

Expresión, purificación, cristalización y
estudios cristalográficos de la
tiorredoxina1 del camarón blanco
Litopenaeus vannamei.

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestro en ciencias

Presenta

Biól. Adam Andres Campos Acevedo

Programa de maestría y doctorado en ciencias bioquímicas

Director de tesis:
Dr. Enrique Rudiño Piñera

Colaborador:
Dr. Rogerio Sotelo Mundo

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos
Instituto de Biotecnología
UNAM

2 0 1 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

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

Este proyecto fue financiado por CONACyT proyecto No. 102370 y por el PAPIIT IN204611.

C ONTENIDO

Lista de ilustraciones	3
Lista de tablas	6
Abreviaturas	7
Resumen	8
Capítulo 1	10
Introducción	10
1.1 <i>Litopenaeus vannamei</i> (Lv)	10
1.2 Tiorredoxina (Trx)	10
1.3 Estudios estructurales de la Trx	12
1.4 Residuos conservados en la Trx	13
1.5 Mecanismo de reacción	15
1.6 Formación del dímero en solución	17
1.7 Residuos de cisteína	18
1.8 Efectos estructurales causados por el daño por radiación	19
Capítulo 2	22
Antecedentes	22
2.1 Hipótesis	23
2.2 Objetivos	23
Capítulo 3	24
Sección experimental	24
3.1 Tiorredoxina recombinante del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> (LvTrx)	24
3.2 Sobreexpresión y purificación de la LvTrx	24
3.2.1 Purificación de la LvTrx sin DTT	26
3.3 Cuantificación de la LvTrx	26
3.4 Determinación del punto isoeléctrico de la LvTrx	26
3.5 Ensayo de actividad de Trx-insulina	27
3.5.1 Generalidades	27
3.5.2 Metodología experimental	27
3.6 Cristalización de la LvTrx	29
3.7 Cristalografía	29
3.8 Identificación de proteína (Id) de la LvTrx	30
3.9 Ensayo de filtración en gel	31

3.10 Estudios de DLS	31
3.11 Determinación cuantitativa de grupos sulfidril (-SH)	33
Capítulo 4	35
Resultados y Discusiones	35
4.1 Sobreexpresión y purificación de la LvTrx recombinante	35
4.1.2 Purificación de la LvTrx recombinante sin DTT	36
4.2 Determinación del punto isoeléctrico	37
4.3 Ensayo de actividad de la Trx-insulina	37
4.4 Cristalización de la LvTrx	38
4.5 Cristalografía	41
4.6 Identificación de la LvTrx	47
Capítulo 5	49
Dimerización de la LvTrx	49
5.1 Experimentos previos	49
5.2 Formación dimérica en la tiorredoxina <i>Litopenaeus vannamei</i> y comparación con la tiorredoxina de humano	51
5.3 Ensayo de filtración en gel	57
5.4 Ensayo de dispersión dinámica de luz (DLS)	60
5.5 Cuantificación de cisteínas libres	62
Capítulo 6	63
Conclusión	63
Referencias	65

LISTA DE ILUSTRACIONES

- Figura 1.** Modelo y arquitectura de la Trx de *L. vannamei*. a) Modelo 3D generado por homología de la secuencia de la Trx de *L. vannamei* (el modelo se basó en la estructura cristalográfica de la Trx de *Drosophila melanogaster*). b) Arquitectura del plegamiento de tiorredoxina. Las láminas β están dibujadas con flechas y las α hélices como rectángulos.....12
- Figura 2.** Regiones conservadas localizadas en el centro y alrededor del sitio activo de la Trx. Los residuos conservados se muestran en forma de cilindros. Triptófano (naranja), residuos con carga (magenta), cisteínas (azules), glicinas (amarillas), fenilalaninas (verdes) y prolinas (rojo). Las regiones hidrofóbicas (verde) las regiones con carga (magenta) y las zonas estructurales expuestas, son indicadas con un ovalo semitransparente. La figura a) y b) muestran el diagrama general de la estructura de la Trx vista de dos posiciones diferentes.....14
- Figura 3.** Esquema de regulación de la actividad de la proteína por control tiol redox en presencia del sistema tiorredoxina. Trx, tiorredoxina, TrxR, tiorredoxina reductasa (tomada y modificada de Holmgren, 1989).....16
- Figura 4.** Estructuras de tiorredoxinas que forman un dímero no-covalente en la unidad asimétrica, *Chlamydomonas reinhardtii* (pdb: 1EP7), tiorredoxina F de cloroplasto de espinaca (pdb: 1F9M), *Trichomonas vaginalis* (pdb: 2F51) y *E. coli* (pdb: 2TRX).....18
- Figura 5.** Tabla de saturación de sulfato de amonio en el libro ‘*Biochemical calculations*’ de Segel.....25
- Figura 6.** Esquema de la reducción de la insulina por DTT catalizada por la Trx. La agregación provoca un aumento de la absorbancia a 650 nm.....27
- Figura 7.** Representación esquemática de los componentes básicos de un equipo de DLS.....31
- Figura 8.** Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en una medición de DLS.....32
- Figura 9.** Reactivo de Ellman. Este forma un puente disulfuro con el grupo tiol del residuo y libera un ion tiolato que está ilustrado en color azul. La máxima absorción de este tiolato es a 412 nm.....33
- Figura 10.** Purificación de *LvTrx*. a) Cromatografía del extracto bacteriano después de la columna de intercambio aniónico (Q-sepharose). b) SDS-PAGE al 15%. En los carriles 2-4 se muestran tres lotes de la purificación de proteína de *LvTrx*, observando la eliminación de contaminantes con solo un paso de purificación; en el carril 6 se muestra la comparación de la primera purificación a través de 4 pasos. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular (*Fermentas*).....35
- Figura 11.** Purificación de la *LvTrx* sin la presencia de DTT. Se muestran dos pasos de purificación y en cada uno de ellos se estableció una variación de pH.....36
- Figura 12.** Gel de isoelectroenfoco, carril 1, 2 y 3 corresponden a la *LvTrx*, el carril intermedio es el marcador de pI.....37

- Figura 13.** Actividad de la tiorredoxina evaluada por el método de reducción de disulfuros de insulina.....38
- Figura 14.** Agregado cristalino, encontrado en la condición 47 del *kit crystal screen I* (acetato de sodio trihidratado 0.1 M, pH 4.6, sulfato de amonio 2.0 M) utilizando la técnica de *microbatch* a 18°C.....39
- Figura 15.** a) Cristales de LvTrx a 30 mg mL⁻¹, TRIS 10 mM, pH 7.5 (sulfato de amonio 0.5 M, acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6) y b) Cristales de LvTrx a 6 mg mL⁻¹, TRIS 10 mM, pH 7.5 (sulfato de amonio 2.0 M, acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6) a 18°C.....39
- Figura 16.** Cristales crecidos a una concentración de LvTrx de 6 mg mL⁻¹, acetato de sodio 10 mM pH 3.8 (sulfato de amonio 2.0 M, acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6) adicionando una concentración de 5 mM de DTT directamente a la gota de cristalización a 18°C. El círculo rojo indica el cristal que se tomó para ser difractado.....40
- Figura 17.** Cristales crecidos a una concentración de LvTrx de 6 mg mL⁻¹, acetato de sodio 10 mM pH 3.8 (sulfato de amonio 2.0 M, acetato de sodio 0.1 M, pH 4.6) en ausencia de DTT a 18°C. El círculo rojo indica el cristal que se tomó para ser difractado.....40
- Figura 18.** Patrón de difracción de la LvTrx a 1.9 Å de resolución. A un costado se muestra la imagen del cristal dentro del *loop* antes de ser difractado.....42
- Figura 19.** Estructura tridimensional por difracción de rayos-X de la LvTrx a 1.88 Å de resolución.....42
- Figura 20.** Ocupaciones de las cisteínas catalíticas y de la cisteína que forma la unión covalente dimérica.....43
- Figura 21.** Interacción de los residuos Asp-60 de cada monómero de la LvTrx.....44
- Figura 22.** Distintos estados redox de la LvTrx, desde el estado reducido hasta el oxidado. Se muestran las ocupaciones del sitio catalítico de cada una de las cadenas A-B que conforman al dímero y el puente disulfuro inter-monomérico que se mantiene estable en los 4 estadios redox.....46
- Figura 23.** El residuo 11 en el modelo como una fenilalanina (Phe). Sin embargo, en la secuencia en esta posición se había reportado una serina (Ser).....47
- Figura 24.** a) Distintas concentraciones del agente reductor (DTT) mostrando una mayor población de la LvTrx en forma monomérica que dimérica. b) Distintas concentraciones del agente reductor (β -mercaptoetanol) mostrando resultados similares al DTT, con una mayor población monomérica que dimérica.....49
- Figura 25.** a) Gel nativo PAGE, mostrando la migración de acuerdo a su carga. Los carriles 2 y 3 son una repetición de la misma muestra, el carril 4 es la muestra con SDS y el carril uno el marcador de peso. b) SDS-PAGE, las muestras de los carriles 2 y 3 fueron cargadas sin SDS y sin agente reductor, el carril 4 fue cargado con SDS y agente reductor y el carril 1 es el marcador de peso. En este gel se muestra una población mayoritaria de la forma dimérica debido a la ausencia de un agente reductor.....50
- Figura 26.** Interacción de residuos que mantienen la formación del dímero en el cristal. a) Vista frontal de uno de los monómeros que conforman el dímero, mostrando en esferas azules los residuos que participan en la interacción inter-monomérica. b) Vista lateral del mismo monómero, las esferas amarillas indican la formación de un puente disulfuro. c) Vista global de los 24 residuos que participan en la formación del dímero.....51

- Figura 27.** Potencial electrostático de la *LvTrx* en estado oxidado y reducido, las cargas positivas están representadas en color azul, mientras que las cargas negativas están representadas en color rojo. a) Comparación de un monómero entre el estado oxidado y reducido de la *LvTrx*, mostrando que no hay cambio significativo en las cargas y distinción del amplio acceso que tiene el sustrato hacia el sitio activo. b) Vista global de carga del dímero, mostrando una amplia región con carga negativa.52
- Figura 28.** Comparación electrostática del acceso del sustrato al sitio activo de la *LvTrx* con otras Trx, mostrando diferencias entre ellas representado con una flecha y un ovalo oscuro. La hTrx, muestra una carga positiva en el acceso al igual que la Trx de *D. melanogaster* y *E. coli*, solo que estas dos últimas presentan un espacio menos accesible para la entrada del sustrato. En azul se muestran las cargas positivas, mientras que en rojo se muestran las cargas negativas.....53
- Figura 29.** Residuos involucrados en la interfaz dimerica, residuos en rojo pertenecen a la *LvTrx* y en gris a la Trx de humano.....54
- Figura 30.** Formación de puentes de hidrogeno en la interacción inter-monomérica.....55
- Figura 31.** Estructura de la tiorredoxina de humano mostrando un monómero en la unidad asimétrica. Al girar el monómero 180°, por medio de una simetría perfecta se forma el dímero, mientras que en el dímero de la *LvTrx* existe un ligero movimiento que lo hace distinto al dímero de la hTrx.....55
- Figura 32.** Empalme estructural entre la *LvTrx* (gris) y la hTrx (rojo), mostrando cambios en ciertos residuos Trp-31, Pro-34, Met-37 que se encuentran cerca del sitio activo, mostrando los cambios más significativos en ovalo azul.....56
- Figura 33.** a) Empalme de estructura dimerica entre *LvTrx* y Trx de humano. b) Representación anisotrópica de todos los átomos que conforman a la *LvTrx*, mostrando el movimiento que tiene la cadena B sobre una dirección a diferencia de la cadena A.....57
- Figura 34.** Cromatograma de exclusión molecular (Superdex 75) pH 7.5, observando solo un pico de elución, correspondiente a la *LvTrx*.....58
- Figura 35.** Cromatograma de exclusión molecular (Superdex 75) a pH 3.8, observando dos picos de elución, correspondientes al dímero/monómero de la *LvTrx*.....59
- Figura 36.** Empalme de cromatogramas de elución a pH 7.5 y pH 3.8, mostrando claramente la existencia de dos poblaciones en solución.....60
- Figura 37.** Comparación de la forma monomérica que presenta la Trx de *E. coli* con la proteína de la *LvTrx*.....61
- Figura 38.** a) Traza espectroscópica del proceso de cuantificación de grupos SH. En tiempo cero se encuentra la proteína con el buffer, la segunda reacción ocurre cuando se le agrega el DTNB reaccionando de manera inmediata con la proteína hasta llegar al tiempo de estabilización. b) Área de superficie accesible al solvente de cada una de las cisteínas que componen la estructura de la *LvTrx*.....62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de colecta y afinamiento de la primera estructura determinada por difracción de rayos X de la <i>LvTrx</i> a 1.88 Å.....	41
Tabla 2. Resumen de las ocupaciones de cada residuo de cisteína que conforman el sitio catalítico de cada cadena y de las cisteínas involucradas en la formación del dímero.....	43
Tabla 3. <i>Data sets</i> colectados en ánodo rotatorio y en sincrotrón de los cristales de la <i>LvTrx</i>	44
Tabla 4. Valores de colecta y afinamiento de las estructuras determinadas por difracción de rayos X de la <i>LvTrx</i> en diferentes estados redox.....	46
Tabla 5. Diferencia de peso utilizando la misma secuencia y variando solo el residuo 11 por Phe o por Ser.....	48
Tabla 6. Muestra los promedios por condición y un promedio general a determinado pH.....	61

ABREVIATURAS

Dif-RX	Difracción con rayos X
DsbA	Enzima promotora de puentes disulfuro
DLS	<i>Dinamic Light Scattering</i>
DTT	Ditiotreitol
Grx	Glutarredoxina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
<i>Lv</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>
<i>LvTrx</i>	Tiorredoxina de <i>Litopenaeus vannamei</i>
MX	Macromoléculas cristalográficas
O/N	Overnight
PDA s	Parámetros de dispersión atómica
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
DmTrx	Tiorredoxina de <i>Drosophila melanogaster</i>
hTrx	Tiorredoxina de humano

ABSTRACT

Thioredoxin (Trx) is part of an enzyme system which allows the system to maintain redox equilibrium against redox changes that can occur as a result of different types of stress (particularly against infections). This redox balance is maintained by oxidizing and reducing the disulfide bridges of Trx. While there is much information on Trx (its involvement in the repair of proteins, as a growth factor, as a proton acceptor in redox systems, as an apoptotic regulator, etc.). In mammals, including humans, the information regarding thioredoxin in invertebrates is scarce, and is almost nonexistent for white shrimp. The three dimensional structure of white shrimp thioredoxin (*LvTrx*) reveals that the protein can form homodimers. The dimer present in the asymmetric unit contains a disulfide bridge formed by the Cys-73 residues of each monomer and a hydrogen bond between the Asp-60 residues of each monomer, which is one of the residues responsible for its pH-dependent dimerization.

This work was carried out with three main objectives. The first was to contribute to the knowledge of the structural features of recombinant Trx *Litopenaeus vannamei* using the technique of diffraction X-ray single crystal (Dif-RX). The second objective was to examine the role of *LvTrx* dimerization, which was found to be mediated by the existence of 12 amino acid residues on each monomer, of which 8 are involved in the dimer interface of internal human Trx. The existence of dimer formation in solution was validated by gel filtration tests, DLS (Dynamic Light Scattering) and the determination of free cysteines. The third objective was to study the behavior of the redox catalytic site of *LvTrx* when exposed to X-rays as well as describe the structural characteristics of *LvTrx* to complement biochemical information generated by Dr. Sotelo Mundo CIAD-Hermosillo's group (our collaborator). With this work we aim to provide information to aid in the understanding of the antioxidant enzyme system of Trx in white shrimp, as well as lay the groundwork for verifying its possible role as a physiological dimer.

RESUMEN

La tiorredoxina (Trx) forma parte de un sistema enzimático que permite contender frente a cambios redox que pueden ocurrir como resultado de diversos tipos de estrés (particularmente frente a infecciones). Este equilibrio redox se mantiene reduciendo y oxidando a los puentes disulfuros de la Trx. Si bien, en mamíferos, incluido el humano, existe mucha información sobre la función y estructura de la Trx (involucrada en la reparación de proteínas, como factor de crecimiento, como aceptor de protones en sistemas redox y como regulador apoptótico, entre otros). En invertebrados, la información referente a la tiorredoxina es escasa, y específicamente para el camarón blanco es casi inexistente. La estructura tridimensional de la tiorredoxina de camarón (*LvTrx*) revela que la proteína puede formar homodímeros. El dímero presente en la unidad asimétrica contiene un puente disulfuro formado por los residuos de Cys-73 de cada monómero y un puente de hidrógeno entre los residuos Asp-60 de cada monómero, que se maneja como uno de los residuos responsables de la dimerización dependiente de pH.

Este trabajo se llevó a cabo con dos objetivos principales. El primero de ellos fue contribuir al conocimiento de las características estructurales de la Trx recombinante de *Litopenaeus vannamei*, haciendo uso de la técnica de difracción de monocristales con rayos X (Dif-RX). El segundo objetivo fue examinar el papel de la dimerización de la *LvTrx* que es mediada por la existencia de 12 residuos de aminoácidos de cada monómero, de los cuales 8 residuos se encuentran involucrados en la intercara dimerica de la Trx de humano [1]. Dando paso en este proyecto a la validación de la existencia de la formación del dímero en solución mediante ensayos de filtración en gel, DLS (*Dinamic Light Scattering*) y determinación de cisteínas libres.

Este ensayo se enfocó al estudio del comportamiento redox del sitio catalítico de la *LvTrx* al ser expuesto a los rayos X, así como a la descripción de las características estructurales de la enzima del camarón blanco, complementando así, la información bioquímica generada por el grupo del Dr. Sotelo Mundo del CIAD-Hermosillo (colaborador nuestro). Con estos trabajos pretendemos aportar información que ayude al entendimiento del sistema enzimático antioxidante de la Trx en el camarón blanco; así como sentar las bases de una posible función del dímero en situaciones fisiológicas.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 *Litopenaeus vannamei* (Lv)

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es uno de los recursos pesqueros más comercializados a nivel mundial y es uno de los crustáceos marinos más cultivados en México. La producción en las granjas camaronícolas ocasiona que el organismo esté sometido a estrés provocado por diversos factores ambientales y fisiológicos (temperatura, presión, salinidad, intensidad de luz, distribución de nutrientes, oxígeno, proceso de muda y ciclo reproductivo, entre otros) [2].

Una respuesta a dichos cambios puede ser mediada a través de sistemas enzimáticos antioxidantes y detoxificantes, que involucran una batería de enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión-S-transferasa, la glutarredoxina y la tiorredoxina reductasa (TrxR) [3]. El sistema de defensa de los organismos invertebrados, como es el caso del camarón Lv, al carecer de sistema inmune (células linfoides e inmunoglobulinas) presentes en vertebrados, es esencial estudiar los factores innatos que brindan protección en contra de las sustancias citotóxicas, exógenas y endógenas, como lo lleva a cabo el sistema tiorredoxina. La tiorredoxina es una proteína oxidoreductora, con dos sitios activos redox (un par de Cys formando, o no, un puente disulfuro) [4–6].

1.2 TIORREDOXINA (Trx)

En proteínas extra celulares, la mayoría de los residuos de cisteína están involucrados en la formación de puentes disulfuro. Por otro lado, dentro de la célula, el ambiente es reductor, por lo que la mayoría de la cisteínas se mantienen reducidas. Aunque las células tienen una concentración milimolar de glutatión y vías alternativas que sirven como amortiguadores redox previniendo la formación de disulfuros no deseados, éstos necesitan de un sistema reductor más eficiente que catalice la reducción de los puentes disulfuro. La tiorredoxina (Trx) es una enzima que reduce puentes disulfuro en muchas otras proteínas siendo una de las más reductoras y se ha determinado que participa en distintas funciones celulares. Inicialmente, las tiorredoxinas fueron descubiertas en 1964 en *Escherichia coli* y descritas

como agentes reductores de la ribonucleótido reductasa y desde entonces se ha visto que también participan en la reducción y asimilación de sulfato, como donadoras de electrones de la metionina sulfóxido reductasa o de la peroxirredoxina, y como reparadora de puentes disulfuro de las proteínas ante un estrés oxidativo [7–9].

La forma activa de la tiorredoxina contiene dos cisteínas reducidas en el sitio activo que comienzan a oxidarse durante la reducción del puente disulfuro de la proteína blanco. La Trx es regenerada por una molécula de NADPH, a través de la enzima NADPH-dependiente tiorredoxina reductasa. El sistema TrxR/Trx al igual que el sistema glutatión, es uno de los principales sistemas que se piensa son responsables de mantener propiamente un ambiente reductor en la célula [4]. Una vez reducidas, las tiorredoxinas participan en reacciones de transferencia de electrones a través de la oxidación reversible de las dos cisteínas del centro activo mediante un ciclo bioquímico junto con los demás elementos del sistema tiorredoxina [10]. Las tiorredoxinas son enzimas de tamaño pequeño (~12000 Da) siendo la secuencia del sitio activo: Trp-Cys-Gly-Pro-Cys [4]. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en todos los organismos, desde arqueas hasta humanos y están localizadas en varios compartimentos celulares; algunas Trx son más abundantes en el citosol, mientras que otras son translocadas al núcleo o mitocondria, asociadas a la membrana celular o secretadas al ambiente extracelular. Poseen entre un 27 y un 69% de identidad y se caracterizan por tener el mismo plegamiento, el llamado dominio tiorredoxina, el cual consiste de cinco hebras β rodeadas por tres o cuatro α hélices [4], [11].

Adicionalmente, la Trx de humano exhibe actividad para mantener el estado redox, uno de los cuales es aparentemente como un activador de varios factores transcripcionales, incluyendo NF- κ B y AP-1 (a través del factor nuclear Ref 1) [12]. La tiorredoxina además puede ser expulsada a través de una vía secretoria, donde ésta actúa como un componente del factor temprano de embarazo y como un estimulador de líneas celulares tumorales.

También se ha encontrado que la Trx de humano puede formar un dímero covalente en solución, formando un puente disulfuro entre los residuos Cys-73 de cada monómero [1], [13]. La región de la intercara del dímero consiste de un centro hidrofóbico, altamente conservado en vertebrados, e incluye un puente de hidrógeno entre los residuos Asp-60 de cada monómero, que se forma a bajo pH. Este residuo Asp tiene un pK_a parcialmente elevado de 6.5 [13]. La formación del dímero puede jugar un papel importante regulando las funciones extracelulares de la Trx [1].

La evidencia de que la Trx de humano interactúa con una variedad de proteínas blanco y que puede estar involucrada con algunos tipos de crecimiento tumoral hace de la Trx un sistema muy atractivo, por lo cual la determinación de la estructura de la tiorredoxina de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* al contar con 8 de los 12 residuos involucrados en la intercara dimérica de la Trx de humano, puede dar lugar a un segundo ejemplo de dimerización similar al descrito en humano.

1.3 ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA Trx

Se conoce la estructura de los 2 estados posibles de la Trx (oxidado y reducido), actualmente se cuenta con 582 estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* de varias especies (PDB, 2012)¹. La principal diferencia entre los estados mencionados es que la forma oxidada contiene un puente disulfuro entre los grupos tiol (SH) de las cisteínas del sitio activo [1], [14]. Como se mencionó, se conoce la estructura de una gran diversidad de tiorredoxinas, con una secuencia que varía de 105 a 110 residuos. En particular, la secuencia de la *LvTrx* consta de 105 aminoácidos. La Trx de *E. coli* es la más estudiada, está compuesta por 108 aminoácidos y su estructura tridimensional en el estado oxidado y reducido, ha sido determinada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y por cristalografía de rayos X [15]. Entre las características esenciales, la molécula está formada por un núcleo central de cinco hebras β (β_1 - β_5), rodeado por cuatro α hélices (α_1 - α_4). El sitio activo se encuentra localizado entre las unidades estructurales β_2 y α_2 y se encuentra separado del resto de la hélice por una torcedura causada por el residuo Pro 40. La estructura está formada por dos dominios conformacionales: $\beta\alpha\beta\alpha$ que van del residuo 1 al 59 y el dominio $\beta\beta\alpha$ del residuo 76 al 108, tomando como referencia a la Trx de *E. coli* (**Figura 1**). Como resultado de este arreglo, el sitio activo sobresale del resto de molécula, pero el puente disulfuro permanece orientado hacia el interior de la hélice α_2 [4], [11].

