bank (PDB). Para el diseño tomaron en cuenta aquellas proteínas que presentaran en su estructura las cubiertas amino y carboxilos terminales y cuyos motivos repetitivos presentaran la secuencia más común entre las anquirinas; se identificaron los aminoácidos con mayor frecuencia en las siete posiciones variables, estos aminoácidos se incorporaron en las secuencias codificantes para dos proteínas con dos y tres módulos de anquirina. Posteriormente, se sintetizó un gen en el que se incluyeron ambas secuencias, flanqueadas con sitios de restricción con la finalidad de obtener de manera independiente cada secuencia. Finalmente, estas secuencias se clonaron de manera independiente en el plásmido de expresión pET-3a HisTEVp.

Anexo C. Los 10 modelos obtenidos de cada acoplamiento molecular entre las ARs diseñadas con la HsTIM WT y la N16D.

A continuación, se presentan los 10 modelos del acoplamiento molecular para cada una de las ARs diseñadas y la HsTIM WT y N16D, además para cada acoplamiento se muestra una tabla en donde se observan cada uno de los agrupamientos (*clusters*) y los miembros de estos. En color cian y rosa se muestra la HsTIM (WT y N16D) y en color rojo y verde las ARs diseñadas.

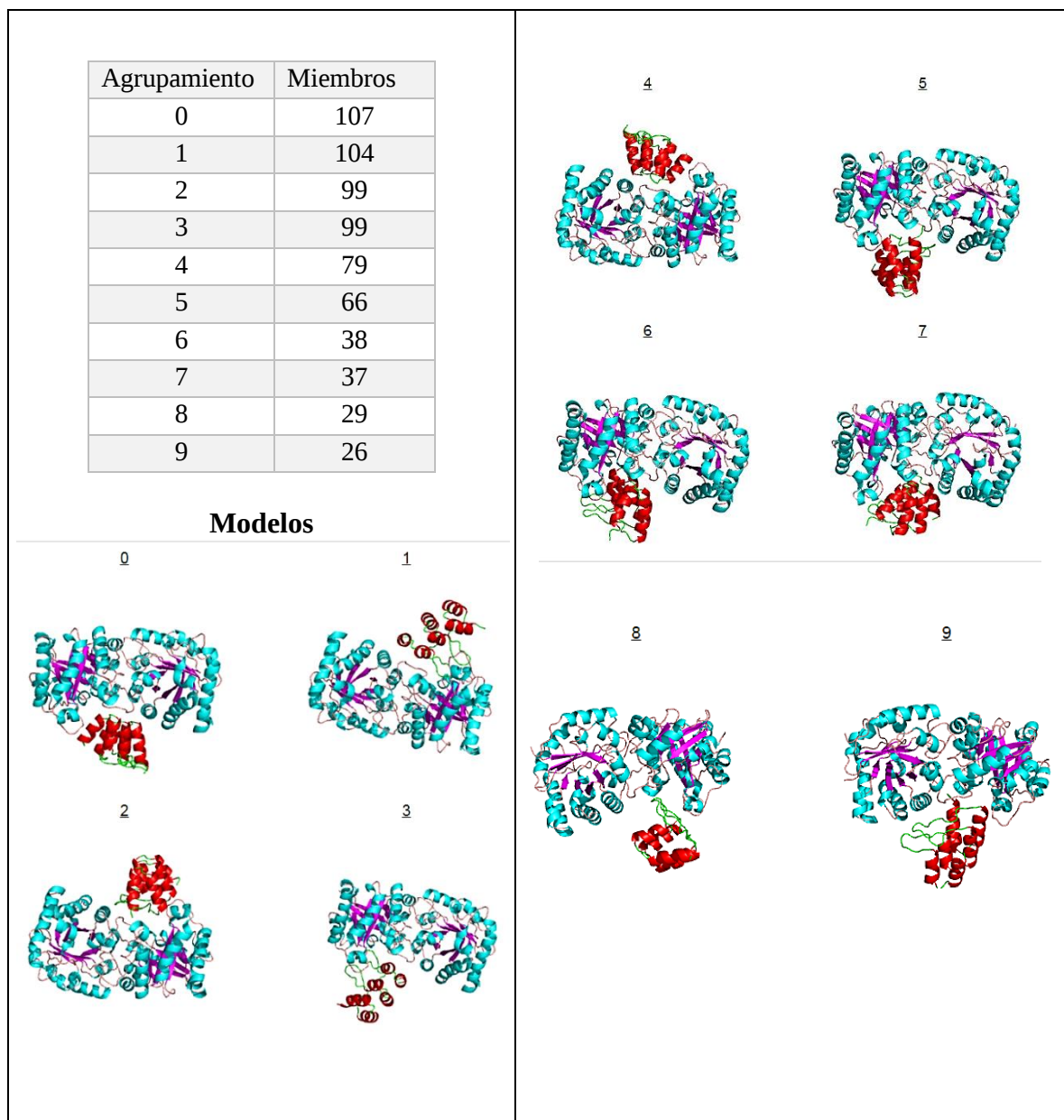


Figura C-1. Modelos del acoplamiento molecular entre 55-6 y HsTIM WT.

