



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“IDENTIFICACIÓN DE REGIONES AMILOIDOGÉNICAS  
EN TRIOSA FOSFATO ISOMERASA HUMANA”**

**T E S I S**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

**P R E S E N T A :**  
M. en C. EDSON NORBERTO CÁRCAMO NORIEGA

**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA. GLORIA SAAB RINCÓN**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELAZCO**  
Facultad de Medicina, UNAM

**DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FEBRERO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Gloria Saab Rincón, en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante los estudios de Doctorado recibí una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT.

La investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN211414) y de CONACyT (154194).

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme regalado la vida y con ella los factores que la complementan.

A mi mamá por tener tanta fe en mí, lo cual me ha dado la confianza para lograr lo que sea. Por todo tu apoyo incondicional, tu ejemplo y amor. A mis hermanos por ser una motivación.

A mi novia Daniela por su apoyo en el día a día, su cariño y amor. Gracias, te amo mucho.

A la Dra. Gloria Saab Rincón, por permitirme trabajar con ella. Gracias por darme la libertad y confianza para desarrollarme como investigador.

A los miembros del comité tutorial; Dr. Daniel Alejandro Fernandez Velazco y al Dr. Takuya Nishigaki Shimizu por sus acertadas observaciones que enriquecieron este trabajo.

A los doctores: Dr. Baltazar Becerril Luján, Dr. Luis del Pozo Yauner, Dra. Leonor Pérez Martínez, Rubén Paul Gaytán Colín y Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas, por apoyar en la revisión de este trabajo.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)” por el apoyo económico brindado para la asistencia de congresos nacionales e internacionales.

Al M. en C. Israel Aguilar Ordoñez, M. en C. Ramon Carrasco Macias y al M. en C. Armando Hernández Ortiz por su amistad y consejos en el desarrollo de este trabajo.

A todos los compañeros y amigos en Cuernavaca por la buena convivencia. Gracias Yossef, Nuria, Fily, Ramon, Acapulco, Niño, Lozano, Sol, Checho, Remi, Barrios, Rick, Emma, Brenda, Lidia, Valeria, Getza, Paloma, Mary, Rodrigo, etc. A todos muchas gracias.

A la familia Zazueta de la Cruz por su apoyo. Gracias Enrique.

**Agradecimientos por asistencia y asesoría técnica:**

Al Biól. Filiberto Sánchez López por asesoría en biología molecular y asistencia en expresión y purificación de proteína.

A la Dra. Guadalupe Zavala Padilla por asistencia en microscopía electrónica.

Al Dr. Yossef López de los Santos por asesoría en biología molecular.

Al Dr. Humberto Flores Soto por asesoría técnica.

A la Ing. Leticia Olvera Rodríguez por asesoría en purificación de proteínas.

A la Dra. Valeria Guzmán Luna por asesoría en análisis de datos.

A la Biol. Emma Liliana Arévalo Salina por asistencia técnica.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	3
ÍNDICE .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUCCIÓN .....	10
ANTECEDENTES .....	24
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	26
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVO GENERAL .....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Reactivos.....	30
Expresión y purificación de HsTPI.....	30
Mutación puntual de HsTPI. ....	32
Nitración <i>in vitro</i> de HsTPI.....	32
Ensayos de la agregación. ....	32
Ensayo de corrimiento espectral del rojo Congo .....	36
Espectroscopia de infrarrojo.....	36
Dot-blot.....	37

Microscopía de fluorescencia. ....	37
Microscopía electrónica de transmisión.....	37
Predicción consenso de regiones cross- $\beta$ . ....	38
Hidrólisis acida de HsTPI.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Expresión y purificación de HsTPI.....	40
Agregación de nitro-HsTPI. ....	40
Agregación de HsTPI. ....	45
Identificación de regiones Cross- $\beta$ en HsTPI.- ....	53
Características protectoras de HsTPI.....	64
CONCLUSIONES .....	67
ANEXOS .....	68
ANEXO I.....	68
ANEXO II.....	71
ANEXO III.....	72
REFERENCIAS.....	73
ARTICULO PUBLICADO .....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	12
Figura 2.....	13
Figura 3.....	17
Figura 4.....	18
Figura 5.....	19
Figura 6.....	23
Figura 7.....	25
Figura 8.....	33
Figura 9.....	34
Figura 10.....	41
Figura 11.....	42
Figura 12.....	44
Figura 13.....	46
Figura 14.....	49
Figura 15.....	50
Figura 16.....	55
Figura 17.....	56
Figura 18.....	58
Figura 19.....	60
Figura 20.....	62
Figura 21.....	63



## RESUMEN

La agregación de proteína hacia fibras amiloides se asocia con diversas enfermedades crónico-degenerativas. Estudios recientes sugieren la participación de la enzima glucolítica triosa fosfato isomerasa (HsTPI) al proceso fisiopatológico del Alzheimer. No obstante, su asociación directa en la formación de agregados amiloides tóxicos no está esclarecida aun. En este trabajo se evaluó la propensión amiloidogénica de HsTPI, encontrándose que mientras que en condiciones nativa, HsTPI se agrega conservando gran parte de su estructura secundaria, a 3.2 M de urea, HsTPI forma agregados- $\beta$  con morfología desordenada. Se demostró por medio de espectroscopía de infrarrojo y por reconocimiento del anticuerpo WO1, la naturaleza cross- $\beta$  de estos agregados, lo que sugiere que HsTPI presenta más de una ruta de agregación. Esto anterior sugiere que HsTPI contiene regiones amiloidogénicas, pero que éstas se encuentran protegidas por una alta barrera energética que impide su fibrillogénesis. Usando distintos algoritmos se identificaron varias regiones potenciales concentradas mayormente hacia el C-terminal. De éstas, 4 regiones formaron fibras amiloides *in vitro* donde la región correspondiente a la hebra- $\beta$  3 resultó altamente amiloidogénica. Más aun, esta región fue la única que formó cross- $\beta$  tras la hidrólisis ácida de HsTPI. No obstante a las regiones formadoras de cross- $\beta$ , HsTPI mostró en condiciones nativas sugiriendo que la topología de barril TIM ejerce mecanismos de protección posiblemente basados en la distribución de los residuos que forman las hebras- $\beta$  y a la alta estabilidad de este plegamiento.

## ABSTRACT

Self-assembly of proteins into highly ordered amyloid fibrils plays a key role in several chronic human diseases. Recent findings suggest a possible participation of the human triosephosphate isomerase (HsTPI) in the amyloid pathophysiology of patients with Alzheimer's disease. However, its role in the formation of toxic amyloid aggregates is unclear. This work was aimed to study the propensity of HsTPI to form amyloid-like aggregates. The incubation of the enzyme under native-like conditions led to native-like assemblies while in partially denaturing conditions (urea 3.2 M) formed large  $\beta$ -aggregates. This increase in  $\beta$ -aggregation only under destabilizing conditions, suggests that native state is protected by a high energetic barrier, so that intermediates leading to amyloid formation are inaccessible under native conditions. However, the  $\beta$ -aggregates formed display poor fibrillar morphology and residual cross- $\beta$  structure, as demonstrated by the recognition of the WO1 antibody and ATR-FTIR analysis. These results indicated an incomplete  $\beta$ -aggregation and possible competitive aggregation pathways. Using bioinformatics approaches, we found eight regions in the HsTPI sequences that are predicted to form amyloid fibrils. Four of the synthetic peptides comprising these regions formed fibrillar aggregates. From these, the  $\beta$ 3 region (residues 59-66) was the most fibrillogenic, and it was also recovered directly from amyloid fibrils formed by HsTPI aggregation upon acid hydrolysis. Despite the fibrillogenic regions found, HsTPI displayed low  $\beta$ -aggregation propensity suggesting the presence of some protective mechanism presumably based on protein topology.

## INTRODUCCIÓN

Las proteínas son las biomoléculas más complejas y versátiles en los organismos. Participan en prácticamente todo proceso biológico. En una célula típica de mamífero existen más de 10,000 proteínas diferentes, las cuales se acumulan en una concentración tan alta (300-400 mg/mL) que el citoplasma celular no exhibe un estado físico de líquido sino de gel <sup>1</sup>. Las proteínas existen y funcionan en un ambiente molecularmente amontonado donde deben permanecer solubles y conservar una estructura tridimensional definida. Esto último es especialmente relevante ya que muchas proteínas deben ser conformacionalmente flexibles para funcionar, lo que quiere decir que son termodinámicamente metaestables en ambiente fisiológico y que cambios sutiles en el ambiente en que se encuentran pueden causar la pérdida de su estructura activa <sup>2,3</sup>. Para mantener la proteostasis (control homeostático del proteoma), la célula regula los procesos de biogénesis, plegamiento, transporte y degradación de las proteínas <sup>4</sup>. Se ha visto que una ineficiencia en la proteostasis celular, causada por el envejecimiento y la acumulación de mutaciones, conlleva a la formación de agregados potencialmente nocivos para la célula <sup>5-7</sup>.

Durante la síntesis de las proteínas, la cadena polipeptídica naciente debe plegarse de la manera más cooperativa y rápida para alcanzar el estado nativo, evitando la formación de estructuras aberrantes <sup>8</sup>. Se sabe que el plegamiento de las proteínas sigue un proceso estocástico, dirigido por interacciones débiles, que fluctúa entre estados conformacionales hacia estructuras más estables <sup>9,10</sup>. Sin embargo, al transitar por múltiples estados conformacionales, el polipéptido es

comúnmente asistido por chaperonas que se encargan de dirigir el plegamiento hacia el estado nativo evitando estados conformacionales aberrantes <sup>11-13</sup>. Una vez alcanzado el estado nativo, que muchas veces no es el más favorable energéticamente, éste se mantiene debido a barreras energéticas altas que lo separan de cualquier otro estado. Sin embargo, alteraciones como modificaciones postraduccionales, mutaciones o estrés bioquímico pueden causar que las proteínas visiten estados alternos y se acumulen intermediarios de plegamiento. En estos intermediarios, parcialmente desplegados, la competencia entre interacciones intramoleculares e intermoleculares abre la posibilidad de visitar un paisaje energético más amplio al incluir estructuras supramoleculares como los agregados (Figura 1) <sup>14</sup>.

La agregación de proteínas se caracteriza por asociación intermolecular de la proteína fuera de la estructura nativa, a diferencia de la precipitación por punto isoeléctrico o por "salting-out" donde el estado plegado se mantiene. Se ha observado que la aparición de un intermediario parcialmente desplegado es clave en la agregación (Figura 2) <sup>15</sup>. En base a lo anterior, factores que promueven conformaciones no nativas, como mutaciones y modificaciones postraduccionales, pueden favorecer la agregación. Además, factores como la temperatura, pH, fuerza iónica, condiciones redox, co-solutos y concentración de proteína pueden ser alterados y promover la agregación <sup>16</sup>.

A diferencia de la precipitación nativa, el cual es un proceso reversible ya que la proteína puede recuperar su solubilidad y conformación nativa, la agregación proteica exhibe, en la mayoría de los casos, una estabilidad mayor al estado

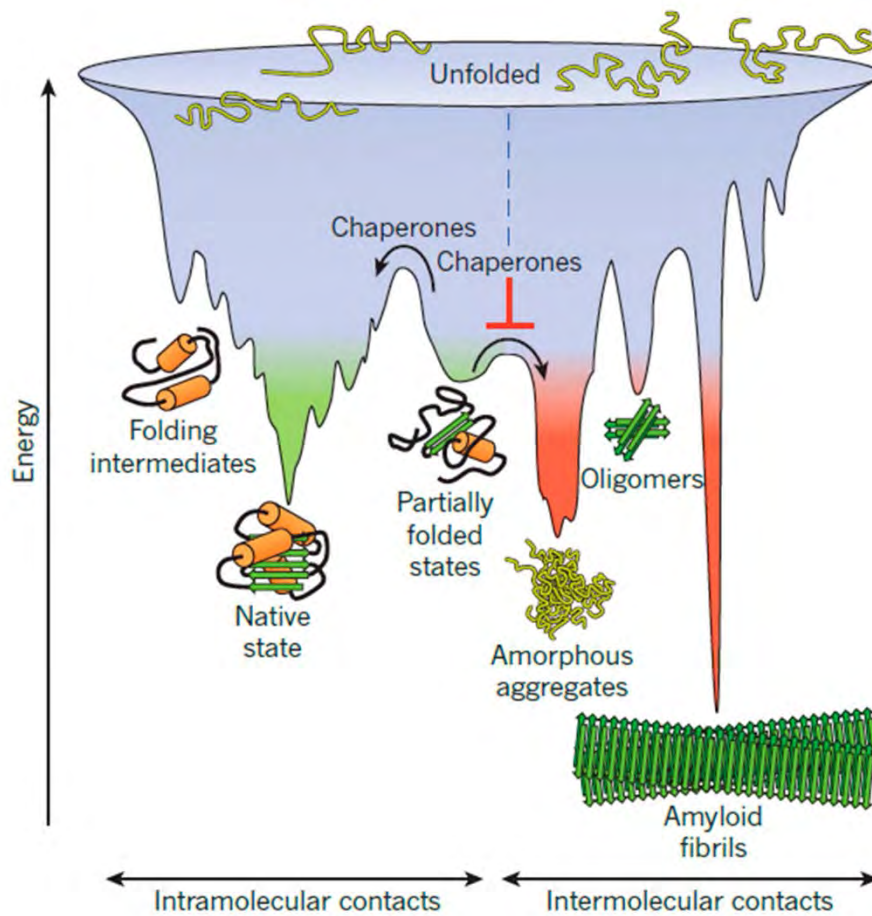
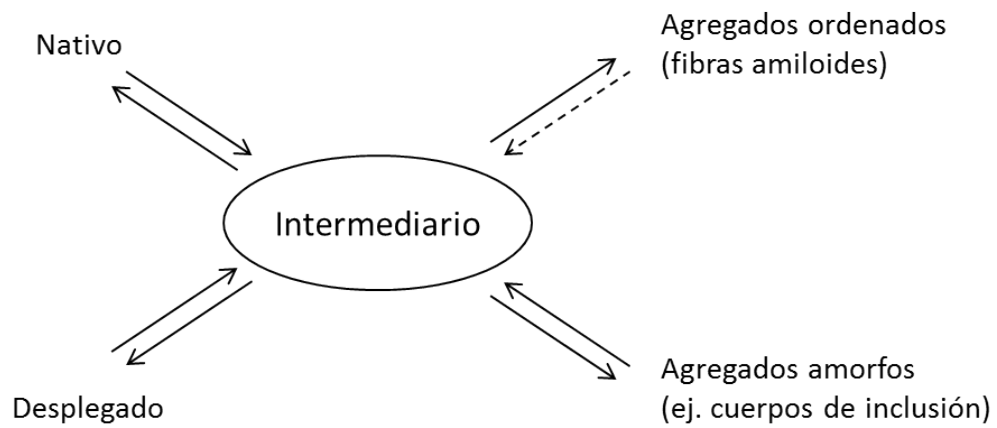


Imagen tomada de Hartl y col., 2011

**Figura 1.** Rutas de interacciones posibles de una cadena polipeptídica naciente. Esquema de túnel de energía libre donde una proteína transita hacia estados energéticos menores por contactos intramoleculares (estado nativo) o contactos intermoleculares (agregados). El proceso es facilitado por chaperonas, las cuales dirigen al polipéptido al estado nativo, impidiendo que estados intermediarios sean reclutados hacia otras vías (agregación).



**Figura 2.** Modelo básico de agregación. Representado en un círculo está el intermediario parcialmente desplegado, clave en la agregación. Este puede acumularse desde el estado nativo en un proceso parcial de desplegamiento o como un intermediario durante el plegamiento del polipéptido. Los agregados ordenados se consideran irreversibles ya que no existen mecanismos biológicos para su remoción.

nativo y solo con el uso de agentes caotrópicos o detergentes se logra su disociación y solvatación. En este sentido, los agregados se forman por las mismas interacciones responsables del plegamiento de proteínas y de igual manera pueden estructurarse en hélices- $\alpha$  y láminas- $\beta$  (estructura secundaria) y compactarse por interacciones de la cadena lateral (estructura terciaria). El tipo de interacciones están ligadas a la estructuración, morfología y estabilidad de los agregados. Comúnmente los agregados son clasificados según su estructuración en agregados amorfos y ordenados.

Los agregados amorfos son aquellos que no contienen una estructura persistente ni un núcleo de agregación, exhibiendo una morfología microscópica irregular. Este tipo de agregado se forma por diversas interacciones no nativas, primordialmente contactos de las cadenas laterales de los aminoácidos<sup>17,18</sup>. Se ha observado que las interacciones hidrofóbicas son las principales responsables de dirigir la asociación intermolecular no ordenada<sup>19</sup>. No obstante, el empaquetamiento en estas estructuras es pobre e irregular lo que le confiere cierta reversibilidad al agregado. Dentro de la célula, estos agregados son separados por chaperonas o eliminados por autofagia y el proteosoma<sup>5,13</sup>. Al no tener un patrón de estructura establecido, los agregados amorfos pueden crecer hacia cualquier lado y alcanzar grandes tamaños donde su tasa de agregación es limitada por la superficie del agregado y la concentración de proteína<sup>20</sup>. Más aun, el mecanismo de agregación puede mostrar una fase lag independiente de nucleación, pero si dependiente al de solubilidad de la proteína. Ejemplos de este

tipo de agregados son los cuerpos de inclusión y los agregados formados por replegamiento *in vitro* de la proteína <sup>15</sup>.

Por otro lado, los agregados ordenados siguen un patrón de estructura con una morfología microscópica regular. La formación de estos agregados se basa en interacciones específicas que conllevan a un plegamiento intermolecular definido. De este tipo de agregados, las fibras amiloides son el único ejemplo existente.

Las fibras amiloides son estructuras proteicas supramoleculares altamente ordenadas que, como su nombre lo indica, poseen morfología fibrilar. La alta estructuración y empaquetamiento de las fibras amiloides le confieren gran estabilidad, más aun, no existen mecanismos biológicos para su eliminación <sup>21,22</sup>. La acumulación de agregados amiloides se ha relacionado con patologías crónico-degenerativas como el Alzheimer, Huntington, Parkinson, entre otras <sup>23-27</sup>. No obstante, los agregados amiloides no siempre se asocian a procesos patológicos. Existen fibras amiloides fisiológicamente funcionales, tanto en procariontes como en eucariotes, con funciones estructurales, de protección, regulación y hasta de desintoxicación <sup>28-30</sup>. Adicionalmente, los agregados fibrilares han adquirido gran importancia en la investigación de nanomateriales para aplicaciones en nanotecnología y nanomedicina <sup>31-33</sup>.

Actualmente, se han descubierto más de 40 diferentes proteínas asociadas a procesos amiloides que difieren tanto en secuencia, como en topología, tamaño y función; pero sin importar el origen, todas comparten características estructurales similares en las fibras formadas <sup>28,34</sup>. La unidad estructural común de las fibras



amiloides es la columna vertebral, conocida como cross- $\beta$ , donde hebras  $\beta$  se ensamblan intermolecularmente de manera perpendicular al eje de la fibra para formar hojas  $\beta$  que crecen a lo largo del eje (Figura 3) <sup>35-37</sup>. Además del plegamiento intermolecular cross- $\beta$ , las fibras amiloides pueden contener regiones con estructuración diferente, sin embargo, el núcleo cross- $\beta$  es el responsable del ordenamiento y estabilidad del agregado<sup>38</sup>.

La formación de fibras amiloides (amiloidogénesis) sigue un esquema general en el cual la proteína precursora es desestabilizada a un intermediario amiloidogénico <sup>39</sup>. Posteriormente, este intermediario se asocia hasta formar una unidad estructural mínima (núcleo cross- $\beta$ ) que luego se ensambla cooperativamente en filamentos y fibrillas mediante eventos de acoplamiento de núcleos, adición de monómero por templado, nucleación secundaria y asociación lateral de protofilamentos (Figura 4) <sup>40</sup>. No obstante, los mecanismos de amiloidogénesis pueden diferir dependiendo de la proteína precursora y las condiciones de agregación. Estas diferencias radican en el número de pasos secuenciales (estados conformacionales y oligoméricos), rutas y la cooperatividad en la agregación <sup>40-44</sup>.

Se han propuesto distintos modelos de amiloidogénesis en base a datos cinéticos, estructurales y morfológicos. La mayoría de las proteínas amiloidogénicas estudiadas siguen un mecanismo basado en nucleación <sup>45</sup>. El mecanismo más común es el de polimerización nucleada (Figura 5a). En éste, la agregación es limitada por la formación de un núcleo

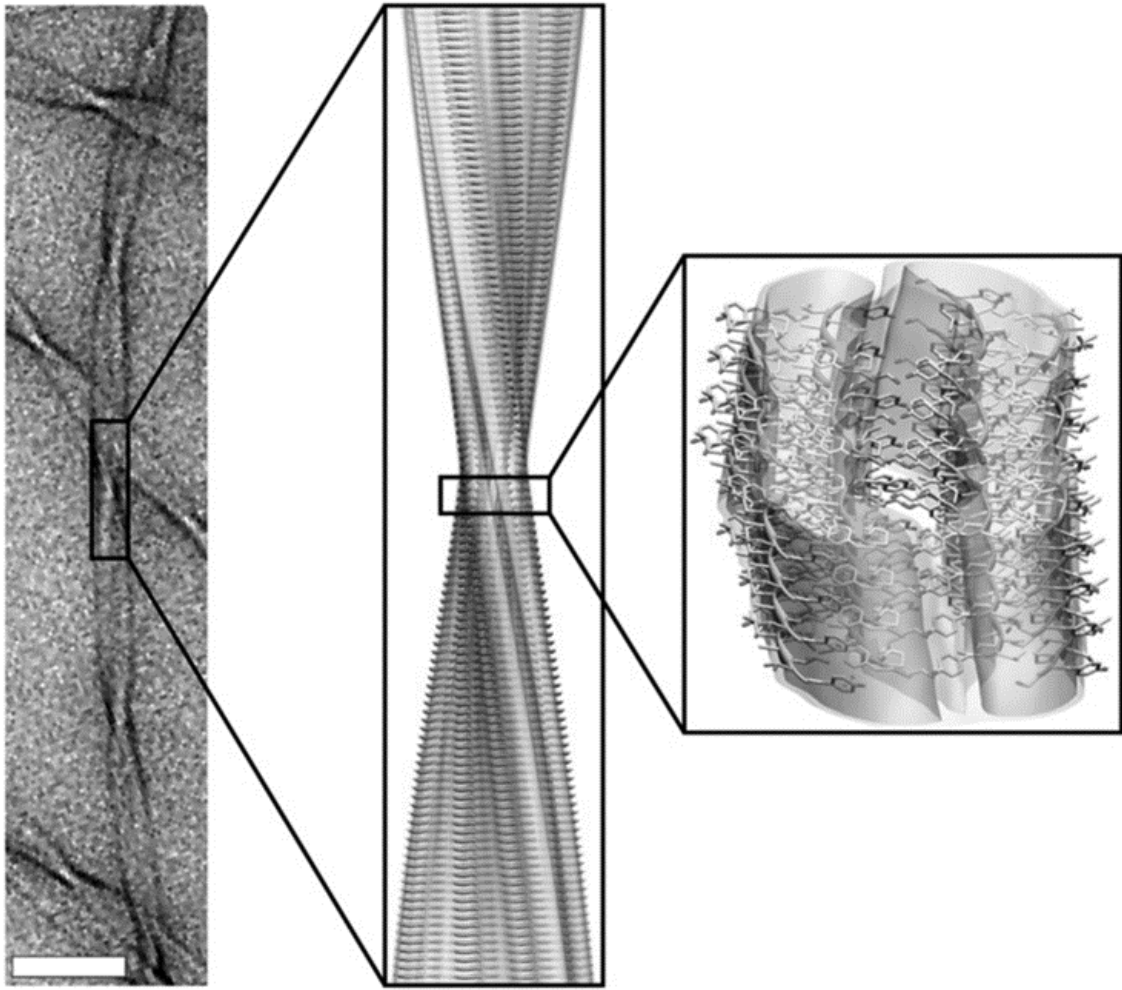
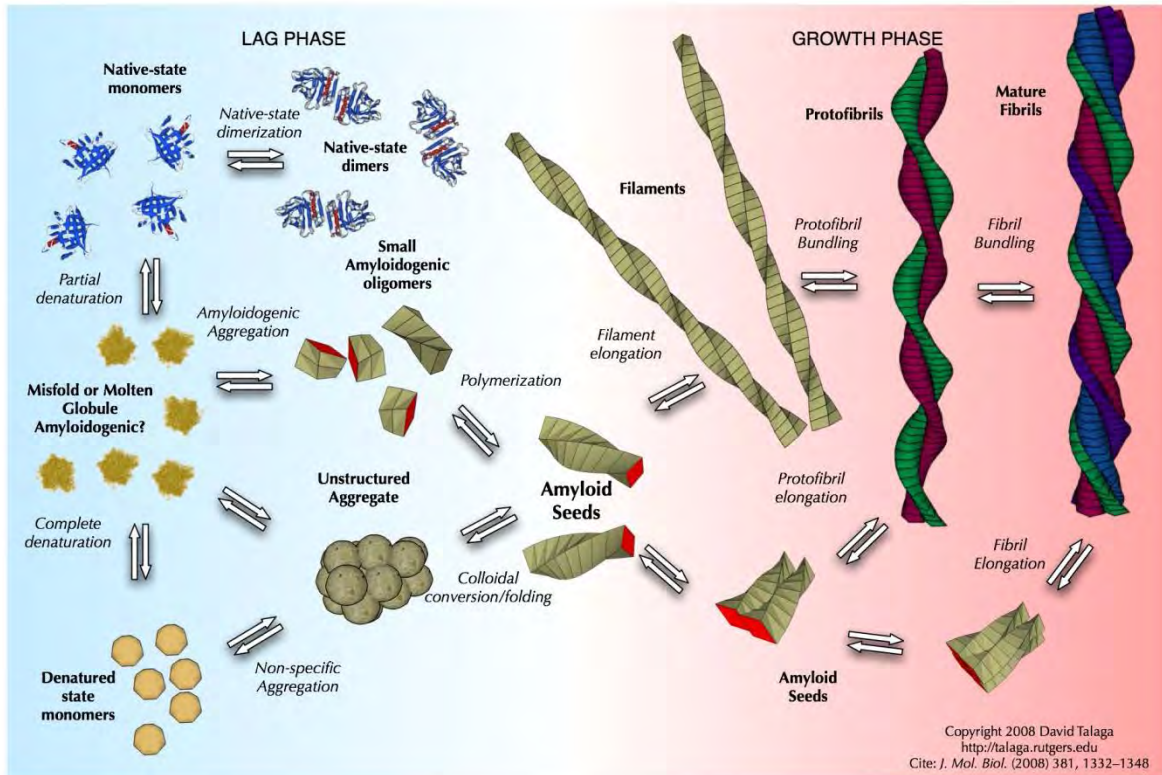


Imagen tomada de Fitzpatrick y col.,

**Figura 3.** Estructura de una fibra amiloide. Combinación de criomicroscopía electrónica (izquierda) y análisis de resonancia magnética nuclear (centro) permitieron alcanzar resolución atómica de este polimorfismo de los agregados amiloides formado por un fragmento de 11 residuos de transtiretina. El modelo gráfico (derecha) la asociación cross- $\beta$  en el empaquetamiento vertical y la asociación de filamentos en el horizontal.