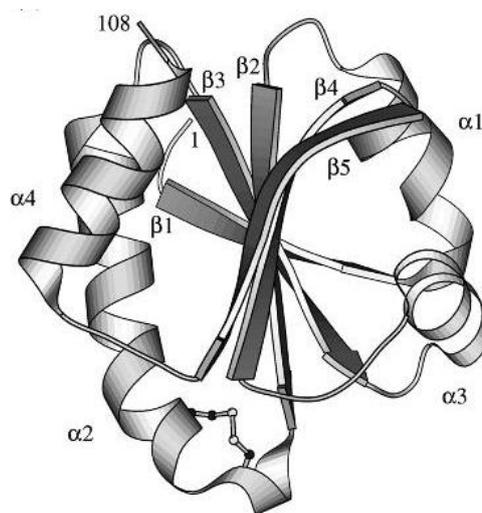


Figura 1. Modelo tridimensional de la estructura de la Trx de *E. coli*. (Holmgren et al. 1975; Katti et al. 1990).

Esta estructura tridimensional es similar a la de otras proteínas que también forman parte de la llamada superfamilia tiorredoxina, tales como: glutarredoxina (Grx), enzima promotora de puentes disulfuro (DsbA), proteína disulfuro isomerasa (PDI), glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa. A diferencia de la DsbA y la PDI, que inducen la formación de enlaces disulfuro, la Trx y la Grx reducen los puentes disulfuro de diversas proteínas, participando en la regulación del estado de óxido-reducción celular [16].

¹PDB (*Protein Data Bank*): Portal de información de estructuras biológicas macromoleculares (www.pdb.org/).

1.4 RESIDUOS CONSERVADOS EN LA Trx

Existen varios residuos que juegan un papel importante estructural y catalítico entre la gran cantidad de Trx reportadas. Dos de ellos, son los residuos cisteína encontrados en el sitio catalítico que son esenciales para la actividad de las tiorredoxinas (Trxs). Existen otros residuos conservados que no son estrictamente requeridos para la actividad, pero dictan las propiedades termodinámicas y propiedades redox de la proteína.

Las Trxs son caracterizadas por la presencia de tres residuos conservados de prolina, uno de los cuales se encuentra localizado entre las cisteínas catalíticas del motivo CGPC. Esta prolina es un residuo clave que determina el poder reductor de las Trxs; el reemplazo de este residuo por una serina o una treonina tiene un efecto dramático en la estabilidad y el potencial redox de la proteína [17]. El segundo residuo de prolina conservado está localizado 5 residuos más allá del motivo catalítico. Esta prolina introduce una torcedura en la hélice- α_2 que separa el motivo CGPC del resto de la hélice, localizado al final de la hélice- α_2 del N-terminal. Mutantes en este residuo desestabilizan la estructura de la Trx, pero no existe un efecto en las propiedades redox de la proteína. La tercera prolina conservada en la secuencia de la Trx está localizada en el sitio opuesto al sitio activo CGPC. Esta prolina, que siempre es encontrada en conformación-*cis*, es importante para el mantenimiento de las conformaciones que puede adoptar el sitio activo y para el potencial redox de la proteína. Este residuo ha sido reemplazado por una alanina y tiene como consecuencia un efecto en la eficiencia de la catálisis (**Figura 2**).

A un lado de la prolina en conformación-*cis* se encuentra otro residuo conservado, una treonina. Este residuo está involucrado en la región estructural opuesta al sitio activo CGPC. El oxígeno de la cadena lateral ($O\gamma_1$) de esta treonina forma un puente de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de la prolina-*cis*. Tres residuos de glicina son conservados entre las Trxs. La primera de ellas que se encuentra conformando parte del sitio activo CGPC, que mantiene parte de la conformación del sitio activo e influye en el potencial redox. Las otras dos glicinas flanquean a la hebra- β_5 y determinan la longitud de esta. Varios residuos aromáticos son conservados en las Trxs. Primero, existen dos residuos de fenilalanina, que están localizados en el N-terminal de la hélice- α_1 y al final de la hebra- β_2 , respectivamente. Ambos residuos forman parte del mismo *cluster* hidrofóbico, en el cual varias isoleucinas y residuos de valina en el centro de las hebras- β también forman parte de éste.

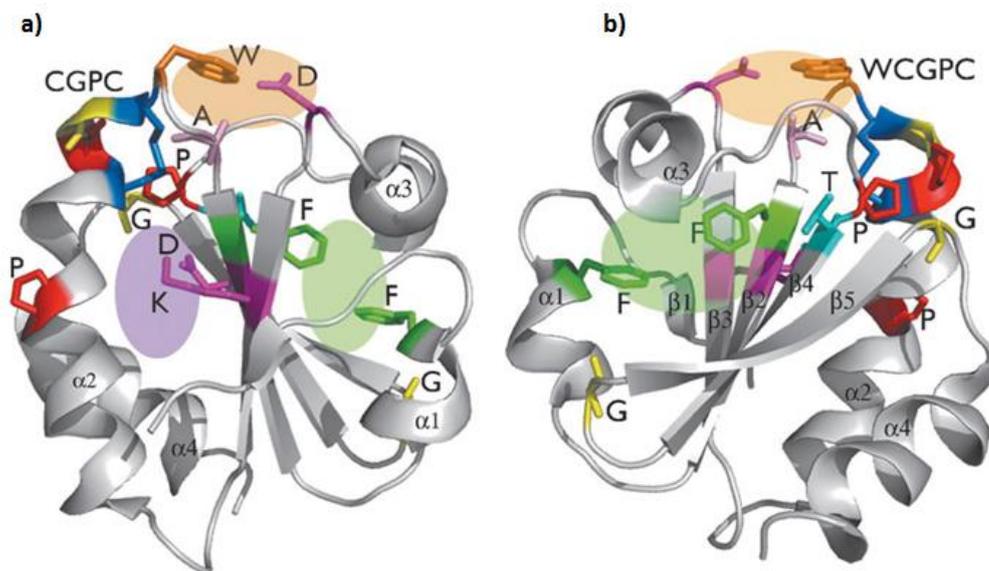


Figura 2. Regiones conservadas localizadas en el centro y alrededor del sitio activo de las Trxs. Los residuos conservados se muestran en forma de cilindros. Triptófano (naranja), residuos con carga (magenta), cisteínas (azules), glicinas (amarillas), fenilalaninas (verdes) y prolinas (rojo). Las regiones hidrofóbicas (verde) las regiones con carga (magenta) y las zonas estructurales expuestas, son indicadas con un ovalo semitransparente. La figura a) y b) muestran el diagrama general de la estructura de la Trx vista de dos posiciones diferentes. (J.F. Collet, 2010).

Otro residuo conservado es el triptófano, que se encuentra localizado inmediatamente antes del sitio activo, este residuo es importante para la estabilidad termodinámica de la Trx. La alanina conservada forma contactos de Van der Waals con el triptófano localizado cerca del sitio activo. Es importante tener un residuo pequeño como la alanina en esta posición, porque un residuo de mayor tamaño podría cambiar la posición del indol de la cadena lateral. El residuo de alanina con el triptófano forman un *cluster* estructural en el cual además hay un aspartato localizado en una vuelta entre la hebra- β_3 y la hélice- α_3 (**Figura 2**). Finalmente, la Trx contiene dos residuos cargados conservados, un aspartato y una lisina localizados en la hebra- β_2 y la hebra- β_3 , respectivamente. Forman parte de una región cargada presente entre la hebra- β y la torcedura de la hélice- α_2 . Esta región se encuentra protegida del medio ambiente por la presencia del puente disulfuro en estado oxidado de la proteína. Este aspartato conservado ha sido considerado, siendo un residuo clave en la activación de la cisteína del C-terminal del sitio catalítico como un nucleófilo. Sin embargo, resultados reportados recientemente por Roos *et al.*, sugieren que este no es el caso, sus resultados muestran que el grupo tiol del C-terminal puede ser activado incluso aún en ausencia de este aspartato.

1.5 MECANISMO DE REACCIÓN

La reacción catalizada por la Trx es una reacción bi-molecular con sustitución nucleofílica (SN_2). La reacción puede ser vista como una transferencia de puente disulfuro, de la proteína sustrato a la Trx. En otras palabras, los electrones provenientes de la Trx son transportados a la proteína sustrato. A pesar del ambiente reductor del compartimento en el cual la Trx se encuentra localizada; la Trx forma un puente disulfuro después de un ciclo catalítico. Este puente disulfuro no es un disulfuro estructural, sino que funciona como un *switch* redox, el cual se encuentra expuesto en la superficie y con acceso de un solo lado de la proteína. La Trx en su estado oxidado es más estable que en estado reducido. La diferencia en estabilidad entre el estado oxidado y reducido, provee a la Trx de la fuerza motriz necesaria para la reacción y predice que el camino de la reacción es termodinámicamente favorable. Los factores que afectan el intercambio de reacción tiol-disulfuro se debe al pKa de la cisteína nucleofílica, al ambiente electrostático de los residuos vecinos, a la geometría para formar el estado de transición lineal y al pH del solvente y a los valores de pKa de los grupos tioles libres que determinen la reacción tiol-disulfuro. La reacción comienza con un ataque nucleofílico del grupo tiol del N-terminal del motivo CGPC en el disulfuro de la proteína blanco, liberando un grupo tiol y formando un disulfuro mezclado entre la Trx y la proteína blanco. Este primer paso del mecanismo, depende del bajo valor de pKa de la cisteína del N-terminal del motivo CGPC ($pKa \sim 6.3$), que es significativamente más bajo que el pKa de un residuo de cisteína libre en solución ($pKa \sim 8.9$). Bajo condiciones fisiológicas, una gran fracción de azufre que forman parte de las cisteínas del N-terminal están presentes en forma de tiolato (desprotonación reactiva del grupo tiol) que funciona como nucleófilo para actuar sobre la proteína sustrato. El bajo valor de pKa resulta de la estabilización de la carga negativa del anión tiolato formando un puente de hidrógeno entre el azufre de la cisteína y los residuos vecinos. En contraste, el azufre de la cisteína del C-terminal tiene un alto pKa (~ 9) y está presente como grupo tiol. Este contribuye en la estabilización del tiolato del N-terminal, por lo tanto se incrementa el rango de reacción. Una vez formado el disulfuro mezclado entre la Trx y el sustrato, el grupo tiol del C-terminal ha sido activado como un tiolato que permite la disociación del complejo (segundo paso de la reacción). Desde el punto de vista mecánico, el pKa de la cisteína del C-terminal necesita disminuir, momentáneamente para que el ataque nucleofílico tome lugar. Instantáneamente el bajo valor de pKa es más relevante que el valor promedio. El último paso del ciclo catalítico necesita ser completado con la selectividad correcta (**Figura 3**). Cálculos basados en química cuántica, racionalizaron el mecanismo detrás de la reacción favorecida durante la disociación del complejo: la cisteína del C-terminal de la Trx ataca al complejo disulfuro mezclado de la cisteína del N-terminal de la Trx y no la cisteína proveniente del sustrato, liberando de esta forma la proteína sustrato reducida por la TrxR a expensas del NADPH, capaz de volver a realizar el ciclo catalítico [10], [18].

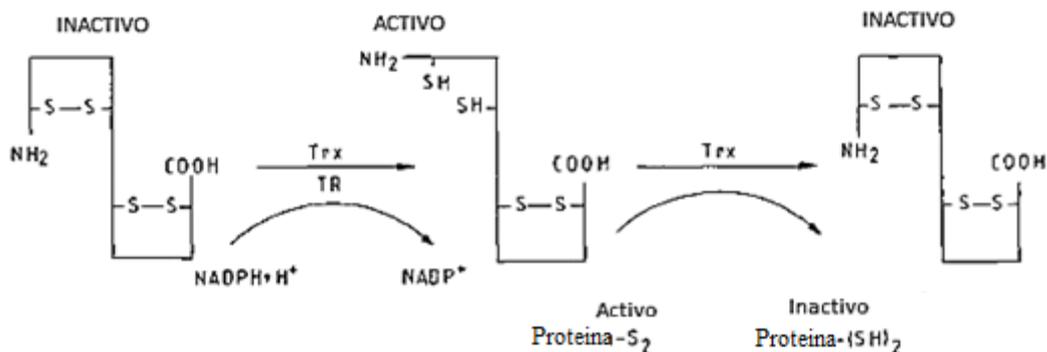


Figura 3. Esquema de regulación de la actividad de la proteína por control tiorredoxina en presencia del sistema tiorredoxina. Trx, tiorredoxina, TR, tiorredoxina reductasa (tomada y modificada de Holmgren, 1989).

Es el ion tiorredoxina (S⁻), no la forma tiorredoxina (-SH), la especie que es reactiva como nucleófilo, por lo que la reactividad del residuo de cisteína catalítico está determinada, además de por su accesibilidad al solvente, por la fracción del tiorredoxina que está presente en la forma de tiorredoxina y por la reactividad intrínseca de este tiorredoxina. Los dos últimos factores dependen de la basicidad del grupo tiorredoxina, es decir de su *pKa*. Se requiere por lo tanto que el grupo tiorredoxina del residuo de cisteína del sitio activo sufra una activación inicial para que esté presente en la forma de tiorredoxina. Esto implica que el ambiente del sitio activo esté diseñado de tal manera que la cisteína catalítica sea accesible y que su *pKa* esté considerablemente disminuido. Los estudios de modificación química realizados con la papaína, una cisteína proteasa [19] revelaron que una forma de activación química del tiorredoxina del residuo de cisteína esencial es la formación de un par iónico con un residuo de un aminoácido cargado positivamente (histidina en este caso).

Este mecanismo de activación del tiorredoxina catalítico se ha encontrado posteriormente en otras enzimas, como la betaína aldehído deshidrogenasa [20]. La formación de pares iónicos provoca así una disminución de varias unidades de pH en el *pKa* del tiorredoxina y, por lo tanto, a los valores de pH del medio intracelular y extracelular el residuo de cisteína catalítica está mayoritariamente en forma de tiorredoxina. La localización del residuo de cisteína nucleofílica en el extremo amino terminal de una α -hélice es otro mecanismo y el usado por las tiorredoxinas, para disminuir su *pKa*, ya que las cargas parciales positivas del dipolo-hélice estabilizan al ion tiorredoxina. Otro mecanismo de activación de los residuos de cisteína catalítica, descrito en una aldehído deshidrogenasa, utiliza a un grupo carboxilo de un residuo de glutámico que toma el protón del tiorredoxina convirtiéndolo en tiorredoxina [21].

La relevancia de los residuos localizados alrededor de las cisteínas del sitio activo de Trx se ha estudiado mediante mutagénesis sitio dirigida y modelaciones estructurales de la Trx de *Staphylococcus aureus*, específicamente sustituyendo el residuo de prolina del sitio activo por una treonina (CGTC) o serina (CGSC) [22]. En este estudio encontraron que el ambiente de la primera cisteína del sitio activo aumentó su hidrofiliidad y disminuyó su *pKa*. Lo anterior ocasionó una disminución en su poder reductor y en su eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M). De esta manera, la sustitución de la prolina del sitio activo por otro aminoácido origina un aumento en la entropía conformacional, que estabiliza el estado reducido y por tanto un aumento en su potencial redox. De manera similar, estudios con mutantes de Trx de *E. coli*, con sustitución del residuo de prolina del sitio activo por una histidina (CGHC), presentaron un aumento en su potencial redox (-235mV) y consecuentemente una disminución de su

poder reductor. Un comportamiento semejante se observó en mutantes cuya secuencia original del sitio activo fue cambiada por Cys-Trp-Gly-Cys, resultando en un potencial redox de -200mV [23]. El potencial de reducción estándar de la familia de las tiorredoxinas se encuentra en un intervalo de -124mV a -270mV, siendo la tiorredoxina de *E. coli* el miembro más reductor -270mV. Por otra parte; los potenciales de reducción estándar del glutatión y del DTT son de -205mV y de -330mV, respectivamente.

El papel de otros aminoácidos conservados en la estructura de Trx también ha sido investigado por Lamotte-Guéry y colaboradores, quienes estudiaron la función de la Pro-40 de la Trx de *E. coli*, donde se concluye que es un residuo esencial para la estabilidad de la proteína. Para esto, construyeron mutantes con sustitución de la Pro-40 por una alanina, observando distintos cambios estructurales. El sitio activo fue desplazado originando la exposición del Trp-31 al solvente, que a su vez aumentó la hidrofobicidad de la proteína.

1.6 FORMACION DEL DIMERO EN SOLUCION

La mayoría de las tiorredoxinas reportadas se encuentran en forma monomérica tanto en solución como en estado cristalino, a excepción de algunas tiorredoxinas que están comprometidas con una interacción dimérica no covalente en su estructura [*Drosophila melanogaster* (PDB: 1XW9, 1XWA, 1XWB), *Chlamydomonas reinhardtii* (PDB: 1EP7), tiorredoxina F de cloroplasto de espinaca (PDB: 1F9M), *Trichomonas vaginalis* (PDB: 2F51) y *E. coli* (PDB: 2TRX)] (**Figura 4**). Entre éstas, la tiorredoxina de humano (hTrx) forma un dímero mediante un puente disulfuro a través de una superficie expuesta mediante el residuo Cys-73, independientemente del estado redox del par de cisteínas del sitio activo. Es importante resaltar que la LvTrx cuenta con una cisteína en este mismo lugar. Significativamente, aunque la Cys-73 es reemplazada por el residuo (Ser-74) en la proteína de *D. melanogaster* (DmTrx), la DmTrx es virtualmente idéntica con el dímero de la Trx de humano.

En la tiorredoxina de humano han propuesto que estos dímeros resultan en la inactivación de la tiorredoxina perdiendo la función para actuar como sustrato para la tiorredoxina reductasa cuando ésta es almacenada por un largo periodo de tiempo, sin la presencia de agente reductor. La mutante en el residuo C73S no pierde la capacidad de ser sustrato de la TrxR, sugiriendo que la inactivación fue el resultado de la formación del puente disulfuro entre las Cys-73 de cada monómero [1], [4].

Se ha propuesto que a un pH ácido la dimerización de la Trx de humano se ve favorecida. Al calcular las constantes aparentes de disociación entre la tiorredoxina silvestre y una mutante D60N, se observó que la tendencia de dimerización de la tiorredoxina silvestre se da a un determinado pH (6.5), mientras que en la mutante se mantiene la dimerización casi constante en un rango de pH de 4-8; encontrando de esta manera como posible responsable de este efecto al residuo Asp-60.

Aunque el papel biológico del dímero en la hTrx no ha sido determinado, un número de posibilidades han sido sugeridas. Una de ellas menciona que la formación del dímero resulta en la inactivación de la proteína, resultando en un mecanismo de regulación para la hTrx

como factor de crecimiento. Existe la posibilidad de que el dímero pueda estar involucrado como un sensor del estrés oxidativo, o podría actuar como un mecanismo de protección para el sitio activo de la tiorredoxina durante la secreción [25].

Esta evidencia sugiere que la dimerización de la hTrx puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas, por otra parte, los residuos localizados en la intercara dimérica se encuentran conservados en todas las tiorredoxinas de los vertebrados [26], sugiriendo que la dimerización de alguna forma juega un papel importante en la función.

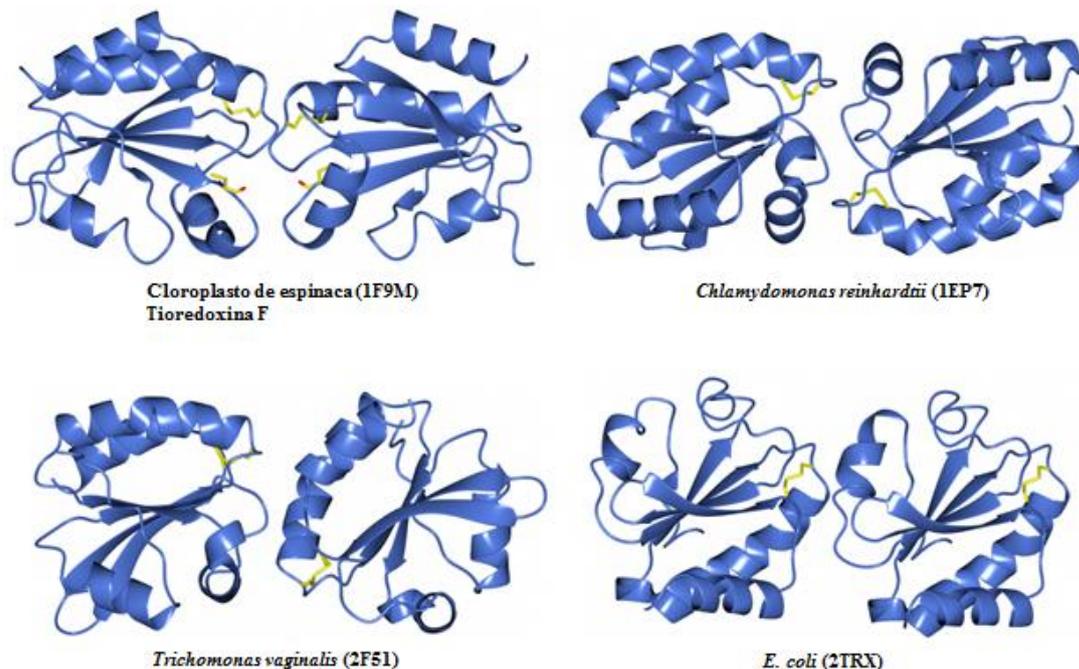


Figura 4. Estructuras de tiorredoxinas que forman un dímero no-covalente en la unida asimétrica, *Chlamydomonas reinhardtii* (PDB: 1EP7), tiorredoxina F de cloroplasto de espinaca (PDB: 1F9M), *Trichomonas vaginalis* (PDB: 2F51) y *E. coli* (PDB: 2TRX).

1.7 RESIDUOS DE CISTEÍNA

Se ha observado que la cisteína es uno de los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas, con un porcentaje menor al 3%. Sin embargo, a pesar de su abundancia relativamente baja, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido (-SH) y diversos estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. Así, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica [27]. Los diferentes estados de oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulf nico (-SOH), el ácido sulf nico (-SO₂H), el ácido sulf nico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). Tanto la oxidación a ácido sulf nico como la que conlleva a la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, son reversibles por agentes reductores, mientras que los otros

dos estados de oxidación, ácidos sulfinico y sulfónico, no pueden ser reducidos a cisteína. El ácido sulfénico es muy inestable y, si no se encuentra en un ambiente apropiado que lo proteja de la oxidación posterior, fácilmente se oxida irreversiblemente a sulfinico o sulfónico, o forma un puente disulfuro si está cerca de otro grupo tiol.

En el sitio activo de algunas enzimas se encuentra un residuo de cisteína altamente reactivo, responsable de la catálisis nucleofílica en la que el sustrato es modificado por la formación de un enlace covalente con la enzima para dar un intermediario reactivo. Los grupos nucleofílicos de las enzimas que comúnmente funcionan en la catálisis covalente son el grupo imidazol de los residuos de histidina, el grupo hidroxilo de los residuos de serina, y el grupo tiol de los residuos de cisteína, que es el nucleófilo más potente de los tres. Enzimas conocidas que usan el grupo tiol de un residuo de cisteína en catálisis nucleofílica son: 1) las aldehído deshidrogenasas, que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos dependiente de NAD(P)^+ ; 2) las tiol proteasas como la papaína y la bromelaína, que prehidrolizan las proteínas y favorecen la digestión de las mismas; las caspasas, proteasas que juegan un papel fundamental en la apoptosis, y las catepsinas, proteasas funcionales en la respuesta inmune; 3) las carbamoil fosfato sintetasas, que producen el carbamoil fosfato utilizado en la síntesis de arginina y pirimidinas en los organismos superiores; 4) las peroxirredoxinas, enzimas que destruyen el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos reduciéndolos a agua o a su correspondiente alcohol, respectivamente, y que por tanto juegan un papel importante en la respuesta de las células al estrés oxidativo; 5) las proteína tirosina fosfatasas, que están involucradas en los mecanismos de transducción de señales; 6) las poliquétidosintasas, que producen una serie de productos naturales que son usados como antibióticos, agentes anticancerígenos, etc. y 7) las tiol: disulfuro oxidorreductasas, como las tiorredoxinas, glutarredoxina, la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR), la NADP^+ -tiorredoxina reductasa (NTR) y la glutatión reductasa (GR), que participan en la regulación de la actividad de muchas proteínas intracelulares manteniendo o recuperando el estado reducido de sus cisteínas [27].