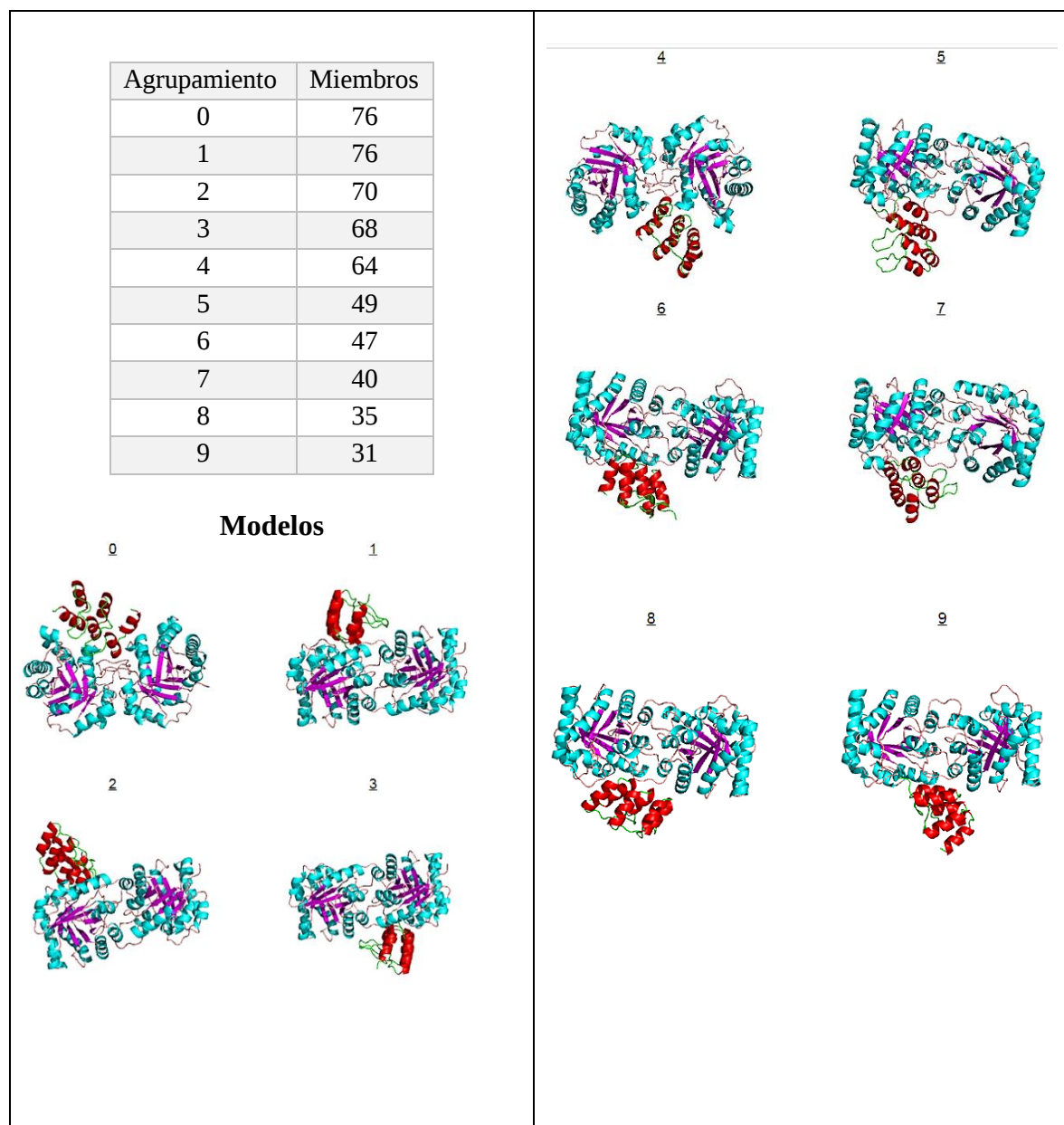


Figura C-2. Modelos del acoplamiento molecular entre 55-6 y HsTIM N16D.