**Figura 4.** Esquema general de agregación amiloide. Durante un proceso de agregación, las proteínas pueden seguir distintas rutas. En la primera fase de la agregación, las especies precursoras de las proteínas (estado nativo, parcialmente desplegado o totalmente desplegado) pueden adquirir una conformación amiloidogénica y ensamblarse en oligómeros cross- $\beta$  o colapsar en agregados desordenados con una posterior estructuración cross- $\beta$ . Esta primera fase es dependiente de la concentración de proteína y es la que dicta la velocidad de amiloidogénesis. Después, estos núcleos cross- $\beta$  se ensamblan cooperativamente en filamentos y fibrillas maduras hasta alcanzar la saturación y un equilibrio con eventos de fragmentación y nucleación secundaria.

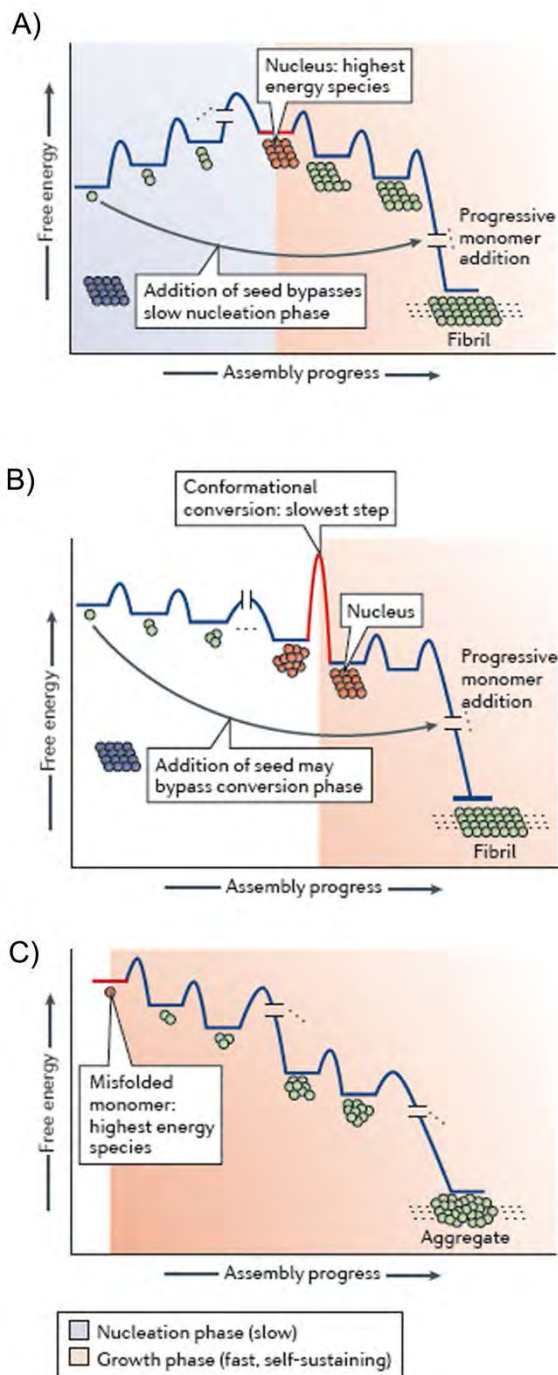


Imagen tomada de Eisele y col., 2015

**Figura 5.** Modelos de amiloidogénesis. En los modelos de nucleación se observa una fase lenta en la que se forman bloques estructurados (núcleos). En el caso de polimerización dependiente de nucleación (A), la velocidad de agregación está limitada por la formación de un núcleo cross- $\beta$  de tamaño crítico. Por otro lado, la velocidad en el modelo de conversión del núcleo (B) se limita en el cambio de estructura hacia cross- $\beta$  de ensambles desordenados. En el tercer ejemplo (C), existe una amiloidogénesis energéticamente favorable (downhill) desde la desestabilización del estado nativo.

termodinámicamente desfavorable de tamaño crítico  $n$  (número de monómeros) <sup>46</sup>. Una vez alcanzado el tamaño crítico, el núcleo desencadena la elongación de la fibra amiloide de manera irreversible <sup>47,48</sup>. La adición de núcleos preformados acortan la fase de nucleación al proporcionar bloques estructurados para la adición de monómeros por templado así como por eventos de nucleación secundaria <sup>40</sup>. Además, este mecanismo se caracteriza por tener una concentración crítica del monómero, por debajo de la cual, la agregación no ocurre <sup>49</sup>.

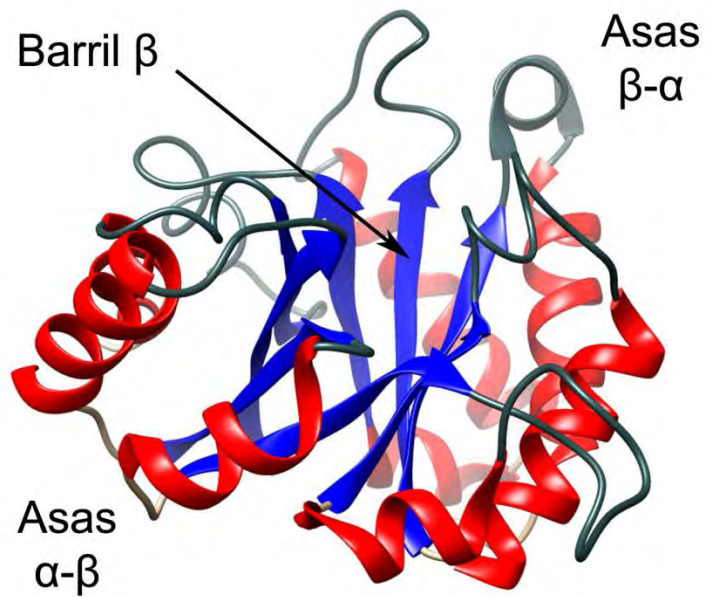
Otro ejemplo de mecanismos basados en nucleación es el de polimerización por conversión del núcleo <sup>50,51</sup> (Figura 5b). En este mecanismo, la velocidad de nucleación no se limita a un tamaño crítico  $n$ , sino al cambio conformacional de especies oligoméricas existentes <sup>52</sup>. La nucleación se da primeramente de manera estocástica hacia especies amorfas, que luego se convierten en núcleos cross- $\beta$  <sup>53</sup>. La fase lag en este mecanismo no siempre es acortada por la adición de núcleos estructurados preformados. Este es el caso del dominio SH3 de la P13-kinasa la cual a pH 3.6 se agrega en un intermediario amorfo que posteriormente exhibe morfología fibrilar <sup>54</sup>.

En otros mecanismos descritos, la amiloidogénesis es independiente de nucleación <sup>45</sup>. En estos modelos, la agregación amiloide es energéticamente favorable limitada solo por la estabilidad del estado nativo de la proteína precursora (Figura 5c). Como ejemplo está la polimerización cuesta abajo (downhill) exhibida por transtiretina, en donde la disociación del tetrámero es el paso limitante <sup>55</sup>. Independientemente del mecanismo que dé lugar a la

amiloidogénesis, ésta depende de la conformación del precursor proteico, y de si éste promueve la formación de estructuras cross- $\beta$  o agregación desordenada, es decir, depende de la propensión amiloidogénica.

Debido a su naturaleza estructural, la formación de cross- $\beta$  es una propiedad generalizada en cadenas polipeptídicas lo cual sugiere que todas las proteínas tienen el potencial de formar fibras amiloides <sup>2,56</sup>. Sin embargo, no todas las proteínas forman agregados en un entorno fisiológico <sup>57</sup>. Se ha observado que existen proteínas que son más propensas a amiloidogénesis que otras para plegarse en cross- $\beta$ . Esta predisposición está dada por factores amiloidogénicos inherentes a ciertas secuencias, como la alternancia de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, baja carga neta, bajo contenido de prolinas y alta tendencia a la formación de estructura secundaria  $\beta$  <sup>58-60</sup>. Es sorprendente la frecuencia con la que estas secuencias amiloidogénicas se encuentran presentes en un gran número de proteínas. En algunos casos, desempeñan un papel clave en la función o el plegamiento de la proteína y, por lo tanto no pueden ser eliminadas. Al parecer, la evolución ha desarrollado mecanismos de protección como la mejora de la solubilidad, impedimento estérico y restricción conformacional, para evitar la exposición de las regiones amiloidogénicas <sup>61,62</sup>. Es evidente que la mayoría de los mecanismos de protección se sustentan en la estabilidad del estado nativo de la proteína, por lo que es de esperarse que topologías con estabilidades más elevadas sean menos susceptibles a la agregación, explicando así el número bastante limitado de topologías observadas en la naturaleza.

Una de las topologías que ha sido reclutada reiteradamente durante la evolución, es la de barril TIM  $(\beta/\alpha)_8$ . Este plegamiento consiste en 8 unidades consecutivas de hebras  $\beta$  seguidas por asas y culminando en hélices- $\alpha$ . En su estructura tridimensional, estas unidades se pliegan de manera que las 8 hebras  $\beta$  se ensamblan de forma paralela formando un barril  $\beta$  al interior de la molécula, rodeado por las hélices- $\alpha$  y las asas (Figura 6). Las asas que conectan las hebras  $\beta$  con las hélices- $\alpha$  ( $\beta$ - $\alpha$ ) son consideradas importantes para la función, por otro lado las asas ( $\alpha$ - $\beta$ ,) al lado posterior de la molécula, están relacionadas con la estabilidad de la estructura terciaria <sup>63</sup>. Esta topología presenta un andamio muy versátil para proteínas funcionales, ya que se encuentran representados 5 de los 6 tipos de reacciones enzimáticas siendo uno de los plegamientos más recurrentes en la naturaleza <sup>63</sup>. A pesar de su ubicuidad, hasta la fecha no se ha demostrado que algún barril TIM participe directamente en agregación amiloide *in vivo*. Por lo anterior surge la pregunta: ¿Existe un potencial amiloidogénico en los barriles TIM? ¿Existen determinantes estructurales propias de la topología  $(\beta/\alpha)_8$  que eviten la formación de fibras amiloides?

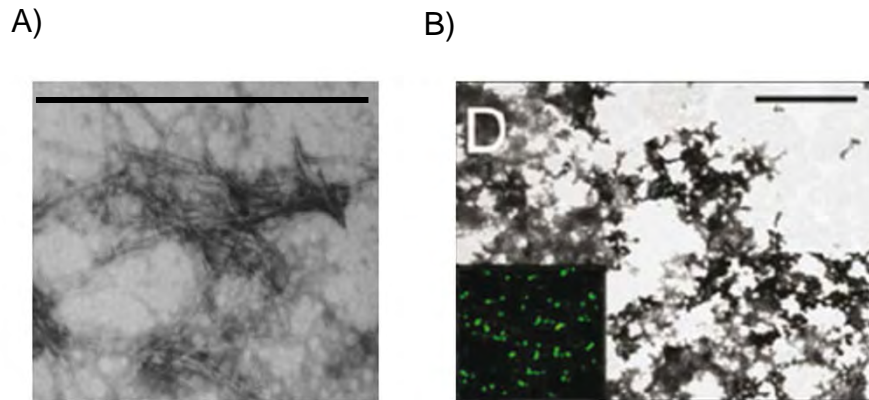


**Figura 6.** Plegamiento de barril TIM (β/α)<sub>8</sub>. Estructura cristalográfica de triosa fosfato isomerasa de humano (PDB: 2JK2). Mostrando en azul las hebras β formando un barril al interior de la molécula y en rojo las hélices α. En la cara superior se orientan las asas β/α y en la inferior las α/β



## ANTECEDENTES

En la literatura se han reportado algunas evidencias que vinculan a triosa fosfato isomerasa (TPI) con la agregación de amiloide. En 1999, Contreras y colaboradores encontraron un segmento (residuos 186 a 218) de TPI de *Escherichia coli* que comparte 20% de identidad con el péptido  $\beta$ -amiloide en alineación múltiple inducida por patrón (PIMA, por sus siglas in inglés) <sup>64</sup>. Al evaluar este fragmento como péptido sintético se demostró que formaba fibras con morfología amiloide (Figura 7a) y afinidad a rojo Congo. Diez años después en otro trabajo, Guix y colaboradores encontraron niveles altos de una variante nitrada de TPI, la cual fue inducida por el proceso oxidativo, a raíz de los depósitos amiloides en tejidos cerebrales de pacientes con enfermedad de Alzheimer <sup>65</sup>. La agregación *in vitro* de la nitro-TPI de conejo llevó a ensambles con características amiloides (Figura 7a). Estos datos podrían indicar un potencial amiloidogénico de TPI, más aun, la posible participación de la enzima humana en procesos amiloidogénicos *in vivo*. Por lo anterior, consideramos imperativo evaluar la propensión *in vitro* de triosa fosfato isomerasa humana (HsTPI) a agregarse en estructura secundaria cross- $\beta$  así como identificar las regiones con potencial para formar este tipo de agregados.



**Figura 7.** A) Agregado con morfología fibrillar con características amiloides formado por el segmento (186-218) de TPI de *E. coli*<sup>64</sup>. B) Agregado formado por la variante nitrada de TPI de conejo<sup>65</sup>. En este agregado no se aprecia morfología fibrilar, sin embargo el agregado presenta fluorescencia con Tioflavina T. Las barras de escala equivalen a 1 $\mu$ m.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Es triosa fosfato isomerasa humana una proteína amiloidogénica?

¿Posee triosa fosfato isomerasa humana regiones formadoras de estructura cross- $\beta$  (regiones fibrilogénicas)?

## **HIPÓTESIS**

Triosa fosfato isomerasa humana posee regiones formadoras de estructura secundaria cross- $\beta$  que en el contexto estructural nativo no son fibrilogénicas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial amiloidogénico de triosa fosfato isomerasa humana al estudiar su agregación e identificar sus regiones fibrilogénicas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar la agregación de la proteína silvestre y variantes de triosa fosfato isomerasa de humano.
2. Identificar regiones fibrilogénicas en HsTPI mediante métodos *in silico* e *in vitro*.
3. Caracterizar morfológica y biofísicamente los agregados obtenidos.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental fue diseñada a partir de los objetivos particulares con el fin de evaluar el potencial amiloidogénico de HsTPI al evaluar su fibrillogénesis e identificar regiones formadoras de cross- $\beta$ . El esquema experimental constó de tres etapas: 1) obtención del precursor de agregación, 2) la incubación para favorecer la agregación y 3) la evaluación del producto final de agregación. A continuación se mencionaran algunos aspectos importantes del esquema que sirvieron para establecer la metodología.

<sup>1</sup>Primeramente, la evaluación de la agregación de HsTPI silvestre permitió determinar la propensión inherente de la enzima a formar amiloides. La proteína se probó tanto en condiciones óptimas para el estado nativo, como en condiciones ligeramente desestabilizantes.

<sup>2</sup> Según el estudio realizado por Guix y colaboradores en el 2009, la enzima TPI sufre una nitración en dos tirosinas que se encuentran en el barril  $\beta$  de la proteína tras un estrés oxidativo. Más aun, mencionan que la variante nitrada *in vitro* resulta amiloidogénica. Con el fin de probar este resultado, en este trabajo se evaluó la variante nitro-HsTPI en ensayos de agregación.

<sup>3</sup>La creación de variantes nos permitió comprobar hipótesis sobre la desestabilización de la enzima tras la nitración. Para ello se mutaron las tirosinas 165 y 209 reportadas en el trabajo de Guix y col.

<sup>4</sup>Con el fin de identificar regiones amiloidogénicas formadoras de estructura cross- $\beta$ , la secuencia se sometió a predicciones *in silico* usando algoritmos disponibles en la red. Se seleccionaron las principales regiones predichas y se evaluaron en ensayos de agregación mediante péptidos sintéticos.

<sup>5</sup>Otra estrategia que se usó para evaluar regiones amiloidogénicas y que además nos permitió evaluar la totalidad de la secuencia de la proteína fue la hidrólisis ácida y la posterior agregación de los fragmentos hidrolizados.

<sup>6</sup>Las condiciones de agregación se estandarizaron para obtener la reproducibilidad de las repeticiones. Se probaron distintas formas de agitación así como distintos materiales en tubos de incubación.

<sup>7</sup>La agregación se monitoreo por la intensidad de la fluorescencia de Tioflavina T la cual aumenta su rendimiento cuántico al unirse a porciones estructuradas cross- $\beta$  <sup>66</sup>.

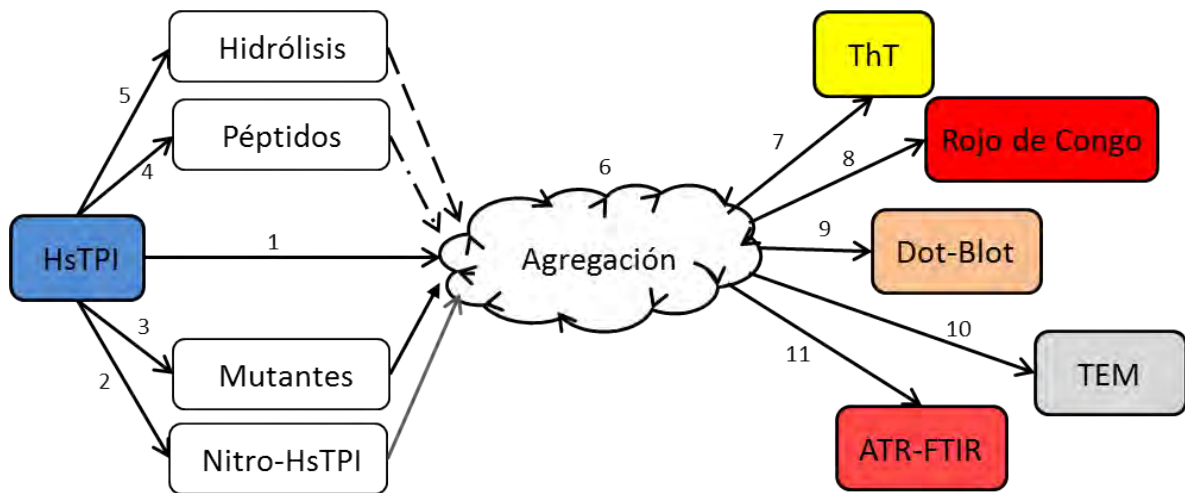
<sup>8</sup>Una propiedad muy característica de los agregados amiloides es la birrefringencia verde que le confiere a la sonda de rojo Congo. Mediante este principio se evaluaron los agregados formados por los péptidos mediante un ensayo de corrimiento espectral.

<sup>9</sup>El ensayo de dot-blot se realizó con el anticuerpo anti-cross- $\beta$  WO1 desarrollado por el grupo del doctor Ronald Wetzel. Este anticuerpo reconoce estructuras cross- $\beta$  en diferentes estadios de la agregación de distintas proteínas,

es decir reconoce estructura secundaria amiloide independientemente de la secuencia de aminoácidos.

<sup>10</sup>Una de las características indispensable que debe exhibir un agregado para ser clasificado como amiloide es poseer morfología estructurada fibrilar. No obstante, existen diferencias en la morfología fibrilar de los agregados que van desde el tamaño de la fibra, la asociación lateral, la flexibilidad, etc. En este estudio, la morfología de los agregados se evaluó mediante microscopia electrónica de transmisión.

<sup>11</sup>Además del ensayo dot-blot, la confirmación de estructura cross- $\beta$  en los agregados se realizó por medio del análisis del espectro infrarrojo en la región de la amida I.



**Esquema de la estrategia experimental**

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos.** Los péptidos sintéticos fueron comprados a GenScript USA inc., sin modificaciones en residuos o en terminaciones N o C. La lisozima de huevo (HEWL, por sus siglas en inglés) fue obtenida de Sigma-aldrich Co (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo WO1 fue generosamente donado por el Dr. Ronald Wetzel de la Universidad de Pittsburgh. Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma-aldrich.

**Expresión y purificación de HsTPI.** El vector pET3a-HsTPI fue amablemente donado por el Dr. Gómez Poyou (IFC-UNAM). Este vector codifica la secuencia de HsTPI optimizada para la expresión heteróloga en *Escherichia coli*<sup>67</sup>. Además, para su purificación, el gen cuenta, en el extremo N-terminal, con una etiqueta de 6 histidinas (His-tag) seguido por una secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (TEV) (Figura 8A).

El plásmido se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS mediante electroporación. Después, se seleccionaron clones positivos al plásmido en placa de agar con medio Luria Bertani (LB) adicionado con 50 µg/mL de ampicilina y 35 µg/mL de cloranfenicol. Para la expresión de HsTPI, se usó un inóculo de 5 mL crecido toda la noche de una colonia seleccionada. El inóculo se llevó a 500 mL de LB líquido adicionado con ampicilina a una concentración de 50 µg/mL y se incubó a 37° C a 250 rpm hasta alcanzar un crecimiento equivalente a una absorbancia de 0,6 a 600 nm.

Una vez alcanzado el crecimiento deseado, el cultivo se enfrió por 5 minutos en hielo y posteriormente se le adicionó Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,2 mM. La incubación continuó a 20°C durante 6 horas. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 7000 g y se guardaron a -20° C hasta la extracción de proteínas.

Las células se resuspendieron en 30 mL de la Solución A (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). La suspensión celular se sometió a sonicación (10 pulsos de 30 segundos, manteniendo la suspensión en hielo y reposando 1 minutos después de cada pulso). La fracción celular se separó por centrifugación a 15,000 g durante 30 minutos, recuperando el sobrenadante. El extracto de proteínas solubles se filtró a través de una membrana de nylon con punto de corte de 0.22  $\mu$ m y se cargó en una columna con 3 mL de agarosa Ni-NTA previamente equilibrada con la Solución A. Posteriormente la resina se lavó con 10 volúmenes de columna de la Solución A adicionada con 50 mM de imidazol. Después HsTPI se eluyó con 200 mM y 300 mM de imidazol. La enzima HsTPI purificada se dializó contra la Solución A y luego se incubó a 4° C con la proteasa TEV recombinante (con His-tag) en una proporción de 1:50 (w/w) proteasa/HsTPI durante toda la noche. La proteasa TEV, así como HsTPI no cortada, se removió mediante el paso por la columna de agarosa NTA-Ni. El efluente de la columna, conteniendo toda HsTPI sin etiqueta de histidinas, se recuperó y HsTPI se precipitó con sulfato de amonio al 75% (w/v) y se almacenó a 4°C. La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción molar de  $\epsilon$



= 33.460 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Este mismo procedimiento se usó para la obtención de las mutantes de HsTPI.

**Mutación puntual de HsTPI.** Se realizaron 2 mutantes sencillas de HsTPI mediante el uso del kit mutagénico QuickChange® Agilent siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello se usaron 2 pares de oligonucleótidos (Figura 8b) y como templado el plásmido pET3a-HsTPI.

**Nitración *in vitro* de HsTPI.** Para esto, se llevó primeramente a la proteína a condiciones de tetraetilamonio 50 mM a un pH de 7.4 mediante diálisis usando una concentración de proteína de 1.5 mg/ mL. Posteriormente se adicionó hidrocloreuro de 3-morfolinosidnonimina (SIN-1) a una concentración de 50 mM (Figura 9). La reacción se incubó a temperatura ambiente en agitación a 300 rpm por 5 hrs. Finalmente se dializó contra Solución A para los ensayos de agregación. La nitración se comprobó mediante dot-blot usando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-nitrotirosinas (ab24496).

**Ensayos de la agregación.** La agregación de HsTPI y sus variantes se realizó en una concentración de 100 μM en tubos Eppendorf de 1 mL en una termomezcladora a 600 rpm, 37° C durante una semana. Para HsTPI se ensayaron condiciones nativas (Solución A) y desestabilizantes (Solución A adicionada con urea). Además, todas las condiciones evaluadas fueron adicionadas con 1 mM de DTT para evitar la oxidación de la proteína y con 0,2% (w/v) de azida de sodio para evitar el crecimiento de microbios.

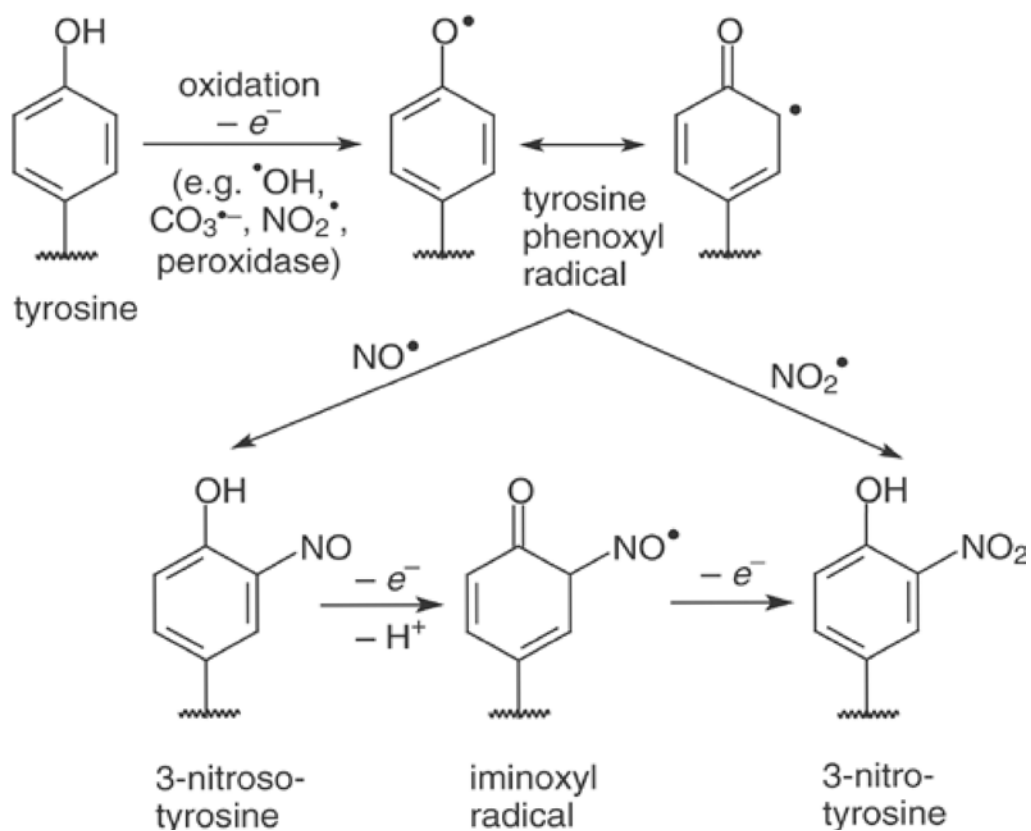
A)

```
          10      20      30      40      50      60      70
Gen HsTPI  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Sitio TEV  atgcatcaccatcatcaccacagcagcgggccgtgaaacctgtacttccagggtcatgcgccctccaagg
HsTPI WT  M  H  H  H  H  H  H  S  S  G  R  E  N  L  Y  F  Q  G  H  A  P  S  R
                                     M  A  P  S  R
```

B)

```
          10      20      30
Y165F-F  GGTCTCCTA GCCTTTGAGC CTGTGTG
Y165F-R  CACACAGGCT CAAAGGCTAG GACGACC
Y209F-F  ACCAGGATAA TATTTGGAGG CTCTGTGACTG
Y209F-R  CAGTCACAGA GCCTCCAAAT ATTATCCTGG
```

**Figura 8.** A) Extremo 5' del gen HsTPI mostrando la secuencia en aminoácidos del sitio de corte TEV al N-terminal de la proteína. Tras la proteólisis sitio-específica con la proteasa TEV, un segmento de 17 aminoácidos es removido (conteniendo la etiqueta de histidinas) dejando a HsTPI con la adición de una glicina hacia el N-terminal y la sustitución de la metionina inicial por una histidina. B) Oligonucleótidos usados para la mutación sitio específica de HsTPI con el Kit mutagénico QuickChange® Agilent.