1.8 EFECTOS ESTRUCTURALES CAUSADOS POR EL DAÑO POR RADIACIÓN

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

ve disminuida en gran medida a temperaturas de nitrógeno líquido. Sin embargo, el daño primario no puede ser evitado ya que es un efecto físico que depende directamente de la energía depositada en el cristal. La ruptura de enlaces S-H, O-H, N-H y C-H, así como la formación de especies reactivas tales como los electrones solvatados (e^-_{aq}), $\cdot OH$ y $\cdot H$ dentro de las espuelas [28]. El daño secundario es provocado por dichas especies radiolíticas altamente reactivas, cuyas concentraciones iniciales pueden alcanzar niveles molares, que se difunden a través del cristal, conduciendo a la ruptura de enlaces en la proteína y a la formación de más radicales en una escala de tiempo de microsegundos a milisegundos a temperatura ambiente [29].

Durante un experimento de difracción de rayos X, para la dispersión cinemática, en un cristal típico de proteína de 100 μm de espesor y a una energía de rayos X de 12.7 keV, aproximadamente el 98% de los fotones incidentes pasan a través del cristal sin interacción. Del 2% que tiene interacción, aproximadamente el 84% son absorbidos por efecto fotoeléctrico, mientras que 8% experimentan dispersión elástica y el 8% restante dispersión inelástica. Por lo que en total, menos del 0.2% de los fotones incidentes son difractados por el cristal [30], [31].

La mayoría de los cristales de macromoléculas, que se mantienen a temperatura ambiente durante la recolección de datos pierden su ordenamiento después de solo unos segundos en un haz de rayos X en un sincrotrón de tercera generación. El uso de técnicas criogénicas ha permitido disminuir en gran medida el daño por radiación que sufre una muestra en un experimento completo de recolección de datos permitiendo que una exposición mucho mayor pueda ser tolerada sin afectar severamente la calidad de la difracción. Esto debido a que las temperaturas criogénicas 100 K restringen la difusión de los radicales libres generados por la radiación a través de la red cristalina. Aún a pesar de esta disminución, los efectos de daño se siguen manifestando [32], [33]. En estudios de difracción realizados en un sincrotrón de segunda generación bajo condiciones criogénicas en cristales de TcAChe (acetil colinesterasa de *Torpedo californicus*) y HEWL (lisozima de huevo de gallina) se demostró que se producía la ruptura de los puentes disulfuro Cys-254–Cys-265 en TcACHe y Cys-6–Cys-127 en HEWL, aunque dichas proteínas tienen más puentes disulfuro, los previamente mencionados fueron mucho más sensibles debido a que presentaban mayor accesibilidad al solvente. Además de lo anterior, cuando se analizaron variaciones en los parámetros de dispersión atómica (PDAs) para los distintos aminoácidos, se observó que los que mostraron un mayor incremento además de las cisteínas de los puentes disulfuro, fueron los residuos glutámicos y aspárticos. El incremento en los PDAs puede ser una consecuencia de una movilidad aumentada, o de la descarboxilación, un efecto bastante conocido de la radiación ionizante [34]. Aunque los cambios estructurales que experimenta un cristal son de alguna forma dependientes de su naturaleza, el daño total causado por la radiación en los cristales proteicos criopreservados es correspondiente a la dosis acumulada recibida. En experimentos realizados con cristales de lisozima de huevo a diferentes energías de rayos X, se observaron incrementos en el daño a una mayor intensidad de los rayos X para las variaciones en los PDAs y los valores de $I/(\sigma I)$ a resoluciones constantes. Sin embargo, el experimento demostró que estos daños son dependientes de la dosis cuando se realizó la normalización de los valores obtenidos a diferentes intensidades [35], [36]. Como el daño primario es un efecto físico provocado por el haz de rayos X, no puede ser disminuido a menos que se disminuya la dosis depositada en el cristal. Sin embargo, el daño secundario puede disminuirse mediante la adición de sustancias que protegen a la proteína de los

electrones y las especies radiolíticas producidas como consecuencia del daño primario. Dichos compuestos son los radioprotectores y los *scavengers* (recolectores) de electrones, en experimentos de daño por radiación realizados en lisozima de huevo de gallina a 100 K se demostró la utilidad del ascorbato, 1,4-Benzoquinona y TEMP (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone) en la protección de cisteína (S-H), cistina (S-S) y ácido α lipoico oxidado (S-S), a excepción de TEMP para el ácido α lipoico [37].

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

Varios investigadores han tratado de revelar detalles acerca del proceso de daños por radiación [28], [38] y hasta hace poco el daño por radiación se creía que era un problema no específico. Los informes recientes han dado una mejor comprensión del problema [39] y los estudios acerca del daño por radiación han descrito que el daño es altamente específico, ejemplos previamente mencionados, el de la acetilcolinesterasa (AChE), la lisozima (HEWL) de huevo de gallina, el inhibidor de la quimotripsina [34], [40] y mirosinasa [41]. En estos casos se ha realizado un estudio integral, colectando datos obtenidos del cristal de proteína; entre cada conjunto de datos, los cristales quedaron sin exponer, expuesto al haz atenuado o expuestos a todo el haz monocromático (no atenuado). La comparación de los datos colectados, revelaron la existencia de un incremento en los parámetros de dispersión atómica, un aumento en los parámetros de la celda unitaria, ligera rotación y traslación de moléculas de proteínas, ruptura de puentes disulfuro y la descarboxilación del ácido aspártico y glutámico. Se ha propuesto que estos cambios son iniciados por la formación de radicales libres durante la exposición a los rayos X, y la dosis necesaria para la formación de radicales libres se manifiesta por un desorden progresivo del cristal y por cambios químicos locales en las moléculas de proteína [41]. Además se reportó daño específico (pérdida de densidad electrónica) para los grupos hidroxilo de la tirosina y los grupos metilol de los residuos de metionina.

El rompimiento de enlaces disulfuro inducido por los rayos X, se manifiestan por sí mismo, como la desaparición gradual de la densidad electrónica en las posiciones del enlace en el mapa de densidad $2F_{obs}-F_{calc}$. Se han realizado numerosos estudios a baja resolución en diferentes estados de deterioración del cristal [34], [40]. Por ejemplo, varios investigadores han reportado la aparición de densidad electrónica positiva en el mapa de diferencia $F_{obs}-F_{calc}$ en las inmediaciones del deterioro del enlace disulfuro original. Esta nueva densidad puede ser explicada por la aparición de nuevas conformaciones de residuos de cisteína [41], [42] o por la divergencia de los dos átomos S^y [43], pero no observados en el modelo debido a la relativamente baja resolución. Por otro lado, se han realizado estudios en los cuales se sigue el deterioro de los enlaces disulfuro S^y-S^y a alta resolución [44] usando solo una colecta de datos por cada cristal, la cual no permite seguir los cambios del deterioro inducidos por los rayos X.

2.1 HIPÓTESIS

Experimentos y análisis bioquímico-estructurales de la *LvTrx* permitirán evaluar la posible existencia de una dimerización, así como listar a los residuos involucrados en la misma y proponer sus potenciales implicaciones biológicas.

2.2 OBJETIVOS

- Sobreexpresión de la *LvTrx* en *E. coli*.
- Purificación de la *LvTrx*.

Cristalografía

- Obtener las condiciones óptimas de cristalización.
- Difracción de los cristales.

Obtención de estructura

- Resolver las fases a través del reemplazo molecular.
- Determinar las estructuras de la Trx recombinante en su forma oxidada y reducida.
- Afinamiento de los modelos obtenidos.
- Analizar las alteraciones de los puentes disulfuro a causa del efecto fotoeléctrico en los cristales de *LvTrx*.

Análisis estructural

- Analizar el comportamiento de las poblaciones monómero/dímero de la *LvTrx* en solución a distintas temperaturas y pH, mediante ensayos de filtración en gel y DLS.
- Comparar a nivel de estructura las similitudes y diferencias entre los dímeros de la hTrx y la *LvTrx*

CAPÍTULO 3

SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 TIORREDOXINA RECOMBINANTE DEL CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI* (*LvTrx*)

Previo a este trabajo, en el laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos (CIAD-Hermosillo), se construyó un plásmido recombinante conteniendo la región codificante del cDNA de la tiorredoxina de *Lv*, clonado en el vector de expresión pET-11a (NOVAGEN), conteniendo únicamente la Trx de camarón sin ningún Tag de histidinas o ninguna proteína de fusión, designado Trx-pv. Este, fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* BL21.

Para transformar se descongelaron las células competentes BL21, previamente preparadas, a las cuales se les agregó el DNA, 200 ng superenrollado (aproximadamente 1 μ l), se incubaron en hielo por 30 minutos, posteriormente se les dio un pulso a 42°C durante 1:30 minutos sin agitar, se incubaron nuevamente en hielo por 2 minutos. Finalmente las células fueron resuspendidas en 1ml de LB y se incubaron por 1 hora a 37°C a 250 rpm. Se platearon 100 μ l del cultivo, en una placa de agar utilizando un medio LB suplementado con 200 μ g mL^{-1} de ampicilina a 37°C.

3.2 SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA *LvTrx*

Para realizar el proceso de sobreexpresión se tomó una colonia y se incubó en 40 ml de LB con ampicilina 200 μ g mL^{-1} O/N (12 horas) a 37°C a 250 rpm. Se inoculó 1 L de LB con 10 ml del cultivo O/N y se adicionó 200 μ g mL^{-1} de ampicilina a 37°C en agitación a 250 rpm. La expresión de *LvTrx* se indujo cuando el cultivo descrito en el párrafo anterior alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.6 unidades de absorbancia. El cultivo se indujo con IPTG a una concentración final de 0.4 mM, se incubó a 37°C y se mantuvo en agitación por 5 horas. Las células se cosecharon por centrifugación a 6000 rpm por 20 minutos para recuperar el *pellet* bacteriano. El *pellet* fue re-suspendido en una solución salina 0.9% (9 g. de NaCl por L.), que nuevamente fueron centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos. Cabe señalar que se utiliza una proporción de 20 ml por gramo de *pellet*. Hasta este punto el *pellet* bacteriano puede ser congelado a -80°C.

Se re-suspendieron las células en 50 ml de *buffer* TRIS 100 mM, pH 8.0 y DTT 10 mM y se adicionó una pastilla de inhibidores de proteasa *complete* (Roche). Posteriormente se ‘sonicaron’ las células (3 veces por 1 min c/u con 5 minutos de reposo entre cada pulso (este procedimiento se lleva a cabo en hielo). Después de haber *sonicado*, la muestra se centrifugó

a 13,800 x g por 20 min a 4°C, para eliminar contaminantes celulares. La Trx se localiza en el sobrenadante, (confirmado por SDS-PAGE).

Seguida de la centrifugación, el sobrenadante se sometió a precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio al 50% (**Figura 5**), y el sobrenadante del 50% se llevó a 85% de saturación (la Trx se localiza en el precipitado del 85%).

Amounts of Solid Ammonium Sulfate Required to Change the Concentration
of a Solution from a Given Starting Value to a Desired Target Value at 0°C

Initial percentage saturation at 0°C	Target percentage saturation at 0°C ^a																		
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697		
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662		
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627		
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592		
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557		
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522		
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488		
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453		
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418		
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383		
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348		
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313		
60										31	62	95	129	164	201	239	279		
65											31	63	97	132	168	205	244		
70												32	65	99	134	171	209		
75													32	66	101	137	174		
80														33	67	103	139		
85															34	68	105		
90																34	70		
95																	35		

^ag of solid ammonium sulfate/L of solution

Figura 5. Tabla de saturación de sulfato de amonio en el libro '*Biochemical calculations*' de Segel.

Posteriormente el precipitado proteico del 85% de sulfato de amonio se disolvió en 20 ml de *buffer* TRIS 10 mM, pH 7.5, DTT 10 mM, y se calentó en un *baño maría* a 70°C durante 20 min para precipitar las proteínas termolábiles de *E. coli*. Se clarificó por centrifugación a 13,800 x g por 20 minutos y se desechó el *pellet* (confirmado por SDS-PAGE). El sobrenadante se dializó contra 2 L de TRIS 10 mM, pH 7.5 por 5 horas, para obtener la LvTrx.

La purificación de la LvTrx recombinante se realizó mediante una columna de intercambio iónico, (Q-Sepharose™ GE Healthcare, Suecia) pre-equilibrada con *buffer* TRIS 10 mM, pH 7.5 utilizando un cromatógrafo Bio-Rad (*Standard BioLogic LP System*). Se dejaron pasar tres volúmenes de columna de la solución amortiguadora, la muestra clarificada y equilibrada se cargó en una columna conteniendo 15 ml de matriz y la LvTrx se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-1 M o se le puede aplicar un pulso de 300 mM de NaCl en la solución amortiguadora de equilibrio a un flujo de 1 ml min⁻¹. Las fracciones colectadas se analizaron a 280 nm, posteriormente el pico correspondiente a la LvTrx se concentró por ultrafiltración (Amicon Ultra-3, Millipore) con una membrana de corte de 3 kDa y se inyectó en una columna de exclusión molecular (Superdex 75) pre-equilibrada con TRIS 10 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM. La LvTrx se eluyó con un flujo de 2.5 ml min⁻¹.

Después de cada cromatografía se realizaron electroforesis desnaturizantes (SDS-PAGE) al 15% para detectar el pico correspondiente a la LvTrx. En todos los casos los geles fueron teñidos con azul de *Coomassie* (Sigma). La proteína fue cuantificada por el método de Bradford.

3.2.1 PURIFICACIÓN DE LA LvTrx SIN DTT

Para llevar a cabo la purificación de la LvTrx sin DTT, básicamente se realizaron los mismos pasos del protocolo mencionado. La diferencia es que en ningún paso de la purificación se le agrega DTT. La muestra se dializó en un *buffer* TRIS 10 mM pH 7.5 y se pasó por una resina de intercambio aniónico (Q-Sepharose) en un *buffer* TRIS 10 mM pH 7.5, la proteína se eluyó como se mencionó anteriormente. Una vez colectadas las fracciones, se analizaron mediante un gel SDS-PAGE para analizar la presencia de la LvTrx; una vez comprobado esto, la muestra se dializó en un *buffer* Acetato de sodio 10 mM pH 3.8 y se volvió a pasar por la resina de intercambio aniónico (Q-Sepharose), obteniendo de este modo la proteína pura sin la presencia de agente reductor. En resumen para obtener la purificación de la LvTrx recombinante se necesita seguir los mismos pasos de purificación sin DTT y se requiere de un cambio de pH (llevar la muestra de un pH alcalino a un pH ácido) es importante mencionar que la LvTrx es una proteína estable a altas temperaturas y distintos pH, sólo que a un pH ácido no puede ser almacenada por periodos largos de tiempo.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA LvTrx

El método de Bradford se basa en la unión de un colorante a las proteínas, *Coomassie Blue G-250* (también *Serva Blue*). Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. El complejo se mide por la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas. Para determinar la concentración de proteína total presente en la muestra se requiere la preparación de una curva de calibración empleando una proteína patrón, en este caso se utilizó la proteína albúmina sérica bovina. Posteriormente ya teniendo la LvTrx concentrada, se prepararon tres diluciones, que contenían 799 µl de H₂O más 1 µl de la solución de LvTrx purificada, Después se le agregaron 200 µl de colorante Bio-Rad (número de catálogo 500-0006), se agitó cada tubo en un *vortex* y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. La absorbancia incrementa con el tiempo, por lo que, las muestras deben de incubarse a temperatura ambiente no más de una hora. Después de la incubación se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro Helios Gamma UV-Visible (Thermo).

3.4 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DE LA LvTrx

Se determinó el punto isoeléctrico de la LvTrx utilizando un gel de gradiente de pH previamente hidratado *phastgel* (Amersham biosciences) que cubre un intervalo de pH de 3-9 y se utilizó una corriente eléctrica entre 75-500 A en un equipo *Phastsystem* (Pharmacia). El gel se reveló con azul de *Coomassie* (Sigma).

3.5 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE Trx-INSULINA

3.5.1 GENERALIDADES

La Trx es una proteína que pertenece a la familia de las oxidoreductasas. Tras ser reducida por la tiorredoxina reductasa (dependiente de NADPH) es capaz de reducir grupos cisteína oxidados en otras proteínas [45]. Como se muestra en el presente ensayo, la tiorredoxina también puede ser reducida por agentes químicos.

El proceso de ensayo fue desarrollado por Arne Holmgren en 1979 y se siguió con ligeras modificaciones. En él, se mide espectroscópicamente la turbidez de una disolución de insulina como función del tiempo a la vez que la tiorredoxina reduce los puentes disulfuro de acuerdo con el siguiente esquema de reacción (**Figura 6**).

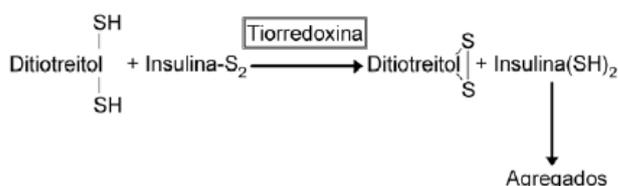


Figura 6. Esquema de la reducción de la insulina por DTT catalizada por la Trx. La posterior agregación provoca un aumento de la absorbancia a 650 nm. (Holmgren, 1979).

La insulina es una proteína compuesta de dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas entre sí por dos enlaces disulfuro. Tras la reducción por parte de la Trx los enlaces disulfuro se vuelven a formar de modo aleatorio entre las distintas cadenas, de modo que se van produciendo agregados de insulina. Cuando estos agregados llegan a tener un tamaño considerable comienzan a dispersar la luz, lo cual resulta en el aumento de la absorbancia a 650 nm.

La actividad de la Trx está relacionada con la velocidad a la cual se agrega la insulina. El parámetro más útil para caracterizar la actividad es la velocidad máxima a la cual se agrega la insulina para una concentración de Trx dada, si bien también es posible utilizar como parámetro el tiempo transcurrido hasta que se hace aparente la agregación (*lag time*).

3.5.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

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

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

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

Para los demás reactivos se necesitó preparar un *buffer* de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0 a $25^{\circ}C$ (llevarla a 100 ml usando agua desionizada, usando fosfato de sodio, monobásico, monohidratado, ACS, *Research Organics*. Se ajustó a pH 7.0 a $25^{\circ}C$ con NaOH 1M). Una solución de ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) 100 mM (llevarla a 10 ml con agua desionizada, usando EDTA, sal disódica, dihidratado, *Research Organics*. Por último se preparó una solución de Ditiotreitól (DTT) 10 mM (se preparó 1 ml en agua desionizada, *sigma products*).

Una vez que se tuvieron los reactivos preparados, se conservaron en hielo. Se termoestabilizan las cubetas en el espectrofotómetro y se selecciona la longitud de onda medida (650 nm). En cada una de las cubetas se mezclaron los siguientes reactivos en las cantidades y ordenes siguientes:

- 770 μ l de *buffer* fosfato de potasio 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 7.0
- 50 μ l de insulina 10 $mg mL^{-1}$
- 170 μ l de tiorredoxina en TRIS-HCl 10 mM, pH 7.5
- 10 μ l de DTT 0.1 M

Posteriormente se mezcló con una pipeta Pasteur y se inició la medición. Si nuestra intención es medir la fase inicial, la medición inicia en el momento de añadir DTT, en caso contrario solo es necesario no demorarse más allá de 2 minutos antes de iniciar la medición. La actividad específica se expresó como: $\Delta_{650nm} / (mg LvTrx) (min)$.

Los principales factores a tener en cuenta a la hora de realizar el experimento fueron:

- Medir la absorbancia en un espectrofotómetro en función del tiempo a una longitud de onda de 650 nm durante 40 minutos.
- Control preciso de la temperatura a la cual se desarrolla el experimento ($37^{\circ}C$).
- La concentración final del DTT debe ser 1 mM. Las medidas de actividad varían fuertemente con la concentración de este reactivo, dado que es el encargado de reducir en un primer momento a la Trx. Este reactivo se tiene que preparar en fresco dado que se degrada fácilmente.
- La concentración de nuestro stock de insulina debe ser 10 $mg mL^{-1}$. De esta concentración depende la amplitud de la cinética, y variaciones en esta amplitud afectan a la velocidad.

- El *buffer* de reacción es fosfato de potasio 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 7.0. Hay que tener en cuenta que los valores de actividad dependen fuertemente del pH.
- La variación de la velocidad máxima de agregación con la concentración de la Trx es solo lineal dentro de un rango. Cuando la velocidad es superior a 0.2-0.25 U.A./min se pierde la linealidad con la concentración. Por ello es mejor trabajar con muestras de proteína hasta 3 μM (0.035 mg mL⁻¹) final.

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

3.6 CRISTALIZACIÓN DE LA LvTrx

Las pruebas de cristalización se realizaron con el método de *microbatch*, en la cual la solución de la proteína se coloca en una solución de pH fijo y concentración de precipitante; como el precipitante se difunde en la proteína, se reduce la solubilidad de la proteína y pueden formar cristales. Para ello se utilizaron dos *Kits* de Hampton Research (*Crystal Screen I/Crystal Screen II*). Como primer acercamiento a la cristalogénesis de la LvTrx, se obtuvieron cristales de la LvTrx después de 1 mes aproximadamente. Una vez teniendo las condiciones iniciales de cristalización, se utilizó el método de difusión de vapor (gota colgante), para poder lograr crecer cristales más grandes y con mejor hábito cristalino.

3.7 CRISTALOGRAFÍA

Los primeros patrones de difracción o datos de difracción se obtuvieron del cristal que tenía DTT durante toda la purificación, gracias al tiempo proporcionado por la Dra. Adela Rodríguez Romero en el laboratorio de estructura de proteínas del LANEM, en el Instituto de Química de la UNAM, el 12 de agosto de 2011, en un ánodo rotatorio Rigaku micromax-007 HF, a una longitud de onda de 1.5418 Å, el tipo de detector utilizado fue un image plate (RAXIS-IV++) con un rango de oscilación $\Delta\phi$ de 0.5 a una temperatura de 100 K y el criopreservador empleado contenía 30% v/v glicerol.

En este mismo ánodo rotatorio se obtuvieron nuevos datos de difracción el 19 de octubre de 2011. Se utilizó el mismo criopreservador y se colectó un *data set* a una longitud de onda de 1.54 Å, este cristal no contenía DTT más que en el primer paso de purificación.

Posteriormente, se obtuvieron más datos de difracción, el 2 de diciembre de 2011 a partir de dos cristales, en la línea X6A del *National Synchrotron Light Source* (Upton, New York). Los datos fueron colectados utilizando un detector ADSC Quantum 210 y el criopreservador empleado contenía 30% v/v glicerol. Uno de los cristales no tuvo contacto con DTT ni con algún otro agente reductor durante la purificación, mientras que al otro cristal se le aplicó directamente a la gota de cristalización una concentración de 5 mM de DTT.

La determinación del grupo espacial, la estimación del mosaicismo, el indexado y la integración de los datos se realizó con el programa XDS [46]. El ordenamiento y escalado de los datos se realizó en SCALA [47]. El problema de las fases para la LvTrx fue resuelto en Phaser [48], por medio de reemplazo molecular (utilizando la tiorredoxina de *Drosophila melanogaster* [14]; código PDB (1XWA) con un 60% de identidad de secuencia. El afinamiento de cuerpos rígidos y restricción geométrica se realizó en Refmac [49]. Todos los programas anteriores a excepción de XDS pertenecen y trabajan bajo la suite CCP4 versión 6.2.0 (*Collaborative Computational Project, Number 4*, 1994). La construcción del modelo y el afinamiento final del mismo se realizó con los programas PHENIX [50] y Coot [51].

3.8 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNA (Id) DE LA LvTrx

En el laboratorio universitario de proteómica del instituto de biotecnología, UNAM, se realizó la identificación de la tiorredoxina de camarón blanco LvTrx.

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida y digerida “in gel” con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes mejores que 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75 μm ID \times 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (*Collision-Induced Dissociation*) y HCD (*High energy Collision Dissociation*) donde solamente los iones con carga 2^+ y 3^+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1^+ , superiores a 4^+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones segundo las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI a través del programa ProteinProspector.

La identificación de proteínas por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem) es la tecnología más confiable para identificar proteínas de forma inequívoca. Debido a que los fragmentos peptídicos (digestión enzimática de la proteína) pueden ser fragmentados por diferentes

métodos, se obtienen partes de la secuencia de la proteína. Al someter los espectros de fragmentación o las secuencias de estos péptidos a los bancos de datos se obtiene la identificación de una determinada proteína de forma muy segura. El análisis incluye la remoción de la banda de interés del gel de una o dos dimensiones, digestión enzimática “in gel”, extracción de los péptidos, desalado a través de *ZipTips*, análisis espectrométrico por LC-MS/MS, identificación de la proteína y reporte completo de los resultados.