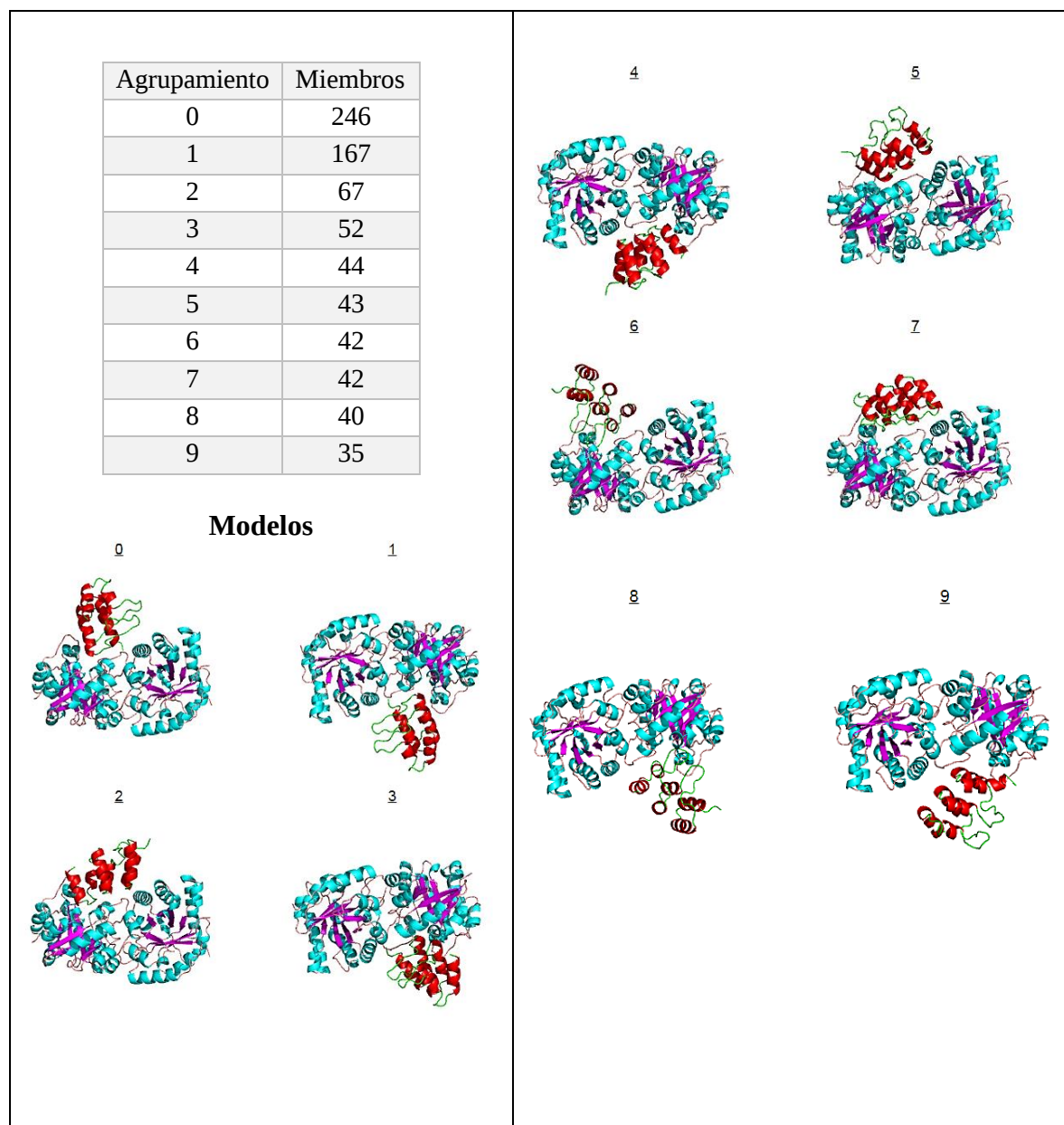


Figura C-3. Modelos del acoplamiento molecular entre 5834 y HsTIM WT.