**Figura 9.** Mecanismo de reacción de la nitración de tirosina hacia 3-nitrotirosina. En la nitración *in vitro*, la oxidación hacia radicales de tirosina se lleva a cabo por peroxinitritos generados a partir de 3-morfolinosidnonimina en ambiente básico.

La agregación se siguió por fluorescencia de Tioflavina T (ThT) a diferentes intervalos de tiempo; 0, 5, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 hrs. Para las mediciones, se tomaron 10  $\mu$ l de muestra y se mezclaron con 140  $\mu$ l de ThT 10  $\mu$ M en placas negras de fondo transparente en un lector de microplacas Tecan Safire multimodo. Se midió la intensidad de fluorescencia a 485 nm con una excitación a 450 nm. Después de una semana de incubación, los agregados fueron recuperados por centrifugación a 25,000 g durante 1 hora para su posterior caracterización. Las cinéticas de agregación se repitieron tres veces con lotes de proteína diferentes donde se les calculó el error estándar. Se utilizó una solución de lisozima de huevo 100  $\mu$ M a pH 2,0 como control positivo de formación de fibras <sup>68</sup>.

Para los ensayos de agregación de los péptidos, primeramente se realizaron soluciones stock de los péptidos desalinizados con pureza mayor al 98%. Los péptidos se solubilizaron según su carga siguiendo las recomendaciones de GenScript (Anexo II). La mayoría de los péptidos fueron solubles en agua, sólo los péptidos  $\beta$ 4 y  $\beta$ 7 se disolvieron en ácido acético al 10% (v/v) y el péptido  $\beta$ 8 en hidróxido de amonio 100 mM. Posteriormente, el stock se diluyó a una concentración de 50  $\mu$ M de péptido en Solución A adicionada con 1mM de DTT y 0.2% (w/v) de azida de sodio. Una muestra de 200  $\mu$ l de cada solución de péptido se incubó a 37° C y 600 rpm durante 5 días. Debido a la poca cantidad de péptido, no se pudieron realizar cinéticas de agregación, solo se realizaron mediciones de la intensidad de fluorescencia y corrimiento espectral del rojo Congo de punto final.

**Ensayo de corrimiento espectral del rojo Congo.** Se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de muestra de agregados a 140  $\mu\text{l}$  de solución filtrada de rojo Congo 5  $\mu\text{M}$ . Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los espectros de absorbancia se tomaron de 400 nm a 700 nm con el lector de microplacas multimodo Tecan Safire utilizando Solución A como blanco. Además, se midió el espectro de absorbancia del rojo de Congo solo. Un pico máximo a 540 nm fue indicativo de corrimiento espectral. Con el fin de realizar una comparación entre las muestras, se calculó un valor de corrimiento espectral relativo usando la relación de absorbancia a 540:490 nm,  $b=(\text{abs}_{540\text{nm}}/\text{abs}_{490\text{nm}})^{69,70}$ .

**Espectroscopia de infrarrojo.** Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) de las muestras de agregados fueron obtenidos usando el espectrómetro Perkin Elmer-Spectrum Rx1 acoplado al accesorio ATR (Attenuated Total Reflection) con cristal de seleniuro de zinc (ZnSe). Para esto, 50  $\mu\text{L}$  de suspensión de agregados en solución acuosa fueron colocados en el cristal y secados con nitrógeno por 10 minutos. Se registraron un total de 256 lecturas por espectro a una resolución de  $1\text{ cm}^{-1}$  en el rango de  $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ . El espectro blanco consistió en agua evaporada con nitrógeno. Se les substrajo el blanco a los espectros y posteriormente se normalizaron al pico de  $1630\text{ cm}^{-1}$  usando Spekwin32. Finalmente, con el fin de evidenciar picos correspondientes a estructura secundaria definida, los datos se analizaron por segunda derivada en la región de la amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) con el programa PeakFit 4.12 usando los parámetros de Savitsky-Golay que vienen en el paquete de Sigmaplot.

**Dot-blot.** Los agregados se probaron contra el anticuerpo anti-cross- $\beta$  WO1 para determinar estructura cross- $\beta$ . Para esto, una gota de la suspensión de agregados se colocó sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejó secar. Se bloqueó la membrana con BSA 5% (w/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó durante 1 hora con el anticuerpo WO1 a una dilución de 1:8000 en Solución A adicionado con Tween 20 al 0,05% (w/v) (T-PBS). La membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con T-PBS. Después, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario 1:30.000 (anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina). La membrana se lavó 5 veces con T-PBS durante 10 minutos y se reveló usando el BCIP® / NBT-Blue Liquid durante 10 minutos. La reacción colorimétrica se paró con agua MilliQ.

**Microscopía de fluorescencia.** El producto final de agregación se incubó en 1 mM ThT en relación 1:1 (v/v) a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad. Una muestra de 10  $\mu$ l de la suspensión se colocó sobre cubreobjetos y se visualizó en un microscopio Zeiss Axioskop de fluorescencia bajo luz azul (300-390 nm).

**Microscopía electrónica de transmisión.** Se colocaron 15  $\mu$ L de la suspensión de agregados en rejillas de cobre de 200 mesh con cobertura de Formvar durante 1 minuto. Las rejillas se tiñeron durante 1 minuto con acetato de uranilo al 2% (w/v), después se lavaron una vez con agua MilliQ. Las imágenes se registraron en un microscopio electrónico de transmisión modelo ZEISS LIBRA a 120 kV.

**Predicción consenso de regiones cross- $\beta$ .** Se determinaron los potenciales núcleos cross- $\beta$  utilizando 4 predictores de libre acceso: FISH-amiloide<sup>71</sup>, FOLD-amiloide<sup>72</sup>, PASTAS 2.0<sup>73</sup> y AMYLPRED 2<sup>74</sup>. Para todos los predictores, se utilizaron los parámetros preestablecidos. En el caso de AMYLPRED 2, el cual es un consenso de diversos algoritmos, se utilizó la totalidad de parámetros que el predictor permite. Se consideró como secuencia consensuada a las regiones reconocidas por al menos 2 de los predictores utilizados.

**Hidrólisis ácida de HsTPI.** El corte químico de la enzima se llevó a cabo en tubos de 1,5 ml. Diez miligramos de HsTPI liofilizada se disolvieron en 1 ml de HCl 10 mM, DTT 1 mM, pH 2 y se incubaron a 65° C durante 8 horas. Después del período de incubación, la reacción se enfrió en hielo y el patrón de hidrólisis se analizó en un gel de electroforesis de Tricina-SDS-PAGE teñido con Coomassie. Los productos de hidrólisis se incubaron a 37° C y 600 rpm para promover la agregación. Los agregados resultantes se lavaron tres veces con agua y luego se disgregaron con Gdn-HCl 7.4 M por toda la noche.

Los agregados disueltos se mandaron a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología UNAM, donde se desalaron usando un cartucho SepPack C18 y se analizaron mediante cromatografía nanolíquida y espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS). Para la cromatografía de fase reversa se utilizó una columna analítica de 25 cm (750- $\mu$ m de diámetro interno) con resina C18 en un flujo continuo de 400 nL/min en un gradiente de 10-90% (v/v) de acetonitrilo en ácido fórmico al 0,1% (v/v) durante 120 min. Todos los espectros se adquirieron en un modo dependiente de los datos a una resolución de 60,000 con un rango de

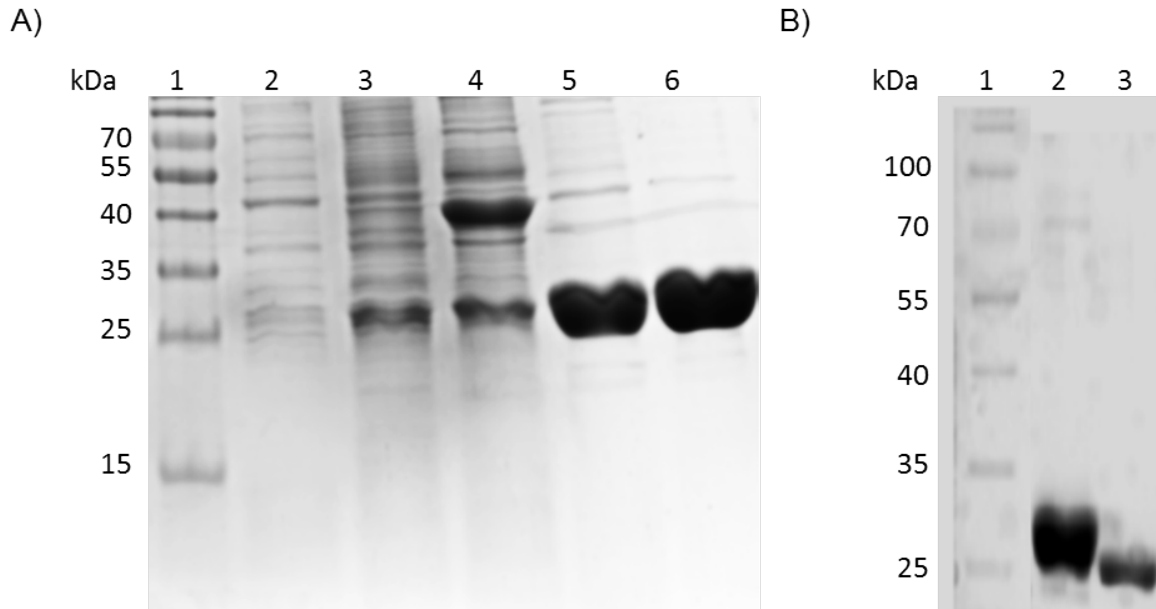
m/z de 300 a 1600. Los iones con una carga de 2, 3 y 4 fueron aislados para la fragmentación utilizando un valor de energía de colisión normalizada de 35 KeV y un valor Q de activación de 0,25.



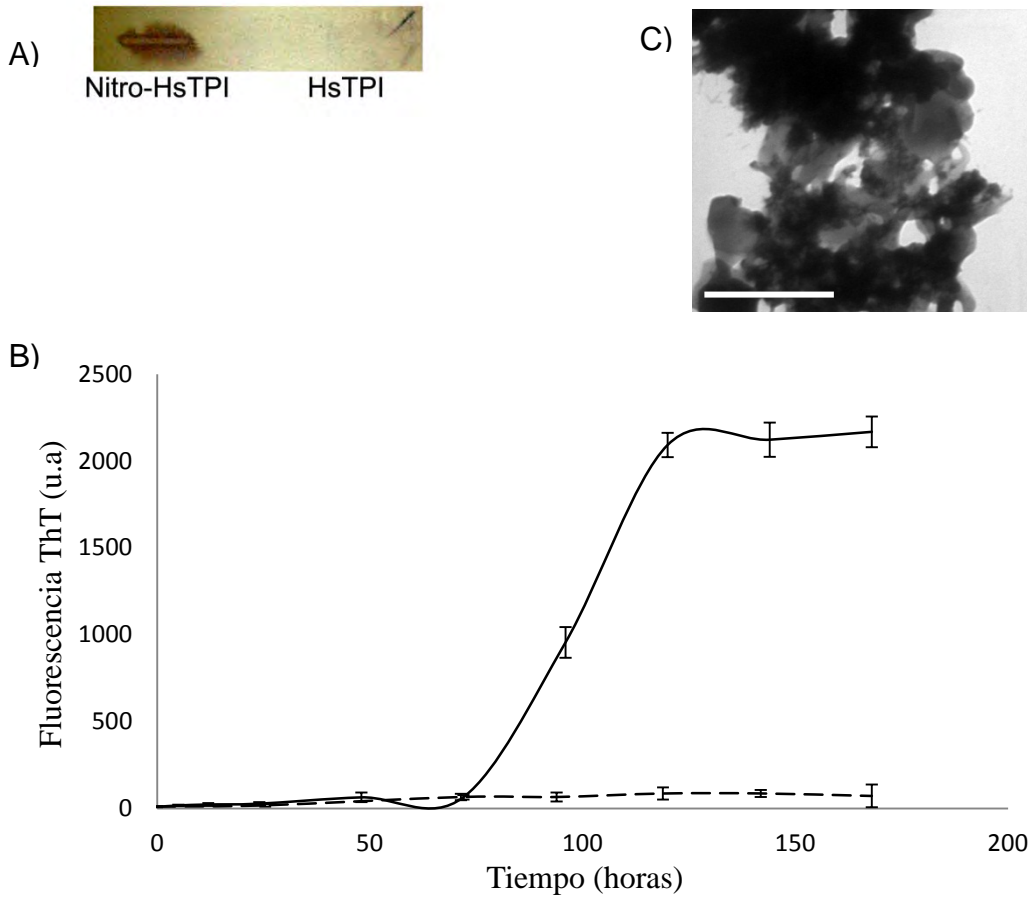
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Expresión y purificación de HsTPI.** Después de 6 horas de la expresión inducida con IPTG y tras la purificación, se obtuvo un rendimiento de  $12,3 \pm 0,8$  mg de His6x-HsTPI por litro de cultivo. El rendimiento se redujo a  $10,5 \pm 0,7$  mg/L después del corte de la etiqueta His6x por la proteasa TEV y su purificación. Después del corte, HsTPI tuvo una reducción de peso de 29 kDa a 26,5 kDa y una pérdida de la afinidad hacia la resina cargada con níquel lo que se aprovecha para separarla de cualquier fracción que no hubiera sufrido el corte, así como de la proteasa utilizada (Figura 10). Se siguió el mismo procedimiento para la expresión y purificación de las mutantes Y165F y Y209F obteniendo grados de pureza similares a la enzima silvestre aunque con rendimiento menores de aproximadamente 7.5 y 8.2 mg/L respectivamente.

**Agregación de nitro-HsTPI.** Lo primero que se realizó fue la evaluación de la amiloidogénesis de la variante nitrada de HsTPI. Esto con el fin de validar el reporte previo de que la nitración de TPI resulta en una variante amiloidogénica<sup>65</sup>. Para esto, se procedió primeramente a nitrar a HsTPI con el reactivo SIN-1, formador de peroxinitritos. La nitración de HsTPI se comprobó con un inmunoensayo usando un anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosinas (Figura 11A). Después, se incubó la variante nitro-HsTPI en agitación a 37° C. Se siguió la aparición de agregados con características amiloides por fluorescencia con ThT (Figura 11B). La cinética de agregación no mostró un aumento en la agregación amiloide, más aun, los agregados finales presentaron morfología amorfa (Figura 11C).



**Figura 10.** A) Expresión y purificación de HsTPI. En el gel de SDS-PAGE se muestra la expresión basal de HsTPI (carril 2). Tras la inducción con 0.2 mM de IPTG la cantidad de HsTPI aumentó tanto en la fracción insoluble (carril 3), como en la soluble (carril 4). Se logró una pureza superior al 98% con la columna de NTA-Ni con elusión de 200 (carril 5) y 300 mM (carril 6) de imidazol. B) Remoción de la etiqueta de histidinas con la proteasa TEV. Se aprecia una reducción de tamaño de aprox. 29 kDa (carril 2) a 26 kDa (carril 3).

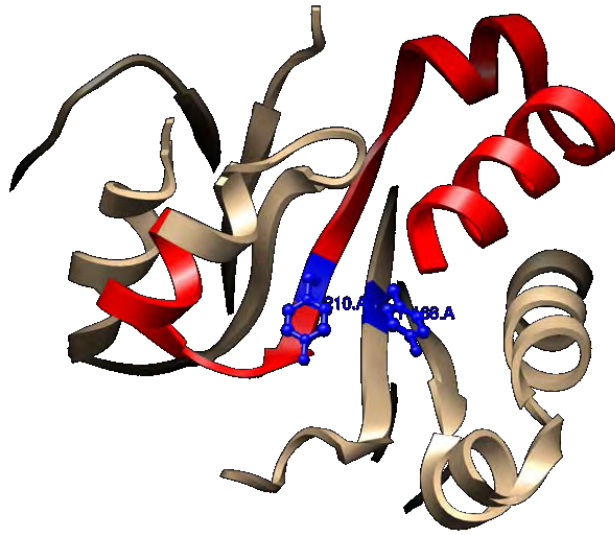


**Figura 11.** A) Ensayo de dot-blot con anticuerpo anti-nitrotirosinas. Se observó una reacción positiva a la proteína tratada con SIN-1 a comparación de la proteína no tratada. B) Cinética de agregación seguida por fluorescencia ThT. La variante nitro-HsTPI (línea discontinua) no mostró un aumento significativo en la fluorescencia tras 7 días de incubación comparada con el control de fibrillogénesis de lisozima de huevo (línea continua). C) Micrográficas de los agregados finales de nitro-HsTPI mostrando una morfología irregular y aglomerados grandes superiores a las 5 µm de diámetro. La barra equivale a 1 µm.

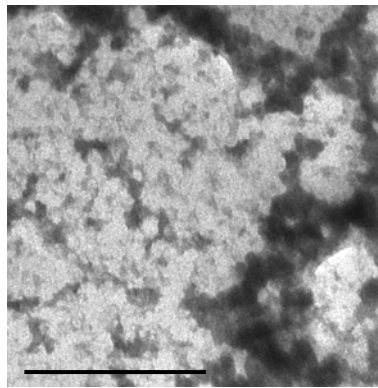
Estos resultados contrastan con los resultados de Guix y col., donde se reportó agregación amiloide para la variante nitrada de TPI. Sin embargo, estos agregados de nitro-TPI no presentaron morfología fibrilar, aunque debido a que exhibieron fluorescencia residual en presencia de ThT, Guix y col., clasificaron a estos agregados como amiloides. No obstante, al realizar la tinción con ThT de los agregados de nitro-HsTPI obtuvimos fluorescencia residual al igual que con otros materiales proteicos y no proteicos, eso por ello que concluimos que esta fluorescencia residual es un artefacto de la técnica.

Más aun, Guix y col., proponen que las nitraciones se dan en la tirosina 165 y 209, esto debido a que el ambiente que rodea a estos residuos favorece la reacción química. Esta modificación podría provocar una desestabilización de la estructura de HsTPI posiblemente al crear repulsión en el interior de la molécula así como comprometería los puentes de hidrogeno formados por estos residuos que estabilizan tanto el barril- $\beta$  como el asa 6. Algo relevante de estas tirosinas es el hecho de que se encuentran en las hebras- $\beta$  6 y 7, justo en la región en donde cae el segmento equivalente al fibrilogénico de TPI de *E. coli* (Figura 12A). Entonces, la modificación de las tirosinas 165 y 209 de la proteína podría exponer esta región potencialmente fibrilogénica y formar agregados amiloides. Con esta idea se decidió probar el potencial amiloidogénico de HsTPI mediante la mutación de estas tirosinas a fenilalaninas, esto con el fin de simular la pérdida de los puentes de hidrógeno tal y como lo sugieren Guix y colaboradores.

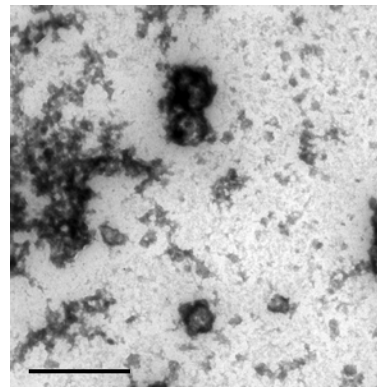
A)



B)



Y165F

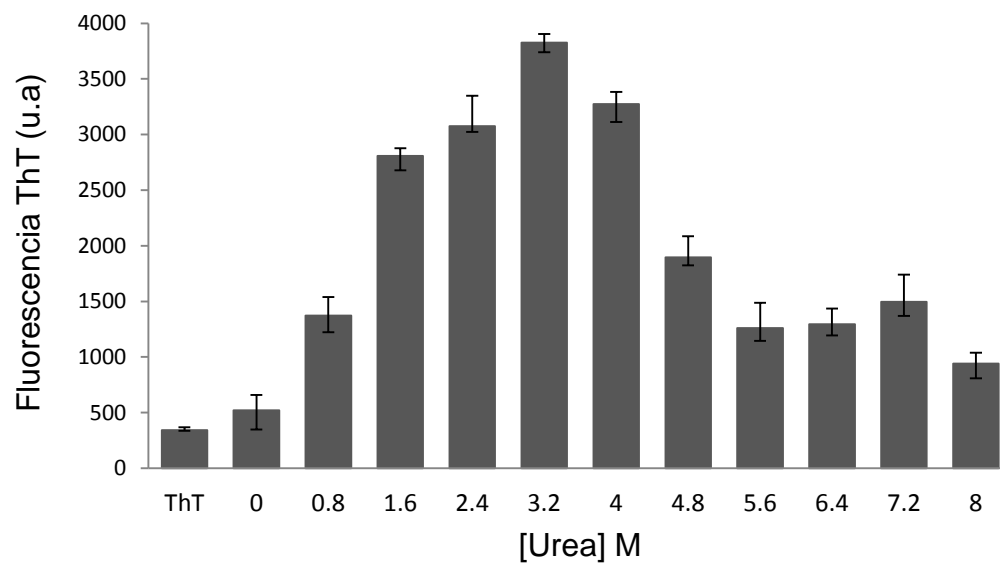


Y209F

**Figura 12.** A) Estructura tridimensional de HsTPI mostrando en azul las tirosinas 165 y 209. Además, se remarca en rojo el segmento equivalente al péptido amiloidogénico de TPI de *E. coli*<sup>64</sup>. B) Micrografías de los agregados formados por las mutantes Y165F y Y209F de HsTPI. La barra equivale a 1  $\mu$ m.

La agregación de estas mutantes, al igual que nitro-HsTPI, llevó a la formación de estructuras desordenadas con fluorescencia residual en presencia de ThT (Figura 12B). Con esto descartamos que ni la nitración de HsTPI ni las mutaciones de las tirosinas 165 y 209 a fenilalanina promueven la amiloidogénesis de HsTPI, a pesar de que estos cambios resultan en una disminución en la actividad enzimática<sup>65</sup>. Aunque, no podemos descartar la participación de la nitración de HsTPI en la fisiopatología del Alzheimer, al potencial el daño celular por la acumulación de metilglioxal, si podemos descartar su participación directa en la formación de cross- $\beta$  en las placas amiloides. No obstante a que se ha encontrado HsTPI en placas amiloides en tejido de hipocampo en pacientes post-mortem con Alzheimer<sup>65</sup>, consideramos que esta presencia es debida a interacciones a la superficie de las placas y no necesariamente en el nucleo cross- $\beta$  de las mismas. Consideramos también, que en la metodología usada por Guix y col., debieron usar como control la búsqueda de otra proteína citosólica diferente a HsTPI lo cual demostraría que su presencia es por efecto amiloidogénico y no por el fenómeno de agregación no específica común de todas las proteínas

**Agregación de HsTPI.** Para establecer condiciones de amiloidogénesis en HsTPI, primeramente se realizó un ensayo en donde la enzima se incubó por una semana en concentraciones de urea en el rango de 0 a 8 M con agitación a 37° C. Al finalizar la incubación, se realizó una medición de fluorescencia con ThT a los



**Figura 13.** Formación de estructuras afines a ThT en respuesta a la concentración de urea en las condiciones de agregación.

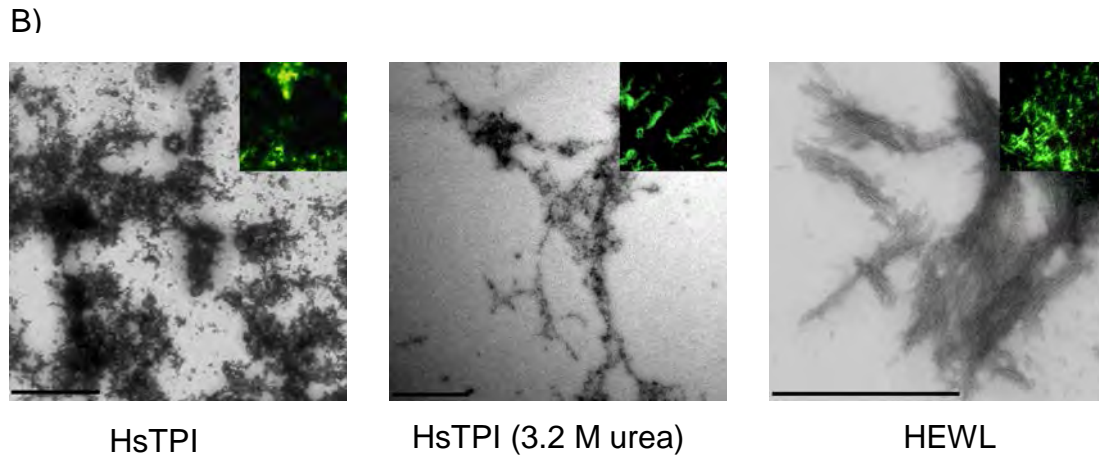
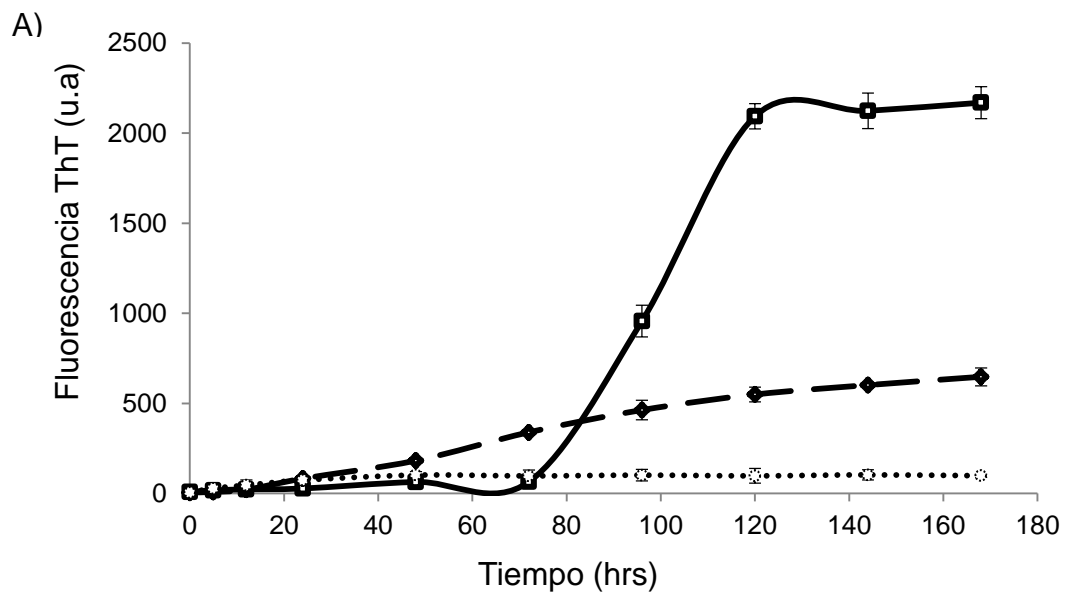
agregados (Figura 13). Se observó un aumento en la fluorescencia en ThT en respuesta a la concentración de urea hasta la concentración de 3.2 M. Concentraciones mayores de urea no mostraron un incremento significativo en la fluorescencia en los agregados formados. Se sabe que en altas concentraciones, la urea solubiliza la cadena principal de las proteínas y compite con los enlaces de hidrógeno durante la formación de la estructura cross- $\beta$  <sup>40,75,76</sup>. Más importante aún, se sabe que la amiloidogénesis requiere de intermediarios parcialmente plegados que conserven cierta estructura que sirva de andamiaje en el ensamble cross- $\beta$  <sup>15,39,77</sup>. En este sentido, a bajas concentraciones de urea (hasta 3.2 M), en donde la agregación- $\beta$  fue promovida, la estructura tanto secundaria como terciaria de HsTPI no es alterada de manera significativa según estudios reportados de desplegamiento de HsTPI con fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular <sup>78,79</sup>. Por otro lado, las concentraciones mayores, donde se disminuyó la agregación- $\beta$ , corresponden a la fase de desplegamiento cooperativo de la curva. Lo anterior sugiere que a concentraciones superiores a 3.2 M de urea, la proteína ha perdido el andamiaje estructural que promueve la agregación- $\beta$ . Por lo anterior se escogió la concentración de 3.2 M de urea para realizar una caracterización mayor.