3.9 ENSAYO DE FILTRACIÓN EN GEL

La filtración en gel FPLC fue utilizada para estimar la formación del equilibrio monómero/dímero en solución como lo han reportado anteriormente [1].

Se utilizó la *LvTrx* a una concentración de 14.5 mg mL^{-1} descrita en la sección 3.2, sin la presencia de DTT en una resina Superdex 75. Se utilizaron dos muestras a distinto pH, para observar la presencia de la población dimérica en solución, que fueron diluidas usando dos *Buffers*. El primero fue TRIS-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM y el otro *Buffer* fue acetato de sodio 50 mM pH 3.8, NaCl 50 mM . Cabe mencionar que se eligieron estos dos pH, debido a que pH 7.5 la proteína es muy estable y a pH 3.8 debido a que son las condiciones óptimas para cristalización de la proteína, además de que reportes anteriores hacen mención que a valores de pH ácido favorecen la formación dimérica en la Trx de humano. Todas las muestras se llevaron a un volumen final de $300 \mu\text{l}$ (pH 7.5) y $300 \mu\text{l}$ (pH 3.8) y se inyectaron en un *loop* de $500 \mu\text{l}$ dentro de la columna que contiene una resina de filtración en gel Superdex 75 HR 10/30 que fue previamente equilibrada a pH de interés. La columna se corrió con un flujo de 0.5 ml min^{-1} , y el tiempo de retención de los picos se determinó usando un detector UV a 280 nm.

3.10 ESTUDIOS DE DLS (Dispersión dinámica de luz)

En esta técnica, un equipo de DLS irradia una solución de moléculas de proteína con un haz monocromático de luz y analiza las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por las proteínas en solución (analito) en función del tiempo (**Figura 7**). El equipo también permite analizar la estabilidad del analito en función de la temperatura. De esta manera el DLS proporciona información acerca del diámetro hidrodinámico de la proteína, pudiéndose observar la monodispersidad de la muestra (esto es, que existan en solución partículas de tamaño uniforme) o la formación de agregados de proteína.

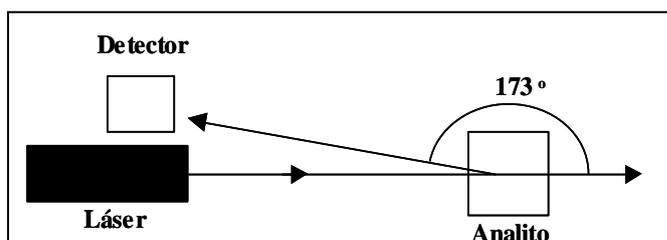


Figura 7. Representación esquemática de los componentes básicos de un equipo de DLS.

Las variaciones en el campo eléctrico total de dispersión se deben al movimiento browniano y a la difusión traslacional de las proteínas dispersantes en solución. De esta manera se correlacionan los distintos campos eléctricos dispersados por las proteínas en solución en una escala de tiempo y se construye una función de correlación.

En términos generales, en el equipo de DLS se encuentra un componente llamado *correlator*, el cual mide el grado de similitud entre dos señales en un periodo de tiempo. Si se compara la intensidad de la señal para una proteína en solución en un tiempo (t) con otra señal para la misma proteína en un periodo de tiempo posterior muy pequeño ($t + \delta t$) se puede observar que las dos señales son muy similares. En un tiempo posterior ($t + 2\delta t$) la señal no será tan similar como la señal en el tiempo ($t + \delta t$) porque la molécula de proteína se movió un poco. De esta manera, la correlación entre las distintas señales para la misma proteína (o agregados) se reducirá con el tiempo y finalmente llegará a cero. Debido al movimiento Browniano, la velocidad de decaimiento de la función de correlación está relacionada con el tamaño de la partícula, así, la velocidad de decaimiento es mucho mayor para partículas pequeñas que para partículas grandes porque las partículas pequeñas se mueven más rápido que las grandes (**Figura 8**).

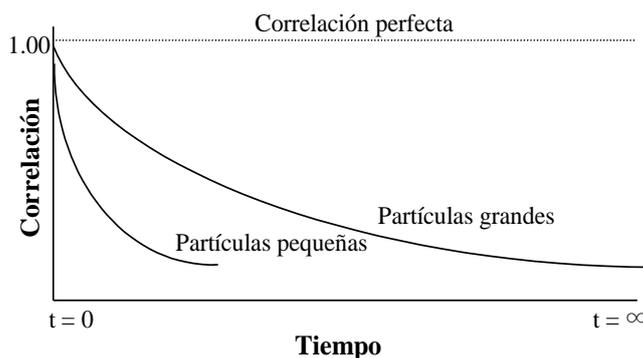


Figura 8. Función de correlación para partículas grandes y pequeñas en una medición de dls.

Después de que la función de correlación se mide, los algoritmos del *software* calculan el coeficiente de difusión traslacional (D) de la proteína (o agregados de proteína). De esta manera, el diámetro hidrodinámico (d_H) de la proteína puede ser calculado por medio de la ecuación de Stokes-Einstein (**Ec. 1**):

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde:

d_H : Diámetro hidrodinámico

k : Constante de Boltzmann

η : Viscosidad del solvente

T : Temperatura absoluta

En este experimento se probaron 6 condiciones a dos pH (TRIS 10 mM, pH 7.5/Acetato de sodio 10 mM, pH 3.8), distintas concentraciones de DTT, sin agente reductor y a distintas temperaturas (4°, 18°, 25°, 37°C). Cada muestra en cada condición fue medida 35 veces por triplicado.

La concentración de la LvTrx para este experimento fue de 1 mg mL⁻¹, cada muestra fue filtrada en filtros MILLIPORE de 0,22 μm; de ellos, para cada muestra se tomaron 100 μl y fueron puestos en una celda de cuarzo para ser medidos en un dispersor Zetasizer nano para proteínas, proporcionado por el Dr. Abel Moreno Cárcamo del Instituto de Química, UNAM.

3.11 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GRUPOS SULFIDRIL (-SH)

Los grupos sulfidrilo-disulfuro son de gran importancia estructural, funcional y biológica para las proteínas. Por ejemplo, el grupo sulfidrilo de la Cys es esencial para la actividad catalítica de algunas enzimas mencionadas en apartados anteriores y en la inter-conversión de Cys SH a Cys S-S. La conformación de muchas proteínas es estabilizada por la presencia de puentes disulfuro y la formación de estas uniones son una importante modificación postraduccional de algunas proteínas.

El reactivo de Ellman 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) fue utilizado por primera vez en el año de 1959, para la estimación de grupos tiol libres. El procedimiento está basado en la reacción del tiol con DTNB para dar una mezcla de disulfuro y 2-nitro-5-ácido tiobenzoico (TNB) que es cuantificado por la absorbancia del anión (TNB²⁻) a 412 nm (Figura 9).

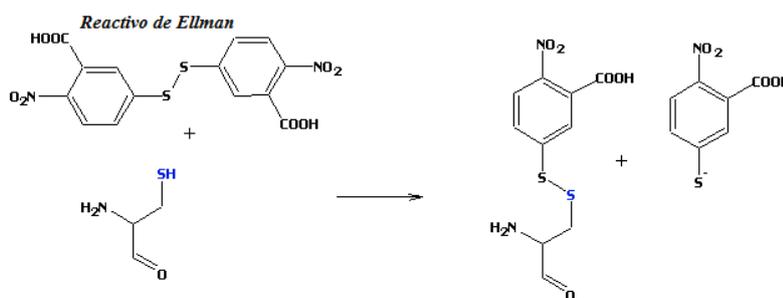


Figura 9. Reactivo de Ellman. Este rápidamente forma un puente disulfuro con el grupo tiol del residuo y libera un ion tiolato que se ilustra en color azul. La máxima absorción de este tiolato es a 412 nm. Modificado de Ellman, G.L, 1959.

Para realizar la cuantificación de cisteínas libres se requieren preparar ciertos reactivos descritos a continuación.

Se preparó una solución *stock* de DTNB y un *buffer* de TRIS; la solución de DTNB está constituida por una solución de acetato de sodio (NaAc) 50 mM, DTNB 2 mM en agua y se preparó una solución TRIS 1 M pH 8.0, que se mantuvo en refrigeración. Posteriormente se preparó eventualmente una curva de calibración estándar SH (acetil cisteína), comenzando con el reactivo DTNB por muestra agregándole 1 μl de solución DTNB, 150 μl de proteína y 849 μl de *buffer* TRIS pH 8.0, para obtener un volumen final de 1000 μl. Se mezcló la

solución cuidadosamente y fue puesta en una cubeta de cuarzo para poder medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 412 nm y se calculó el contenido de SH. Para preparar el blanco se substituyó la cantidad de DTNB por *buffer*.

CAPÍTULO 4

R RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA LvTrx RECOMBINANTE

La metodología que se utilizó para la sobreexpresión y purificación de la LvTrx consistió en algunas modificaciones del protocolo descrito por Emmanuel Aispuro H. [52], con el objetivo de tener una proteína con alto porcentaje de pureza. Se obtuvo un rendimiento final de 5.3 mg de LvTrx por litro de cultivo. En un análisis por electroforesis en gel SDS-PAGE, después de los pasos descritos en la metodología junto con una cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose), se observó la completa eliminación de contaminantes en la LvTrx. Cabe mencionar que en las primeras purificaciones obtenidas se tenían que realizar 4 pasos de purificación utilizando dos pasos en una resina de intercambio aniónico (Q-Sepharose) y dos pasos más en una resina de exclusión molecular (Superdex-75) obteniendo un rendimiento $\sim 3.1 \text{ mg mL}^{-1}$ y con una proporción minoritaria pero inadecuada de contaminantes para llevar a cabo las pruebas de cristalización. Con la optimización se realizó un solo paso de purificación por una resina de intercambio aniónico (Q-Sepharose), la diferencia fue la adición de DTT a una concentración 10 mM obteniendo un rendimiento total por litro de cultivo de $\sim 5.3 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 10 a-b).

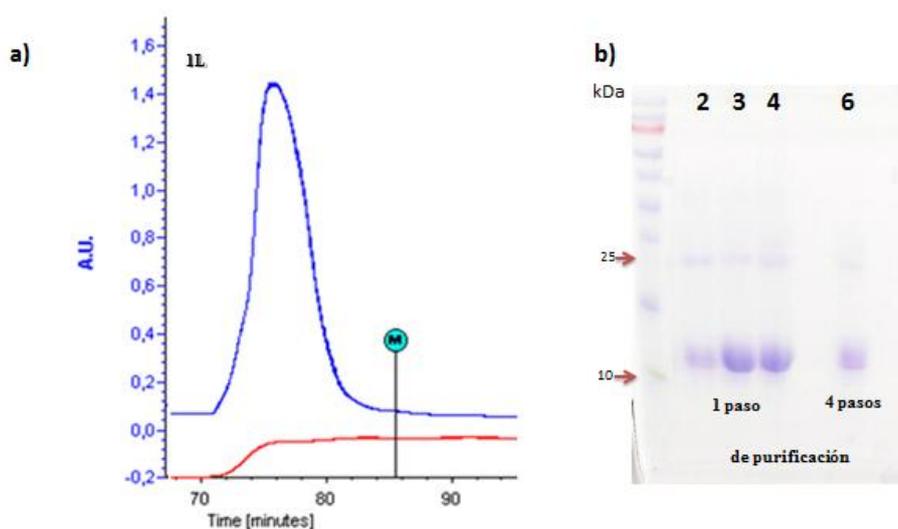


Figura 10. a) Cromatografía del extracto bacteriano después de la columna de intercambio aniónico (Q-sepharose). b) SDS-PAGE 15%. Carriles 2-4 se muestra tres lotes de purificación de proteína de LvTrx, observando la eliminación de contaminantes con solo un paso de purificación; carril 6 se muestra la comparación de la primera purificación a través de 4 pasos. Carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (*Fermentas Page Ruler prestained protein ladder*).

4.1.2 PURIFICACIÓN DE LA LvTrx RECOMBINANTE SIN DTT

Como se mencionó en la sección de métodos, se realizó la purificación de la LvTrx sin la presencia de DTT, esto con el fin de obtener el sitio catalítico completamente oxidado, para tratar de analizar el efecto directo que tienen los daños por radiación causado por los rayos X que interaccionan con el cristal de la LvTrx.

Los resultados obtenidos de esta purificación constan de dos pasos y principalmente el éxito de este protocolo debió a una variación de pH (**Figura 11**).

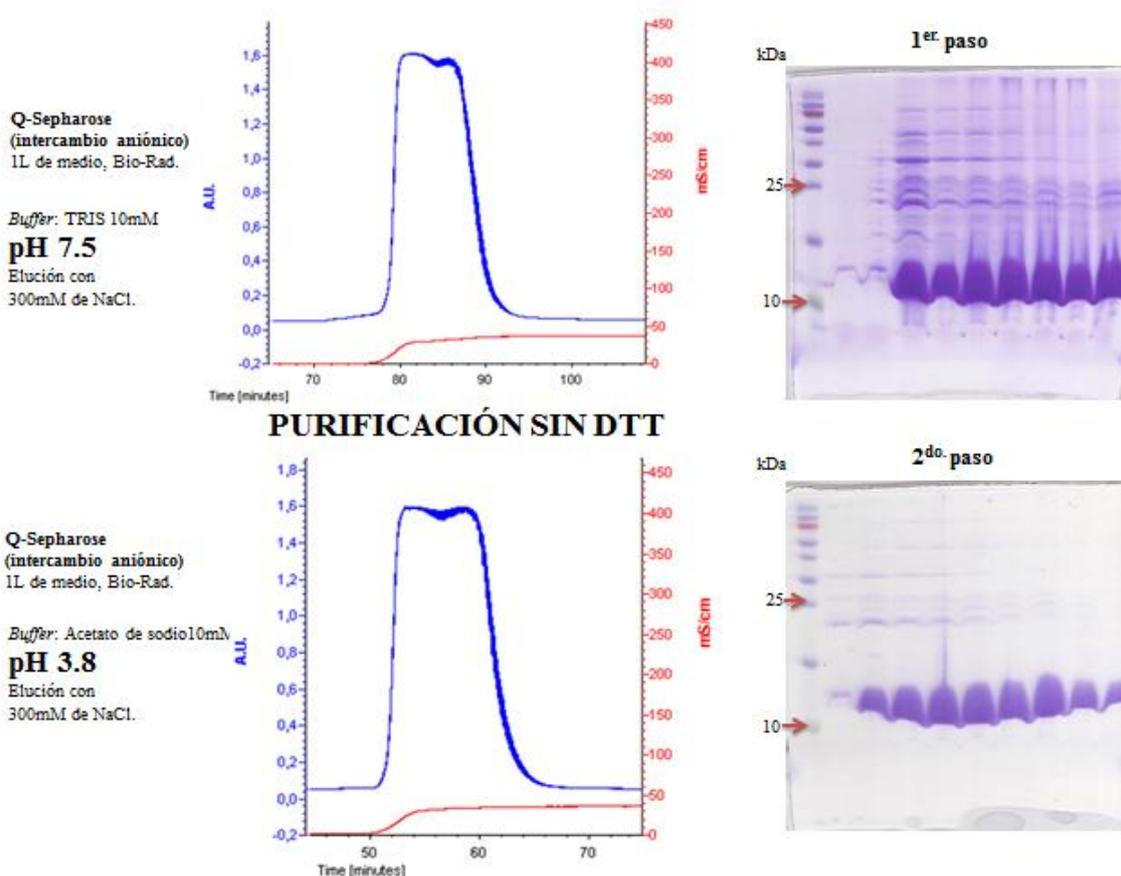


Figura 11. Purificación de la LvTrx sin la presencia de DTT, mostrando dos pasos de purificación y en cada uno de ellos se estableció una variación de pH.

4.2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

Se determinó el punto isoeléctrico de la *LvTrx* utilizando un gel previamente hidratado *phastgel* (*Amersham bioscience*) con un intervalo de 3-9 y corriente eléctrica entre 75-500 A. El punto isoeléctrico real determinado por el gel de isoelectroenfoque es de 4.2 (**Figura 12**). La concentración de la muestra fue de 1 mg mL^{-1} .

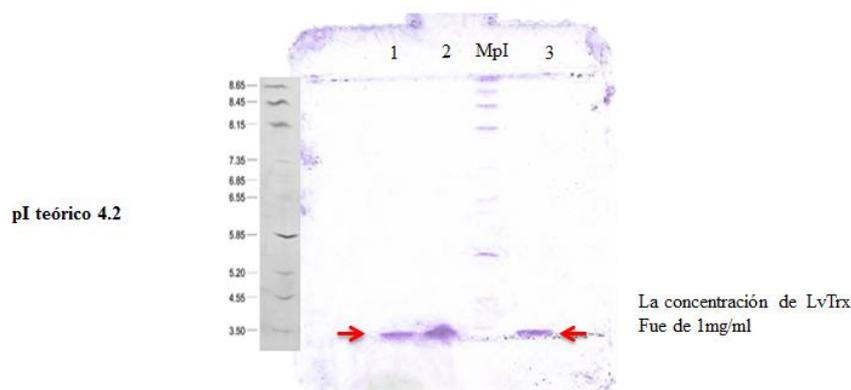


Figura12. Gel de isoelectroenfoque, carril 1, 2 y 3 corresponden a la *LvTrx*, carril intermedio: marcador de pI.

Para comprobar que este punto isoeléctrico correspondía a la de la proteína *LvTrx* y no a otra *Trx* se identificó la proteína por LC-MS/MS, en los cuales se confirmó la identidad de la proteína de estudio.

4.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA Trx-INSULINA

La actividad específica de la *LvTrx* recombinante se midió haciendo modificaciones a los métodos reportados por Holmgren 1979. La reacción se llevó a cabo a 37°C e inició al agregarle la *LvTrx* recombinante pura. El incremento de la turbidez causada por la insolubilización de las cadenas de la insulina reducida se leyó por triplicado a 650 nm durante 40 min en un espectrofotómetro. La proteína purificada presentó actividad reductora de disulfuros de insulina (**Figura 13**). La capacidad de reducir los puentes disulfuro de proteínas es una característica de las tiorredoxinas, por tanto este ensayo permitió identificar la agregación de las cadenas de insulina midiendo a 650 nm durante 40 min. y con base a la pendiente más alta de la curva se calculó la actividad específica por miligramo de proteína por minuto, consiguiendo datos similares a los obtenidos por nuestros colaboradores.

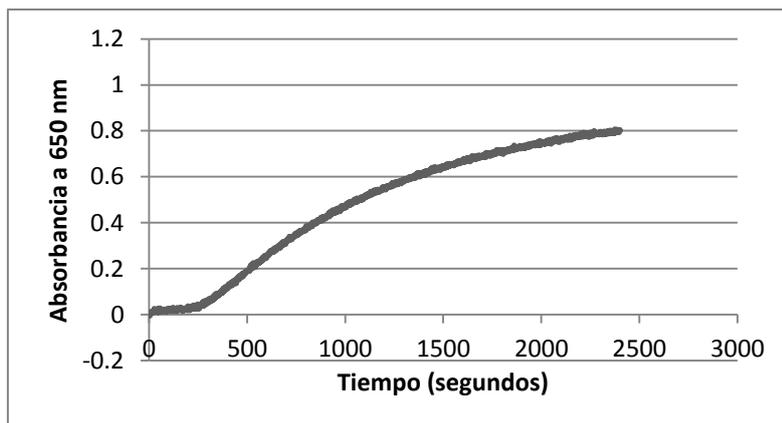


Figura 13. Actividad de la tiorredoxina evaluada por el método de reducción de disulfuros de insulina.

La actividad específica de la LvTrx recombinante es de $8.34 \Delta A_{650} \text{nm/mg min}$. Este valor es del mismo orden de magnitud que la Trx de *E. coli* (4.93), timo de ternera (6.50) e hígado de ternera (5.09) (Holmgren, 1979), y casi el triple que la Trx de *T. brucei*.

Por tanto para futuras mediciones de actividad de Trx, se recomienda utilizar el ensayo de reducción por la tiorredoxina reductasa en presencia de NADH. En este ensayo la TrxR utiliza a la Trx como sustrato específico, y la actividad total puede ser medida en base a la oxidación del NADH/min.

4.4 CRISTALIZACIÓN DE LA LvTrx

Se realizaron las primeras pruebas de cristalización por el método de *microbatch*, utilizando dos *Kits Crystal screen I y II (Hampton Research)*, con un total de 98 pruebas 1:1 de proteína con distintas condiciones. La proteína se llevó a una concentración de 30 mg mL^{-1} . En el *Kit Crystal screen I* se pusieron 50 pruebas (30 mg mL^{-1} en TRIS 10mM pH 7.5 T: 18°C), mientras que el *Kit Crystal screen II* se pusieron 48 pruebas (30 mg mL^{-1} en TRIS 10mM, pH 7.5T: 18°C). Después de analizar las gotas, se observaron en una proporción menor al 10% total de las pruebas realizadas un precipitado, mientras que en otras condiciones no se observó cristalización, a excepción de las condiciones **20** y **47** del *Kit Crystal screen I* y del *Kit Crystal screen II*, se encontraron cristales en las condiciones **14**, **15**, **21** y **28**. En general los cristales encontrados en estas condiciones eran muy pequeños a excepción de la condición **47** (Acetato de sodio trihidratado 0.1 M, pH 4.6, Sulfato de amonio 2.0 M), creciendo en un tiempo aproximado de un mes. Esta condición mostraba un agregado cristalino y con un hábito cristalino mejor que las condiciones mencionadas (**Figura 14**).

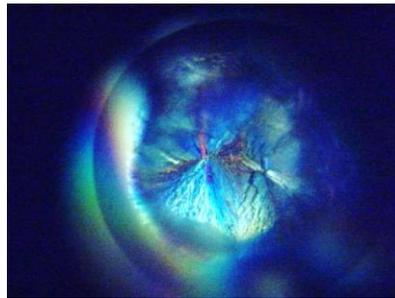


Figura 14. Agregado cristalino, encontrado en la condición 47 del *kit crystal screen I* (acetato de sodio trihidratado 0.1 M pH 4.6, sulfato de amonio 2.0 M) utilizando la técnica de *microbatch* a 18°C.

Una vez que se obtuvieron las mejores condiciones de cristalización para la LvTrx, Se realizaron diferentes matrices por el método de difusión de vapor (gota colgante), variando tanto la concentración de Sulfato de amonio (0.5 M, 1 M, 1.5 M, 2 M, 2.5 M), como el pH del *buffer* acetato de sodio (pH 4-5.5), la concentración de la proteína (30 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹ y 6 mg mL⁻¹) y distintas temperaturas (4° y 18°C). El volumen dentro del reservorio en gota colgante fue de 1 ml. Después del proceso de optimización se obtuvieron los mejores cristales en la condición inicial, solo la concentración de proteína fue de 6 mg mL⁻¹ a 18°C. El tiempo de cristalización se optimizó de 1 mes a 2 semanas aproximadamente. Todas las gotas tuvieron un volumen final de 2 µl, con proporción de proteína/solución del reservorio 1:1 utilizando agua tetradestilada.

Con las condiciones ya estandarizadas, se consiguió obtener cristales que tuvieron contacto con el DTT durante toda la purificación a una concentración de 10 mM, cristales con proteína que estuvo en contacto con DTT solo en el primer paso de purificación, cristales con 5 mM de DTT puesta directamente en la gota de cristalización y cristales sin DTT durante toda la purificación.

Las 2 condiciones más exitosas fueron: 30 mg mL⁻¹, TRIS 10 mM pH 7.5 (Sulfato de amonio 0.5 M, Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6) (**Figura 15a**) y 6 mg mL⁻¹, TRIS 10 mM pH 7.5 (Sulfato de amonio 2.0 M, Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6) crecidos a 18°C (**Figura 15b**).