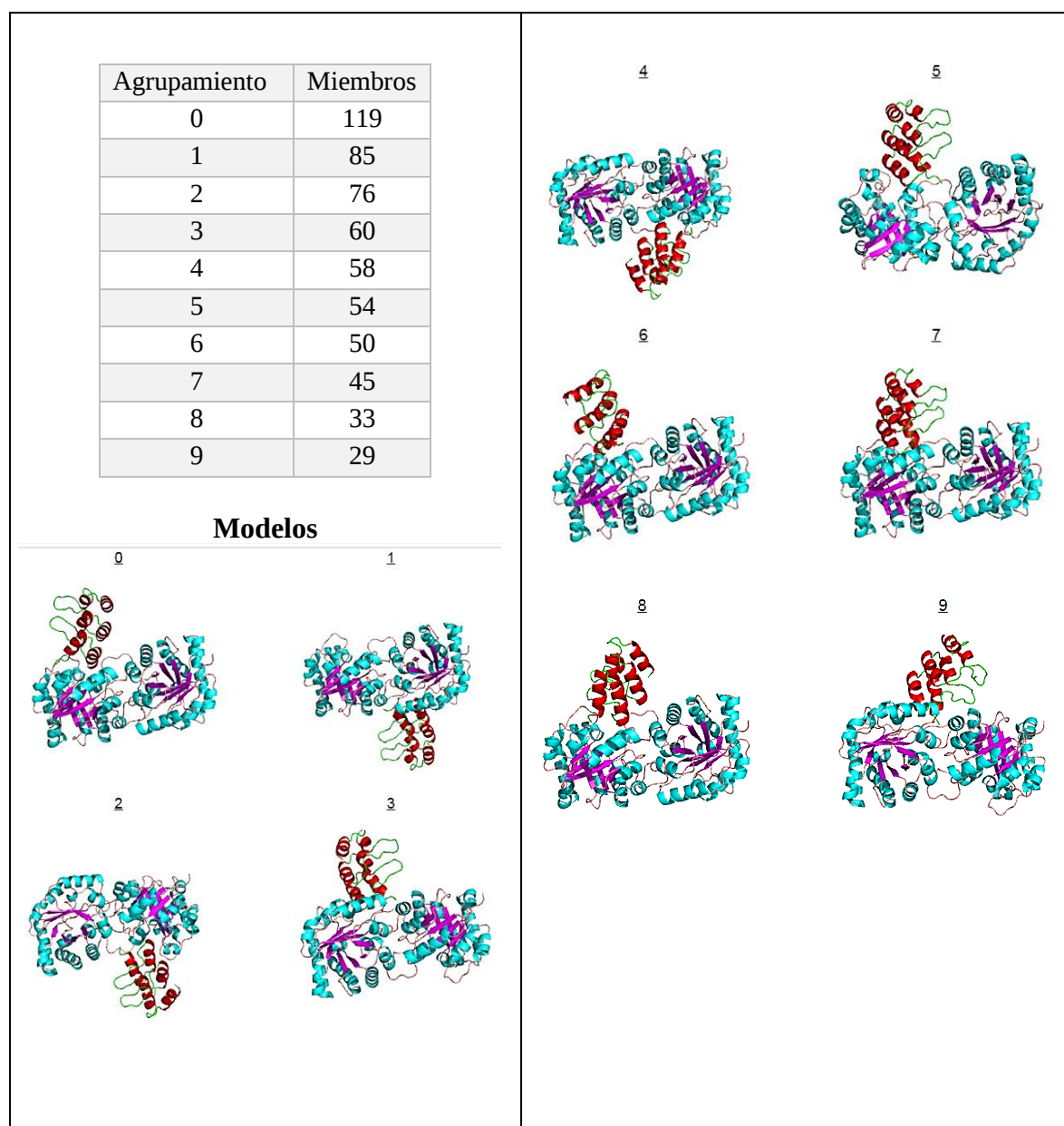


Figura C-4. Modelos del acoplamiento molecular entre 5834 y HsTIM N16D.

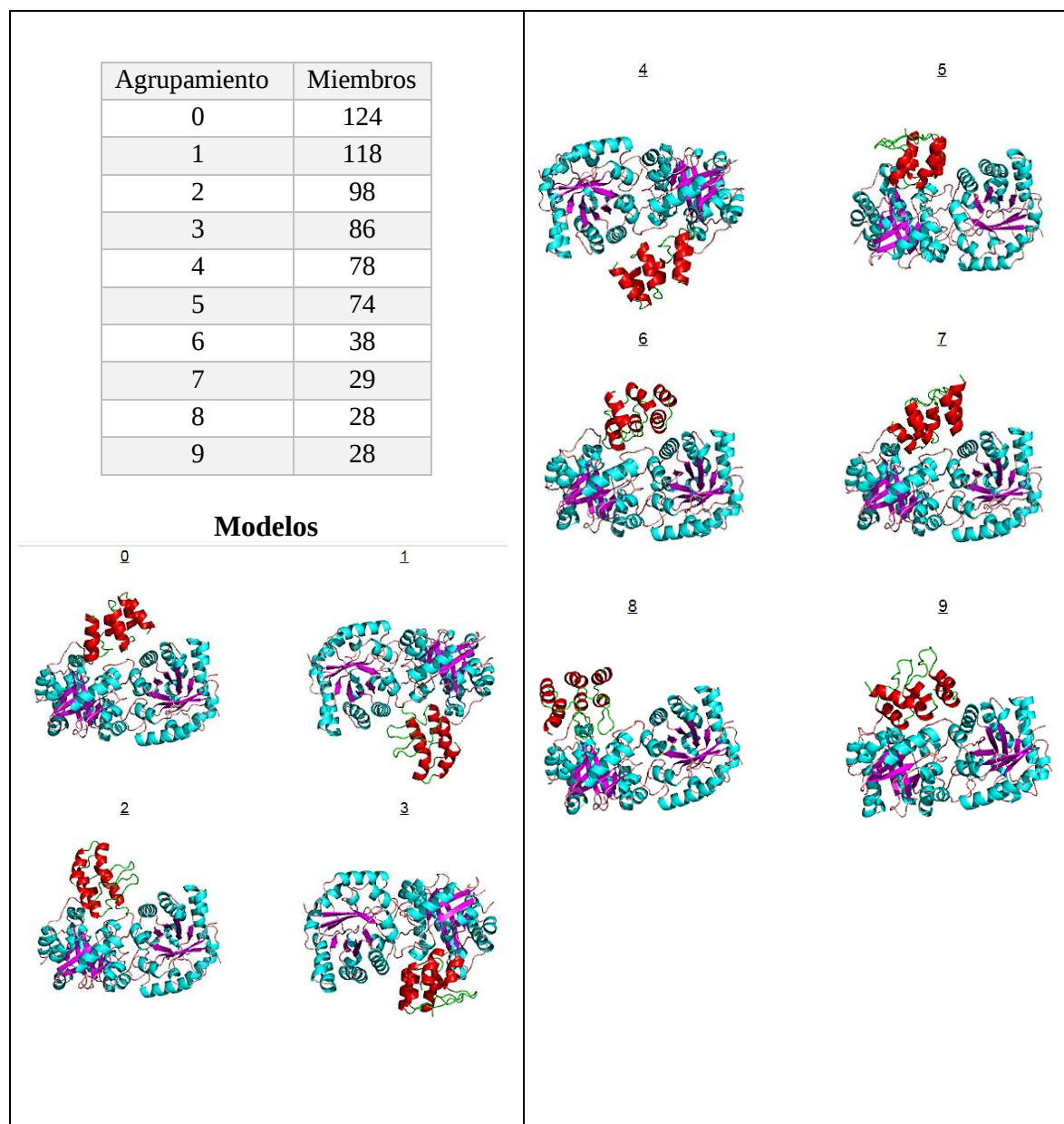


Figura C-5. Modelos del acoplamiento molecular entre 55a32 y HsTIM WT.