Se realizaron cinéticas de agregación para HsTPI en Solución A con 0 M de urea (HsTPI<sub>n</sub>) y 3.2 M de urea (HsTPI<sub>urea</sub>). A pesar de que HsTPI<sub>n</sub> se agregó tras la incubación por siete días, no se observó tendencia alguna a la formación de cross- $\beta$  (Figura 14A). Más aun, los agregados formados presentaron una morfología irregular más consistente con agregados amorfos que con agregados

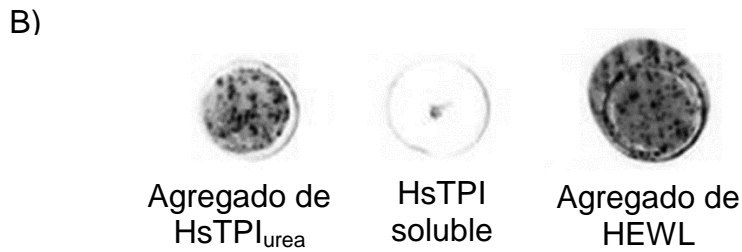
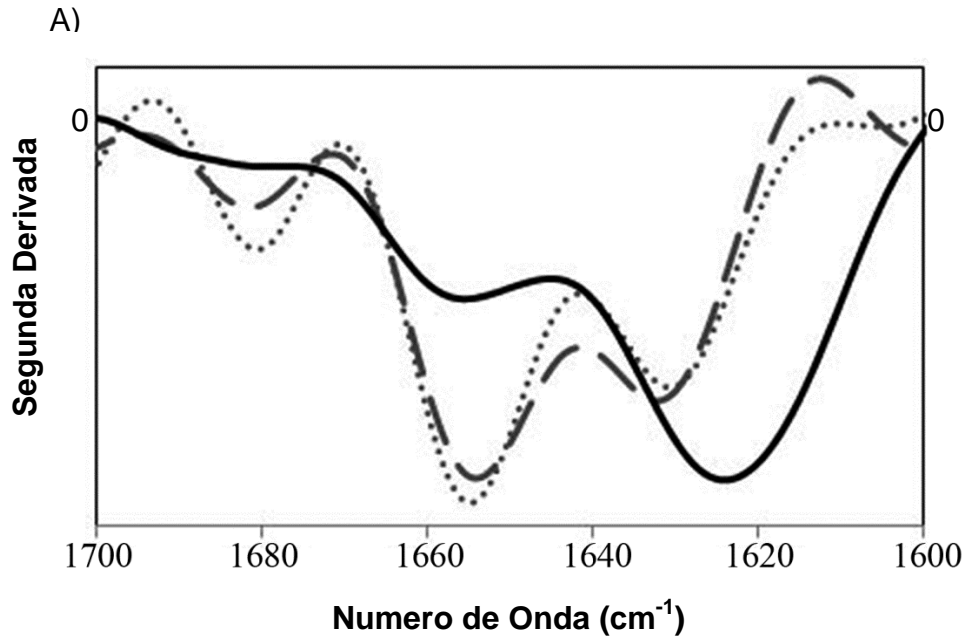


fibrilares (Figura 14B). Esta morfología fue similar a la exhibida por los agregados formados por la variante nitro-TPI evaluada por Guix <sup>65</sup>.

Interesantemente, HsTPI<sub>n</sub> conservó en gran parte su estructura secundaria, de acuerdo al espectro de IR, tras la incubación, sugiriendo agregación nativa (Figura 15A). Este tipo de agregación se caracteriza por interacciones intermoleculares promovidas por la flexibilidad intrínseca de las proteínas y no por procesos de desplegamiento <sup>80,81</sup>. En este sentido, HsTPI sigue un desplegamiento térmico irreversible de dos estados con una constante cinética de primer orden de  $7.2 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  a  $37^\circ \text{ C}$  <sup>82,83</sup>. De acuerdo con ese valor, la incubación de HsTPI<sub>n</sub> por 7 días fue insuficiente para que la proteína visite posibles estados conformacionales que promuevan su agregación. No obstante, HsTPI posee movilidad en las asas principalmente en el asa  $\beta\alpha$ -6 en la cual su flexibilidad es necesaria para la conversión de los estados abierto y cerrado en el mecanismo de catálisis<sup>84</sup>. Así que, es posible que esta flexibilidad haya promovido interacciones intermoleculares no ordenadas. Cualquiera que sea el caso, HsTPI mostró resistencia a la agregación- $\beta$  al proteger, por su alta estabilidad, las potenciales regiones amiloidogénicas y más bien otros procesos de agregación diferentes secuestraron a la proteína.



**Figura 14.** Agregación de HsTPI. A) Cinética de agregación seguida por fluorescencia con ThT de HsTPI<sub>n</sub> (línea punteada), HsTPI<sub>urea</sub> (línea discontinua) y HEWL (línea continua). Micrografías de los productos finales de agregación tras una semana de incubación. La barra equivale a 1  $\mu$ m. Los insertos muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia con ThT.



**Figura 15.** Estructura secundaria de agregados HsTPI. A) Segunda derivada de los espectros de ATR-FTIR en la región de la amida I del HsTPI precipitada con sulfato de amonio (línea punteada), agregada en condiciones nativas (línea discontinua) y en 3.2 M de urea (línea solida). B) Dot-blot usando el anticuerpo WO1 confirmando la presencia de estructuras cross- $\beta$  en el agregado de HsTPI<sub>urea</sub>.

Por otro lado, HsTPI<sub>urea</sub> mostró un incremento en la fluorescencia de ThT tras la incubación, respecto a la exhibida por HsTPI<sub>n</sub>, indicando la formación de agregados- $\beta$  (Figura 14A). Sin embargo la intensidad de fluorescencia alcanzada por HsTPI<sub>urea</sub> tras 7 días de incubación es menor a la de HEWL indicando un menor grado de agregación- $\beta$ . Consistente con lo anterior, las micrografías muestran una morfología desordenada, aunque más estructurada que HsTPI<sub>n</sub>, con regiones alargadas con apariencia quebrada, que asemejan filamentos o protofilamentos (Figura 14B). Estos resultados no demuestran contundentemente la formación de cross- $\beta$ , ya que el aumento de fluorescencia podría deberse a interferencia con otro tipo de agregados presentes <sup>66,85</sup>. Es por ello que adicionalmente se analizó la estructura secundaria por ATR-FTIR confirmando la formación de nuevas estructuras  $\beta$  al exhibir la banda característica alrededor de  $1624\text{ cm}^{-1}$  <sup>86,87</sup> (Figura 15A). No obstante, algunos estudios indican que la formación de nuevas estructuras- $\beta$  en procesos de agregación es un fenómeno común y no depende del tipo de agregación (ordenada o desordenada) ni de formación de cross- $\beta$  <sup>88,89</sup>. En este sentido, es importante diferenciar la agregación- $\beta$ , en la cual se forman aglomerados con estructura residual  $\beta$ , de la formación cross- $\beta$ , la cual desencadena la elongación de la hoja- $\beta$  en un ensamblaje de filamentos. La presencia de cross- $\beta$  se terminó de confirmar mediante dot-blot utilizando el anticuerpo monoclonal WO1 (Figura 15B) que reconoce estructura secundaria cross- $\beta$  independientemente de la estructura primaria de las proteínas <sup>90</sup>.

Una vez establecida la formación de cross- $\beta$  por distintos métodos, es interesante notar que la agregación de HsTPI<sub>urea</sub> no sigue un mecanismo clásico de polimerización nucleada como se muestra en el caso de HEWL (Figura 14A) así como de otras proteínas y péptidos amiloides <sup>91</sup>. En cambio, HsTPI<sub>urea</sub> sigue un mecanismo no cooperativo con ausencia de fase lag. Esto sugiere que HsTPI en 3.2 M de urea se encuentra en un estado conformacional en el cual se favorece la agregación- $\beta$  en un mecanismo independiente de nucleación ordenada <sup>41,45</sup>. Existen ejemplos en la literatura de comportamientos similares al exhibido por HsTPI aunque con cinéticas más rápidas. Este es el caso de transtiretina, la cual en condiciones ligeramente desnaturizantes se agrega en formas amorfas con su posterior ensamblaje en fibras en un mecanismo “downhill” <sup>55</sup>. Otro ejemplo es el del dominio SH3 de la cinasa PI3, el cual presenta un mecanismo similar. Primeramente, SH3 se agrega rápidamente (1-3 hrs) en agregados desordenados a un pH de 3.6 con la posterior aparición de fibras amiloides al quinto día <sup>54</sup>. En este último trabajo se sugirió que los agregados desordenados son energéticamente más favorables que la nucleación. Además, se ha descrito una cooperatividad similar en la agregación ordenada y desordenada lo que sugiere que la asociación desordenada podría competir con la agregación- $\beta$  y la formación de cross- $\beta$  en etapas temprana de la amiloidogénesis <sup>60,92-94</sup>. Más aun, estos agregados desordenados podrían desempeñar un papel importante en el reclutamiento y asociación de moléculas de proteínas que posteriormente son transformadas en estructuras cross- $\beta$  <sup>52,95,96</sup>. Esto podría explicar la morfología de los agregados HsTPI<sub>urea</sub> que presentan estructuras desordenadas con morfología

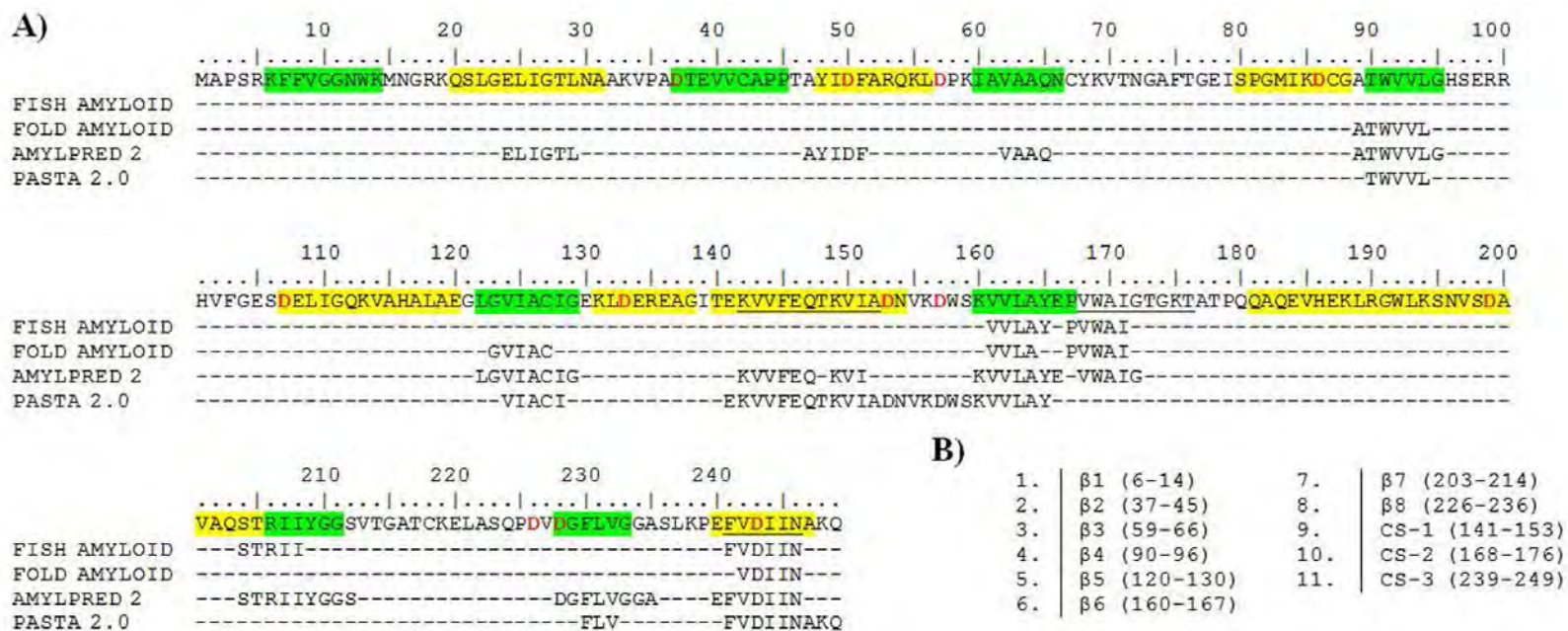
residual fibrilar. Es decir, que en HsTPI<sub>urea</sub> ambas rutas de agregación están en competencia, siendo la formación de agregados amorfos favorecida cinéticamente, ya que la agregación amiloidogénica fue incompleta tras 7 días de incubación. Esto debido al mecanismo propuesto el cual forma primeramente agregados desordenados, los cuales posteriormente pueden seguir en ruta de amiloidogénesis con una conversión lenta hacia cross- $\beta$ <sup>97-100</sup>.

**Identificación de regiones Cross- $\beta$  en HsTPI.-** Se utilizaron diferentes algoritmos de predicción fundamentados en una base de datos de secuencias amiloidogénicas de priones, proteínas asociadas enfermedades amiloides y proteínas amiloides funcionales<sup>59</sup>. Algunos principios físico-químicos también fueron considerados por los predictores, tales como la propensión de estructura secundaria, el potencial de enlaces de hidrógeno, secuencias camaleónicas (CS por sus siglas en inglés), regiones internas y los residuos que rompen estructura secundaria. Tras la serie de predicciones, se encontraron 8 potenciales regiones formadoras de estructura cross- $\beta$ . Se consideró como regiones consensuadas a las identificadas por al menos dos de los predictores usados. Las regiones identificadas se concentraron hacia el extremo C-terminal de la proteína abarcando tres CS (142-152, 168-176 y 241-246) y cinco regiones- $\beta$  cadena (90-95, 122-129, 160-167, 206-211 y 223-233) (Figura 16A). Para evaluar la agregación de las regiones predichas se mandaron a sintetizar los péptidos correspondientes además de los péptidos de las 3 hebras- $\beta$  no identificadas por los predictores:  $\beta$ 1 (6-14),  $\beta$ 2 (37-45) y  $\beta$ 3 (59-66) debido a su propensión inherente a formar hojas- $\beta$  paralelas y potenciales agregados- $\beta$ . Para maximizar la

solubilidad de los péptidos sintéticos, se añadieron algunos residuos nativos adicionales a las regiones predichas según lo recomendado por GenScript USA Inc. (Figura 16B).

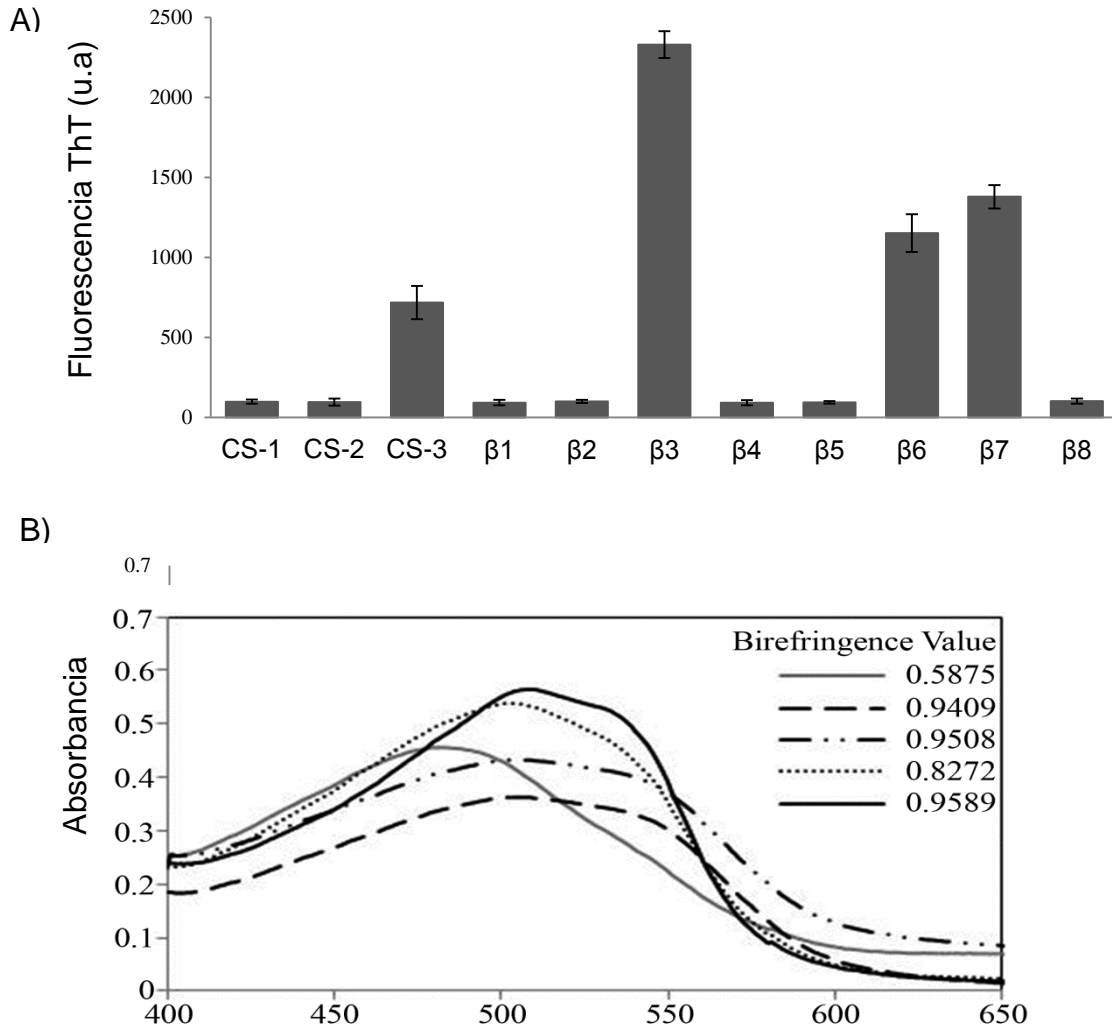
Durante el período de incubación, la solución del péptido  $\beta 3$  se volvió turbia al segundo día, seguida por las soluciones  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  y CS-3 al quinto día. Las mediciones finales de fluorescencia con ThT a 485 nm (Figura 17A) muestran que tras 5 días de incubación, los péptidos  $\beta 3$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  y CS-3 formaron agregados con características amiloides. Además, se evaluó la propiedad de corrimiento espectral del rojo Congo al calcular el valor relativo de corrimiento espectral de las muestras (Figura 17B). Los cuatro péptidos dieron valores de corrimiento espectral superiores al control de rojo Congo. Más aun, se confirmó morfología fibrilar para los cuatro péptidos por TEM (Figura 18), donde el mayor nivel de asociación lo alcanzó el péptido  $\beta 3$  el cual formó una red densa de fibras maduras. El tamaño, la forma y el nivel de asociación de los péptidos  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  y CS-3 fueron muy variados. El péptido  $\beta 7$  formó fibras cortas, rotas que no eran más largas que 500 nm, mientras que los péptidos  $\beta 6$  y CS-3 formaron grandes aglomerados de aparentes protofilamentos. El resto de los péptidos no mostró agregación- $\beta$  (Anexo III).

A pesar de que no se pudo comparar la velocidad de agregación entre péptidos, debido a que la cantidad de péptido con la que se contaba no fue suficiente para realizar cinéticas de agregación, si se pudo constatar formación de agregados amiloides. Además, se puede aseverar que el péptido  $\beta 3$  fue el más amiloidogénico al exhibir la mayor intensidad de fluorescencia con ThT, mayor corrimiento espectral del rojo Congo y una morfología de fibras maduras.



**Figura 16.** Identificación de regiones potencialmente formadoras de estructura cross-β. A) Predicción consenso de regiones propensas a agregación-β. Las hebras-β se muestran en verde, las hélices-α en color amarillo y las secuencias camaleónicas se encuentran subrayadas. Residuos de aspártico están en rojo, indicando los posibles sitios de hidrólisis ácida. B) Lista de las regiones potencialmente formadoras de estructura cross-β seleccionadas para la síntesis de péptidos.

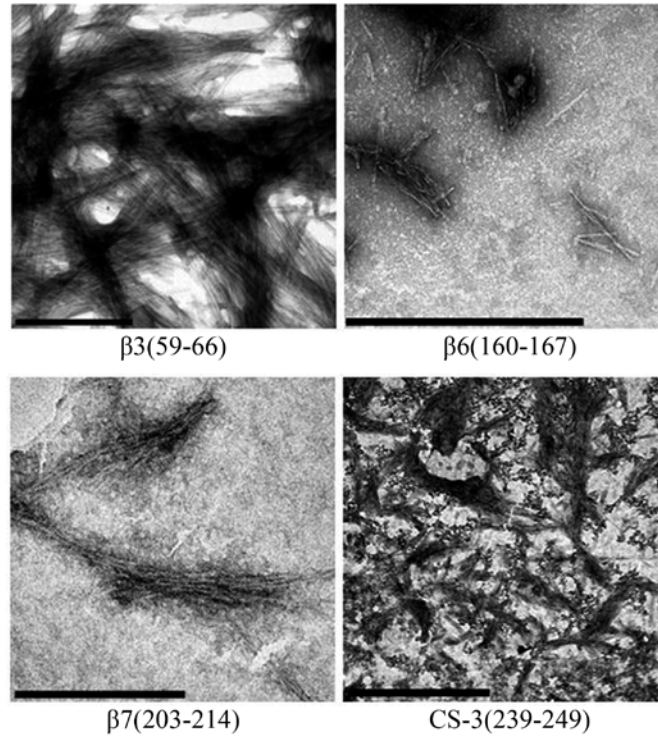




**Figura 17.** Agregación de los péptidos. A) Mediciones de intensidad de fluorescencia de ThT al punto final de agregación tras 5 días de incubación. B) Espectros de absorbancia de los agregados en presencia de 5  $\mu$ M de rojo Congo. Un pico máximo a 540 nm se muestra en los agregados del péptido- $\beta$ 3 (línea sólida negra), péptido- $\beta$ 6 (línea discontinua), péptido- $\beta$ 7 (línea discontinua punteada) y péptido-CS-3 (línea punteada) en comparación con rojo Congo solo (línea sólida gris).

Interesantemente, de los péptidos encontrados con un comportamiento amiloidogénicos, sólo el que abarca la región de la  $\beta 3$  no fue consensuada por los predictores, no obstante fue el más amiloidogénico. El único predictor que reconoció a esta región como potencial formadora de cross- $\beta$  fue AMYLPRED 2, lo que demuestra una mayor sensibilidad y especificidad de éste con respecto a los demás predictores usados. Esto tiene sentido ya que este predictor es a su vez un consenso de diferentes algoritmos como AGGRESCAN, AmyloidMutants, Amyloidogenic Pattern, Average Packing Density, Beta-strand contiguity, Hexapeptide Conformational Energy, NetCSSP, Pafig, SecStr (Possible Conformational Switches), TANGO y Waltz <sup>74</sup>.

Por otro lado, con el fin de contrastar la región formadora de fibras encontrada en TPI de *E. coli* (186-218), el cual corresponde a la hélice- $\alpha$  6 y toda la hebra- $\beta 7$  del barril TIM <sup>64</sup>, con la región equivalente en HsTPI, se sintetizó el péptido P1 (185-213) y se evaluó su agregación. Este péptido comparte un 47 % de identidad con el reportado con un 88% de identidad en la región de la  $\beta 7$  (Figura 19A). Tras la incubación por 5 días en agitación, el péptido P1 formó fibras cortas de menos de 500 nm de longitud. Según las imágenes de TEM, el péptido P1 mostró una menor fibrilogénesis respecto a lo reportado para el péptido de la secuencia equivalente de *E. coli*. Esta diferencia en el grado de agregación se puede explicar si se considera la diferencia en la concentración de péptido usado para la agregación, la cual fue menos de la mitad en este trabajo, ya que se sabe que la velocidad de agregación es sensible a concentración de péptido <sup>101,102</sup>. No obstante, en este trabajo se pudo delimitar el núcleo cross- $\beta$  del fragmento



**Figura 18.** Imágenes TEM de los péptidos agregados; la barra de escala equivale a 1  $\mu\text{m}$ .

amiloidogénico hacia la  $\beta 7$ , ya que la región de la hélice- $\alpha 6$  no posee propensión a cross- $\beta$  según las predicciones.

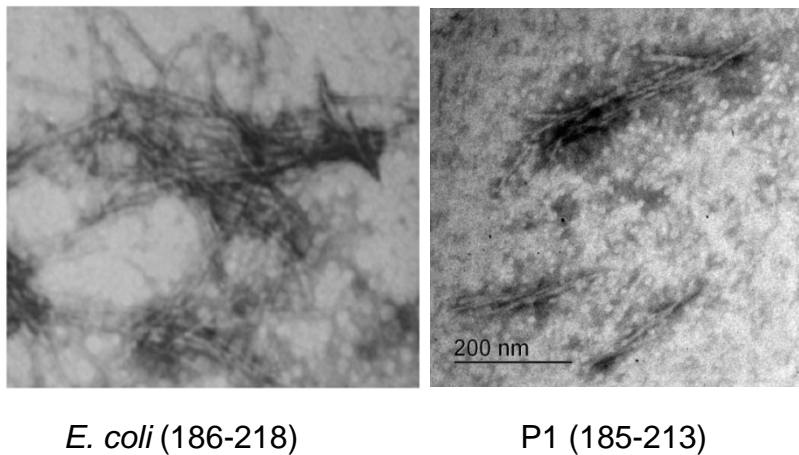
A través del análisis de las diferentes regiones predichas con los péptidos se cubrió el 51 % de la secuencia de HsTPI, encontrándose 4 secuencias amiloidogénicas; sin embargo, permanece un 49 % de la secuencia que no fue evaluada, y como el resultado del péptido  $\beta 3$  lo demuestra, pueden haber regiones con alta propensión a la formación de fibras amiloides no identificadas con los predictores. Para tener una cobertura completa de la secuencia se procedió hacer una hidrólisis ácida de la proteína (HCl 10 mM), que tiende a digerir enlaces peptídicos específicamente en residuos aspárticos (Figura 20A). Tras la incubación por toda la noche en condiciones ácidas, la proteína se hidrolizó parcialmente, obteniendo péptidos de tamaño muy variados (Figura 20B). Una hidrólisis completa no hubiera exhibido fragmentos mayores a 4 kDa, lo que sugiere que como se buscaba, la HsTPI fue parcialmente hidrolizada.