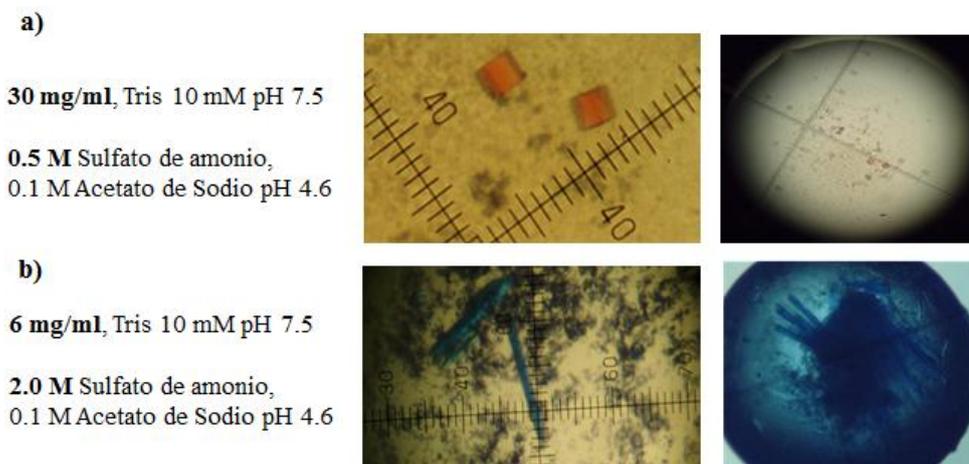


Figura 15. a) Cristales de LvTrx a 30 mg mL⁻¹, TRIS 10 mM pH 7.5 (sulfato de amonio 0.5 M, acetato de sodio 0.1 M pH 4.6) y b) Cristales de LvTrx a 6 mg mL⁻¹, TRIS 10 mM pH 7.5 (sulfato de amonio 2.0 M, acetato de sodio 0.1 M pH 4.6) a 18°C.

Los cristales mostrados en la figura 15, en particular los que crecieron a una concentración de 30 mg mL^{-1} con sulfato de amonio 0.5 M , presentan un color naranja, que aún no sea podido dar una explicación clara de porqué esa coloración; mientras que la otra condición a 6 mg mL^{-1} con sulfato de amonio 2.0 M , el cristal esta coloreado con *izit* para asegurar que se trataban de cristales de proteína y no de sal, este cristal fue el primero en ser difractado.

Posteriormente se obtuvieron cristales, en condiciones que el DTT fue aplicado directamente a la gota de cristalización a una concentración de 5 mM , las condiciones de cristalización se mantuvieron y la concentración de la proteína fue de 6 mg mL^{-1} , acetato de sodio 10 mM pH 3.8 (Sulfato de amonio 2.0 M , Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6). Estos cristales fueron crecidos con la finalidad de ver si existía la posibilidad de romper el puente disulfuro (Cys-73) inter-monómero, discutida en un apartado posterior (**Figura 16**).

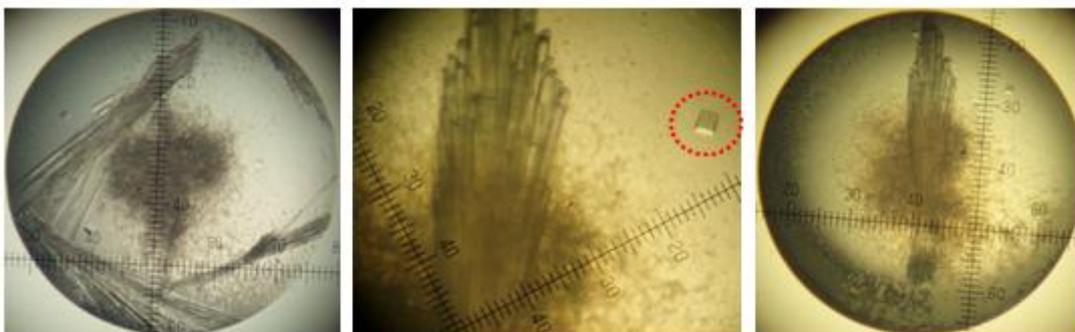


Figura 16. Cristales crecidos a una concentración de *LvTrx* de 6 mg mL^{-1} , acetato de sodio 10 mM pH3.8 (sulfato de amonio 2.0 M , acetato de sodio 0.1 M pH 4.6) adicionando una concentración de 5 mM de DTT directamente a la gota de cristalización a 18°C , el círculo rojo indica el cristal que se tomó para ser difractado.

También al tener la proteína pura en ausencia de DTT, se decidió realizar pruebas de cristalización utilizando una concentración de *LvTrx* de 6 mg mL^{-1} , acetato de sodio 10 mM pH 3.8 (Sulfato de amonio 2.0 M , Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.6). De igual forma el crecimiento aproximado de estos cristales fue de dos semanas (**Figura 17**). De estos cristales obtenidos uno de ellos señalado en círculo rojo fue el segundo cristal difractado.



Figura 17. Cristales crecidos a una concentración de *LvTrx* de 6 mg mL^{-1} , acetato de sodio 10 mM pH 3.8 (sulfato de amonio 2.0 M , acetato de sodio 0.1 M pH 4.6) en ausencia de DTT a 18°C , el círculo rojo indica el cristal que se tomó para ser difractado.

4.5 CRISTALOGRAFÍA

En la siguiente tabla se resumen los *data sets* colectados en el ánodo rotatorio para la LvTrx el 12 de agosto de 2011. El criopreservador utilizado fue glicerol 30% v/v. El cristal difractó a 2.0 Å, con 100 *frames* ($\Delta\phi = 0.5$) 1 *data set*. Se determinó la primera estructura tridimensional por difracción de rayos X de la LvTrx a 1.88 Å resolución. El sistema cristalino fue romboédrico y el grupo espacial P3₂12, con parámetros de celda unidad de $a = 57.8$, $b = 57.8$, $c = 118.1$; $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$. El coeficiente de Matthews demuestra la presencia de un dímero en la unidad asimétrica (**Tabla 1**) y el patrón de difracción junto con el cristal que se utilizó para este experimento se muestra en la **Figura 18**.

Parámetros	LvTrx
Código PDB	3ZZX
Colecta de datos	
Grupo espacial	P3 ₂ 12
Celda unidad	
a, b, c (Å)	57.831, 57.831,
α, β, γ (°)	118.182
	90.0, 90.0, 120.0
Rango de resolución (Å)	23.290–1.88 (1.99–1.88)
No. de reflexiones	56768
No. de reflexiones únicas	17740
Integridad (%)	94.5 (91.6)
R_{merge} (%)	6.0 (44.0)
$I/\sigma(I)$	13.30 (3.14)
Multiplicidad	3.2 (3.16)
Unidad asimétrica	Dímero
Afinamiento	
Rango de resolución (Å)	23.290–1.88 (1.99–1.88)
R_{work}/R_{free} (%)	18.47/23.12
No. de átomos	
Proteína	1799
Ligando	65
Agua	105
Valores B (Å ²)	
Proteína	A-24.20/B-25.06
Ligando	A-45.84/B-45.93
Agua	A-45.84/B-45.93
Total	25.08
Parámetros de Wilson	23.81
RMSD	
Enlaces (Å)	0.007
Ángulos(°)	1.026
(<i>Maximum-Likelihood Base</i>)	0.51
Ramachandran plot (%)	
Regiones más favorecidas	98.0
Regiones adicionales permitidas	2.0
Regiones no permitidas	0

Tabla 1. Parámetros obtenidos a partir de la primera estructura determinada por difracción de rayos X de la LvTrx a 1.88 Å.

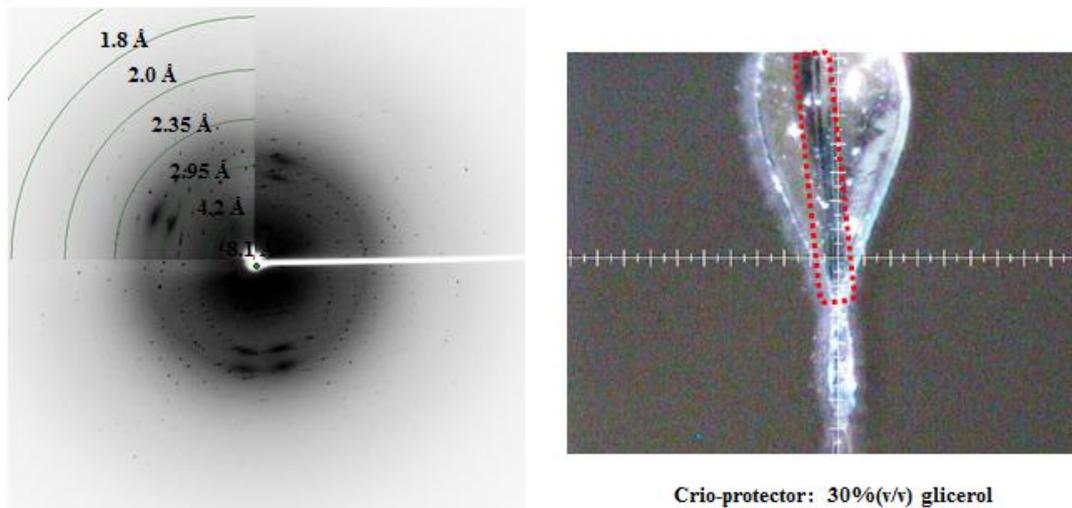


Figura 18. Patrón de difracción de la *LvTrx* a 1.88 Å de resolución, y aun costado se muestra la imagen del cristal dentro del *loop* antes de ser difractado.

La estructura tridimensional de la *LvTrx* se determinó a partir de la resolución de fases obtenidas por medio de reemplazo molecular (utilizando la estructura de la tiorredoxina de *Drosophila melanogaster* [14]; código PDB 1XWA) con un 60% de identidad de secuencia (**Figura 19**).

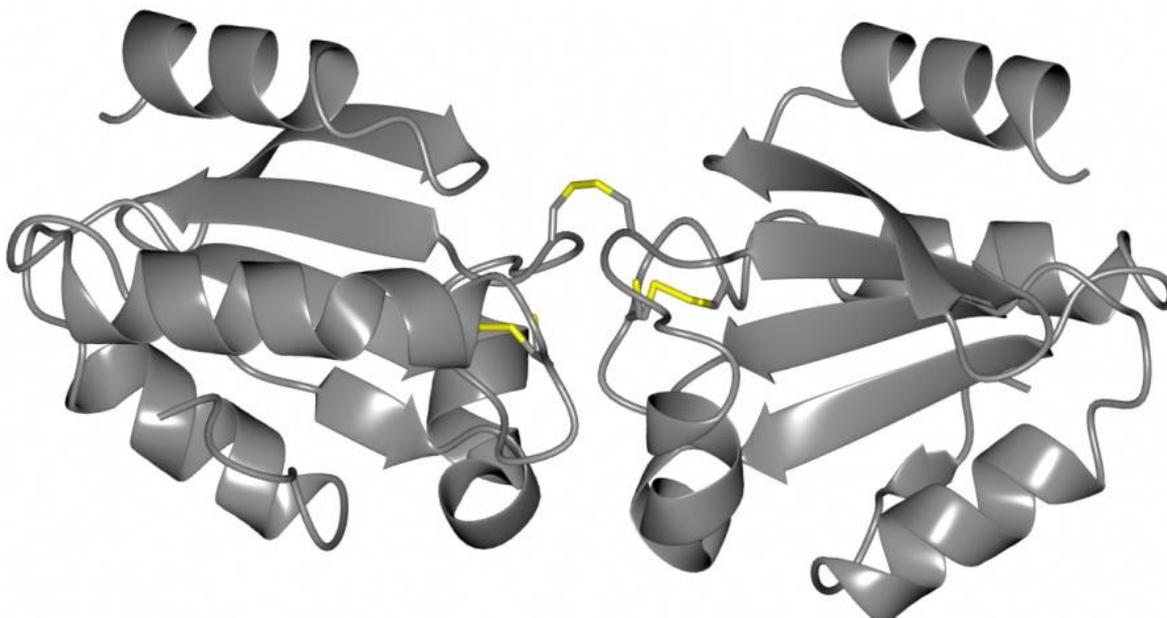


Figura 19. Estructura tridimensional por difracción de rayos-X de la *LvTrx* a 1.88 Å de resolución.

La estructura de la *LvTrx* muestra un dímero en la unidad asimétrica. Cada monómero de la *LvTrx* está formado por un núcleo central de cinco hebras β (β_1 - β_5), rodeado por cuatro α hélices (α_1 - α_4). El sitio activo se localiza en el extremo amino terminal de α_2 y se encuentra

separado del resto de la hélice por una torcedura causada por el residuo Pro-40, en general la estructura es similar a las reportadas. Sin embargo, se encontró la formación de un dímero mantenido por una unión covalente entre las Cys-73 de cada monómero, efecto similar encontrado en la Trx de humano, lo que abrió la posibilidad para realizar más ensayos sobre la formación de esta dimerización, mencionados más adelante. Los sitios catalíticos de cada monómero se encuentran en una proporción del 90% en estado reducido. Sin embargo, a pesar de mantener una concentración constante y alta de DTT (10 mM) durante los pasos de purificación el puente disulfuro formado entre las Cys-73 se mantiene intacto con una ocupación de 1.00 (**Tabla 2**); mientras que las cisteínas catalíticas presentan ocupaciones parciales (**Figura 20**).

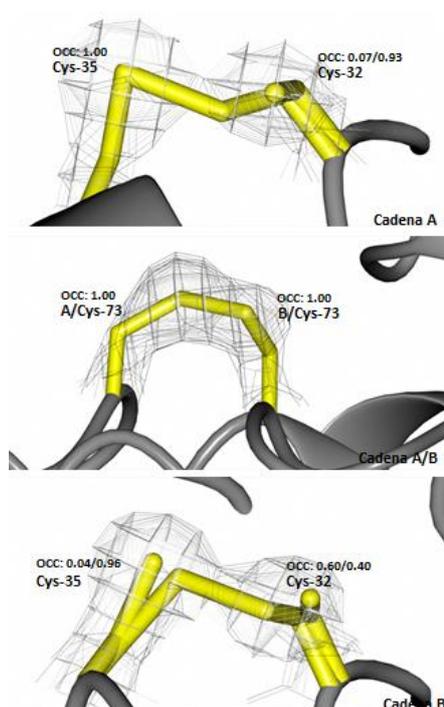


Figura 20. Ocupaciones de las cisteínas catalíticas y de la cisteína que forma la unión covalente dimérica.

Cadena 1.88 Å		OCC S-S	OCC Libre		OCC: S-S	OCC Libre
Cadena A	CYS 32	0.07	0.93	CYS 35	1.00	---
A/B	CYS 73	1.00	---	CYS 73	1.00	---
Cadena B	CYS 32	0.60	0.40	CYS 35	0.04	0.96

Tabla 2. Resumen de las ocupaciones (OCC) de cada residuo de cisteína que conforman el sitio catalítico de cada cadena y de las cisteínas involucradas en la formación del dímero.

Se ha reportado en la Trx de humano [13] que el residuo Asp-60 juega un papel muy importante en el mantenimiento del dímero, debido a que el pK_a de la cadena lateral del residuo Asp-60 es elevado alrededor de 6.5 [13], en comparación al valor normal alrededor

de 3.9, visto como ácido aspártico libre. Un factor que podría estar afectando el pK_a es la proximidad del Asp-60 del Asp-58. El residuo Asp-58 está expuesto al solvente y es probable que tenga un valor más bajo de pK_a que el Asp-60 [1]. Siendo este residuo parte de uno de los 12 residuos que mantienen la interacción inter-monómero en la LvTrx, (Figura 21).

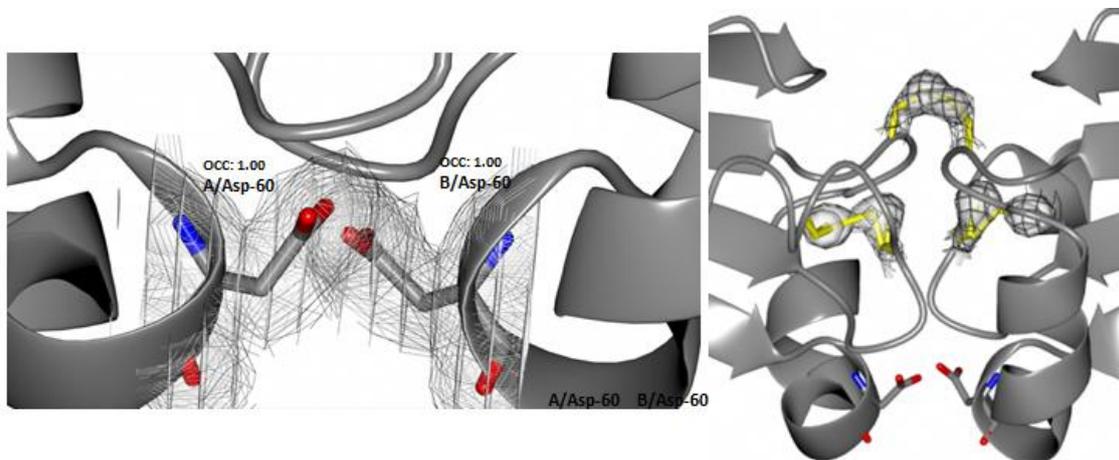


Figura 21. Interacción de los residuos Asp-60 de cada monómero de la LvTrx.

Durante el periodo octubre-diciembre de 2011 se difractaron nuevos cristales uno de ellos en ánodo rotatorio y otros dos cristales en el sincrotrón. Se colectaron datos de un cristal de LvTrx en condiciones que presentaban DTT en el primer paso de purificación, un cristal de LvTrx que presentaba una concentración de 5 mM de DTT directamente a la gota y un cristal de LvTrx que se mantuvo libre de DTT. En la siguiente tabla se resumen los *data sets* colectados (Tabla 3). El criopreservador utilizado fue glicerol 30% v/v.

Cristal	Datos Colectados
<p>LvTrx-Red/oxi (DTT durante la purificación) Ánodo rotatorio R-AXIS IV++ image plate</p>	<p>1.88 Å, 100 frames ($\Delta\phi = 0.5$) $\lambda = 1.5418$, d=100, t=14.1s 1 data set</p>
<p>LvTrx-Red/Oxi (DTT, primer paso de purificación) Ánodo rotatorio R-AXIS IV++ image plate</p>	<p>1.54 Å, 280 frames ($\Delta\phi = 0.5$) $\lambda = 1.5418$, d=100, t=14.1s 1 data set</p>
<p>LvTrx-Red (DTT en la gota de cristalización) BNL NSLS Beamline X6A</p>	<p>2.0 Å, 180 frames ($\Delta\phi = 0.5$) $\lambda = 0.97949$, d=200, t=10s 1 data set</p>
<p>LvTrx-Oxi (Sin DTT) BNL NSLS Beamline X6A</p>	<p>2.0 Å, 220 frames ($\Delta\phi = 0.5$) $\lambda = 0.97949$, d=270, t=15s 1 data set</p>

Tabla 3. Data sets colectados en ánodo rotatorio y en sincrotrón de los cristales de la LvTrx.

Con estos *data sets* se determinaron las estructuras tridimensionales por difracción de rayos X de la proteína LvTrx en diferentes estados redox. El sistema cristalino fue romboédrico y el grupo espacial P3₂12, con parámetros de celda unidad de $a = 57.5 \pm 0.4$, $b = 57.5 \pm 0.4$, $c = 118.1 \pm 0.8$; $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$. El coeficiente de Matthews predice la presencia de un dímero en la unidad asimétrica. Los datos estadísticos están resumidos en la (tabla 4).

Parámetros	LvTrx-Red	LvTrx-Red/ _{oxi}	LvTrx-Red/Oxi	LvTrx-Oxi
Código PDB	4AJ6	3ZZX	4AJ8	4AJ7
Estadística (Colecta de datos)				
Fuente de rayos-X	BNL NSLS Beamline X6A	Ánodo rotatorio R-AXIS IV ⁺⁺ image plate	Ánodo rotatorio R-AXIS IV ⁺⁺ image plate	BNL NSLS Beamline X6A
Longitud de onda (Å)	0.9795	1.5418	1.5418	0.9795
Grupo espacial	P3 ₂ 12	P3 ₂ 12	P3 ₂ 12	P3 ₂ 12
Dimensiones (celda-unitaria) a, b, c (Å)	57.99, 57.99, 118.61	57.83, 57.83, 118.18 90.0, 90.0, 120.0	57.52, 57.52, 118.02,	57.90, 57.90, 117.87
α, β, γ ángulos (°)	90.0, 90.0, 120.0		90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Rango de resolución (Å)	19.16–2.00	23.290–1.88	24.37–1.54	19.64–2.00
No. de reflexiones	87019	56768	212026	94693
No. de reflexiones únicas	15712	17740	33397	14756
Integridad (%)	99.9 (96.3)	94.5 (91.6)	99.7 (98.6)	99.4 (96.6)
R _{merge} (%)	6.7 (35.4)	6.0 (44.0)	5.7 (40.0)	5.8 (24.2)
I/ σ (I)	18.8 (4.8)	13.30 (3.14)	17.0 (4.9)	20.3 (5.2)
Redundancia	5.5 (5.6)	3.2 (3.16)	6.3 (5.5)	6.4 (4.3)
Unidad Asimétrica	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero
Estadística (Afinamiento)				
Rango de resolución (Å)	19.16–2.00	23.290–1.88	24.37–1.54	19.64–2.00
R _{work} /R _{free} (%)	19.37/24.54	18.47/23.12	17.76/21.41	17.35/22.59
No. de átomos				
Proteína	1789	1799	1857	1802
Ion/Ligando	22	65	45	29
Agua	204	105	192	110
Valor-B (Å²)				
Proteína	18.99	22.23	17.20	21.74
Ion/Ligando	45.42	45.20	39.79	46.64
Agua	26.00	28.88	24.52	27.37
Todos los átomos	22.86	25.81	21.21	24.73
Wilson plot	22.29	23.81	19.27	24.49
RMSD Estereoquímica ideal				
Longitud de uniones (Å)	0.018	0.007	0.007	0.008
Longitud de ángulos (°)	1.17	1.026	1.053	0.976
Error de coordinación	0.12	0.51	0.34	0.27
(Maximum-Likelihood Base)				
Ramachandran plot (%)				

Regiones favorecidas	más	98.18	96.99	94.59	97.74
Regiones permitidas	adicionales	1.82	3.01	5.41	2.26
Regiones no permitidas		0	0	0	0

Tabla 4. Parámetros obtenidos a partir de las estructuras determinadas por difracción de rayos X de la LvTrx en diferentes estados redox.

De esta forma se logró obtener un espectro de diferentes estados redox de la LvTrx, resultando de gran interés al analizar las estructuras obtenidas, la presencia del puente disulfuro (Cys-73) inter-monomérico, sin importar la adición de una alta concentración de DTT durante la purificación o directamente agregado a la gota. Lo anterior hace pensar que este fenómeno podría ser debido a la existencia de un probable artefacto cristalográfico; o que este puente disulfuro es particularmente estable a pesar de la presencia de 10 mM de DTT, concentración suficiente para mantener el sitio activo completamente reducido sobre el curso de la cristalización y durante los experimentos de difracción por rayos X. (**Figura 22**). Este resultado derivó en un gran interés en tratar de probar si esta formación del dímero tiene la posibilidad de existir en solución, por lo cual en la sección experimental se describen varias metodologías (filtración en gel a distintos pH, DLS y ensayo de cisteínas libres) para tratar de descifrar este comportamiento.