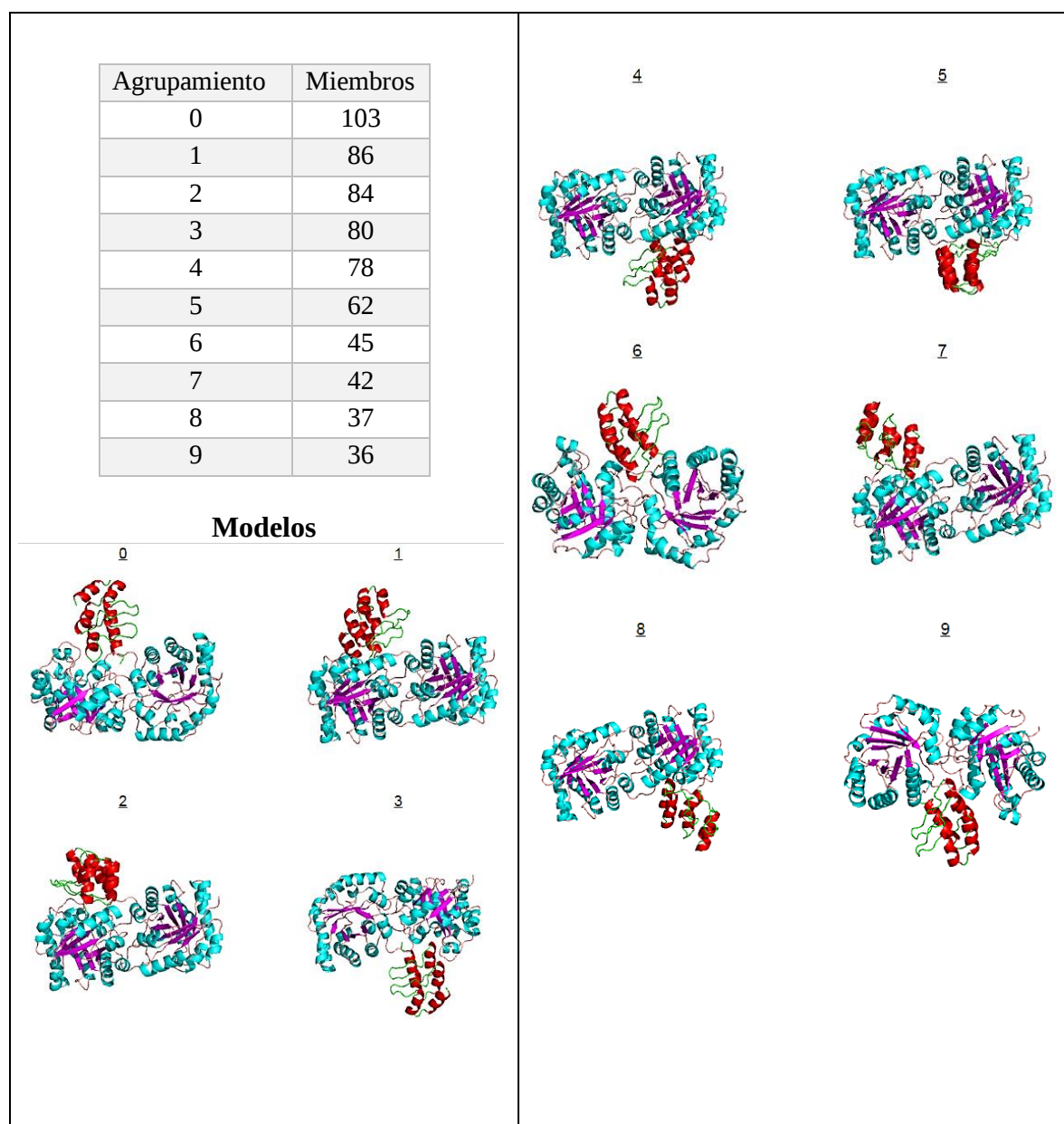


Figura C-6. Modelos del acoplamiento molecular entre 55a32 y HsTIM N16D.