Después de la hidrólisis ácida, la mezcla de reacción se incubó a 37 °C y 600 rpm por 7 días. Al seguir la agregación por fluorescencia de ThT, se observó un comportamiento de agregación de los fragmentos hidrolizados que era indicativo de la formación de fibras amiloides ya que siguió un mecanismo de nucleación-polimerización con una fase lag de 45 horas y alcanzando la fase estacionaria hasta las 140 horas (Figura 21A). Además, las imágenes de TEM de los productos finales de agregación mostraron una morfología consistente con fibras amiloides maduras (Figura 21B). Esto anterior es interesante ya que la agregación de la proteína no hidrolizada (HsTPI<sub>urea</sub>) siguió un comportamiento monofásico

A)

	Identidad 47%
TPI de <i>E. coli</i>	12 NVSDAVAQSTRII-YGGSV 29
	N+ +            II YGGSV
HsTPI	16 NIAEQV-----IIQYGGSV 29

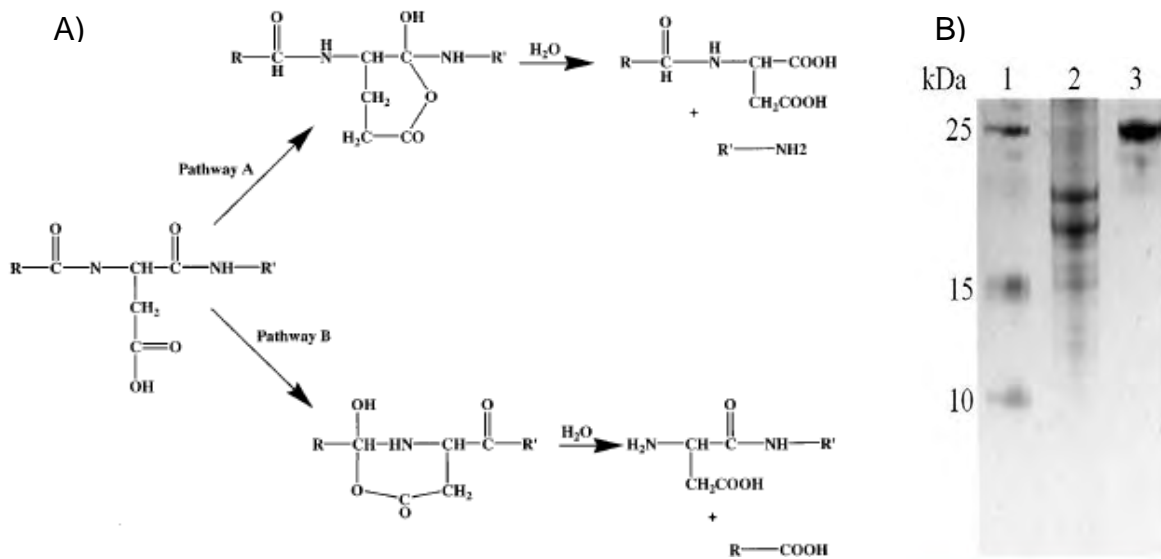
B)



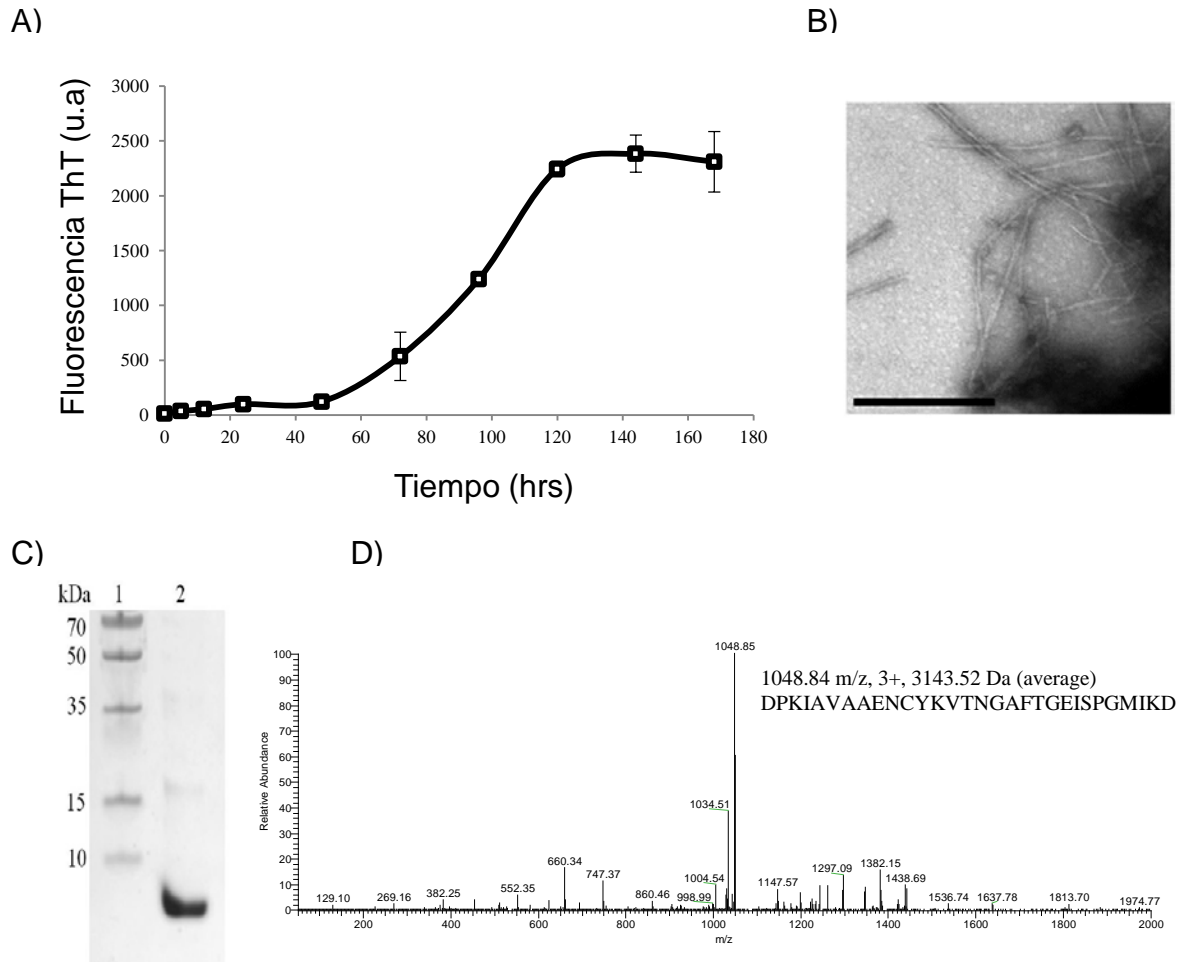
**Figura 19.** A) Alineamiento de la región amiloidogénica encontrada en *E. coli* con la región equivalente en HsTPI. B) Diferencia en el grado de agregación del fragmento reportado y el péptido P1. Ambas imágenes muestran la misma magnificación. La escala esta como se representa. Imagen de la izquierda tomada de la publicación de Contreras y col., 1999<sup>64</sup>.

independiente de nucleación estructurada con una amiloidogénesis incompleta a 7 días de incubación. Esto sugiere que tras la hidrólisis de HsTPI se perdieron estructuras que promovían rutas alternas a la agregación cross- $\beta$ , que desviaban la agregación hacia especies amorfas y retardaban la amiloidogénesis. La disociación parcial de las fibras amiloides con Gdn-HCl condujo a un único fragmento (Figura 21C) que corresponde a la región entre los residuos 57-85 (DPKIAVAAENCYKVTNGAFTGEISPGMIK) de HsTPI según lo determinado por nLC-MS/MS (Figura 21D). Este fragmento corresponde a la totalidad de la hebra- $\beta$ 3 encontrada en el análisis de péptidos. Ningún otro péptido amiloidogénico fue recuperado en esta agregación a pesar de que toda la secuencia estuvo potencialmente representada en la digestión.

No obstante, según el análisis MS/MS, la glutamina 65 del fragmento enriquecido por la agregación fue desaminada en un glutamato debido al tratamiento ácido de la proteína. Sin embargo, este cambio químico no tuvo efecto aparente en la propensión amiloidogénica. No pudimos determinar la influencia de este cambio en las velocidades ya que se imposibilitó la realización de cinéticas de agregación de los péptidos sintéticos.



**Figura 20.** A) Mecanismos propuestos para la hidrólisis ácida específica en residuos de aspártico <sup>103</sup>. El corte se realiza por el ataque nucleofílico de una molécula de H<sub>2</sub>O hacia el carbono del carbonilo anterior o posterior al carbono- $\alpha$  dando dos opciones de hidrólisis, hacia el N-terminal (Pathway A) o hacia el C-terminal (Pathway B). B) Gel de electroforesis SDS-PAGE-TRICINA de los productos de hidrólisis ácida de HsTPI. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular con los pesos como se indican, en el carril 2 la proteína hidrolizada y en el carril 3 la proteína antes de la hidrólisis.



**Figura 21.** A) Cinética de agregación de los fragmentos producto de hidrólisis ácida de HsTPI. B) Micrografía del producto final de agregación de los fragmentos hidrolizados. Barra equivale a 1  $\mu\text{m}$ . C) SDS-PAGE-TRICINA de la disolución de los agregados fibrilares obtenidos. Se muestra el enriquecimiento principal de un fragmento con masa molecular menor a 10 kDa. D) Espectro MS/MS de ion +3  $m/z$  1048.84 para la identificación del fragmento enriquecido correspondiente a los residuos 57-85 de HsTPI.



**Características protectoras de HsTPI.** Al analizar la topología  $(\beta/\alpha)_8$  de HsTPI podemos notar ciertas características que la podrían hacer resistente a la agregación- $\beta$  y a la formación de estructuras cross- $\beta$ . En primer lugar, todos los hebras- $\beta$  paralelas están enterradas dentro de la proteína en la formación de un barril- $\beta$  que previene la propagación de la hoja- $\beta$  y por lo tanto la agregación- $\beta$ . Para formar la estructura cross- $\beta$ , las hebras deben ser expuestas a la superficie. Sin embargo, debido a que los aminoácidos que constituyen el barril- $\beta$  son predominantemente hidrofóbicos, la exposición del núcleo interno tenderá a colapsar hidrofóticamente en agregados amorfos en vez de rápidamente formar estructuras cross- $\beta$ , retardando la agregación amiloide. Este es posiblemente el escenario de la agregación de HsTPI<sub>urea</sub>, donde una ligera desestabilización de la molécula expuso regiones internas que antes de formar cross- $\beta$ , se asociaron desordenadamente.

En el caso de regiones expuestas a solvente, que son más accesibles para las asociaciones intermoleculares, hay una restricción estructural evitando la conformación  $\beta$  en la superficie promoviendo solo hélices- $\alpha$  o “random coil”. Este mecanismo puede estar previniendo la asociación cross- $\beta$  de CS-3 en el estado nativo de HsTPI conformándola como la hélice- $\alpha_8$ . Este mecanismo de protección existe en otra proteína como es el caso de apoA-I donde regiones camaleónicas fibrilogénicas se configuran en hélice- $\alpha$  evitando la agregación; sin embargo, se ha visto que algunas mutaciones pueden eliminar esta restricción estructural y la proteína puede sucumbir a la agregación amiloide<sup>104</sup>.

Tras un análisis de la estructura terciaria de HsTPI notamos algunos residuos altamente conservados en la familia de TPIs que podrían estar fungiendo como restricción conformacional de la CS-3 ( $\alpha 8$ ). Primeramente, la  $\alpha 8$  es precedida por la hebra- $\beta 8$ , separados por la prolina 239 que produce un giro y dirige a la  $\alpha 8$  hacia el costado de la molécula facilitando la interacción con el interior de la proteína estabilizada principalmente por la fenilalanina 241. Además, este giro está estabilizado por un puente salino entre la lisina 238 y el glutámico 240.

Además de la estructura terciaria de  $(\beta/\alpha)_8$ , TPI siempre se encuentra como un oligómero y más frecuentemente como una proteína dimérica. La interfase de dimerización está formada precisamente por la asa después de la hebra- $\beta 3$  que se internaliza en el sitio activo de la otra subunidad. La dimerización de TPI incrementa hasta 8 veces la estabilidad de la molécula <sup>78</sup>. Esta interacción da una protección adicional a la región alrededor de la hebra  $\beta 3$ . En este sentido, múltiples intentos de perturbar la interface de dimerización han llevado a variantes inactivas de TPI <sup>105-107</sup>, pero que a través de evolución dirigida son capaces de recuperar la actividad <sup>108</sup>. Esto sugiere fuertemente que la dimerización de TPI podría ser un factor seleccionado por la evolución para ayudar a proteger a la molécula de la agregación.

Por último, se ha observado que el tamaño del polipéptido podría influenciar la agregación <sup>2,109,110</sup>. La longitud de la cadena podría estar asociado al número de estados conformacionales posibles, no solo en interacciones intramoleculares sino que también y más importante en interacciones intermoleculares, incrementando así el número y complejidad de rutas de agregación. Consideramos que tanto la

longitud del polipéptido, el factor topológico y la hidrofobicidad de las hebras- $\beta$  pudieron haber dirigido la agregación desordenada de HsTPI<sub>urea</sub> alentando la amiloidogénesis.

## CONCLUSIONES

- La enzima bajo agitación en condiciones nativas de pH, fuerza iónica y temperatura es resistente a la agregación- $\beta$ .
- Una ligera desestabilización de HsTPI con 3.2 M de urea permite la asociación  $\beta$  con la formación de estructuras amorfas en un mecanismo de fibrilogénesis lento con la aparente formación de intermediarios desordenados.
- Triosa fosfato isomerasa de humano tiene al menos 4 secuencias formadoras Cross- $\beta$  que en la estructura nativa se encuentran como tres hebras- $\beta$  y un hélice- $\alpha$ . De las 4 secuencias, la región correspondiente a la hebra- $\beta$ 3 fue la más fibrilogénica.
- El servidor de predicción AMYLPRED 2 mostró una mayor sensibilidad al identificar las cuatro regiones fibrilogénicas, sin embargo mostró una baja especificidad con 6 falsos positivos de 10 hits.
- Es claro que la naturaleza de HsTPI confiere protección contra la formación de agregados amiloides tóxicos. Sin embargo, procesamientos proteolíticos podrían liberar las regiones fibrilogénicas y promover la formación de placas amiloides, resultando en enfermedades amiloides.
- Las cuatro secuencias fibrilogénicas encontradas en HsTPI podrían tener potencial uso biotecnológico en nanomateriales, sobre todo la región  $\beta$ 3 ya que forman estructuras más organizadas y homogéneas.

## ANEXOS

### ANEXO I. Soluciones y reactivos

**Medio *Luria Bertani* (LB).** El medio se preparó disolviendo 20g de Triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl, ajustado el pH a 7.5 con NaOH y aforando a un litro. Posteriormente se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121° C con una presión alrededor de 103 kPa. En caso de ser sólido al medio LB se le agregó agar para tener una concentración final del 1.5% (w/v).

**Ampicilina.** Se preparó un stock 1000x pesando 500 mg y disolviéndolo en 10 mL de H<sub>2</sub>O a concentración final de 50 mg/mL. La solución se filtró con un punto de corte de 0.2 µm y se almacenó a -20° C. La concentración de trabajo fue de 50 µg/mL.

**Cloranfenicol.** La solución stock 1000x se preparó disolviendo 350 mg en 10 mL de etanol a concentración final de 35mg/mL. La solución se filtró con un punto de corte de 0.2 µm y se almacenó a -20° C. La concentración de trabajo fue de 35 µg/mL.

**IPTG.** Se usó una solución stock de concentración 100 mM. Para esto, se pesó 2.38 g de IPTG sólido y se disolvió en 100 mL de H<sub>2</sub>O estéril. La solución se filtró con un punto de corte de 0.2 µm y se almacenó a -20° C. La concentración de trabajo fue de 0.2 mM.

**Solución A.** Esta solución se derivó de un stock 10x el cual se preparó disolviendo 27.4g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 87g de NaCl en un litro de H<sub>2</sub>O

y ajustando el pH a 7.4. Antes de cada ensayo, la solución de trabajo se filtró y degasificó. Esta solución fue suplementada para los distintos ensayos realizados. Para la purificación de HsTPI se suplementó con imidazol usando un stock 500 mM (realizado en la misma solución). Para los ensayos de agregación se suplementó, además de urea, con 1 mM de DTT y 0.2% (w/v) de azida de sodio. En el inmunoensayo dot-blot se le adicionó 0.05% (w/v) Tween 20.

**Tetraetilamonio.** Este se preparó diluyendo la solución comercial que está al 40% (w/v) hasta una concentración de 50 mM. Posteriormente se le ajustó el pH a 7.4. Se usó solución fresca para cada reacción de nitración.

**Hidrocloreuro de 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1).** El reactivo sólido se separó en alícuotas de 10 mg equivalentes a 1 mL de reacción. Para la nitración, el reactivo sólido se disolvió en la solución de proteína en tetraetilamonio.

**Tioflavina T.** Las soluciones de 10  $\mu$ M y de 1 mM de Tioflavina T se prepararon a partir de una solución patrón 10 mM. Este se preparó disolviendo 32 mg en 10 mL de H<sub>2</sub>O. La concentración se verificó por absorbancia usando un coeficiente de extinción molar a 412 nm,  $\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Rojo de Congo.** La solución de trabajo se preparó diluyendo una solución patrón (o estándar) 10 mM preparada con 70 mg de rojo de Congo en 10 mL de H<sub>2</sub>O. La concentración se verificó por absorción de luz usando un coeficiente de extinción molar a 498 nm,  $\epsilon = 45,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

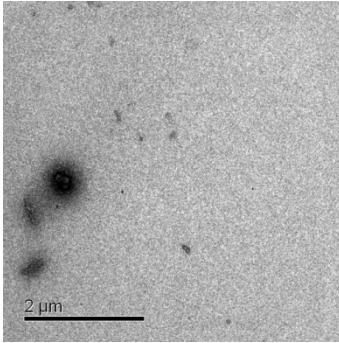
**Agarosa Ni-NTA.** Antes de cada cromatografía, la resina fue regenerada y pre-equilibrada, ya que fue reutilizada para la purificación de los distintos lotes de proteína así como en la remoción de la proteasa TEV. Para esto, la resina se lavó secuencialmente como a continuación se indica: i) 5 volúmenes de cama (VC) de H<sub>2</sub>O, ii) 10 VC de EDTA 100 mM, iii) 5 VC de H<sub>2</sub>O, iv) 10 VC de SDS 0.1 % (w/v), v) 10 VC de H<sub>2</sub>O, vi) 3 VC de NiSO<sub>4</sub> 100 mM, vii) 5 VC de H<sub>2</sub>O y finalmente 10 VC de Solución A.

**ANEXO II.** Lista de péptidos sintéticos probados en ensayos de agregación.

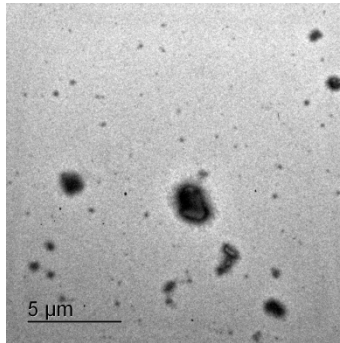
No.	Nombre	Secuencia	Residuos	Carga
1	CS-1	EKVVFEQTKVIAD	13	-1
2	CS-2	VWAIGTGKT	9	1
3	CS-3	PEFVDIINAKQ	11	-1
4	$\beta$ 1	KFFVGGNWK	9	2
5	$\beta$ 2	DTEVVCAPP	9	-2
6	$\beta$ 3	KIAVAAQN	8	1
7	$\beta$ 4	TWVVLGH	7	1
8	$\beta$ 5	EGLGVIACIGE	11	-2
19	$\beta$ 6	KVVLAYEP	8	0
10	$\beta$ 7	QSTRIIYGGSVT	12	1
11	$\beta$ 8	DVDGFLVGGAS	11	-2
12	P1	VHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGG	30	2



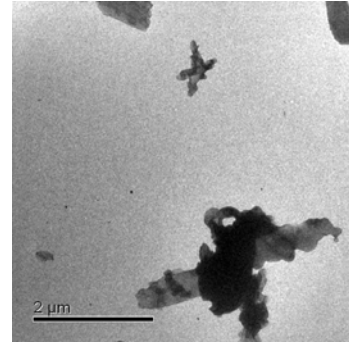
**ANEXO III.** Micrografías TEM de agregados no fibrilares obtenidos de los péptidos no amiloidogénicos.



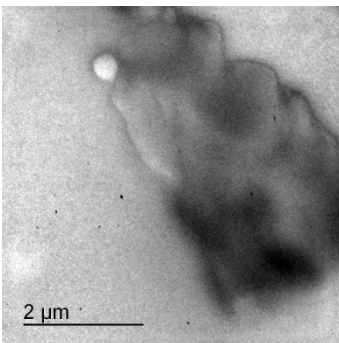
B1



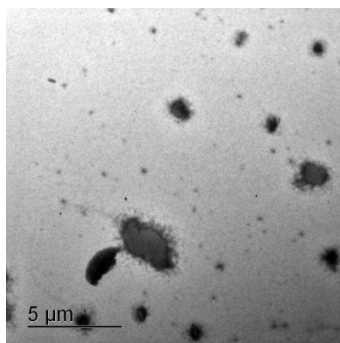
B2



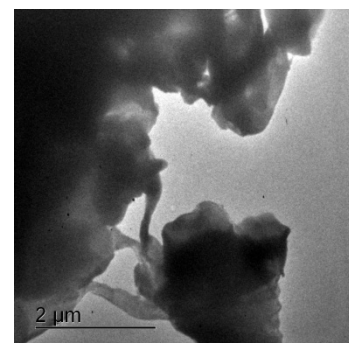
B4



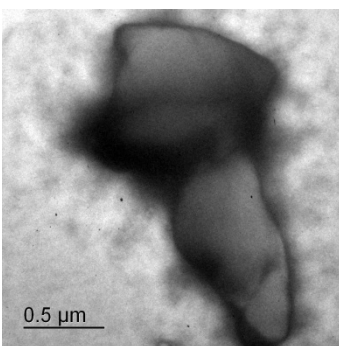
B5



B8



CS-1



CS-2

## REFERENCIAS

- 1 Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* **26**, 597-604, doi:S0968-0004(01)01938-7 [pii] (2001).
- 2 Baldwin, A. J. *et al.* Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc* **133**, 14160-14163, doi:10.1021/ja2017703 (2011).
- 3 Thirumalai, D. & Reddy, G. Protein thermodynamics: Are native proteins metastable? *Nat Chem* **3**, 910-911 (2011).
- 4 Bustamante, C. J., Kaiser, C. M., Maillard, R. A., Goldman, D. H. & Wilson, C. A. Mechanisms of cellular proteostasis: insights from single-molecule approaches. *Annual review of biophysics* **43**, 119-140, doi:10.1146/annurev-biophys-051013-022811 (2014).
- 5 Hipp, M. S., Park, S.-H. & Hartl, F. U. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology* **24**, 506-514, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.05.003> (2014).
- 6 Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. & Balch, W. E. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual review of biochemistry* **78**, 959-991, doi:10.1146/annurev.biochem.052308.114844 (2009).
- 7 Morimoto, R. I. & Cuervo, A. M. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **69 Suppl 1**, S33-38, doi:10.1093/gerona/glu049 (2014).
- 8 Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 3-16, doi:10.1016/j.semcdb.2003.12.008 (2004).
- 9 Montgomery Pettitt, B. The unsolved "solved-problem" of protein folding. *Journal of biomolecular structure & dynamics* **31**, 1024-1027, doi:10.1080/07391102.2012.748547 (2013).
- 10 Dill, K. A., Ozkan, S. B., Weikl, T. R., Chodera, J. D. & Voelz, V. A. The protein folding problem: when will it be solved? *Current opinion in structural biology* **17**, 342-346, doi:10.1016/j.sbi.2007.06.001 (2007).
- 11 Voisine, C., Pedersen, J. S. & Morimoto, R. I. Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis* **40**, 12-20, doi:S0969-9961(10)00158-0 [pii]  
10.1016/j.nbd.2010.05.007 (2010).
- 12 Ellis, R. J. Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv Exp Med Biol* **594**, 1-13, doi:10.1007/978-0-387-39975-1\_1 (2007).

- 13 Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324-332, doi:nature10317 [pii] 10.1038/nature10317 (2011).
- 14 Jahn, T. R. & Radford, S. E. Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **469**, 100-117, doi:10.1016/j.abb.2007.05.015 (2008).
- 15 Fink, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design* **3**, R9-R23, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00002-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00002-9) (1998).
- 16 Jahn, T. R. & Radford, S. E. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of biochemistry and biophysics* **469**, 100-117, doi:10.1016/j.abb.2007.05.015 (2008).
- 17 Stranks, S. D. *et al.* Model for amorphous aggregation processes. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **80**, 051907 (2009).
- 18 Khurana, R. *et al.* Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* **40**, 3525-3535 (2001).
- 19 Gsponer, J. & Vendruscolo, M. Theoretical approaches to protein aggregation. *Protein and peptide letters* **13**, 287-293 (2006).
- 20 Borgia, M. B., Nickson, A. A., Clarke, J. & Hounslow, M. J. A Mechanistic Model for Amorphous Protein Aggregation of Immunoglobulin-like Domains. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 6456-6464, doi:10.1021/ja308852b (2013).
- 21 Marshall, K. E., Marchante, R., Xue, W. F. & Serpell, L. C. The relationship between amyloid structure and cytotoxicity. *Prion* **8** (2014).
- 22 Rambaran, R. N. & Serpell, L. C. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion* **2**, 112-117 (2008).
- 23 Irwin, D. J., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Parkinson's disease dementia: convergence of  $\alpha$ -synuclein, tau and amyloid- $\beta$  pathologies. *Nat Rev Neurosci* **14**, 626-636, doi:10.1038/nrn3549 (2013).
- 24 Renner, M. & Melki, R. Protein aggregation and prionopathies. *Pathol Biol (Paris)*, doi:10.1016/j.patbio.2014.01.003 (2014).
- 25 Welzel, A. T. & Walsh, D. M. Aberrant protein structure and diseases of the brain. *Ir J Med Sci* **180**, 15-22, doi:10.1007/s11845-010-0606-z (2011).
- 26 Westermark, P. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J* **272**, 5942-5949, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05024.x (2005).

- 27 Knowles, T. P., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 384-396, doi:10.1038/nrm3810 (2014).
- 28 Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E. & Kelly, J. W. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* **32**, 217-224, doi:10.1016/j.tibs.2007.03.003 (2007).
- 29 Pham, C. L., Kwan, A. H. & Sunde, M. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. *Essays in biochemistry* **56**, 207-219, doi:10.1042/bse0560207 (2014).
- 30 Otzen, D. Functional amyloid: Turning swords into plowshares. *Prion* **4**, 256-264, doi:10.4161/pri.4.4.13676 (2010).
- 31 Hauser, C. A., Maurer-Stroh, S. & Martins, I. C. Amyloid-based nanosensors and nanodevices. *Chemical Society reviews* **43**, 5326-5345, doi:10.1039/c4cs00082j (2014).
- 32 Haldar, S., Sil, P., Thangamuniyandi, M. & Chattopadhyay, K. Conversion of amyloid fibrils of cytochrome c to mature nanorods through a honeycomb morphology. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **31**, 4213-4223, doi:10.1021/la5029993 (2015).
- 33 Li, D. *et al.* Structure-based design of functional amyloid materials. *J Am Chem Soc* **136**, 18044-18051, doi:10.1021/ja509648u (2014).
- 34 Shewmaker, F., McGlinchey, R. P. & Wickner, R. B. Structural Insights into Functional and Pathological Amyloid. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 16533-16540, doi:10.1074/jbc.R111.227108 (2011).
- 35 Langkilde, A. E., Morris, K. L., Serpell, L. C., Svergun, D. I. & Vestergaard, B. The architecture of amyloid-like peptide fibrils revealed by X-ray scattering, diffraction and electron microscopy. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **71**, 882-895, doi:10.1107/S1399004715001674 (2015).
- 36 Jahn, T. R. *et al.* The common architecture of cross-beta amyloid. *Journal of molecular biology* **395**, 717-727, doi:10.1016/j.jmb.2009.09.039 (2010).
- 37 Fitzpatrick, A. W. P. *et al.* Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- $\beta$  amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 5468-5473, doi:10.1073/pnas.1219476110 (2013).
- 38 Tompa, P. Structural disorder in amyloid fibrils: its implication in dynamic interactions of proteins. *FEBS Journal* **276**, 5406-5415, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07250.x (2009).
- 39 Calamai, M., Chiti, F. & Dobson, C. M. Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophysical journal* **89**, 4201-4210, doi:10.1529/biophysj.105.068726 (2005).
- 40 Gillam, J. E. & MacPhee, C. E. Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of physics. Condensed matter : an*

*Institute of Physics journal* **25**, 373101, doi:10.1088/0953-8984/25/37/373101 (2013).