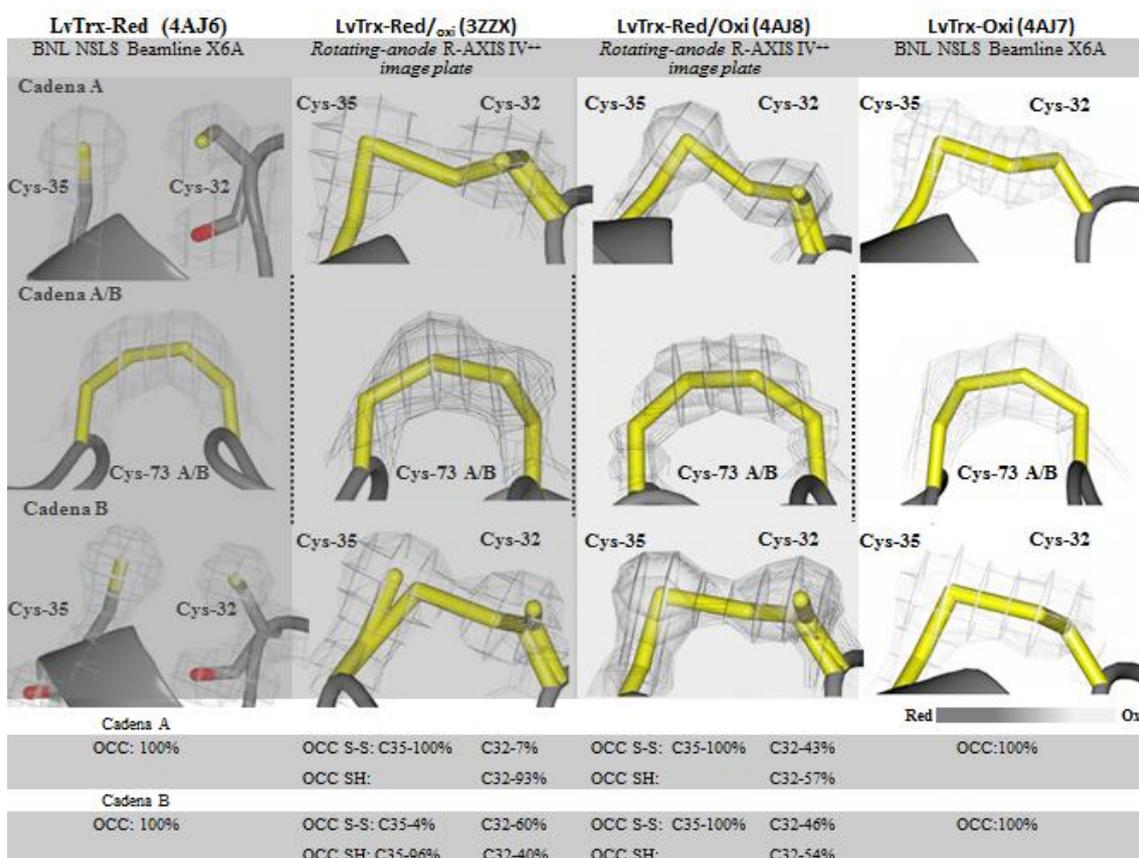


Figura 22. Distintos estados redox de la LvTrx, desde el estado reducido hasta el oxidado, mostrando las ocupaciones del sitio catalítico de cada una de las cadenas A-B que conforman al dímero y el puente disulfuro inter-monomérico que se mantiene estable en los 4 estadios redox.

Al momento de ir analizando la estructura y compararla con la secuencia, se encontró que en el residuo 11 en la secuencia depositada en el *GenBank* le corresponde un residuo serina, sin embargo, en las estructuras mostradas anteriormente el residuo 11 corresponde a una fenilalanina (**Figura 23**).

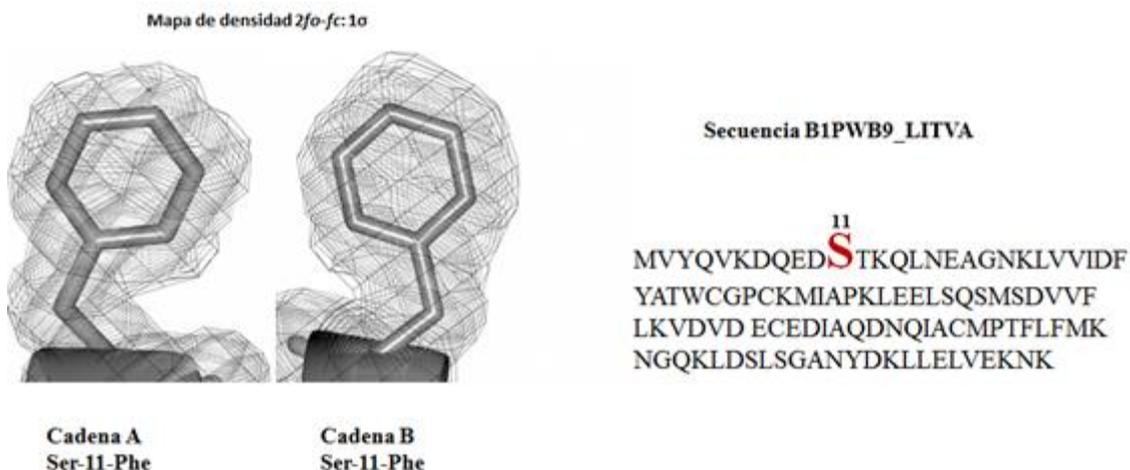


Figura 23. El residuo 11 en el modelo como una fenilalanina (Phe), sin embargo en la secuencia en esta posición corresponde a una serina (Ser).

Para corroborar que la Phe estaba presente, se realizó una determinación de masas LC-MS/MS para evaluar la presencia de serina o fenilalanina en la posición 11 (datos mostrados en el apartado siguiente). Se ha estado manteniendo contacto con nuestros colaboradores, para poder dar una explicación del porqué de este cambio de residuo, sin embargo aún no se ha llegado a una conclusión exacta, pero la presencia de una Phe en la posición 11 es incuestionable.

4.6 IDENTIFICACIÓN DE LA *LvTrx*

Al calcular el peso usando la secuencia de la *LvTrx* con Ser el MW fue de 11887.64, y al calcular el peso usando la secuencia de la *LvTrx* con Phe el MW fue de 11947.74, que es más cercano al dado por masas, comprobando de esta forma, la existencia mayoritaria de la Phe en la posición 11 de ambas cadenas (**Tabla 5**).

Especie: LITOPENAEUS VANNAMEI **Nombre:** thioredoxin 1

Proteína MW: 11945.88 **Proteína pI:** 4.4 **Numero de residuos:** 105

1 M VYQV K D Q E D S T K Q L N E A G N K L V V I D F Y A T W C G P C K M I A P K L E E L S Q S M S D V V F L K V D V D E C E D I A Q D N Q I A C M P T F L F M
 81 K N G Q K L D S L S G A N Y D K L L E L V E K N K

Espectrometría de masas

<i>LvTrx</i>	MW
	11945.88

Usando secuencia con Ser MW 11887.64 calculado con http://web.expasy.org/compute_pi/
 Usando secuencia con Phe MW 11947.74 calculado con http://web.expasy.org/compute_pi/

Tabla 5. Diferencia de peso utilizando la misma secuencia y variando solo el residuo 11 por Phe o por Ser.

Estos resultados abarcaron el 67% de cobertura de la secuencia, asegurando de esta forma que la proteína con la que se está trabajando pertenece al organismo deseado y no a *E. coli*, que es el organismo utilizado para la sobreexpresión de la *LvTrx*.

CAPÍTULO 5

DIMERIZACIÓN DE LA *Lv*Trx

5.1 EXPERIMENTOS PREVIOS

En investigaciones anteriores se ha reportado que la Trx de humano puede agregarse en formas diméricas y/o multiméricas [1], [54]. Esta era una opción muy viable para la *Lv*Trx, ya que posee 8 de los 12 residuos implicados en la homodimerización de la hTrx (Thr 30, Trp 31, Cys 32, Val 59, Asp 60, Gln 63, Ala 66, Ser 67, Val 71, Lys 72, Met 74 y la Cys 73). Por lo anterior, se realizaron pruebas realizando geles SDS-PAGE antes de obtener la proteína con un grado de pureza mayor al 90% con dos agentes reductores DTT y β -mercaptoetanol a distintas concentraciones (**Figura 24**); así como geles nativos PAGE, para comprobar la formación de agregados multiméricos (**Figura 25**).

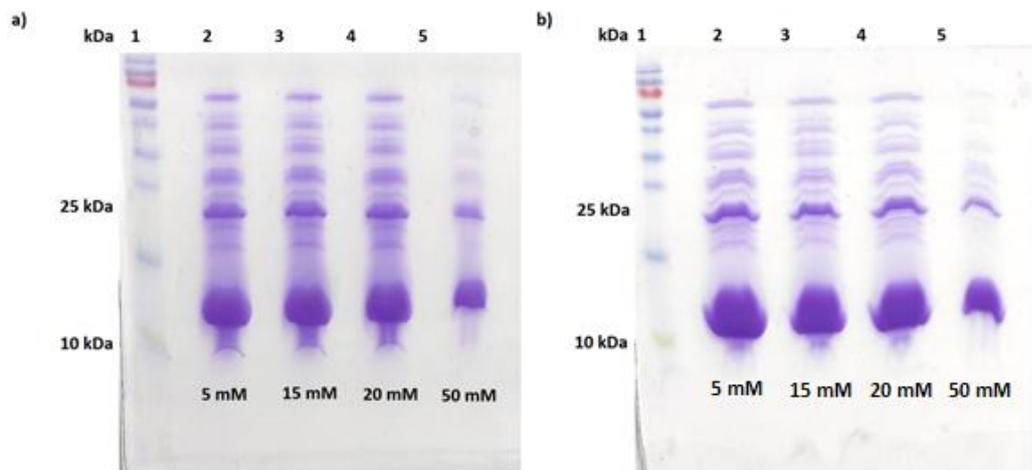


Figura 24. a) SDS-PAGE a distintas concentraciones de agente reductor (DTT) mostrando una mayor población de la *Lv*Trx en forma monomérica que dimérica. b) Distintas concentraciones de agente reductor (β -mercaptoetanol) mostrando resultados similares al DTT, con una mayor población monomérica que dimérica.

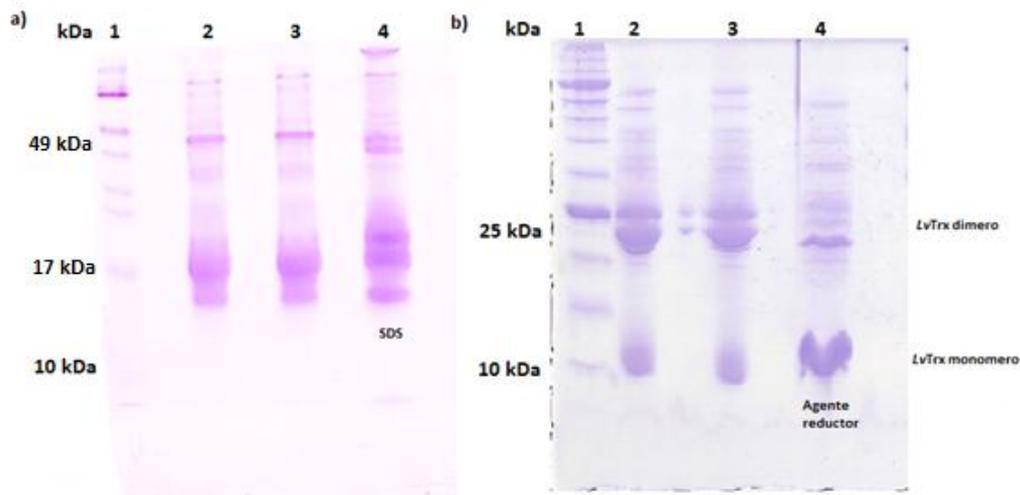


Figura 25. a) Gel nativo page, mostrando la migración de acuerdo a su carga, los carriles 2 y 3 es una repetición de la misma muestra, el carril 4 es la muestra con SDS y el carril uno el marcador de peso. b) SDS-PAGE, las muestras de los carriles 2 y 3 fueron cargadas sin SDS y sin agente reductor, el carril 4 fue cargada con SDS y agente reductor y el carril 1 es el marcador de peso. En esta se muestra una población mayoritaria de forma dimérica debido a la ausencia de un agente reductor.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Bunik y colaboradores en 1997, quienes encontraron varias bandas en los geles analizados, después de tratar la Trx mitocondrial de corazón de cerdo con diamida. Sin embargo, el tratamiento de la muestra con DTT ocasionó la desaparición de bandas de mayor peso molecular. También existe una movilidad de las proteínas en los geles dependiendo del estado redox de los grupos sulfidrilo. Por otro lado, Weichsel y colaboradores en 1996 analizaron mediante SDS-PAGE sin agente reductor una muestra de la Trx humana pura, almacenada por dos meses, descubriendo que la proteína permanecía predominantemente en forma dimérica. No obstante un pequeño porcentaje de Trx se detectó en forma monomérica y multimérica.

Estos antecedentes sustentan a los resultados obtenidos, ya que al realizar un gel SDS-PAGE sin un agente reductor la *LvTrx* presentó un porcentaje alto de la forma dimérica y una menor proporción de su forma monomérica, con la diferencia que no se almacenó por un periodo largo de tiempo. Esto supone que al ver los cromatogramas del último paso de purificación y los geles SDS-PAGE y PAGE, se tiene de esta forma la *LvTrx* pura y las bandas de pesos superiores al monómero/dímero, se atribuyen a un efecto del gel formando agregados multiméricos, más que a la existencia de contaminantes.

5.2 FORMACIÓN DIMÉRICA EN LA TIORREDOXINA *LITOPENAEUS VANNAMEI* Y COMPARACION CON LA TIORREDOXINA DE HUMANO

La tiorredoxina se encuentra en forma dimérica en las cuatro estructuras determinadas en el presente trabajo. Los cristales contienen un dímero en la unidad asimétrica. Se sabe que la tiorredoxina es funcional como monómero en reacciones redox. Una forma dimérica inactiva se ha reportado en la tiorredoxina de humano, existiendo la posibilidad que la formación del dímero puede tener una capacidad regulatoria. La interfaz dimérica de la *LvTrx* consiste de varios componentes: un área de aproximadamente de 975 \AA^2 (B/A 646.9 \AA^2 ; A/B 329.0 \AA^2 por monómero)², residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, 3 puentes de hidrógeno y el puente disulfuro A/Cys-73--B/Cys-73. En la **Figura 26**, se muestra una vista global de las interacciones entre residuos que mantienen al dímero, las cuales se describen más adelante, mostrados en esferas azules y vista frontal y lateral de un monómero.

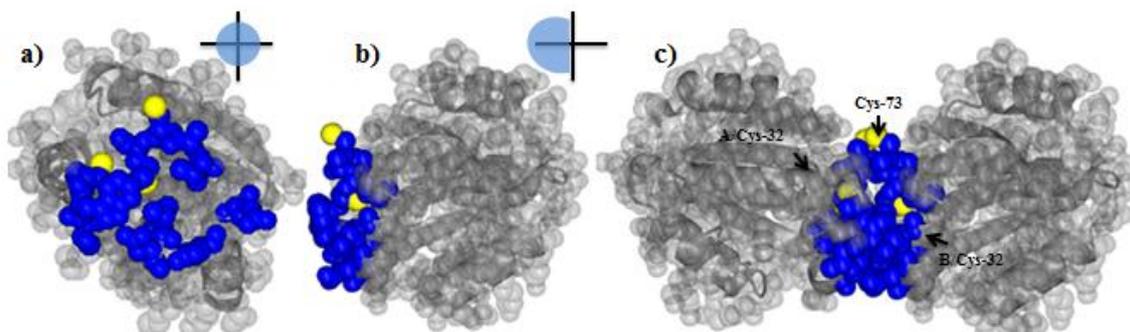


Figura 26. Interacción de residuos que mantienen la formación del dímero en el cristal. a) Vista frontal de uno de los monómeros que conforman el dímero, mostrando en esferas azules los residuos que participan en la interacción inter-monomérica. b) Vista lateral del mismo monómero, las esferas amarillas indican la formación de un puente disulfuro. c) Vista global de los 24 residuos que participan en la formación del dímero.

Si se analiza la distribución de las cargas superficiales de las estructuras de la *LvTrx* en su forma reducida y oxidada, se puede observar que en la región del sitio catalítico por donde el sustrato es reducido, el ambiente es negativo, como se muestra en la (**Figura 27a**), de igual forma se observa que al tener una visión general de las cargas que tiene el dímero, existe una zona muy localizada con carga negativa (**Figura 27b**).

²http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver. Es una herramienta que realiza búsquedas estructurales, de intercara y ensamblajes, así como la búsqueda de varios ensamblajes y parámetros tomados del PDB.

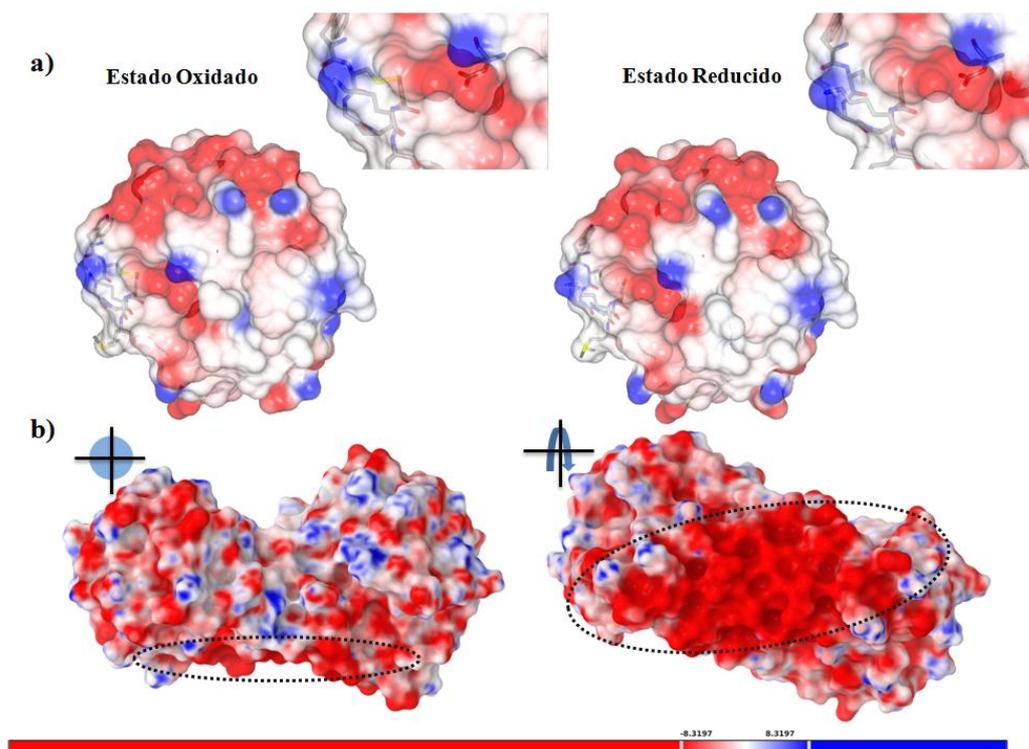


Figura 27. Potencial electrostático de la LvTrx en estado oxidado y reducido, las cargas positivas están representadas en color azul, mientras que las cargas negativas están representadas en color rojo. a) Comparación de un monómero entre el estado oxidado y reducido de la LvTrx, mostrando que no hay cambio significativo en las cargas y distinción del amplio acceso que tiene el sustrato hacia el sitio activo. b) Vista global de carga del dímero, mostrando una amplia región con carga negativa.

Si se compara la superficie del sitio catalítico de la LvTrx con otras tiorredoxinas, existe una variación entre las regiones negativas ya que la LvTrx y la hTrx presentan una región negativa más amplia que las otras. Si se analiza la carga que tiene el acceso por el cual el sustrato interactúa con el sitio activo de la LvTrx se puede observar que el área de acceso es mucho mayor que el de las otras tiorredoxinas como la hTrx, que en esta zona muestran un residuo con carga positiva tanto en su forma reducida como oxidada. Si se compara con otras tiorredoxinas como la de *D. melanogaster* y la de *E. coli*, la distribución de la carga en esta zona del sitio catalítico no es tan negativa como en la LvTrx y la hTrx, así como la entrada del sustrato al sitio catalítico no es tan accesible, esto puede dar un indicio de que la LvTrx, sea una de las tiorredoxinas más eficientes para llevar a cabo su función redox (**Figura 28**).

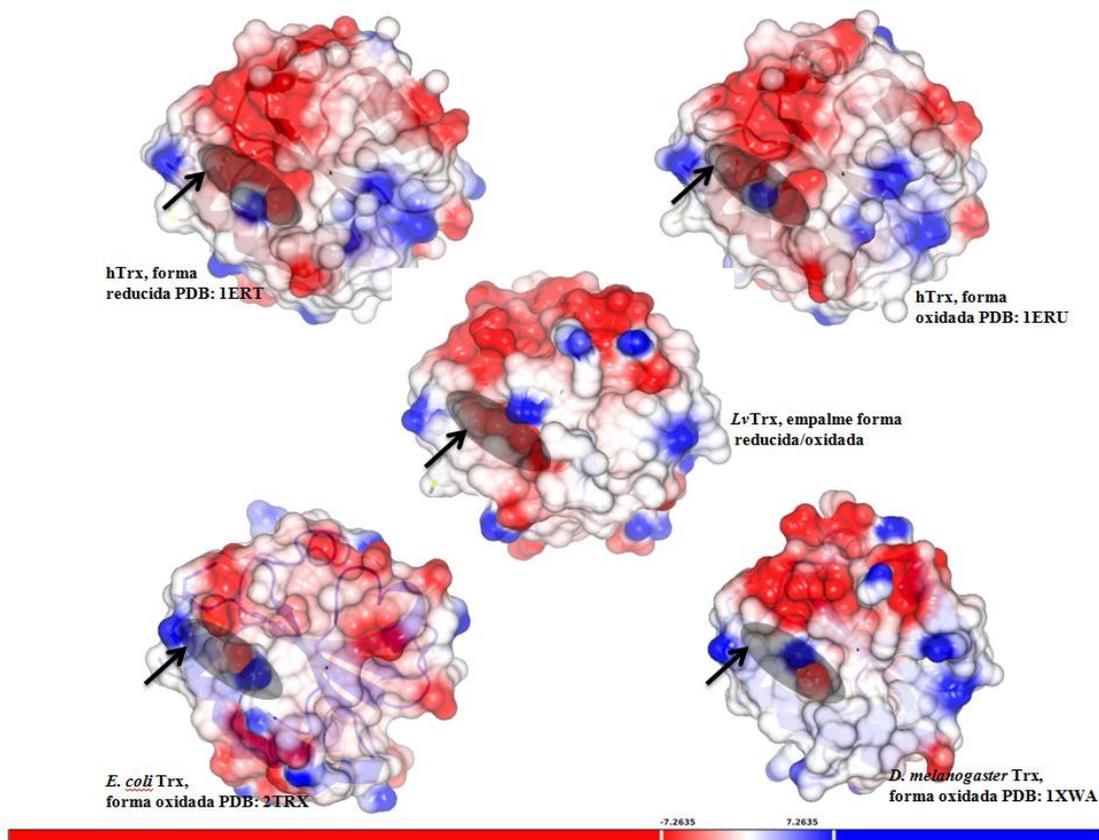


Figura 28. Comparación electrostática del acceso del sustrato al sitio activo de la LvTrx con otras Trx, mostrando diferencias entre ellas representado con una flecha y un ovalo oscuro. La hTrx, muestra una carga positiva en el acceso al igual que la Trx de *D. melanogaster* y *E.coli*, solo que estas últimas dos presentan un espacio menos accesible para la entrada del sustrato. En azul se muestran las cargas positivas, mientras que en rojo se muestran las cargas negativas.

Los residuos involucrados en la intercara dimérica junto con el puente disulfuro inter-dimérico, se muestran en la **Figura 29**. El puente disulfuro se encuentra aparentemente estable a pesar de que se encuentra expuesto al solvente. Una razón que no es tan clara pero probable por la que el puente disulfuro inter-dimérico es estable, puede ser en parte por su orientación y por el espacio estéricamente restringido para la formación de un puente disulfuro por parte de los dos sulfhidrilos en el dímero.