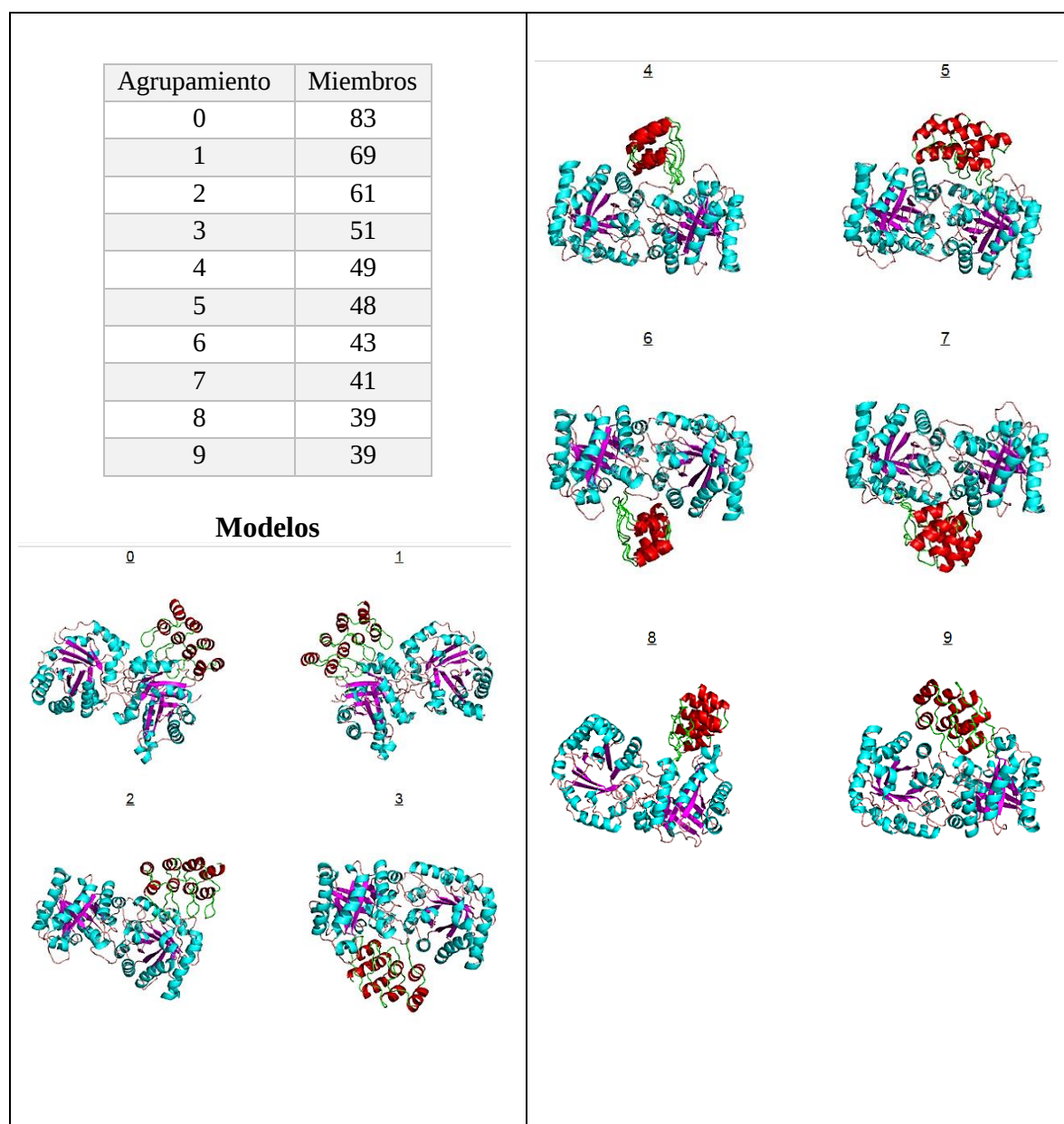


Figura C-7. Modelos del acoplamiento molecular entre D2 y HsTIM WT.