41 Dovidchenko, N. V., Leonova, E. I. & Galzitskaya, O. V. Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry. Biokhimiia* **79**, 1515-1527, doi:10.1134/S0006297914130057 (2014).

42 Gosal, W. S. *et al.* Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *Journal of molecular biology* **351**, 850-864, doi:10.1016/j.jmb.2005.06.040 (2005).

43 Zou, Y. *et al.* New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach. *The journal of physical chemistry. B* **118**, 9834-9843, doi:10.1021/jp504201k (2014).

44 Giurleo, J. T., He, X. & Talaga, D. S. Beta-lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates. *Journal of molecular biology* **381**, 1332-1348, doi:10.1016/j.jmb.2008.06.043 (2008).

45 Zerovnik, E. *et al.* Mechanisms of amyloid fibril formation--focus on domain-swapping. *FEBS J* **278**, 2263-2282, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08149.x (2011).

46 Xue, W.-F., Homans, S. W. & Radford, S. E. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8926-8931, doi:10.1073/pnas.0711664105 (2008).

47 Auer, S. Nucleation of Polymorphic Amyloid Fibrils. *Biophysical journal* **108**, 1176-1186, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.013> (2015).

48 Invernizzi, G., Papaleo, E., Sabate, R. & Ventura, S. Protein aggregation: Mechanisms and functional consequences. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 1541-1554, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.023> (2012).

49 Kashchiev, D. & Auer, S. Nucleation of amyloid fibrils. *The Journal of Chemical Physics* **132**, 215101, doi:doi:<http://dx.doi.org/10.1063/1.3447891> (2010).

50 Auer, S., Ricchiuto, P. & Kashchiev, D. Two-Step Nucleation of Amyloid Fibrils: Omnipresent or Not? *Journal of molecular biology* **422**, 723-730, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.022> (2012).

51 Lee, J., Culyba, E. K., Powers, E. T. & Kelly, J. W. Amyloid- $\beta$  Forms Fibrils by Nucleated Conformational Conversion of Oligomers. *Nature chemical biology* **7**, 602-609, doi:10.1038/nchembio.624 (2011).

52 Serio, T. R. *et al.* Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* **289**, 1317-1321 (2000).

53 Wu, C. & Shea, J. E. Coarse-grained models for protein aggregation. *Current opinion in structural biology* **21**, 209-220, doi:10.1016/j.sbi.2011.02.002 (2011).

54 Bader, R., Bamford, R., Zurdo, J., Luisi, B. F. & Dobson, C. M. Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation. *Journal of molecular biology* **356**, 189-208, doi:10.1016/j.jmb.2005.11.034 (2006).

55 Hurshman, A. R., White, J. T., Powers, E. T. & Kelly, J. W. Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. *Biochemistry* **43**, 7365-7381, doi:10.1021/bi049621l (2004).

56 López de la Paz, M. & Serrano, L. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 87-92, doi:2634884100 [pii]

10.1073/pnas.2634884100 (2004).

57 Baldwin, A. J. *et al.* Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 14160-14163, doi:10.1021/ja2017703 (2011).

58 Maurer-Stroh, S. *et al.* Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nature methods* **7**, 237-242, doi:10.1038/nmeth.1432 (2010).

59 Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature biotechnology* **22**, 1302-1306, doi:10.1038/nbt1012 (2004).

60 Hills, R. D., Jr. & Brooks, C. L., 3rd. Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation. *Journal of molecular biology* **368**, 894-901, doi:10.1016/j.jmb.2007.02.043 (2007).

61 Tzotzos, S. & Doig, A. J. Amyloidogenic sequences in native protein structures. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**, 327-348, doi:10.1002/pro.314 (2010).

62 Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2754-2759, doi:10.1073/pnas.052706099 (2002).

63 Wierenga, R. K. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters* **492**, 193-198, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02236-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02236-0) (2001).

64 Contreras, C. F., Canales, M. A., Alvarez, A., De Ferrari, G. V. & Inestrosa, N. C. Molecular modeling of the amyloid-beta-peptide using the homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid in vitro. *Protein engineering* **12**, 959-966 (1999).

65 Guix, F. X. *et al.* Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain : a journal of neurology* **132**, 1335-1345, doi:10.1093/brain/awp023 (2009).

66 Biancalana, M. & Koide, S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochimica et biophysica acta* **1804**, 1405-1412, doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001 (2010).

67 Aguirre, B. *et al.* A Ribosomal Misincorporation of Lys for Arg in Human Triosephosphate Isomerase Expressed in *Escherichia coli* Gives Rise to Two Protein Populations. *PLoS one* **6**, e21035, doi:10.1371/journal.pone.0021035 (2011).

68 Mishra, R. *et al.* Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation but decelerated by intact protein binding and conversion. *Journal of molecular biology* **366**, 1029-1044, doi:10.1016/j.jmb.2006.11.084 (2007).

69 Klunk, W. E., Jacob, R. F. & Mason, R. P. Quantifying amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) aggregation using the Congo red-A $\beta$  (CR-A $\beta$ ) spectrophotometric assay. *Analytical biochemistry* **266**, 66-76, doi:10.1006/abio.1998.2933 (1999).

70 Frid, P., Anisimov, S. V. & Popovic, N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* **53**, 135-160, doi:10.1016/j.brainresrev.2006.08.001 (2007).

71 Gasior, P. & Kotulska, M. FISH Amyloid - a new method for finding amyloidogenic segments in proteins based on site specific co-occurrence of aminoacids. *BMC bioinformatics* **15**, 54, doi:10.1186/1471-2105-15-54 (2014).

72 Garbuzynskiy, S. O., Lobanov, M. Y. & Galzitskaya, O. V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics* **26**, 326-332, doi:10.1093/bioinformatics/btp691 (2010).

73 Walsh, I., Seno, F., Tosatto, S. C. & Trovato, A. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic acids research* **42**, W301-307, doi:10.1093/nar/gku399 (2014).

74 Tsohis, A. C., Papandreou, N. C., Iconomidou, V. A. & Hamodrakas, S. J. A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PLoS one* **8**, e54175, doi:10.1371/journal.pone.0054175 (2013).

75 Zhang, X., Dong, Y., Yu, J. & Tu, X. Effects of environmental factors on MSP21-25 aggregation indicate the roles of hydrophobic and electrostatic interactions in the aggregation process. *European biophysics journal : EBJ* **43**, 1-9, doi:10.1007/s00249-013-0934-9 (2014).

76 Cai, Z. *et al.* Effect of urea concentration on aggregation of amyloidogenic hexapeptides (NFGAIL). *The journal of physical chemistry. B* **118**, 48-57, doi:10.1021/jp407776e (2014).

77 Uversky, V. N. Amyloidogenesis of Natively Unfolded Proteins. *Current Alzheimer research* **5**, 260-287 (2008).

78 Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A. & Goraj, K. Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability

of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* **35**, 4110-4117, doi:10.1021/bi952692n (1996).

79 Mainfroid, V. *et al.* Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *Journal of molecular biology* **257**, 441-456, doi:10.1006/jmbi.1996.0174 (1996).

80 Bemporad, F., De Simone, A., Chiti, F. & Dobson, Christopher M. Characterizing Intermolecular Interactions That Initiate Native-Like Protein Aggregation. *Biophysical journal* **102**, 2595-2604, doi:10.1016/j.bpj.2012.03.057 (2012).

81 Bemporad, F. & Chiti, F. "Native-like aggregation" of the acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* and its biological implications. *FEBS Letters* **583**, 2630-2638, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.013> (2009).

82 Costas, M. *et al.* Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *Journal of molecular biology* **385**, 924-937, doi:10.1016/j.jmb.2008.10.056 (2009).

83 Aguirre, Y. *et al.* Different contribution of conserved amino acids to the global properties of triosephosphate isomerases. *Proteins* **82**, 323-335, doi:10.1002/prot.24398 (2014).

84 Desamero, R., Rozovsky, S., Zhadin, N., McDermott, A. & Callender, R. Active site loop motion in triosephosphate isomerase: T-jump relaxation spectroscopy of thermal activation. *Biochemistry* **42**, 2941-2951, doi:10.1021/bi026994i (2003).

85 Frankenfield, K. N., Powers, E. T. & Kelly, J. W. Influence of the N-terminal domain on the aggregation properties of the prion protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* **14**, 2154-2166, doi:10.1110/ps.051434005 (2005).

86 Zandomenighi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G. & Fändrich, M. FTIR reveals structural differences between native  $\beta$ -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**, 3314-3321, doi:10.1110/ps.041024904 (2004).

87 Moran, S. D. & Zanni, M. T. How to Get Insight into Amyloid Structure and Formation from Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **5**, 1984-1993, doi:10.1021/jz500794d (2014).

88 Wang, L., Schubert, D., Sawaya, M. R., Eisenberg, D. & Riek, R. Multidimensional structure-activity relationship of a protein in its aggregated states. *Angewandte Chemie* **49**, 3904-3908, doi:10.1002/anie.201000068 (2010).

89 Shivu, B. *et al.* Distinct beta-sheet structure in protein aggregates determined by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **52**, 5176-5183, doi:10.1021/bi400625v (2013).



90 O'Nuallain, B. & Wetzel, R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1485-1490, doi:10.1073/pnas.022662599 (2002).

91 Hill, S. E., Robinson, J., Matthews, G. & Muschol, M. Amyloid protofibrils of lysozyme nucleate and grow via oligomer fusion. *Biophysical journal* **96**, 3781-3790, doi:10.1016/j.bpj.2009.01.044 (2009).

92 Vetri, V. *et al.* Amyloid fibrils formation and amorphous aggregation in concanavalin A. *Biophysical chemistry* **125**, 184-190, doi:10.1016/j.bpc.2006.07.012 (2007).

93 Krishnan, S. & Raibekas, A. A. Multistep aggregation pathway of human interleukin-1 receptor antagonist: kinetic, structural, and morphological characterization. *Biophysical journal* **96**, 199-208, doi:10.1016/j.bpj.2008.10.002 (2009).

94 Miti, T., Mulaj, M., Schmit, J. D. & Muschol, M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules* **16**, 326-335, doi:10.1021/bm501521r (2015).

95 Auer, S., Meersman, F., Dobson, C. M. & Vendruscolo, M. A generic mechanism of emergence of amyloid protofilaments from disordered oligomeric aggregates. *PLoS computational biology* **4**, e1000222, doi:10.1371/journal.pcbi.1000222 (2008).

96 Johnson, S. M., Connelly, S., Fearn, C., Powers, E. T. & Kelly, J. W. The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of molecular biology* **421**, 185-203, doi:10.1016/j.jmb.2011.12.060 (2012).

97 Powers, E. T. & Powers, D. L. Mechanisms of Protein Fibril Formation: Nucleated Polymerization with Competing Off-Pathway Aggregation. *Biophysical journal* **94**, 379-391, doi:10.1529/biophysj.107.117168 (2008).

98 Soreghan, B. *et al.* The influence of the carboxyl terminus of the Alzheimer Abeta peptide on its conformation, aggregation, and neurotoxic properties. *Neuromolecular medicine* **1**, 81-94, doi:10.1385/NMM:1:1:81 (2002).

99 Kodali, R. & Wetzel, R. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Current opinion in structural biology* **17**, 48-57, doi:10.1016/j.sbi.2007.01.007 (2007).

100 Bellesia, G. & Shea, J. E. Diversity of kinetic pathways in amyloid fibril formation. *J Chem Phys* **131**, 111102, doi:10.1063/1.3216103 (2009).

101 Powers, E. T. & Powers, D. L. The Kinetics of Nucleated Polymerizations at High Concentrations: Amyloid Fibril Formation Near and Above the "Supercritical Concentration". *Biophysical journal* **91**, 122-132, doi:<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.073767> (2006).

102Arosio, P., Knowles, T. P. J. & Linse, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 7606-7618, doi:10.1039/c4cp05563b (2015).

103Li, A. *et al.* Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification. *Anal Chem* **73**, 5395-5402 (2001).

104Louros, N. N. *et al.* Chameleon 'aggregation-prone' segments of apoA-I: A model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis. *International journal of biological macromolecules* **79**, 711-718, doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.032 (2015).

105Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1515-1518 (1994).

106Borchert, T. V. *et al.* An interface point-mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *Febs Lett* **367**, 315-318 (1995).

107Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**, 9655-9662 (1997).

108Saab-Rincon, G., Juarez, V. R., Osuna, J., Sanchez, F. & Soberon, X. Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein engineering* **14**, 149-155 (2001).

109Solomon, J. P. *et al.* The 8 and 5 kDa Fragments of Plasma Gelsolin Form Amyloid Fibrils by a Nucleated Polymerization Mechanism, while the 68 kDa Fragment is Not Amyloidogenic. *Biochemistry* **48**, 11370-11380, doi:10.1021/bi901368e (2009).

110Ramshini, H. *et al.* Large proteins have a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils. *PLoS one* **6**, e16075, doi:10.1371/journal.pone.0016075 (2011).

**ARTICULO PUBLICADO**



# Identification of fibrillogenic regions in human triosephosphate isomerase

Edson N. Carcamo-Noriega and Gloria Saab-Rincon

Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

## ABSTRACT

**Background.** Amyloid secondary structure relies on the intermolecular assembly of polypeptide chains through main-chain interaction. According to this, all proteins have the potential to form amyloid structure, nevertheless, in nature only few proteins aggregate into toxic or functional amyloids. Structural characteristics differ greatly among amyloid proteins reported, so it has been difficult to link the fibrillogenic propensity with structural topology. However, there are ubiquitous topologies not represented in the amyloidome that could be considered as amyloid-resistant attributable to structural features, such is the case of TIM barrel topology.

**Methods.** This work was aimed to study the fibrillogenic propensity of human triosephosphate isomerase (HsTPI) as a model of TIM barrels. In order to do so, aggregation of HsTPI was evaluated under native-like and destabilizing conditions. Fibrillogenic regions were identified by bioinformatics approaches, protein fragmentation and peptide aggregation.

**Results.** We identified four fibrillogenic regions in the HsTPI corresponding to the  $\beta 3$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  y  $\alpha 8$  of the TIM barrel. From these, the  $\beta 3$ -strand region (residues 59–66) was highly fibrillogenic. In aggregation assays, HsTPI under native-like conditions led to amorphous assemblies while under partially denaturing conditions (urea 3.2 M) formed more structured aggregates. This slightly structured aggregates exhibited residual cross- $\beta$  structure, as demonstrated by the recognition of the WO1 antibody and ATR-FTIR analysis.

**Discussion.** Despite the fibrillogenic regions present in HsTPI, the enzyme maintained under native-favoring conditions displayed low fibrillogenic propensity. This amyloid-resistance can be attributed to the three-dimensional arrangement of the protein, where  $\beta$ -strands, susceptible to aggregation, are protected in the core of the molecule. Destabilization of the protein structure may expose inner regions promoting  $\beta$ -aggregation, as well as the formation of hydrophobic disordered aggregates. Being this last pathway kinetically favored over the thermodynamically more stable fibril aggregation pathway.

**Subjects** Biophysics

**Keywords** Fibrillogenesis, Amyloid, Aggregation, Triosephosphate isomerase, Cross- $\beta$

## INTRODUCTION

The conversion of native soluble proteins into highly structured insoluble fibrillar assemblies is associated with several degenerative pathologies, such as Alzheimer's disease, Huntington's disease and Parkinson's disease, among others (*Chiti & Dobson, 2006*). Currently, more than 30 different proteins are involved in amyloid processes that differ

Submitted 21 November 2015

Accepted 20 January 2016

Published 4 February 2016

Corresponding author

Gloria Saab-Rincon,  
gsaab@ibt.unam.mx

Academic editor

Vladimir Uversky

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 16

DOI 10.7717/peerj.1676

© Copyright

2016 Carcamo-Noriega and Saab-  
Rincon

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

in their sequence, topology, size and function but share similar structural features in the fibrils formed. A common unit of the cross- $\beta$  spine structure is conserved in fibrillar assemblies, where  $\beta$ -strands stack to form  $\beta$ -sheets that grow perpendicular to the fiber axis (Jahn *et al.*, 2010; Knowles, Vendruscolo & Dobson, 2014; Westermark, 2005). Several fibrillogenesis mechanism models have been proposed based on kinetic, structural and morphological data (Zerovnik *et al.*, 2011). These mechanisms differ from each other by: (i) the number of aggregation pathways, (ii) number of steps (conformational and oligomeric states of the protein) and (iii) the cooperativity of amyloid assembly (Calamai, Chiti & Dobson, 2005; Dovidchenko, Leonova & Galzitskaya, 2014; Gillam & MacPhee, 2013; Gosal *et al.*, 2005; Powers & Powers, 2008; Wu & Shea, 2011; Zou *et al.*, 2014).

Regardless the mechanism followed, amyloid fibrils formation always relies on the intermolecular interactions of the polypeptide main chain. Therefore, all polypeptide chains have the potential to form  $\beta$ -aggregates. However, not all proteins aggregate into cross- $\beta$  structures in the physiological environment (Baldwin *et al.*, 2011). To observe protein aggregation, the native state must usually be destabilized to expose aggregation-prone regions (Knowles, Vendruscolo & Dobson, 2014). It is clear that some sequences are more prone to form cross- $\beta$  structures than others (Jahn & Radford, 2008). Some experimental and computational studies have identified the inherent properties of the sequence, including the net charge, length, hydrophobicity and secondary structure propensities, as determinants of aggregation (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004; Hills Jr & Brooks 3rd, 2007; Maurer-Stroh *et al.*, 2010). Based on experimental evidence, several informatics approaches have been developed to identify aggregation-prone regions that could allow us to predict protein aggregation propensity.

These aggregation-prone regions are present in a large number of proteins and, in some cases, play a key role in the function or folding of the protein and, therefore, cannot be eliminated. However, evolution has developed protective mechanisms, such as improving solubility, steric hindrance and conformational restriction, to avoid the exposure of aggregation-prone regions (Richardson & Richardson, 2002; Tzotzos & Doig, 2010). It is clear that most of the protective mechanisms that evolved, are based on increasing the stability of the native state of the protein, suggesting that topologies with higher stabilities are less susceptible to amyloid aggregation (Baldwin *et al.*, 2011). Thus, this trait can be selected during evolution, which may explain the rather limited number of folds observed in nature (Goldstein, 2008; Koehl & Levitt, 2002).

A scaffold that has been recursively recruited during evolution is the TIM barrel ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Wierenga, 2001). So far, there are no reports of any TIM barrel forming fibrillar aggregates. Nevertheless, there is some evidence that links triosephosphate isomerase (TPI) with amyloid aggregation. In 1999, Contreras and coworkers (1999) found a segment (residues 186–218) from *Escherichia coli* TPI that shares 20% identity with the amyloid  $\beta$ -peptide. When investigated, this fragment was able to assemble into amyloid-like fibrils with affinity to Congo red. In another work, Guix and coworkers found high levels of a nitrated variant of TPI (nitro-TPI) that was induced by amyloid  $\beta$ -peptide depositions in the brain tissues of Alzheimer's disease patients Guix *et al.* (2009). Aggregation of *in vitro* nitrated rabbit TPI formed large  $\beta$ -aggregates with amyloid-like properties that were

able to induce aggregation of the Tau protein. These data indicate a fibrillogenic potential in TIM barrels, moreover in human triosephosphate isomerase (HsTPI) with interest in the physiopathology of Alzheimer's disease. Therefore, we considered imperative to evaluate the *in vitro* propensity of HsTPI to aggregate into fibril conformation and search for fibrillogenic regions in its sequence.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All peptides were synthesized by Liquid Phase Peptide Synthesis (LPPS) without N- or C-terminal modifications by GenScript USA Inc. (Fig. 3B). The WO1 antibody was generously donated by Dr. Ronald Wetzel from the Department of Structural Biology of the University of Pittsburgh. Hen egg-white lysozyme (HEWL) and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

### Expression and purification of HsTPI

The vector pET3a-HsTPI was kindly donated by Dr. Gomez Poyou (IFC-UNAM). This vector encodes the sequence of the wild-type HsTPI with a His-tag at the N-terminus followed by a TEV protease recognition sequence. The plasmid was transformed into the *E. coli* BL21-Gold(DE3) strain. Transformed cells were grown in LB medium supplemented with ampicillin at 37 °C until an absorbance of 0.6 at 600 nm was reached. Then, the expression of HsTPI was induced with IPTG at a final concentration of 0.2 mM. Incubation continued at 20 °C for 6 h. The cells were harvested and suspended in buffer A (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). The cell suspension was sonicated (five times for 30 s) and centrifuged at 15,000 g for 30 min. The supernatant was loaded into a Ni-NTA agarose column. The resin was washed with 10 column volumes of buffer A containing 50 mM imidazole. HsTPI was then eluted with 300 mM imidazole in buffer A. The purified HsTPI was dialyzed against buffer A in order to eliminate the imidazole. The His<sub>6X</sub> tag was cleaved using recombinant His-tagged TEV protease at a ratio of 1:50 (w/w) protease/HsTPI at 4 °C overnight. To remove the His-tagged TEV protease as well as any undigested HsTPI, the mixture was loaded into a Ni-NTA agarose column and washed with buffer A. The effluent from the column containing the cleaved HsTPI was recovered, precipitated with 75% ammonium sulfate and stored at 4 °C. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of  $\epsilon = 33,460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The integrity of HsTPI was checked using a specific activity assay.

### Aggregation assays

Aggregation assays were performed in 1.5-mL Eppendorf tubes containing 1 mL of 100  $\mu\text{M}$  HsTPI previously dialyzed against buffer A supplemented with 0.2% of sodium azide. Aggregation was also performed under slightly denaturing conditions (3.2 M of urea in the same buffer). The tubes containing the enzyme were incubated in a thermomixer (series 22670000; Eppendorf, Hamburg, Germany) at 37 °C and 600 rpm for one week. HsTPI aggregation was followed through time by a turbidimetric assay

at 405 nm and by Thioflavin T (ThT) fluorescence. To do so, protein samples (10  $\mu$ L) were added to 140  $\mu$ L of filtered 10  $\mu$ M ThT in buffer A and the fluorescence emission intensity at 485 nm was recorded using 96-well black clear bottom plates in a Tecan Safire multimode microplate reader at an excitation of 440 nm. After one week of incubation, the aggregates were recovered by centrifugation at 25,000 g for 1 h. The aggregation kinetics were repeated three times with protein originating from different expression and purification batches.

For peptide aggregation assays, desalted freeze-dried peptide was first dissolved. All but the  $\beta$ 4,  $\beta$ 7, and  $\beta$ 8 peptides were soluble in water. The  $\beta$ 4 and  $\beta$ 7 peptides were dissolved in 10% acetic acid while the  $\beta$ 8 peptide was dissolved in 100 mM ammonium hydroxide. After dissolving, peptide solutions were diluted with phosphate buffer, supplemented with 0.02% of sodium azide, to a final concentration of 50  $\mu$ M and the pH was adjusted to 7.4. Large particles were removed by micro filtration (0.45- $\mu$ m pore size). A 1 mL sample of each peptide solution in 1.5-mL Eppendorf tubes was sealed and incubated at 37 °C and 600 rpm for 3 weeks. The final ThT fluorescence intensity and green-birefringence with Congo red were measured.

### Congo red birefringence

Congo red binding analysis was conducted by spectrophotometric assay. First, 10  $\mu$ L of an aggregate sample was added to 140  $\mu$ L of filtered 5  $\mu$ M Congo red in PBS. Congo red alone was used as a reference. The mixtures were incubated at room temperature for 30 min. Absorbance spectra from 400 nm to 700 nm were acquired on a Tecan Safire multimode microplate reader blanked with phosphate buffer. A maximum peak at 540 nm was indicative of red-green birefringence. A relative birefringence value was calculated using the ratio of absorbance at 540:490 nm,  $b = (\text{abs}_{540 \text{ nm}}/\text{abs}_{490 \text{ nm}})$  based on previous reports (*Frid, Anisimov & Popovic, 2007; Klunk, Jacob & Mason, 1999*).

### Dot-blot assay

To confirm cross- $\beta$  structure in the aggregates, a dot-blot assay against the anti-cross- $\beta$  WO1 antibody was performed. First, a 10  $\mu$ L sample was placed as a drop on a nitrocellulose membrane and allowed to dry. Non-specific binding sites were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin for 1 h at room temperature. The membrane was incubated for 1 h with the WO1 antibody at a dilution of 1:8,000 in phosphate buffer containing 0.05% (w/v) Tween 20 (T-PBS). The unbound primary antibody was washed three times for 10 min with T-PBS. Then, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody (alkaline phosphate conjugated anti-mouse antibody; A3562; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using a dilution factor of 1:30,000 in T-PBS. The membrane was then washed 5 times with T-PBS for 10 min and revealed using the BCIP<sup>®</sup>/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes for 10 min. The colorimetric reaction was stopped with MilliQ water.

### Transmission electron microscopy (TEM)

The final aggregation products were placed on Formvar-coated 200 mesh copper grids for 1 min. The grids were stained for 1 min with 2% (w/v) uranyl acetate and then washed

once with MilliQ water. The images were recorded on a ZEISS transmission electron microscope model LIBRA 120 operating at 120 kV.

### Infrared spectroscopy

Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of HsTPI samples were recorded using a Perkin Elmer-Spectrum Rx1 spectrometer equipped with a zinc selenide (ZnSe) Attenuated total reflection (ATR) accessory. Sample treatment and data recording was carried out as previously described (Shivu *et al.*, 2013). A total of 256 accumulations at  $1\text{ cm}^{-1}$  of resolution were performed in the range of  $1,800\text{--}1,500\text{ cm}^{-1}$ . Water-vapor spectrum was subtracted from all samples spectrum and then spectral intensities were normalized in the  $1,630\text{ cm}^{-1}$  peak using the Spekwin32 software. Furthermore, raw spectra in amide I region ( $1,700\text{--}1,600\text{ cm}^{-1}$ ) were analyzed by second-derivative with PeakFit 4.12 software using the Savitsky-Golay routine.

### Cross- $\beta$ region consensus prediction

Potential fibrillogenic regions were predicted using HsTPI sequence (UniProt ID P60174-1). A consensus prediction was considered to be at least two sequence hits by any of the four different predictors used: FISH-AMYLOID, FOLD-AMYLOID, PASTA 2.0 and AMYLPRED 2. For all servers, the default parameters were used.

### Acid hydrolysis of HsTPI

The chemical cleavage reaction was carried out in 1.5-mL Eppendorf tubes. Ten mg of freeze dried HsTPI was dissolved in 1 mL of 10 mM HCl, 1 mM DTT, pH 2, and incubated at  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 8 h. After the incubation period, the reaction was cooled on ice and the hydrolysis pattern was analyzed by tricine SDS-PAGE stained with coomassie dye. The hydrolysis products were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 600 rpm for 7 days. The resulting aggregates were washed five times with water and then disaggregated with 7.4 M guanidinium chloride (Gdm-HCl) by mixing overnight at room temperature.