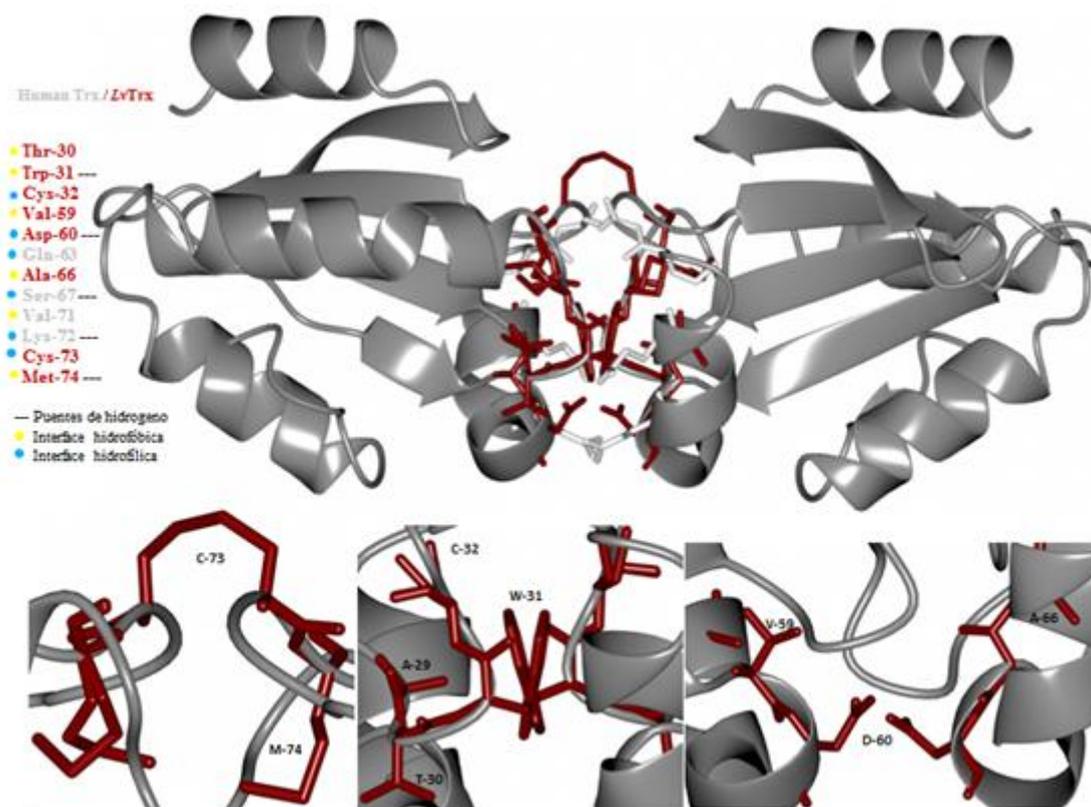


Figura 29. Residuos involucrados en la intercara dimérica, residuos en rojo pertenecen a la *LvTrx* y en gris a la *Trx* de humano.

La interfaz dimérica de la *LvTrx* está compuesta por 24 aminoácidos (12 en cada monómero), la mayoría de los contactos entre monómeros son hidrofóbicos conformados por (Thr-30, Trp-31, Val-59, Ala-66, Ile-71, Ala-72, Met-74) posicionando las cadenas laterales dentro de la intercara y estos contactos son suficientemente estrechos de manera que no existe espacio para moléculas de agua. Los residuos hidrofílicos lo conforman (Cys-32, Asp-60, Glu-63, Gln-67) y un puente disulfuro (Cys-73). Cinco puentes de hidrógeno son formados en la intercara dimérica (AThr-30—BGlu-63; ATrp-31—BVal-59; AMet-64—BAla-72; AAla-72—BMet-74; AGlu 63—BThr-30) (**Figura 30**).

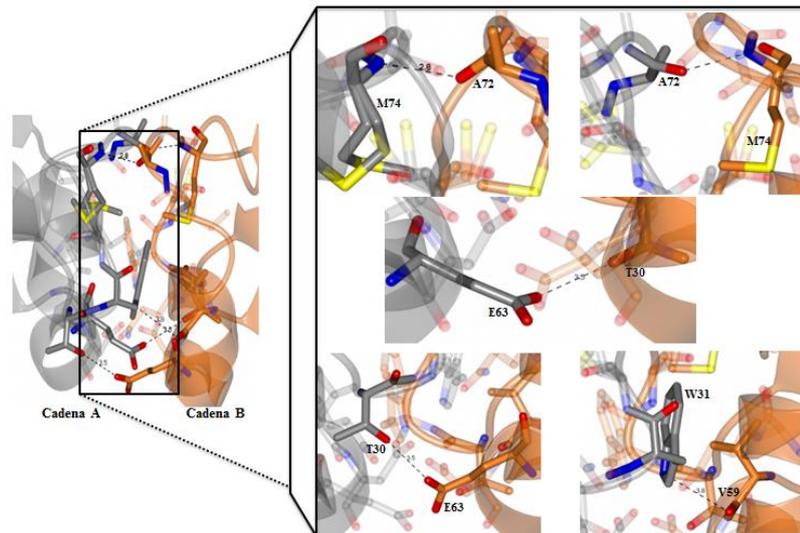


Figura 30. Formación de puentes de hidrógeno en la interacción inter-monomérica

Existe cierta diferencia en cuanto a la estructura dimérica de la Trx de humano con respecto a la estructura de la *LvTrx*, ya que la estructura de Trx de humano solo se muestra un monómero en la unidad asimétrica que por simple rotación de 180° se genera el dímero, derivando en una simetría perfecta, debido a que la intercara del dímero pasa por un eje de simetría dentro de la red cristalina, mientras que la *LvTrx* se muestra como dímero (**Figura 31**).

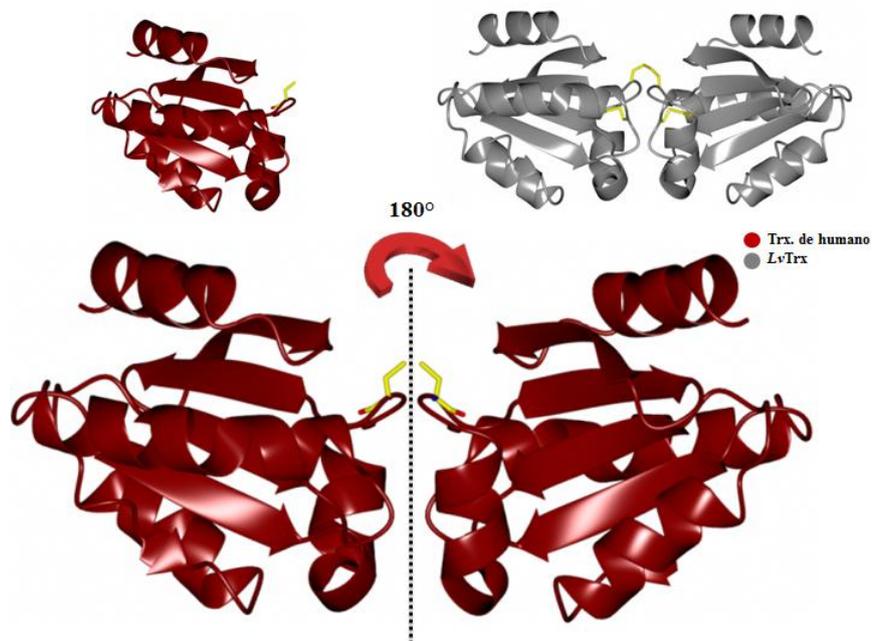


Figura 31. Estructura de la tiorredoxina de humano mostrando un monómero en la unidad asimétrica, al girar el monómero 180° , por medio de una simetría perfecta se forma el dímero, mientras que el dímero de la *LvTrx* existe un ligero movimiento que lo hace distinto al dímero de la hTrx.

En la estructura de la tiorredoxina de humano, la formación del puente disulfuro causa cambios en el asa del sitio activo, que resultan en el movimiento de residuos en la interfaz dimérica. El cambio más aparente en la intercara lo presenta el residuo Trp-31 [1]. Estos cambios podrían potencialmente cambiar la formación del dímero. En el caso de la tiorredoxina de camarón (*LvTrx*), existe un cambio aparente en varios residuos si se sobrepone con la estructura de la hTrx en estado oxidado y reducido, uno de ellos es el residuo Trp-31 que presenta un ligero movimiento, el residuo Pro-34 que presenta distintos ángulos de torsión y tres conformaciones distintas en el residuo Met-37 (**Figura 32**). La Met-74 se encuentra conformando una de las 8 interacciones inter-diméricas, presentando conformaciones alternas.

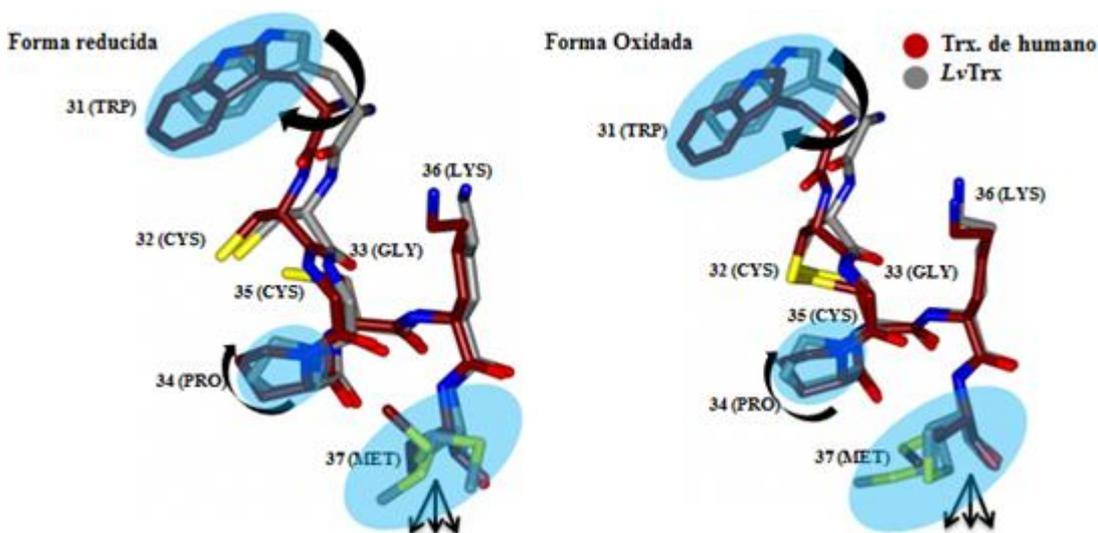


Figura 32. Empalme estructural entre la *LvTrx* (gris) y la hTrx (rojo), mostrando cambios en ciertos residuos Trp-31, Pro-34, Met-37 que se encuentran cerca del sitio activo, mostrando los cambios más significativos en ovalo azul.

Al sobreponer las estructuras (hTrx y *LvTrx*), la *LvTrx* presenta un movimiento distinto a la Trx de humano (**Figura 33a**). De esta manera al representar la anisotropía de los átomos de la *LvTrx* se muestra con más detalle la tendencia que tienen sobre cierta dirección los átomos que componen a la cadena B (**Figura 33b**); a diferencia de la cadena A que presentan de igual forma un ligero movimiento en comparación con su contraparte monomérica. Esto resulta de gran interés ya que la hTrx al no presentar ningún tipo de movimiento entre los monómeros sugiere que la formación del dímero existente en la *LvTrx* sea utilizado como un mecanismo fisiológico en solución más que un artefacto cristalográfico, y para estudiar este comportamiento de la *LvTrx* se realizaron diversos estudios mencionados en la sección de métodos para tratar de confirmar su existencia en solución.

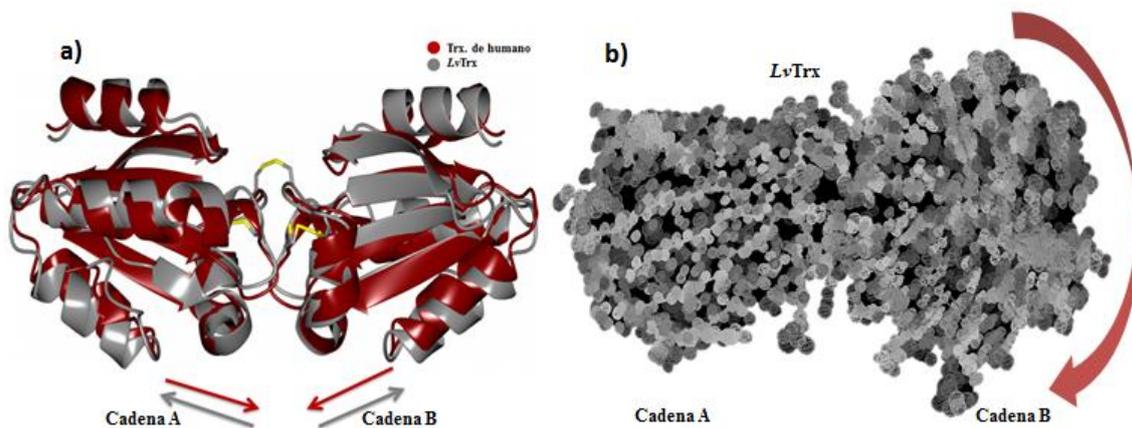


Figura 33. a) Empalme de estructura dimérica entre *LvTrx* y Trx de humano. b) Representación anisotrópica de todos los átomos que conforman a la *LvTrx*, mostrando el movimiento que tiene la cadena B sobre una dirección a diferencia de la cadena A.

5.3 ENSAYO DE FILTRACIÓN EN GEL

El ensayo de filtración en gel asume que el equilibrio entre la especie dimérica y monomérica es más rápida que el tiempo que toma la proteína en pasar a través de una columna empacada con una resina de exclusión molecular [55]. Bajo esta condición, la proteína migrará como una sola especie con un peso molecular intermedio entre los valores diméricos y monoméricos.

Anteriormente J. F. Andersen en 1997, reportó que la formación del dímero se favorecía a pH ácido, y a pH básico prevalecía la población monomérica, por lo que se realizó el ensayo por medio a un pH ácido (3.8) y a un pH estable para la proteína (7.5) con el fin de lograr ver las dos poblaciones en el cromatograma.

Primero se corrió la muestra que estaba a pH 7.5, en la columna de exclusión molecular previamente equilibrada como lo describe la metodología. La muestra se eluyó con un *Buffer* TRIS 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, sin la presencia de DTT. La muestra presentaba una concentración final de 14.5 mg mL^{-1} en un volumen final de $300 \mu\text{l}$. obteniendo de esta forma solamente un pico mayoritario (No. 3) de elución correspondiente a la *LvTrx* monomérica. Cabe mencionar que durante la elución, en el cromatograma se muestran dos picos (No. 1 y 2) de menor proporción que podrían ser explicados como principios de oligomerización de la *LvTrx*, sin embargo al analizar el gel, no se pudo obtener una conclusión muy clara de ello ya que la resolución de estas muestras fueron muy bajas (**Figura 34**).

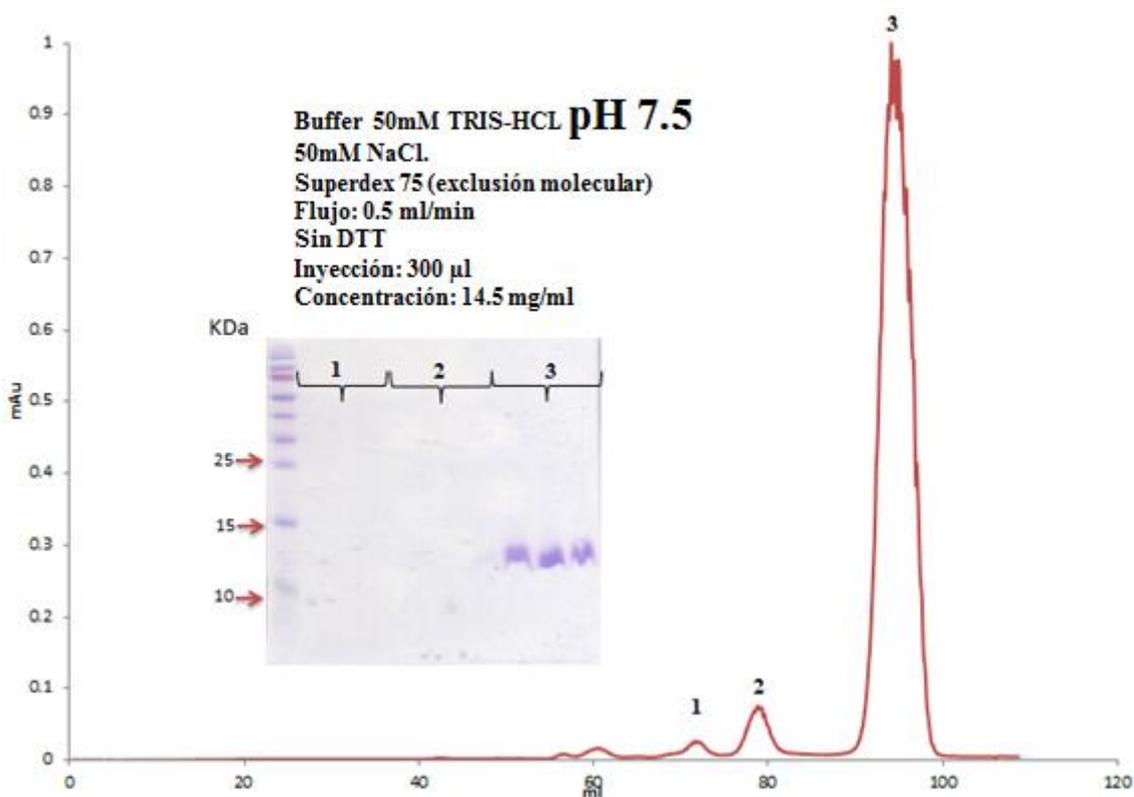


Figura 34. Cromatograma de exclusión molecular (Superdex 75) pH 7.5, observando solo un pico de elución, correspondiente a la LvTrx monomérica.

De la misma forma en que se estableció el ensayo para la primera muestra, se realizó otro ensayo que contenía la misma concentración de proteína en un volumen final de 300 µl, la muestra se corrió con un *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH 3.8. Analizando el cromatograma, se muestra claramente la elución de dos poblaciones que corresponden al dímero y monómero como se muestra en la **Figura 35**. De igual forma a lo sucedido a pH 7.5, se observó que en el cromatograma aparecen dos picos de menor proporción (No. 1 y 2) pudiendo observar de manera más evidente la formación de oligomerizaciones de la LvTrx a un pH ácido.

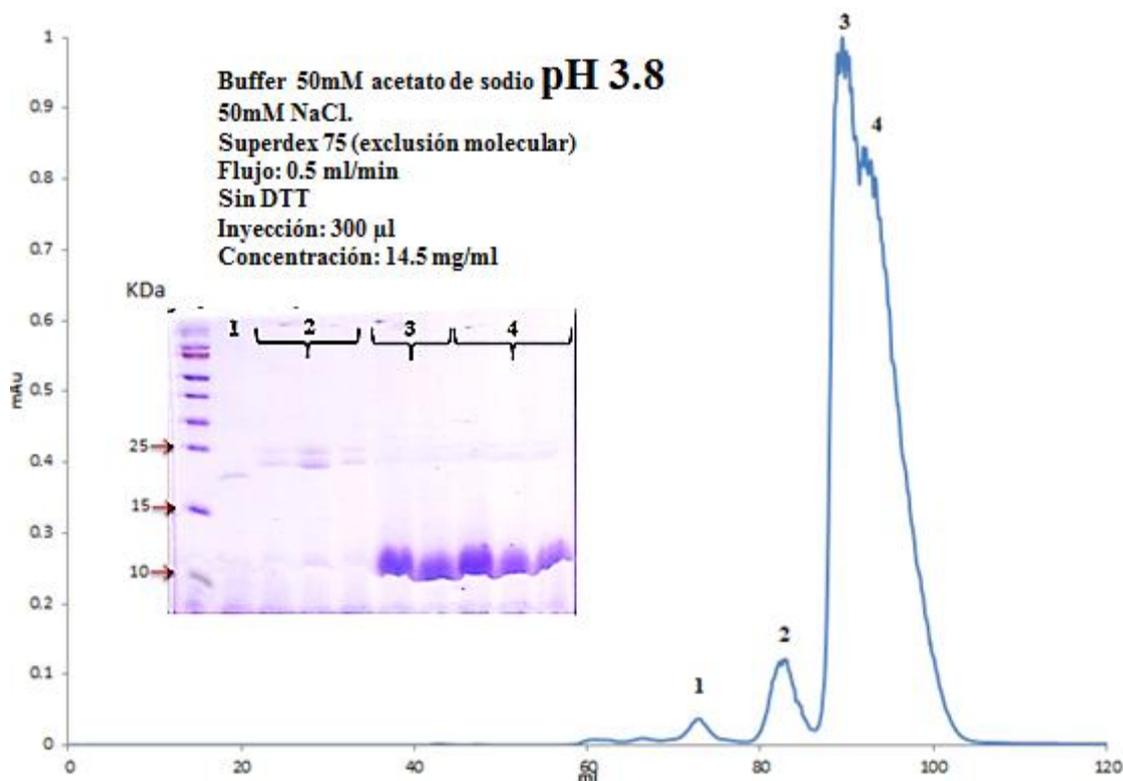


Figura 35. Cromatograma de exclusión molecular (Superdex 75) pH 3.8, observando dos picos de elución, correspondiente al dímero/monómero de la LvTrx.

Para tener aún más claro este equilibrio, se empalmó el cromatograma a pH 3.8 con el cromatograma obtenido a pH 7.5, siendo todos los datos normalizados, para una mejor definición de estas poblaciones (**Figura 36**). Aunque no es del todo clara la migración de ambas poblaciones monómero/dímero en el gel nativo, es evidente la existencia de dos poblaciones correspondientes a diferentes pesos moleculares.

En resumen, se pudo comprobar la existencia de la población dimérica en solución, descartando que la formación del dímero solo sea un artefacto cristalográfico en la LvTrx.

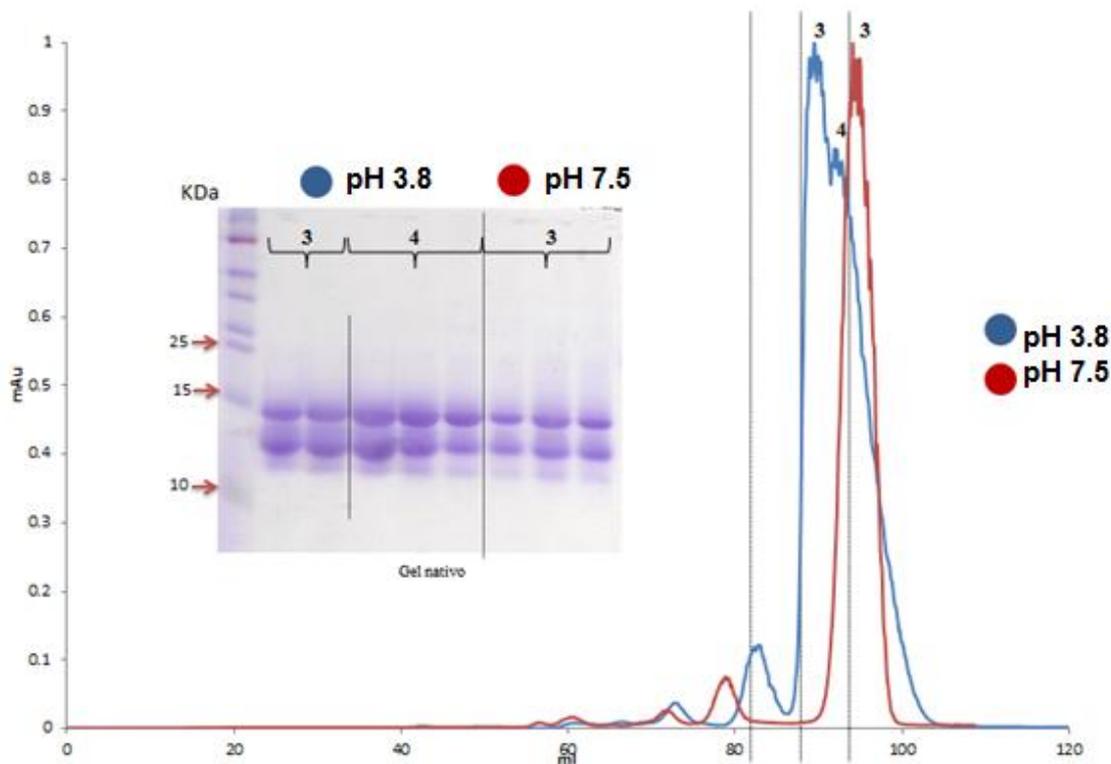


Figura 36. Empalme de cromatogramas de elución a pH 7.5 y pH 3.8 y gel nativo, mostrando claramente la existencia de dos poblaciones en solución.

5.4 ENSAYO DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Este ensayo se realizó para observar la existencia de la forma dimérica de la LvTrx. Este ensayo tuvo como ventaja también el tratar de hacer un barrido a ciertas temperaturas así como, analizar el efecto del DTT en la muestra. Las condiciones que se trabajaron en el ensayo fueron las siguientes:

Muestras:

- Ac. Sodio 10 mM, pH 3.8 (LvTrx 1 mg mL⁻¹)
- Ac. Sodio 10 mM, pH 3.8, DTT 5 mM (LvTrx 1 mg mL⁻¹)
- Ac. Sodio 10 mM pH 3.8, DTT 10 mM (LvTrx 1 mg mL⁻¹)
- TRIS 10 mM pH 7.5 (LvTrx 1 mg mL⁻¹)
- TRIS 10 mM pH 7.5, 5 mM DTT (LvTrx 1 mg mL⁻¹)
- TRIS 10 mM pH 7.5, 10 mM DTT (LvTrx 1 mg mL⁻¹)

Condiciones:

- Radio hidrodinámico (nm) a 4°C (temperatura de almacenamiento de la muestra).
- Radio hidrodinámico (nm) a 18°C (temperatura de condición de cristalización).
- Radio hidrodinámico (nm) a 25°C (temperatura ambiente promedio).
- Radio hidrodinámico (nm) a 37°C (temperatura óptima para ensayos de actividad).