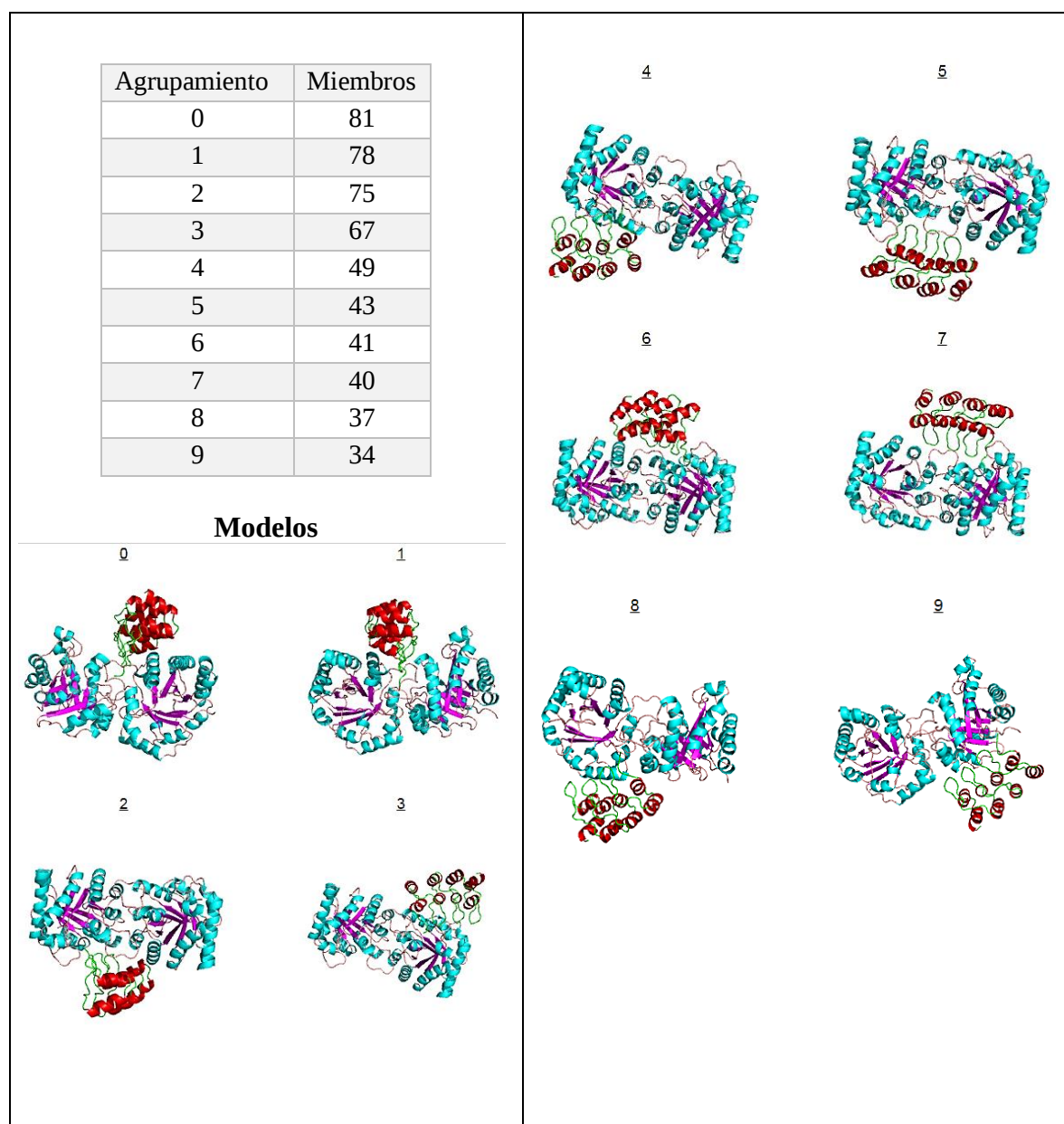


Figura C-8. Modelos del acoplamiento molecular entre D2 y HsTIM N16D.