### Mass spectroscopy analysis

The dissolved aggregates were desalted using a SepPack C18 cartridge and analyzed by nanoliquid chromatography and tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS) with collision-induced dissociation (CID) on a LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) integrated with EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA). For reverse chromatography, a 25-cm analytical column ( $750\text{-}\mu\text{m}$  inner diameter) packed with C18 resin was used in a continuous flow of 400 nL/min in a 10–90% gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid over 120 min. All spectra were acquired in a data-dependent mode at a resolution of 60,000 with an  $m/z$  range of 300–1,600. Ions with a charge of +2, +3 and +4 were isolated for fragmentation using a normalized collision energy value of 35 and an activation Q value of 0.25.

## RESULTS

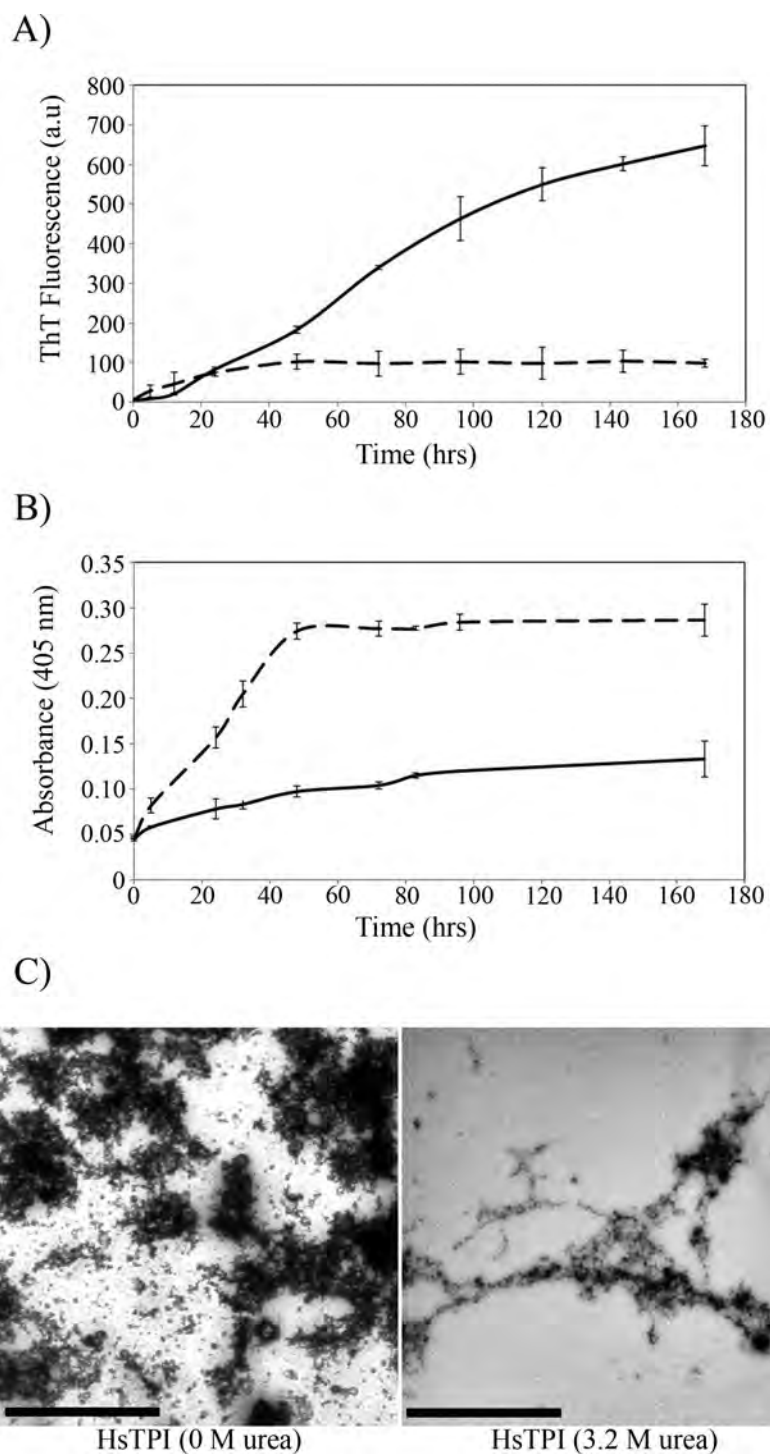
### HsTPI aggregation

The  $\beta$ -aggregation propensity of HsTPI was evaluated by incubation with stirring for 7 days at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  under native-like conditions (HsTPI<sub>n</sub>). Additionally the incubation was

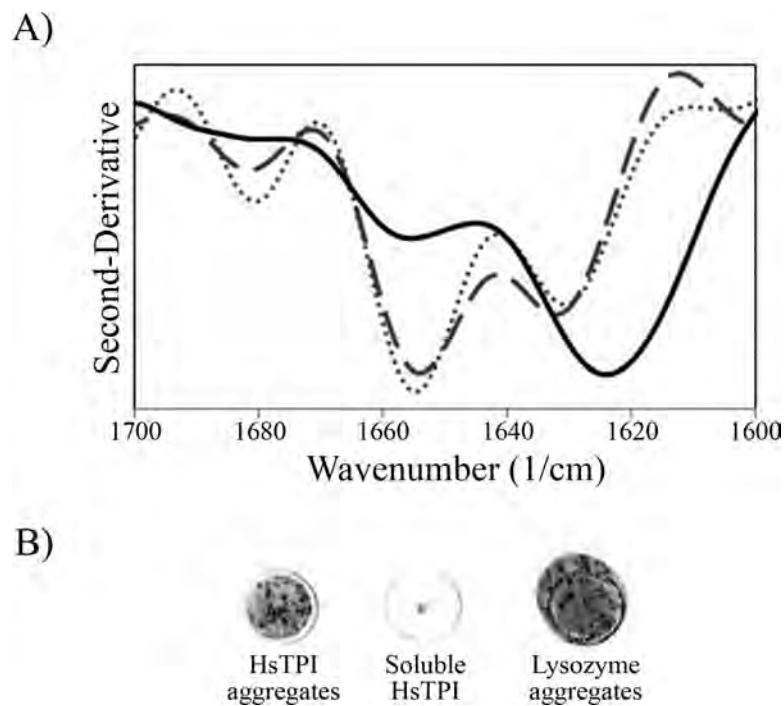


also carried out in 3.2 M of urea (HsTPI<sub>urea</sub>), a condition slightly destabilizing but still at the beginning of the unfolding transition (Mainfroid *et al.*, 1996a; Mainfroid *et al.*, 1996b). The kinetics of aggregation was followed by ThT fluorescence (Fig. 1A) and by visible light dispersion monitored at 405 nm (Fig. 1B). A slight increase in the ThT fluorescence is observed for HsTPI<sub>n</sub> after 40 h. Nevertheless this low fluorescence intensity was not indicative of  $\beta$ -aggregation; the more drastic increment in turbidity, as indicated by the dispersion of visible light, suggests that it is more likely an interference of non-specific binding of the ThT to disordered aggregates, as displayed by other amorphous assemblies (Biancalana & Koide, 2010; Nielsen *et al.*, 2012; Scarafone *et al.*, 2012). HsTPI<sub>urea</sub>, on the other hand, displayed a fast but small increase in turbidity (Fig. 1B), while ThT fluorescence showed a more significant increase (Fig. 1A). In this case, a short lag phase (about 5 h) is observed with an elongation phase extended up to 7 days without reaching a plateau. According to this data, amorphous aggregation precedes  $\beta$ -aggregation of HsTPI<sub>urea</sub>, which was not complete after 7 days of incubation. Longer incubation was not possible due the loss of protein by adhesion to the tube and microbial contamination despite that sodium azide was added. The TEM images of the final aggregation products of HsTPI<sub>n</sub> showed disordered aggregates with a fragmented appearance (Fig. 1C). It is worth to mention that staining conditions were the same for both samples; however, the HsTPI<sub>n</sub> sample showed some spots that seem to be overstained. Image analysis shows a very entropic saturation of this micrograph compared to the one from HsTPI<sub>urea</sub>, suggesting that the very dark spots are indeed reflecting a high concentration of protein aggregated. In the case of HsTPI<sub>urea</sub> the aggregates displayed some elongated structures co-aggregated with clusters of disordered aggregates that seem to be in an incomplete stage of the fibrillogenic pathway. This observation is in good agreement with the slow rate of  $\beta$ -aggregation as detected by ThT fluorescence.

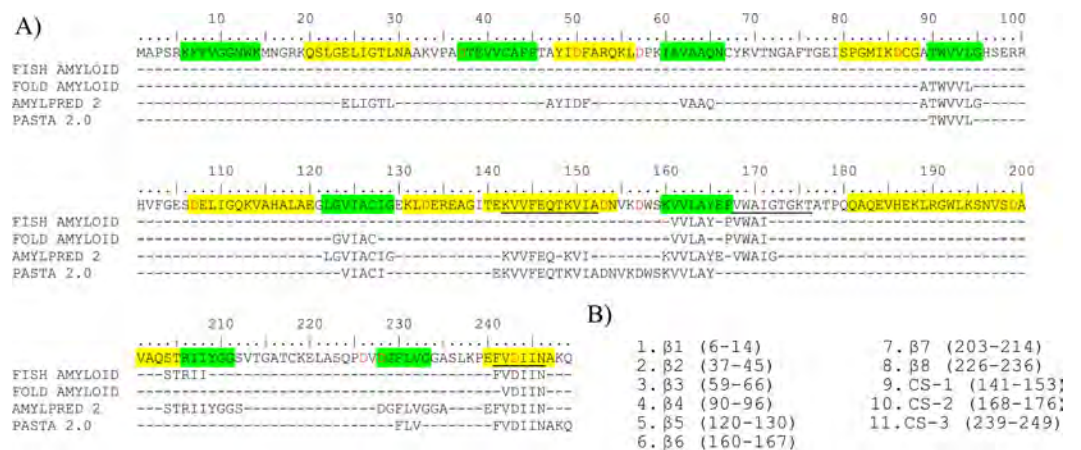
ATR-FTIR was performed in order to evaluate the secondary structure of the aggregates obtained after a week of incubation. The second-derivative of the IR spectrum of salted-out HsTPI shown two maximal peaks around 1,655 and 1,633  $\text{cm}^{-1}$  in the amide I region (Fig. 2A). These bands correspond to  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures, respectively. This second-derivative ATR-FTIR spectrum was consistent with spectra of others  $(\beta/\alpha)_8$  barrel protein in  $\text{H}_2\text{O}$  (Baldassarre *et al.*, 2011; Dong, Huang & Caughey, 1990; Huang & Dong, 2003; Kong & Yu, 2007). After one week of incubation under native-favoring conditions, the secondary structure of HsTPI was virtually unchanged suggesting native-like aggregation. In contrast, HsTPI<sub>urea</sub> showed an increase of  $\beta$ -structure (1,624  $\text{cm}^{-1}$  band) upon aggregation. Some residual non- $\beta$  secondary structure was maintained around 1,656  $\text{cm}^{-1}$  indicating that  $\beta$ -aggregation was not complete. Recent studies have sighted a clear tendency in the formation of new  $\beta$ -structure formation upon aggregation despite the nature of the aggregates (Shivu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). In this regard, cross- $\beta$  structure was further confirmed for HsTPI<sub>urea</sub> aggregates by the recognition of the anti-cross- $\beta$  WO1 antibody (O'Nuallain & Wetzel, 2002) (Fig. 2B).



**Figure 1** Aggregation kinetics followed by (A) ThT fluorescence and (B) by turbidimetry at 405 nm of HsTPI<sub>n</sub> (dashed line) and HsTPI<sub>urea</sub> (solid line). (C) TEM images of HsTPI aggregates at the final time point of aggregation. Scale bars are 1  $\mu$ m.



**Figure 2 Secondary structure of HsTPI aggregates.** (A) Second-derivative ATR-FTIR spectra in the amide I region of salted-out HsTPI (dotted line), HsTPI<sub>n</sub> (dashed line) and HsTPI<sub>urea</sub> (solid line). (B) Dot-blot assay of HsTPI aggregates with the WO1 antibody confirming cross- $\beta$  structure.



**Figure 3 Identification of potential fibrillogenic regions in HsTPI.** (A) Consensus of different prediction methods of fibrillogenic regions. The  $\beta$ -strands are shown in green, the  $\alpha$ -helices in yellow and the chameleonic sequences are underlined. Aspartic residues are in red, indicating the potential sites for acid hydrolysis. Prediction hits are shown in the corresponding line of the predictor. (B) List of the potential fibrillogenic regions selected for peptide aggregation assay. All  $\beta$ -strands were selected as well as the three more significant chameleonic sequences of the protein.

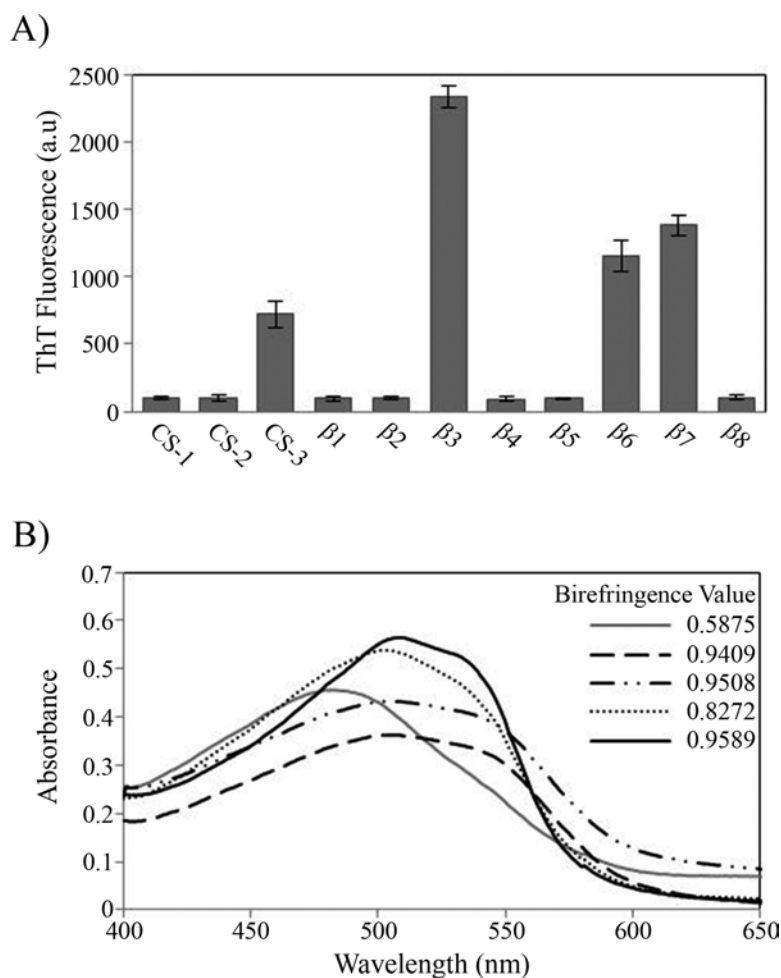
## Fibrillogenic regions in HsTPI

In order to identify the fibrillogenic regions in HsTPI, the primary structure was submitted to four servers that use different protein aggregation prediction algorithms: FISH-AMYLOID (Gasior & Kotulska, 2014), FOLD-AMYLOID (Garbuzynskiy, Lobanov & Galzitskaya, 2010), AMYLPRED 2 (Tsolis et al., 2013) and PASTA 2.0 (Walsh et al., 2014). The prediction algorithms were based on a database of fibrillogenic sequences of prions, disease-associated proteins and functional amyloid proteins (Fernandez-Escamilla et al., 2004), as well as some physical-chemical principles, such as secondary structure propensity, hydrogen-bonding potential, chameleonic sequences (CS), fully buried regions and structure-breaker residues such as proline. The predictions reached a consensus for eight regions primarily located at the C-terminus half of the protein (Fig. 3A). The sequences of these eight regions were selected to carry out aggregation assays (Fig. 3B). These peptides comprise the three chameleonic regions: CS-1 (residues 141–153), CS-2 (residues 168–176) and CS-3 (residues 239–249); and five  $\beta$ -strand regions  $\beta$ 4 (residues 90–96),  $\beta$ 5 (residues 120–130),  $\beta$ 6 (residues 160–167),  $\beta$ 7 (residues 203–214) and  $\beta$ 8 (residues 226–236). Furthermore, the regions covering the three non-recognized  $\beta$ -strand regions:  $\beta$ 1 (residues 6–14),  $\beta$ 2 (residues 37–45) and  $\beta$ 3 (residues 59–66), were also included for peptide aggregation assays due their inherent propensity to form parallel  $\beta$ -sheets and potential  $\beta$ -aggregation. To maximize the solubility of the synthetic peptides, extra native residues were added to the predicted regions as recommended by GenScript USA Inc (Table S1).

During the peptide aggregation assays, the  $\beta$ 3 peptide became turbid by the second day of incubation followed by the  $\beta$ 6,  $\beta$ 7 and CS-3 peptide, where turbidity appeared by the fifth day. Measurements of the final ThT fluorescence intensities at 485 nm were recorded for all of the samples. The  $\beta$ 3,  $\beta$ 6,  $\beta$ 7 and CS-3 peptide aggregates showed a clear increase in ThT fluorescence indicating  $\beta$ -aggregation (Fig. 4A). The  $\beta$ 3 aggregates showed the highest ThT fluorescence intensity, indicating a greater fibril formation for this sequence than for the  $\beta$ 6,  $\beta$ 7 and CS-3 sequences. In addition, aggregates of the  $\beta$ 3,  $\beta$ 6,  $\beta$ 7 and CS-3 peptides were tested in the spectrometric birefringence assays with Congo red (Nilsson, 2004). The four aggregates exhibited a red-green birefringence, as they displayed a maximal peak at 540 nm in the absorbance spectrum in the range of 400–700 nm, indicative of amyloid formation, (Fig. 4B). The  $b$  value was consistent with the ThT fluorescence measurements, indicating higher  $\beta$ -aggregation for  $\beta$ 3 and  $\beta$ 7 peptides. Furthermore, all peptide aggregates were examined by TEM. The four peptide aggregates displayed fibrillar morphology; however, a higher degree of association was achieved by the  $\beta$ 3 peptide since it formed a dense net of mature fibers (Fig. 5). All others studied peptides showed amorphous aggregation or no aggregation at all.

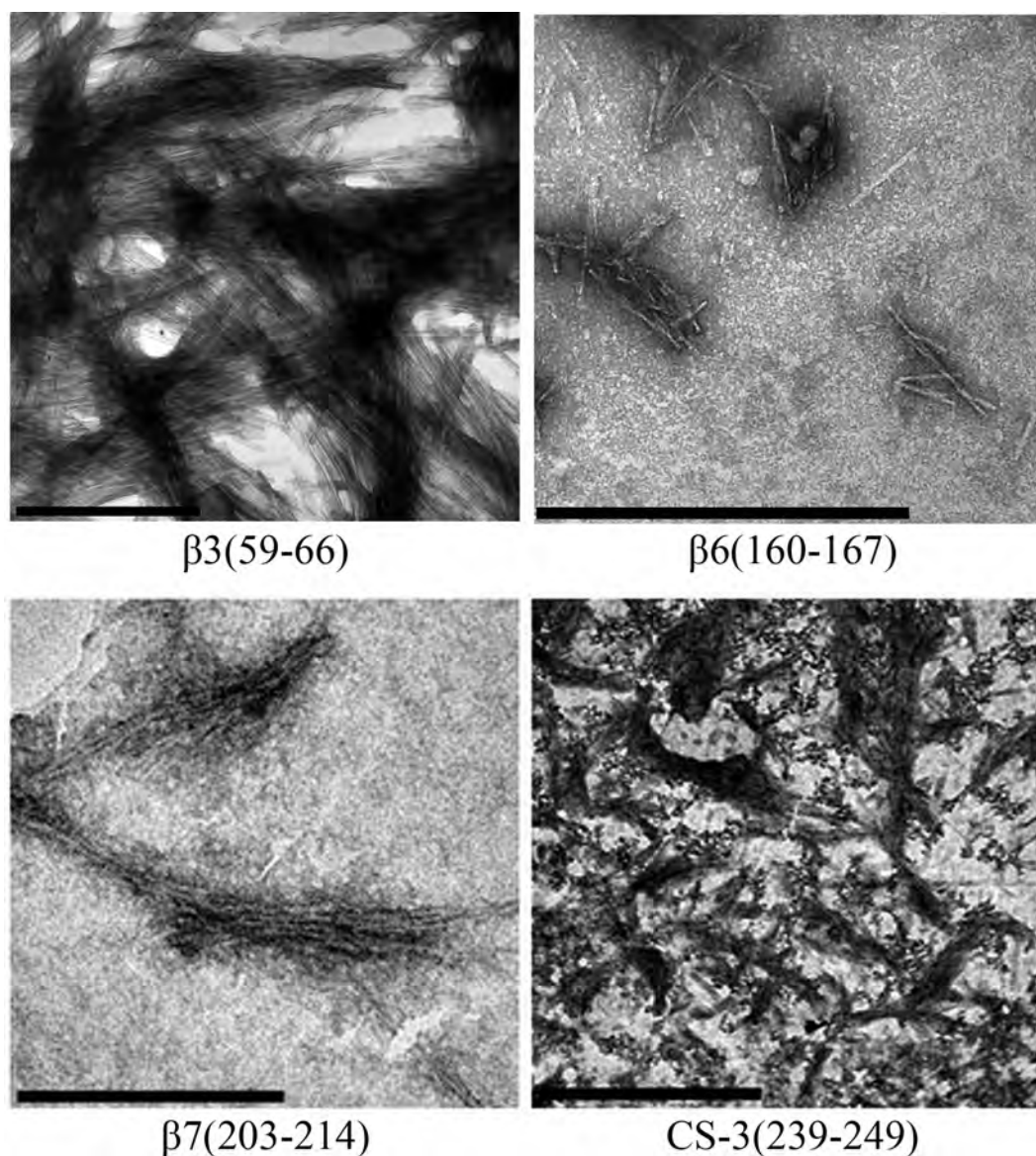
## Acid hydrolysis of HsTPI

It is known that protein processing is an important factor in physiopathology of some amyloid diseases (O'Brien & Wong, 2011; Solomon et al., 2009). This processing can be limited to specific sites in wild-type proteins, but mutations and environmental factors that destabilize the native-state can increase the fragmentation of a protein, exposing



**Figure 4 Peptide aggregation.** (A) ThT fluorescence intensities at 485 nm of aggregates of peptides at final time point of incubation. (B) Congo red birefringence assay of the  $\beta_3$  (solid black line),  $\beta_6$  (dashed line),  $\beta_7$  (dotted-dashed line) and CS-3 (dotted line) aggregates. A maximal peak at 540 nm is shown in aggregates compared with Congo red alone (solid gray line).

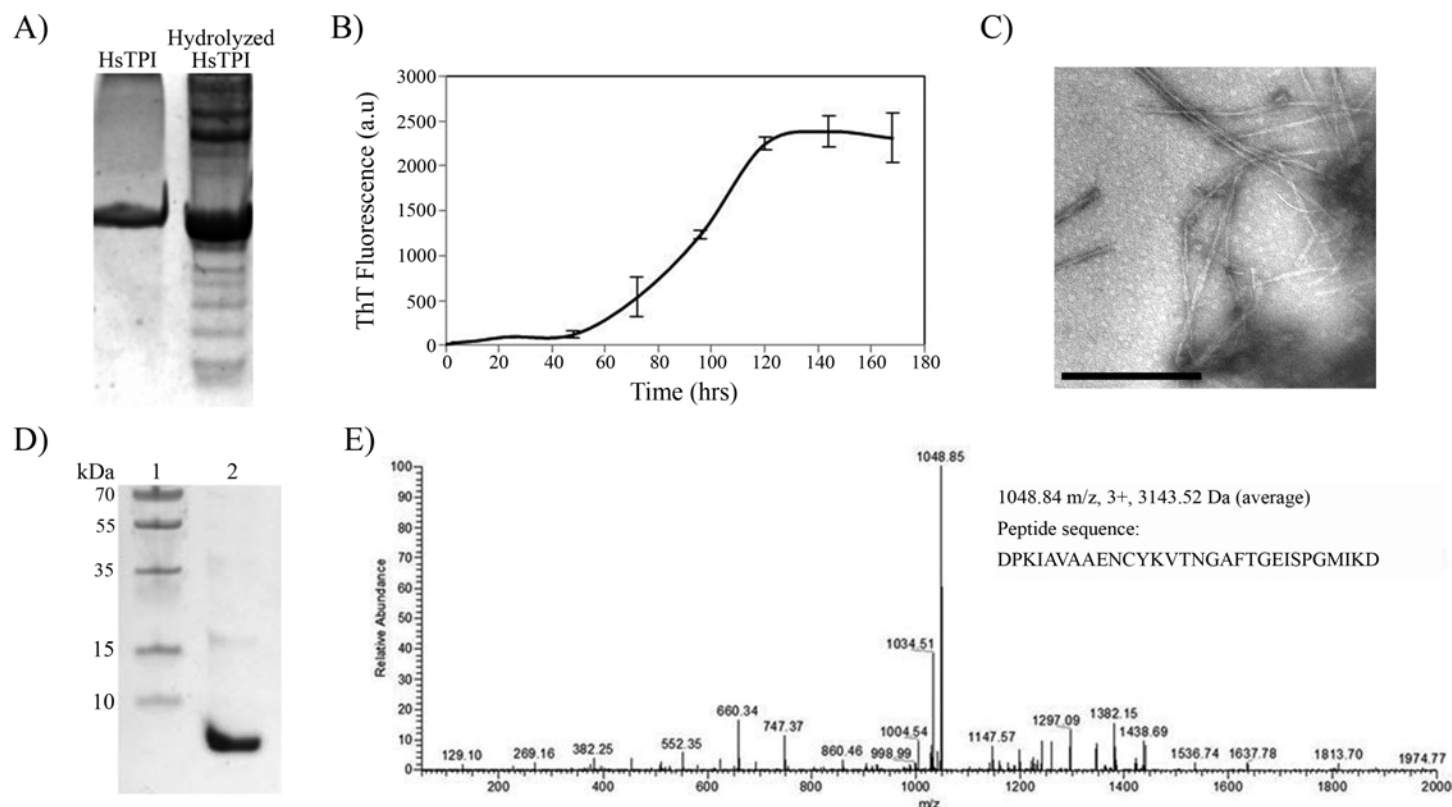
potential amyloid-prone regions. Incubation of proteins under acidic conditions gives rise to random fragmentation near Asp residues (*Li et al., 2001*), and favors amyloid fibril formation (*Frare et al., 2004; Mishra et al., 2007*). In order to investigate the potential amyloidogenic regions in HsTPI, a partial acidic hydrolysis was performed by incubating the protein at pH 2 and 65 °C during 8 h (*Fig. 6A*). Assemblies of high molecular weight appeared upon partial hydrolysis, indicating a rapid association of the resulting fragments. The aggregation of fragmented HsTPI followed a nucleated polymerization mechanism with a lag phase of approximately 45 h that reached saturation after 140 h (*Fig. 6B*). Fibrillar morphology was confirmed by TEM images (*Fig. 6C*). The dissociated aggregate, after 7.4 M Gdm-HCl treatment, was analyzed by SDS-PAGE and nLC-MS-MS. *Figure 6D* shows one main fragment below 10 kDa, a small band above 15 kDa, and other light bands at higher MW, suggesting that more than one fragment were incorporated into the amyloid



**Figure 5** TEM images of peptides aggregates. The scale bar are 1  $\mu\text{m}$ .

fibril. However, the nLC-MS/MS analysis detected only one fragment with average mass of 3143.52 Daltons (Fig. 6E). We presume that the higher molecular weight bands were oligomeric forms of the fragment not dissociated by Gdm-HCl. The sequence of the band found by nLC-MS-MS corresponds to residues 57–85 from HsTPI, covering the entire  $\beta 3$ -strand and most of the  $\alpha 3$ -helix of the  $(\beta/\alpha)_8$  barrel.