✓ Cada muestra en cada condición fue medida 35 veces por triplicado.

Obteniendo de este modo en cada muestra tres promedios, indicándonos el radio hidrodinámico que tiene la muestra; en este estudio la *LvTrx* tiene un peso de 12 kDa y en teoría la formación del dímero tendría el doble de peso 24 kDa. Bajo estas condiciones el radio hidrodinámico que detecta el aparato de DLS para una molécula de 12 kDa es de: 1.72 nm y para una molécula de 24 kDa el radio hidrodinámico es de: 2.32 nm.

Teniendo en cuenta estos datos, la siguiente tabla resume lo realizado en el experimento bajo las distintas condiciones anteriormente mencionadas (**Tabla 6**).

pH 3.8	4°	18°	25°	37°	
Trx 1mg/ml (10 mM Ac. sodio)	(2.83/3.23/3.19)	(3.33/3.59/3.35)	(--/2.00/--)	(3.11/2.99/--)	Promedio ~3.09 nm
Trx 1mg/ml (10 mM Ac. sodio, 5 mM DTT)	(2.99/2.94/3.34)	(3.25/3.62/3.27)	(3.30/3.96/3.79)	(2.7/2.17/2.86)	
Trx 1mg/ml (10 mM Ac. sodio, 10 mM DTT)	(3.15/3.15/3.15)	(3.06/3.30/3.31)	(3.04/3.03/2.95)	(2.93/2.79/2.92)	
Radio hidrodinámico teórico establecido por el DLS.					
Proteína de 12kDa. RH: 1.72 nm.					
Proteína de 24kDa. RH: 2.32 nm.					
Diam. (nm)					
pH 7.5	4°	18°	25°	37°	
Trx 1mg/ml (10 mM TRIS)	(2.62/2.52/2.61)	(3.47/2.86/2.76)	(2.60/2.51/2.55)	(2.71/2.51/2.49)	Promedio ~2.75 nm
Trx 1mg/ml (10 mM TRIS, 5 mM DTT)	(3.07/3.03/2.97)	(2.59/2.70/2.70)	(2.93/2.63/2.69)	(2.65/2.83/2.66)	
Trx 1mg/ml (10 mM TRIS, 10 mM DTT)	(3.11/2.90/3.03)	(2.86/2.86/2.77)	(2.65/2.67/2.45)	(2.72/2.95/2.95)	
Diam. (nm)					

Tabla 6. Muestra los promedios por condición y un promedio general a determinado pH.

El resultado de este ensayo comprueba la formación de poblaciones diméricas en solución, tomando como control a la Trx de *E. coli*, ya que esta Trx no presenta formación de dímero, obteniendo los resultados que se muestran en la (**Figura 37**).

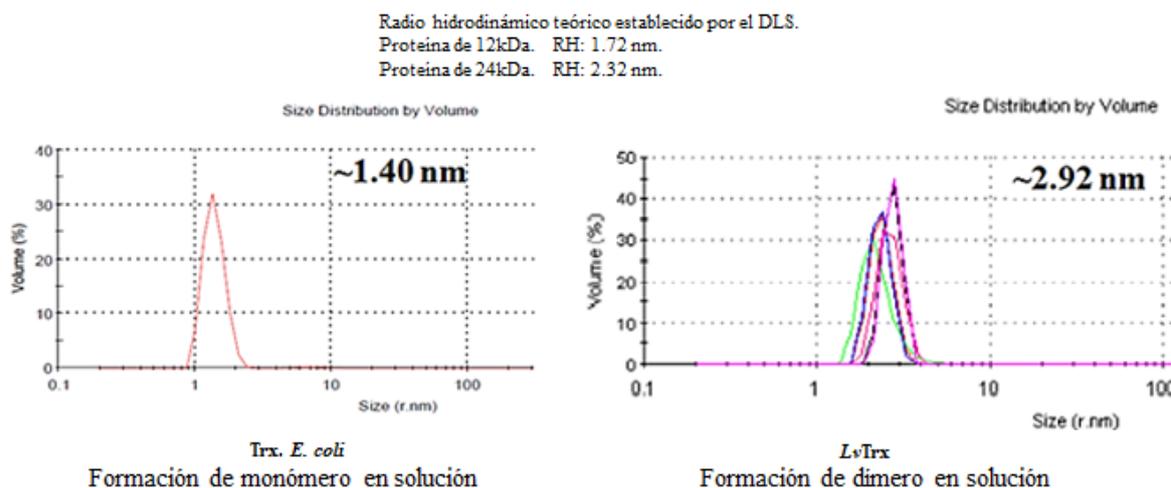


Figura 37. Comparación de la forma monomérica que presenta la Trx de *E. coli*, con la proteína de la *LvTrx*.

Este último experimento confirmó la existencia del dímero en solución debido a que el radio hidrodinámico para la Trx de *E. coli* es de: 1.40 nm (monómero) y para la *LvTrx* fue de: 2.92 nm (dímero).

Los resultados mostrados en estos experimentos, y en trabajos previos [13], permiten concluir la existencia del dímero en solución para la *LvTrx*.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE CISTEÍNAS LIBRES

El valor que se obtuvo después de medir la absorbancia a 412 nm fue de 1.12, este valor fue dividido entre el coeficiente de extinción del reactivo $1.12/14,150 M^{-1} cm^{-1}$, obteniendo 7.91×10^{-5} moles y se multiplicó por el factor de dilución del DTNB que fue de 1000, obteniendo $0.079 M$. La concentración de la proteína fue de $1 mg mL^{-1}$. A partir de este resultado se pudo concluir que existe un solo sitio SH por subunidad que se encuentra libre en solución. Este dato podemos apoyarlo en resultados obtenidos por la ATP sulfurilasa de *Penicillium chrysogenum*, en la cual obtienen una gráfica donde muestran la cantidad de grupos sulfhidrilos libres por subunidad (**Figura 38a**). Por último se obtuvo el cálculo de superficie expuesta al solvente de cada una de las cisteínas que contiene la *LvTrx*, siendo la Cys-73 la que está más expuesta al solvente ya que no presenta algún contacto cristalino en la estructura. (**Figura 38b**).

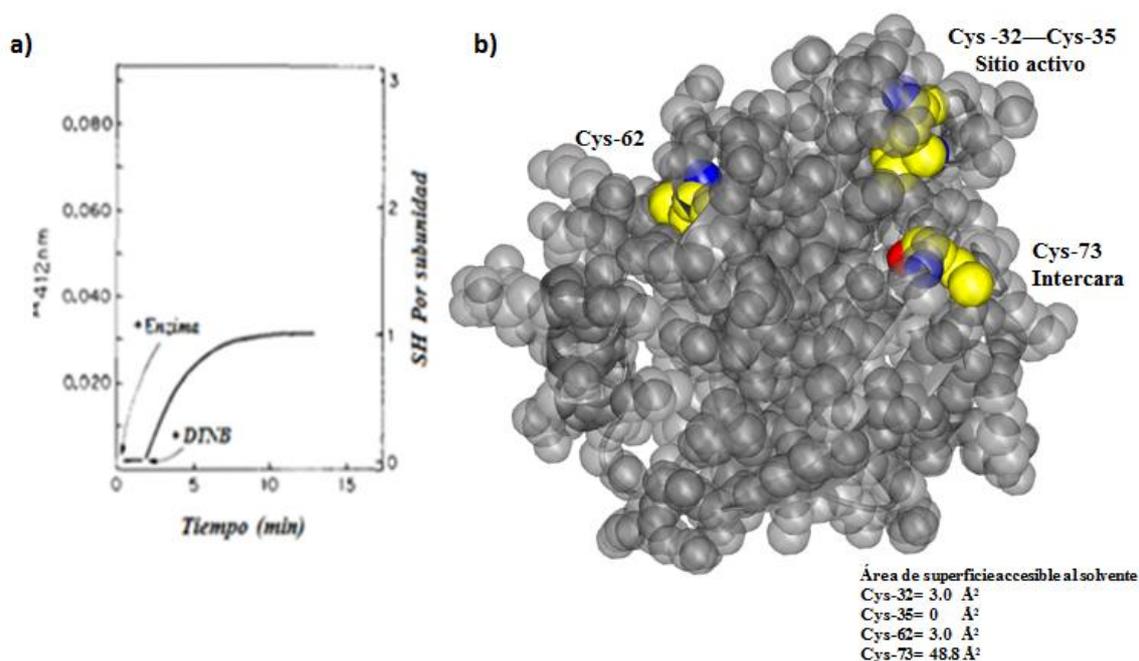


Figura 38. a) Trazo espectroscópica del proceso de cuantificación de grupos SH. En tiempo cero se encuentra la proteína con el *buffer*, la segunda reacción ocurre cuando se le agrega el DTNB reaccionando de manera inmediata con la proteína hasta llegar a el tiempo de estabilización. b) Área de superficie accesible al solvente de cada una de las cisteínas que componen la estructura de la *LvTrx*.

CAPÍTULO 6

C ONCLUSIÓN

En este proyecto se determinaron y analizaron por primera vez las estructuras cristalográficas de la Trx de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* encontrándose que forman un dímero en el cristal, tanto en su forma reducida, parcialmente reducida como oxidada. Esto permitió estudiar cambios estructurales en comparación con otra Trx, en particular con la hTrx, ya que al igual que la LvTrx muestra la formación de un dímero mediado por 11 residuos de aminoácidos y un puente disulfuro entre las Cys-73 de cada monómero. Además las estructuras demostraron tener movimientos en ciertos aminoácidos del sitio activo entre las formas reducida y oxidada

Como se ha reportado, la Trx se conoce por su gran capacidad redox en su forma monomérica en solución, sin embargo la tiorredoxina de camarón blanco y la tiorredoxina de humano presentan una población dimérica que se ha descrito a nivel estructural y se ha obtenido información en solución mediante ensayos de filtración en gel, que esta interacción puede existir entre monómeros a pH ácidos. Por lo cual se decidió realizar otros ensayos bioquímicos en la LvTrx para ir más allá para descartar que el dímero solamente se deba a un artefacto cristalográfico. Como resultado se determinó mediante filtración en gel, que la formación de dimérica está favorecida por pH bajos, mientras que la población monomérica se presentó en pH neutro/básicos, siendo no suficiente esta técnica para constatar de la existencia del dímero en solución, se sometió la muestra a distintos pH y temperaturas para obtener su radio hidrodinámico mediante la técnica de dispersión dinámica de luz obteniendo una población constante con un radio hidrodinámico con tendencia dimérica, sumado a este experimento se determinó por un método cuantitativo experimental, la cantidad de cisteínas libres en solución en la LvTrx a través del reactivo DTNB, mostrando sólo un sitio libre por subunidad, recordando que la LvTrx tiene 4 residuos de cisteína, dos que forman el sitio catalítico que en el experimento estaban comprometidos formando un puente disulfuro, la Cys-73, que forma parte de la interacción inter-monómero y la Cys-62 que no tiende a formar ninguna interacción, esta última es la única cisteína responsable que en la LvTrx en su estado oxidado permanezca libre. Todos los ensayos realizados, nos permiten sustentar la posible existencia de la formación de un dímero en solución prevaleciendo del mismo modo la forma monomérica. Sin embargo, el significado funcional de la formación del dímero aún no ha sido reconocido, no se sabe si este dímero es activo y aún se desconoce cómo es el mecanismo de regulación del equilibrio monómero-dímero en solución y en qué proporción de la población de LvTrx se encuentra en forma dimérica.

El análisis de los datos obtenido acerca del comportamiento de la LvTrx como dímero, ha permitido establecer un amplio espectro de investigaciones, para constatar la existencia de

este comportamiento. De este modo se han empezado a realizar pruebas utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear, para poder identificar cambios en la proteína a distintos pH, de igual forma a no poder establecer que el mantenimiento de la interacción intermonomérica sea solamente debida al puente disulfuro Cys-73, se están realizando mutaciones en este sitio, al igual que en el residuo Asp-60, que mantiene un puente de hidrógeno en esta interacción, con el fin de poder ir identificando cuales de los 12 aminoácidos son los responsables en mantener esta interacción en la *LvTrx*.

PERSPECTIVAS

Para poder seguir con estas investigaciones uno de los puntos a trabajar, sería el poder obtener la estructura de la *LvTrx* en su forma monomérica, como se ha venido manejando en este trabajo la dependencia del formación del dímero es meramente a un cambio de pH, por lo que al obtener cristales a pH neutro-básico, se pensaría obtener a la población monomérica. El sistema descrito en este proyecto abre la posibilidad de llevar a cabo estudios de biología molecular, ya que es de gran interés conocer qué residuos son los principales causales de la formación dimérica en la *LvTrx*. Es de mencionar que lo importante de este estudio es que dentro del universo de Trx depositadas en el PDB y reportadas, solo la tiorredoxina de humano y la *LvTrx*, presentan la formación del dímero mediada por una unión covalente. Por lo que sería importante empezar a trabajar con mutaciones en los residuos que están involucrados en esta interacción. Trabajos previos en la hTrx han realizado mutaciones puntuales, sin embargo no han podido descifrar cual o cuales residuos son fundamentales en esta interacción. Lejos de no haber eliminado la dimerización por las mutaciones realizadas a residuos de la interfaz dimérica de la tiorredoxina de humano [13], existen otros sitios potenciales que no han sido caracterizados que podrían ocasionar la eliminación del dímero. Los candidatos más probables serían la metionina 74 y valina 59, siendo la Met 74 el mejor candidato, debido a que este residuo está localizado directamente en el centro de la interfaz dimérica, y está implicada en la formación de la misma.

REFERENCIAS

- [1] A. Weichsel, J. R. Gasdaska, G. Powis, and W. R. Montfort, "Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer.," *Structure.*, vol. 4, no. 6, pp. 735-51, Jun. 1996.
- [2] M. P. Lesser, "Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology," *Review Literature And Arts Of The Americas*, vol. 68, no. 3, pp. 253-78, 2006.
- [3] H. Nakamura, K. Nakamura, and J. Yodoi, "Redox regulation of cellular activation," *Ann. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 351-69, 1997.
- [4] A. Holmgren, "Thioredoxin," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 237-71, 1985.
- [5] W. H. Watson, X. Yang, Y. E. Choi, D. P. Jones, and J. P. Kehrer, "Thioredoxin and its role in toxicology.," *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 78, no. 1, pp. 3-14, Mar. 2004.
- [6] G. Powis and W. R. Montfort, "Properties and biological activities of thioredoxins," *Annual Reviews*, vol. 41, no. 9, pp. 261-95, 2001.
- [7] M. R. Fernando, H. Nanri, S. Yoshitake, K. Nagata-Kuno, and S. Minakami, "Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells.," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 209, no. 3, pp. 917-22, Nov. 1992.
- [8] E. S. Arnér and A. Holmgren, "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.," *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 267, no. 20, pp. 6102-9, Oct. 2000.
- [9] O. Carmel-harel and G. Storz, "Roles of the glutathione and thioredoxin dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces*," *Regulation*, 2000.
- [10] A. Holmgren, "Electron Transport to Reductive Enzymes," *Biochemistry*, vol. 264, no. 24, pp. 13963-13966, 1989.
- [11] H. Eklund, F. K. Gleason, and a Holmgren, "Structural and functional relations among thioredoxins of different species.," *Proteins*, vol. 11, no. 1, pp. 13-28, Jan. 1991.
- [12] W. H. Watson et al., "Redox Potential of Human Thioredoxin 1 and Identification of a Second Dithiol / Disulfide Motif *," *Biochemistry*, vol. 278, no. 35, pp. 33408 -33415, 2003.
- [13] J. F. Andersen, D. a Sanders, J. R. Gasdaska, a Weichsel, G. Powis, and W. R. Montfort, "Human thioredoxin homodimers: regulation by pH, role of aspartate 60, and crystal structure of the aspartate 60 --> asparagine mutant.," *Biochemistry*, vol. 36, no. 46, pp. 13979-88, Nov. 1997.
- [14] M. C. Wahl, A. Irmeler, B. Hecker, R. H. Schirmer, and K. Becker, "Comparative structural analysis of oxidized and reduced thioredoxin from *Drosophila melanogaster*." *Journal of molecular biology*, vol. 345, no. 5, pp. 1119-30, Feb. 2005.
- [15] S. K. Katti, D. M. Lemasterf, and H. Eklund, "Crystal Structure of Thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å Resolution," *Molecular Biology*, pp. 167-184, 1990.

- [16] J. L. Martin, "Thioredoxin--a fold for all reasons.," *Structure.*, vol. 3, no. 3, pp. 245-50, Mar. 1995.
- [17] J.-F. Collet and J. Messens, "Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins.," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 13, no. 8, pp. 1205-16, Oct. 2010.
- [18] T. R. H. M. Kouwen et al., "Thioredoxin A active-site mutants form mixed disulfide dimers that resemble enzyme-substrate reaction intermediates.," *Journal of molecular biology*, vol. 379, no. 3, pp. 520-34, Jun. 2008.
- [19] M. T. Akadbmia, S. B. Kozpont, and B. Intbzet, "On the Mode of activation of the catalytically essential sulfhydryl group of papain.," *Enzyme*, vol. 109, pp. 104-109, 1973.
- [20] R. Velasco-García et. al., "Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt," *Biochemical Journal*, vol. 585, pp. 577-585, 2002.
- [21] X. Wang and H. Weiner, "Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis.," *Biochemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 237-43, Jan. 1995.
- [22] G. Roos et al., "The Conserved Active Site Proline Determines the Reducing Power of *Staphylococcus aureus* Thioredoxin," pp. 800-811, 2007.
- [23] P. Stefankova, J. Maderova, I. Barak, M. Kollarova, and Z. Otwinowski, "Expression, purification and X-ray crystallographic analysis of thioredoxin from *Streptomyces coelicolor*." *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, vol. 61, no. Pt 2, pp. 164-8, Feb. 2005.
- [24] F. de Lamotte-Guéry et al., "Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin.," *Protein engineering*, vol. 10, no. 12, pp. 1425-32, Dec. 1997.
- [25] J. F. Andersen, D. a Sanders, J. R. Gasdaska, a Weichsel, G. Powis, and W. R. Montfort, "Human thioredoxin homodimers: regulation by pH, role of aspartate 60, and crystal structure of the aspartate 60 --> asparagine mutant.," *Biochemistry*, vol. 36, no. 46, pp. 13979-88, Nov. 1997.
- [26] H. Eklund, F. K. Gleason, and a Holmgren, "Structural and functional relations among thioredoxins of different species.," *Proteins*, vol. 11, no. 1, pp. 13-28, Jan. 1991.
- [27] Lillian González-Segura y Rosario Muñoz-Clares, "El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de la proteínas," *REB*, no. 1, pp. 2-10, 2003.
- [28] R. González and C. Nave, "Radiation damage in protein crystals at low temperature.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 50, no. Pt 6, pp. 874-7, Dec. 1994.
- [29] R. Henderson, "The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules.," *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 28, no. 2, pp. 171-93, May 1995.
- [30] J. W. Murray, E. Rudiño-Piñera, R. L. Owen, M. Grininger, R. B. G. Ravelli, and E. F. Garman, "Parameters affecting the X-ray dose absorbed by macromolecular crystals.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 12, no. Pt 3, pp. 268-75, May 2005.
- [31] R. B. G. Ravelli and E. F. Garman, "Radiation damage in macromolecular cryocrystallography.," *Current opinion in structural biology*, vol. 16, no. 5, pp. 624-9, Oct. 2006.

- [32] E. F. Garman and R. L. Owen, "Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 62, no. Pt 1, pp. 32-47, Jan. 2006.
- [33] U. Chinte, B. Shah, Y. S. Chen, a A. Pinkerton, C. a Schall, and B. L. Hanson, "Cryogenic (<20 K) helium cooling mitigates radiation damage to protein crystals.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 63, no. Pt 4, pp. 486-92, Apr. 2007.
- [34] M. Weik et al., "Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 2, pp. 623-8, Jan. 2000.
- [35] N. Shimizu, K. Hirata, K. Hasegawa, G. Ueno, and M. Yamamoto, "Dose dependence of radiation damage for protein crystals studied at various X-ray energies.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 14, no. Pt 1, pp. 4-10, Jan. 2007.
- [36] D. Borek, S. L. Ginell, M. Cymborowski, W. Minor, and Z. Otwinowski, "The many faces of radiation-induced changes.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 14, no. Pt 1, pp. 24-33, Jan. 2007.
- [37] A. I. Barker, R. J. Southworth-Davies, K. S. Paithankar, I. Carmichael, and E. F. Garman, "Room-temperature scavengers for macromolecular crystallography: increased lifetimes and modified dose dependence of the intensity decay.," *Journal of synchrotron radiation*, vol. 16, no. Pt 2, pp. 205-16, Mar. 2009.
- [38] B. Hedman, K. O. Hodgson, J. R. Helliwell, R. Liddington, and M. Z. Papiz, "Protein microcrystal diffraction and the effects of radiation damage with ultra-high-flux synchrotron radiation.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 22, pp. 7604-7, Nov. 1985.
- [39] T. Y. Teng and K. Moffat, "Radiation damage of protein crystals at cryogenic temperatures between 40 K and 150 K," *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 9, no. 4, pp. 198-201, Jun. 2002.
- [40] R. B. Ravelli and S. M. McSweeney, "The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures.," *Structure (London, England : 1993)*, vol. 8, no. 3, pp. 315-28, Mar. 2000.
- [41] W. P. Burmeister, "Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage," *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, vol. 56, no. 3, pp. 328-341, Mar. 2000.
- [42] S. Banumathi, P. H. Zwart, U. a Ramagopal, M. Dauter, and Z. Dauter, "Structural effects of radiation damage and its potential for phasing.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 60, no. Pt 6, pp. 1085-93, Jun. 2004.
- [43] M. Cianci, J. R. Helliwell, and A. Suzuki, "The interdependence of wavelength, redundancy and dose in sulfur SAD experiments.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 64, no. Pt 12, pp. 1196-209, Dec. 2008.
- [44] H.-kirsti S. Leiros and A. O. Smala, "research papers Atomic resolution structures of trypsin provide insight into structural radiation damage research papers," *October*, pp. 488-497, 2001.
- [45] G. Powis and W. R. Montfort, "Properties and biological activities of thioredoxins," *Annual Reviews*, vol. 41, no. 9, pp. 261-95, 2001.
- [46] W. Kabsch, "XDS," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 66, no. Pt 2, pp. 125-32, Feb. 2010.

- [47] P. Evans, "Scaling and assessment of data quality.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 62, no. Pt 1, pp. 72-82, Jan. 2006.
- [48] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read, "Phaser crystallographic software.," *Journal of applied crystallography*, vol. 40, no. Pt 4, pp. 658-674, Aug. 2007.
- [49] G. N. Murshudov, a Vagin, and E. J. Dodson, "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 53, no. Pt 3, pp. 240-55, May 1997.
- [50] P. D. Adams et al., "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 66, no. Pt 2, pp. 213-21, Feb. 2010.
- [51] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan, "Features and development of Coot.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 66, no. Pt 4, pp. 486-501, Apr. 2010.
- [52] E. Aispuro-hernandez et al., "Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein," *Molecular Biology*, vol. 148, pp. 94-99, 2008.
- [53] A. Holmgren, "Thioredoxin Catalyzes the reduction of insulin disulfide by dithiothreitol and dihydroliipoamide," *Journal of biological chemistry*, vol. 254, no. 19, pp. 9627-9632, 1979.
- [54] G. Raddatz, V. I. Bunik, T. Scior, and H. Bisswanger, "Homology modelling of a newly discovered thioredoxin protein and analysis of the force field and electrostatic properties," *Journal of Molecular Modeling*, vol. 3, no. 8, pp. 359-363, Aug. 1997.
- [55] L. R. Manning, W. T. Jenkins, J. R. Hess, K. Vandegriff, R. M. Winslow, and J. M. Manning, "Subunit dissociations in natural and recombinant hemoglobins.," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 5, no. 4, pp. 775-81, Apr. 1996.