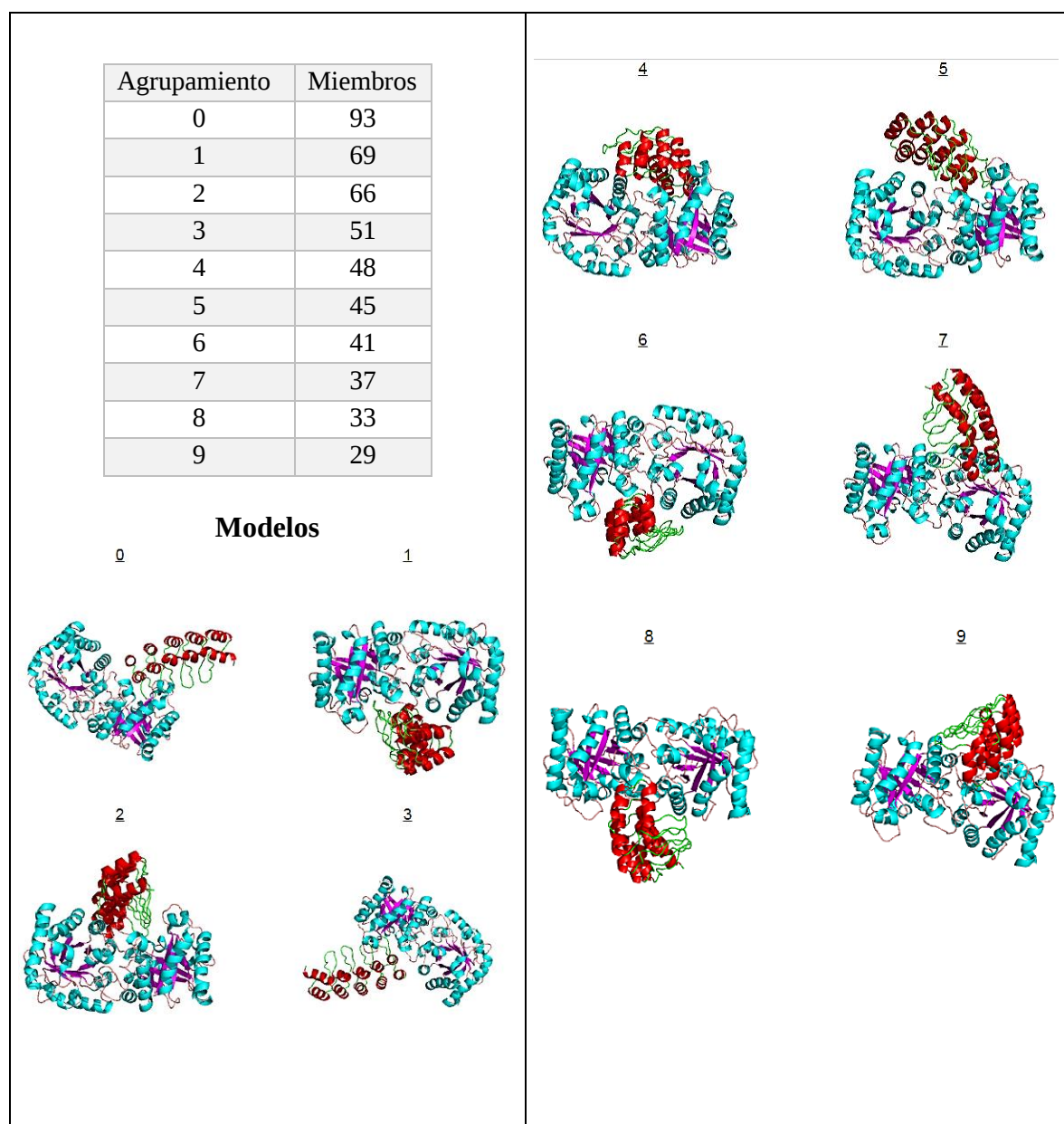


Figura C-9. Modelos del acoplamiento molecular entre D3 y HsTIM WT.

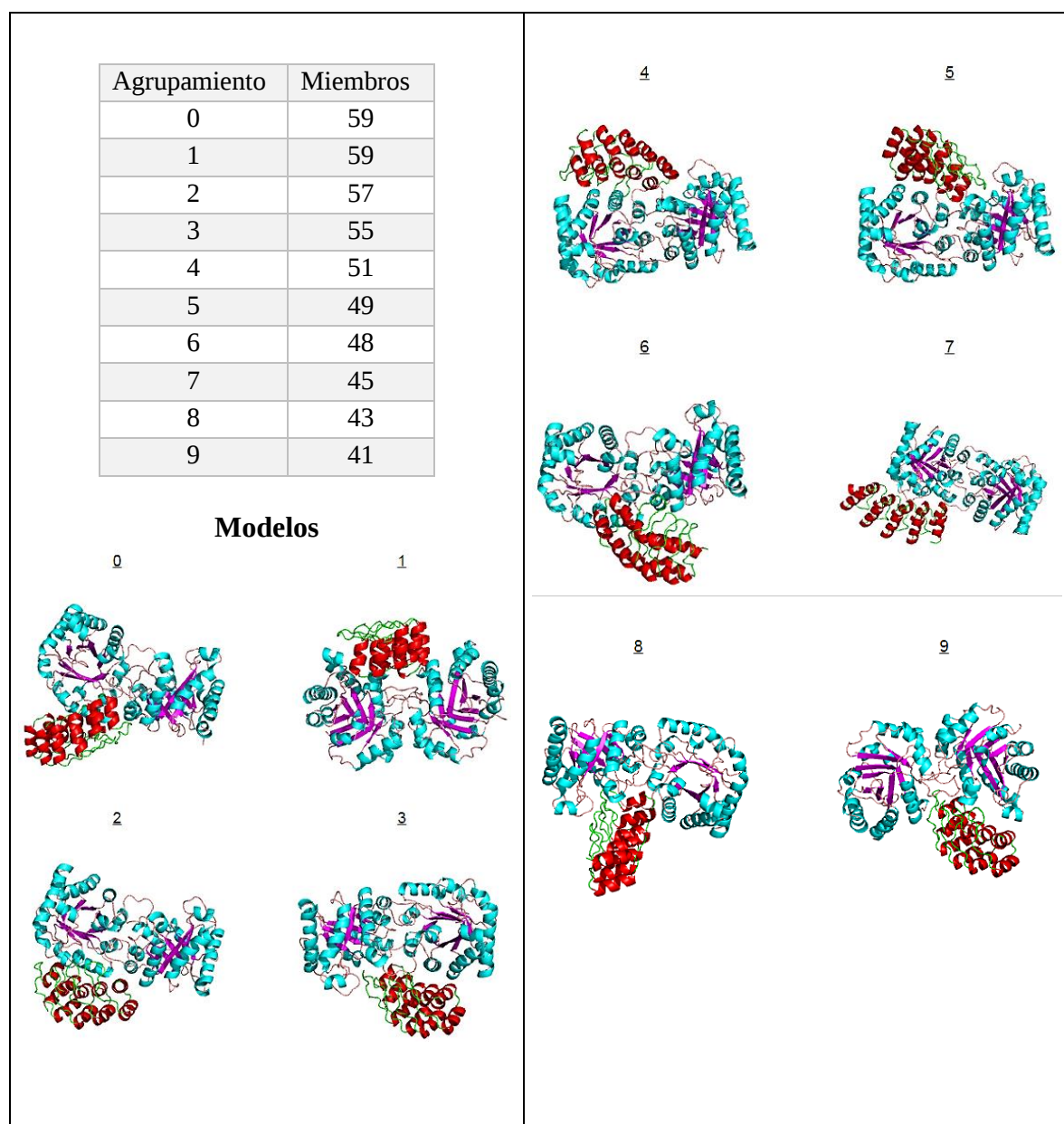


Figura C-10. Modelos del acoplamiento molecular entre D3 y HsTIM N16D.