As displayed in the resultant sequence, the glutamine 65 was deaminated into a glutamate due to acid treatment of the protein. However, this chemical change had no effect in fibrillogenic propensity since both, the synthetic ( $\beta 3$  peptide) and hydrolyzed fragment, were able to form amyloid-like fibrils. It is noteworthy that despite the fact that every



**Figure 6** Acid hydrolysis of HsTPI. (A) Tricine SDS-PAGE of hydrolyzed HsTPI. (B) Aggregation kinetics of the hydrolyzed fragments of HsTPI followed by ThT fluorescence. (C) TEM image of the amyloid fibrils formed by fragmented HsTPI; the scale bars is 1  $\mu$ M. (D) Tricine SDS-PAGE of the enriched fragment upon aggregation. (E) MS/MS spectrum of the triply charged precursor ion at  $m/z$  1048.84 identifies the amyloid fragment as the sequence DPKIAVAENCYKVTNGAFTGEISPGMIKD, which corresponds to residues 57–85 of HsTPI.

aspartic residue was a potential cleavage site (*Li et al., 2001*) and therefore all predicted segments were potentially covered, no other fragment was aggregated upon hydrolysis.

## DISCUSSION

### HsTPI aggregation

The incubation of HsTPI<sub>n</sub> led to non-fibrillar aggregates as shown in the TEM images. ATR-FTIR analysis of this aggregates revealed that HsTPI<sub>n</sub> aggregates kept most of its native secondary structure. Previous studies have remarked that globular proteins can self-assemble into native-like aggregates promoted by subtle conformational changes not necessarily implying unfolding, that can be on- or off-pathway of fibrillogenesis (*Bemporad & Chiti, 2009; Jahn et al., 2006*). The turbidimetric assay showed a fast increase during the first hours of incubation, reaching saturation after 40 h (*Fig. 1B*). This change is accompanied by a small increase of ThT fluorescence (*Fig. 1A*). The rapidity with which these aggregates were formed, as well as the low intensity of ThT fluorescence indicate rather a native-like amorphous nature of HsTPI<sub>n</sub> aggregates. These results suggest that HsTPI under native-favoring conditions has great stability that prevents  $\beta$ -aggregation. In

this matter and similarly to other TPIs, HsTPI thermal denaturation follows a two-state irreversible model with a first-order kinetic rate constant of  $7.2 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  at  $37^\circ\text{C}$  (Aguirre et al., 2014; Costas et al., 2009). According to this value, seven days of incubation under native-favoring conditions are insufficient to allow HsTPI to visit conformational states that could lead to fibrillogenesis.

On the other hand, the slightly destabilization of HsTPI structure with 3.2 M urea (Mainfroid et al., 1996a) showed an increase in  $\beta$ -aggregation according to ThT fluorescence intensities (Fig. 1A) suggesting that native state is protected by a high energy barrier that impedes the exploration of intermediate states susceptible to  $\beta$ -aggregation. Higher concentrations of urea did not increase  $\beta$ -aggregation (Fig. S2), as expected, since urea can solvate the main-chain and compete for hydrogen bonds during  $\beta$ -aggregation (Cai et al., 2014; Hamada & Dobson, 2002; Zhang et al., 2014). In addition to ThT fluorescence, HsTPI<sub>urea</sub> aggregates were analyzed by ATR-FTIR demonstrating formation of new  $\beta$ -structure with a characteristic lower-frequency band position around  $1,624 \text{ cm}^{-1}$  indicative of cross- $\beta$  formation (Moran & Zanni, 2014; Zandomeneghi et al., 2004). Even though recent studies have sighted a clear tendency in new  $\beta$ -structure formation upon aggregation despite the nature of the aggregate, the position of the band below  $1,630 \text{ nm}$  is indicative of a stronger H-bond formation as in fibrils (Shivu et al., 2013; Wang et al., 2010). In this regard, cross- $\beta$  structure was further confirmed by the recognition of WO1 antibody (O'Nuallain & Wetzel, 2002).

It is interesting to note that destabilized HsTPI followed a nucleation-based aggregation model with a short lag phase; however, the characteristic exponential fibril elongation phase of the nucleated-polymerization model, was not observed. Instead, the kinetics showed a very slow increase in ThT fluorescence during the seven days of incubation. A similar behavior was observed in the amyloid fibril formation of the SH3 domain of the PI3 kinase, which at pH 3.6 formed amorphous aggregates (1–3 h) with the posterior appearing of curly fibrils (5 days) (Bader et al., 2006). It was suggested in this work that amorphous aggregates were energetically more favorable than the nucleation needed for fibril formation. In contrast to HsTPI<sub>urea</sub>, the aggregation of the fibrillogenic fragment found upon acid hydrolysis exhibited a longer lag phase with an exponential elongation of amyloid fibrils in a clear nucleated-polymerization model (Fig. 6B). It seems that the disordered association of HsTPI<sub>urea</sub> was caused by interactions of the rest of the protein, not present in the fragment (57–85), competing with cross- $\beta$  association, delaying fibrillogenesis. Nevertheless, these interactions accelerated the intermolecular association in HsTPI<sub>urea</sub> exhibiting a shorter lag phase. It has been described as a similar cooperativity in both amorphous and  $\beta$ -sheet oligomerization, suggesting that disorder aggregation could compete with  $\beta$ -aggregation in early steps of fibril formation (Hills Jr & Brooks, 2007; Krishnan & Raibekas, 2009; Vetri et al., 2007). Moreover, this early amorphous aggregates can play an important role in the recruitment and association of protein molecules into cross- $\beta$  structure by conformational conversion (Auer et al., 2008; Johnson et al., 2012; Serio et al., 2000). This proposed mechanism can explain the co-aggregation of disordered structures with poor fibrillar morphology shown by HsTPI<sub>urea</sub> aggregates, indicating that the fibrillogenesis was on track but it was incomplete after 7 days of incubation.



### Fibrillogenic region of HsTPI

The identification of fibrillogenic regions was achieved through different algorithms. From these, eight consensus predictions were found, from which only 3 peptides covering the regions  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  and CS-3, respectively, were able to form amyloid-like aggregates as confirmed by fluorescence and birefringence assays (Fig. 4). In particular, the  $\beta$ -aggregation of the  $\beta 7$  peptide was consistent with previous evidence of amyloid-like aggregation in the region containing the equivalent strand in the *Escherichia coli* TPI (Contreras *et al.*, 1999). However, Contreras *et al.* (1999) did not delimit the cross- $\beta$  core of the 32 residue fragment. According to our results, we can infer that  $\beta 7$ -strand is at least one cross- $\beta$  core in the *E. coli* TPI fibrillogenic fragment (186–218) due to its high identity with  $\beta 7$ -strand from HsTPI.

In addition to the consensual predicted regions, we found that the sequence comprising the  $\beta 3$ -strand (residues 59–66), only predicted by AMYLPRED 2 server (Tsolis *et al.*, 2013), was highly fibrillogenic. All others studied peptides showed amorphous aggregation or no aggregation at all. It is interesting that from an independent experiment in which fibrillogenesis was investigated from acid-generated fragments of the protein, the only fragment detected from dissociated fibers contains precisely the  $\beta$ -3 strand sequence, corroborating the great fibrillogenic propensity of this region.

### Amyloid protective features in HsTPI

The presence of at least 4 cross- $\beta$  regions, including one with high fibrillogenic propensity, in a highly expressed protein that participates in the central metabolism of any living cell, raises the question of how nature has avoided the major catastrophic events that could preclude the necessary balance to sustain life. Some structural characteristics of HsTPI topology could be considered as protective features.

First, all parallel  $\beta$ -stands are buried inside the protein, forming a  $\beta$ -barrel that prevents further  $\beta$ -sheet propagation and, thereby,  $\beta$ -aggregation. In order to form cross- $\beta$  structure, the fibrillogenic  $\beta$ -strands found in this study ( $\beta 3$ ,  $\beta 6$  and  $\beta 7$ ) must be exposed to the surface. However, because the amino acids constituting the  $\beta$ -barrel are predominantly hydrophobic, the exposure of the inner core may collapse into amorphous aggregates instead of rapidly forming cross- $\beta$  structures, retarding or avoiding amyloid-like aggregation.

In the case of solvent-exposed regions, which are more accessible for intermolecular associations, there is a structural restriction avoiding the  $\beta$ -conformation that promotes the  $\alpha$ -helix or random coil conformations. This mechanism could prevent the cross- $\beta$  association of CS-3 in the native fold because this region is restricted to the last  $\alpha$ -helix of HsTPI.

It is noteworthy that most of the predicted and demonstrated fibrillogenic regions are in the C-terminus half of the protein. Recent studies of *in vivo* folding indicate that folding starts as soon as the polypeptide chain leaves the ribosome tunnel (O'Brien *et al.*, 2010). So that *in vivo*, by the time the C-regions are exposed, the N-terminus half has probably started its folding process, directing the folding of the remaining of the polypeptide, and avoiding any off-pathway intermolecular interaction. Once the native state is reached

its high energy barrier protects it from partial unfolding that could expose these regions (O'Brien *et al.*, 2011; Ugrinov & Clark, 2010).

In addition to the tertiary structure of  $(\beta/\alpha)_8$ , TPI is always found as an oligomer, and more frequently as a dimer. This intermolecular association contributes to an 8-fold increase in the stability of the human enzyme (Mainfroid *et al.*, 1996a). The interface region is precisely formed by the loop following the  $\beta$ 3-strand that interdigitates into the active site of the other subunit. This interaction gives extra protection to the region around the  $\beta$ 3-strand. Although most of the efforts to perturb the dimeric interface of the protein have yielded inactive proteins (Borchert *et al.*, 1994; Borchert *et al.*, 1995; Schliebs *et al.*, 1997), the generation of a sufficiently active monomeric variant (Saab-Rincon *et al.*, 2001) rules out the possibility that activity is the only major selective pressure for this protein to maintain its oligomeric state. Instead, it is possible that the changes in tertiary contacts in the fibrillogenic regions upon dimerization, increases the energetic barrier for the formation of amyloid fibrils, as suggested by Buell *et al.* (2012), which could be another selective factor to maintain TPIs as dimers.

Finally, it has been observed that the size of polypeptide chain could influence in the aggregation of proteins (Baldwin *et al.*, 2011; Ramshini *et al.*, 2011; Solomon *et al.*, 2009). The length of the polypeptide chain could be associated with the number of possible conformation states in the intermolecular protein association increasing the number and complexity of the aggregation pathways. Since HsTPI is a medium-size protein with a compact, stable and evolution-selected topology is reasonable to speculate the existence of competitive aggregation pathways, once the native state is altered, that avoid cross- $\beta$  formation.

## CONCLUSION

It is clear that albeit containing at least four potential amyloidogenic regions, the nature of HsTPI confers protection against the formation of toxic amyloid aggregates. However, mutations or post-translational modifications might affect its solubility, stability and/or folding, allowing it to develop a role in amyloid diseases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Ronald Wetzel and Ravindra Kodali for kindly donating the WO1 antibody, Dr. Armando Gómez Poyou† for providing the pET3a-HsTPI plasmid, Biol. Filiberto Sanchez López for technical support, and the following facilities of the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México for their services at different stages of this work: Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, specifically, Dr. Guadalupe Zavala; Laboratorio Universitario de Proteómica, specifically Dr. Cesar Ferreira Batista; and Unidad de Cómputo and Unidad de Biblioteca.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (grant number IN211414 to GSR) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (grant number 154194). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): IN211414.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): 154194.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Edson N. Carcamo-Noriega performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables.
- Gloria Saab-Rincon conceived and designed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, reviewed drafts of the paper.

### Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Data can be found in [Data S1](#)

### Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1676#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Aguirre Y, Cabrera N, Aguirre B, Perez-Montfort R, Hernandez-Santoyo A, Reyes-Vivas H, Enriquez-Flores S, De Gomez-Puyou MT, Gomez-Puyou A, Sanchez-Ruiz JM, Costas M. 2014.** Different contribution of conserved amino acids to the global properties of triosephosphate isomerases. *Proteins* **82**:323–335 DOI [10.1002/prot.24398](https://doi.org/10.1002/prot.24398).
- Auer S, Meersman F, Dobson CM, Vendruscolo M. 2008.** A generic mechanism of emergence of amyloid protofilaments from disordered oligomeric aggregates. *PLoS Computational Biology* **4**:e1000222 DOI [10.1371/journal.pcbi.1000222](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000222).
- Bader R, Bamford R, Zurdo J, Luisi BF, Dobson CM. 2006.** Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic

- model for protein aggregation and fibril formation. *Journal of Molecular Biology* **356**:189–208 DOI [10.1016/j.jmb.2005.11.034](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.034).
- Baldassarre M, Scire A, Fiume I, Tanfani F. 2011.** Insights into the structural properties of D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*: an FT-IR spectroscopic and in silico approach. *Biochimie* **93**:542–548 DOI [10.1016/j.biochi.2010.11.009](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.009).
- Baldwin AJ, Knowles TP, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shammas SL, Waudby CA, Mossuto MF, Meehan S, Gras SL, Christodoulou J, Anthony-Cahill SJ, Barker PD, Vendruscolo M, Dobson CM. 2011.** Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society* **133**:14160–14163 DOI [10.1021/ja2017703](https://doi.org/10.1021/ja2017703).
- Bemporad F, Chiti F. 2009.** Native-like aggregation of the acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* and its biological implications. *FEBS Letters* **583**:2630–2638 DOI [10.1016/j.febslet.2009.07.013](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.013).
- Biancalana M, Koide S. 2010.** Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica ACTA/General Subjects* **1804**:1405–1412 DOI [10.1016/j.bbapap.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001).
- Borchert TV, Abagyan R, Jaenicke R, Wierenga RK. 1994.** Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:1515–1518 DOI [10.1073/pnas.91.4.1515](https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1515).
- Borchert TV, Zeelen JP, Schliebs W, Callens M, Minke W, Jaenicke R, Wierenga RK. 1995.** An interface point-mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *FEBS Letters* **367**:315–318 DOI [10.1016/0014-5793\(95\)00586-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00586-X).
- Buell AK, Dhulesia A, White DA, Knowles TP, Dobson CM, Welland ME. 2012.** Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth. *Angewandte Chemie International Edition* **51**:5247–5251 DOI [10.1002/anie.201108040](https://doi.org/10.1002/anie.201108040).
- Cai Z, Li J, Yin C, Yang Z, Wu J, Zhou R. 2014.** Effect of urea concentration on aggregation of amyloidogenic hexapeptides (NFGAIL). *The Journal of Physical Chemistry B* **118**:48–57 DOI [10.1021/jp407776e](https://doi.org/10.1021/jp407776e).
- Calamai M, Chiti F, Dobson CM. 2005.** Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophysical Journal* **89**:4201–4210 DOI [10.1529/biophysj.105.068726](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.068726).
- Chiti F, Dobson CM. 2006.** Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* **75**:333–366 DOI [10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901).
- Contreras CF, Canales MA, Alvarez A, De Ferrari GV, Inestrosa NC. 1999.** Molecular modeling of the amyloid-beta-peptide using the homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid *in vitro*. *Protein Engineering* **12**:959–966 DOI [10.1093/protein/12.11.959](https://doi.org/10.1093/protein/12.11.959).
- Costas M, Rodriguez-Larrea D, De Maria L, Borchert TV, Gomez-Puyou A, Sanchez-Ruiz JM. 2009.** Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins

- linked to solvation-barrier free energies. *Journal of Molecular Biology* **385**:924–937 DOI [10.1016/j.jmb.2008.10.056](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.056).
- Dong A, Huang P, Caughey WS. 1990.** Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* **29**:3303–3308 DOI [10.1021/bi00465a022](https://doi.org/10.1021/bi00465a022).
- Dovidchenko NV, Leonova EI, Galzitskaya OV. 2014.** Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry* **79**:1515–1527 DOI [10.1134/S0006297914130057](https://doi.org/10.1134/S0006297914130057).
- Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. 2004.** Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology* **22**:1302–1306 DOI [10.1038/nbt1012](https://doi.org/10.1038/nbt1012).
- Frare E, Polverino De Laureto P, Zurdo J, Dobson CM, Fontana A. 2004.** A highly amyloidogenic region of hen lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **340**:1153–1165 DOI [10.1016/j.jmb.2004.05.056](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.056).
- Frid P, Anisimov SV, Popovic N. 2007.** Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* **53**:135–160 DOI [10.1016/j.brainresrev.2006.08.001](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.001).
- Garbuzynskiy SO, Lobanov MY, Galzitskaya OV. 2010.** FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics* **26**:326–332 DOI [10.1093/bioinformatics/btp691](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp691).
- Gasior P, Kotulska M. 2014.** FISH Amyloid—a new method for finding amyloidogenic segments in proteins based on site specific co-occurrence of aminoacids. *BMC Bioinformatics* **15**:54 DOI [10.1186/1471-2105-15-54](https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-54).
- Gillam JE, MacPhee CE. 2013.** Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of Physics: Condensed Matter* **25**:373101 DOI [10.1088/0953-8984/25/37/373101](https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/37/373101).
- Goldstein RA. 2008.** The structure of protein evolution and the evolution of protein structure. *Current Opinion in Structural Biology* **18**:170–177 DOI [10.1016/j.sbi.2008.01.006](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.006).
- Gosal WS, Morten IJ, Hewitt EW, Smith DA, Thomson NH, Radford SE. 2005.** Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *Journal of Molecular Biology* **351**:850–864 DOI [10.1016/j.jmb.2005.06.040](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.040).
- Guix FX, Ill-Raga G, Bravo R, Nakaya T, De Fabritiis G, Coma M, Miscione GP, Villa-Freixa J, Suzuki T, Fernandez-Busquets X, Valverde MA, De Strooper B, Munoz FJ. 2009.** Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain* **132**:1335–1345 DOI [10.1093/brain/awp023](https://doi.org/10.1093/brain/awp023).
- Hamada D, Dobson CM. 2002.** A kinetic study of beta-lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein Science* **11**:2417–2426 DOI [10.1110/ps.0217702](https://doi.org/10.1110/ps.0217702).
- Hills Jr RD, Brooks 3rd CL. 2007.** Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation. *Journal of Molecular Biology* **368**:894–901 DOI [10.1016/j.jmb.2007.02.043](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.043).
- Huang P, Dong A. 2003.** Thermal, chemical and chemothermal denaturation of yeast enolase. *Spectroscopy* **17**:453–467 DOI [10.1155/2003/941801](https://doi.org/10.1155/2003/941801).

- Jahn TR, Makin OS, Morris KL, Marshall KE, Tian P, Sikorski P, Serpell LC. 2010.** The common architecture of cross-beta amyloid. *Journal of Molecular Biology* 395:717–727 DOI 10.1016/j.jmb.2009.09.039.
- Jahn TR, Parker MJ, Homans SW, Radford SE. 2006.** Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nature Structural and Molecular Biology* 13:195–201 DOI 10.1038/nsmb1058.
- Jahn TR, Radford SE. 2008.** Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469:100–117 DOI 10.1016/j.abb.2007.05.015.
- Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET, Kelly JW. 2012.** The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of Molecular Biology* 421:185–203 DOI 10.1016/j.jmb.2011.12.060.
- Klunk WE, Jacob RF, Mason RP. 1999.** Quantifying amyloid beta-peptide (Abeta) aggregation using the Congo red-Abeta (CR-Abeta) spectrophotometric assay. *Analytical Biochemistry* 266:66–76 DOI 10.1006/abio.1998.2933.
- Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. 2014.** The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:384–396 DOI 10.1038/nrm3810.
- Koehl P, Levitt M. 2002.** Protein topology and stability define the space of allowed sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1280–1285 DOI 10.1073/pnas.032405199.
- Kong J, Yu S. 2007.** Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39:549–559 DOI 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
- Krishnan S, Raibekas AA. 2009.** Multistep aggregation pathway of human interleukin-1 receptor antagonist: kinetic, structural, and morphological characterization. *Biophysical Journal* 96:199–208 DOI 10.1016/j.bpj.2008.10.002.
- Li A, Sowder RC, Henderson LE, Moore SP, Garfinkel DJ, Fisher RJ. 2001.** Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification. *Analytical Chemistry* 73:5395–5402 DOI 10.1021/ac010619z.
- Mainfroid V, Mande SC, Hol WG, Martial JA, Goraj K. 1996a.** Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* 35:4110–4117 DOI 10.1021/bi952692n.
- Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, Frere JM, Mande SC, Hol WG, Martial JA, Goraj K. 1996b.** Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *Journal of Molecular Biology* 257:441–456 DOI 10.1006/jmbi.1996.0174.
- Maurer-Stroh S, Debulpaep M, Kuemmerer N, Lopez de la Paz M, Martins IC, Reumers J, Morris KL, Copland A, Serpell L, Serrano L, Schymkowitz JW, Rousseau F. 2010.** Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nature Methods* 7:237–242 DOI 10.1038/nmeth.1432.

- Mishra R, Sorgjerd K, Nystrom S, Nordigarden A, Yu YC, Hammarstrom P. 2007.** Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation but decelerated by intact protein binding and conversion. *Journal of Molecular Biology* **366**:1029–1044 DOI [10.1016/j.jmb.2006.11.084](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.084).
- Moran SD, Zanni MT. 2014.** How to Get Insight into Amyloid Structure and Formation from Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **5**:1984–1993 DOI [10.1021/jz500794d](https://doi.org/10.1021/jz500794d).
- Nielsen SB, Y De P, Giehm L, Sundbye S, Christiansen G, Mathiesen J, Jensen MH, Jensen PH, Otzen DE. 2012.** Multiple roles of heparin in the aggregation of p25alpha. *Journal of Molecular Biology* **421**:601–615 DOI [10.1016/j.jmb.2012.01.050](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.050).
- Nilsson MR. 2004.** Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods* **34**:151–160 DOI [10.1016/j.ymeth.2004.03.012](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012).
- O'Brien EP, Christodoulou J, Vendruscolo M, Dobson CM. 2011.** New scenarios of protein folding can occur on the ribosome. *Journal of the American Chemical Society* **133**:513–526 DOI [10.1021/ja107863z](https://doi.org/10.1021/ja107863z).
- O'Brien EP, Hsu ST, Christodoulou J, Vendruscolo M, Dobson CM. 2010.** Transient tertiary structure formation within the ribosome exit port. *Journal of the American Chemical Society* **132**:16928–16937 DOI [10.1021/ja106530y](https://doi.org/10.1021/ja106530y).
- O'Brien RJ, Wong PC. 2011.** Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience* **34**:185–204 DOI [10.1146/annurev-neuro-061010-113613](https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613).
- O'Nuallain B, Wetzel R. 2002.** Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:1485–1490 DOI [10.1073/pnas.022662599](https://doi.org/10.1073/pnas.022662599).
- Powers ET, Powers DL. 2008.** Mechanisms of protein fibril formation: nucleated polymerization with competing off-pathway aggregation. *Biophysical Journal* **94**:379–391 DOI [10.1529/biophysj.107.117168](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.117168).
- Ramshini H, Parrini C, Relini A, Zampagni M, Mannini B, Pesce A, Saboury AA, Nemat-Gorgani M, Chiti F. 2011.** Large proteins have a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils. *PLoS ONE* **6**:e16075 DOI [10.1371/journal.pone.0016075](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016075).
- Richardson JS, Richardson DC. 2002.** Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:92754–2759 DOI [10.1073/pnas.052706099](https://doi.org/10.1073/pnas.052706099).
- Saab-Rincon G, Juarez VR, Osuna J, Sanchez F, Soberon X. 2001.** Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Engineering* **14**:149–155 DOI [10.1093/protein/14.3.149](https://doi.org/10.1093/protein/14.3.149).
- Scarafone N, Pain C, Fratamico A, Gaspard G, Yilmaz N, Filee P, Galleni M, Matagne A, Dumoulin M. 2012.** Amyloid-like fibril formation by polyQ proteins: a critical balance between the polyQ length and the constraints imposed by the host protein. *PLoS ONE* **7**:e31253 DOI [10.1371/journal.pone.0031253](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031253).

- Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. 1997. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36:9655–9662 DOI 10.1021/bi963086a.
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL. 2000. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289:1317–1321 DOI 10.1126/science.289.5483.1317.
- Shivu B, Seshadri S, Li J, Oberg KA, Uversky VN, Fink AL. 2013. Distinct beta-sheet structure in protein aggregates determined by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 52:5176–5183 DOI 10.1021/bi400625v.
- Solomon JP, Yonemoto IT, Murray AN, Price JL, Powers ET, Balch WE, Kelly JW. 2009. The 8 and 5 kDa Fragments of Plasma Gelsolin Form Amyloid Fibrils by a Nucleated Polymerization Mechanism, while the 68 kDa Fragment is Not Amyloidogenic. *Biochemistry* 48:11370–11380 DOI 10.1021/bi901368e.
- Tsolis AC, Papandreou NC, Iconomidou VA, Hamodrakas SJ. 2013. A consensus method for the prediction of ‘aggregation-prone’ peptides in globular proteins. *PLoS ONE* 8:e54175 DOI 10.1371/journal.pone.0054175.
- Tzotzos S, Doig AJ. 2010. Amyloidogenic sequences in native protein structures. *Protein Science* 19:327–348 DOI 10.1002/pro.314.
- Ugrinov KG, Clark PL. 2010. Cotranslational folding increases GFP folding yield. *Biophysical Journal* 98:1312–1320 DOI 10.1016/j.bpj.2009.12.4291.
- Vetri V, Canale C, Relini A, Librizzi F, Militello V, Gliozzi A, Leone M. 2007. Amyloid fibrils formation and amorphous aggregation in concanavalin A. *Biophysical Chemistry* 125:184–190 DOI 10.1016/j.bpc.2006.07.012.
- Walsh I, Seno F, Tosatto SC, Trovato A. 2014. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Research* 42:w301–w307 DOI 10.1093/nar/gku399.
- Wang L, Schubert D, Sawaya MR, Eisenberg D, Riek R. 2010. Multidimensional structure–activity relationship of a protein in its aggregated states. *Angewandte Chemie International Edition* 49:3904–3908 DOI 10.1002/anie.201000068.
- Westermarck P. 2005. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS Journal* 272:5942–5949 DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.05024.x.
- Wierenga RK. 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters* 492:193–198 DOI 10.1016/S0014-5793(01)02236-0.
- Wu C, Shea JE. 2011. Coarse-grained models for protein aggregation. *Current Opinion in Structural Biology* 21:209–220 DOI 10.1016/j.sbi.2011.02.002.
- Zandomenighi G, Krebs MR, H, McCammon MG, Fändrich M. 2004. FTIR reveals structural differences between native  $\beta$ -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 13:3314–3321.
- Zerovnik E, Stoka V, Mirtic A, Guncar G, Grdadolnik J, Staniforth RA, Turk D, Turk V. 2011. Mechanisms of amyloid fibril formation–focus on domain-swapping. *FEBS Journal* 278:2263–2282 DOI 10.1111/j.1742-4658.2011.08149.x.



**Zhang X, Dong Y, Yu J, Tu X. 2014.** Effects of environmental factors on MSP21-25 aggregation indicate the roles of hydrophobic and electrostatic interactions in the aggregation process. *European Biophysics Journal* **43**:1–9  
[DOI 10.1007/s00249-013-0934-9](https://doi.org/10.1007/s00249-013-0934-9).

**Zou Y, Hao W, Li H, Gao Y, Sun Y, Ma G. 2014.** New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach. *The Journal of Physical Chemistry B* **118**:9834–9843 [DOI 10.1021/jp504201k](https://doi.org/10.1021/jp504201k).