



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL
PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS MONOMÉRICAS
CON LA ARQUITECTURA DE BARRIL TIM**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA**

P R E S E N T A:

SUSANA VÁZQUEZ TORRES

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS:

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2017

CIUDAD UNIVERSITARIA



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.

Para los que ya no están, para los que están, y los que vienen...

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme una formación académica de excelente calidad durante mis estudios de Licenciatura.

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

A la Red de Estructura, Función y Evolución de Proteínas (REFEP) por el apoyo económico brindado para la asistencia a la 2^{da} Escuela de Proteínas y al XXXI Congreso Nacional de Bioquímica.

Al M.C. Sergio Romero Romero y a los miembros del jurado, por tomarse el tiempo de revisar el presente trabajo:

- Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort
- Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
- Dr. Miguel Antonio Costas Basín
- Dra. Georgina Regina Garza-Ramos Martínez
- Dr. Alfredo Torres Larios

Al Laboratorio de Biofisiocoquímica de la Facultad de Química de la UNAM por compartir generosamente el uso del equipo DSC MicroCal VP.

A los técnicos académicos del LFQIP, M. en C. Laura Álvarez y Dra. Isabel Velázquez, por su valioso trabajo técnico.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Mateo y Lupita por educarme siempre con amor, por proveerme de bases sólidas y de las herramientas necesarias para salir adelante. Pero, sobre todo, por apoyarme en cada una de las decisiones de mi vida.

A mis hermanos, y a los nuevos integrantes de la Familia Vázquez Torres, que hacen de ésta una mejor familia.

A la Familia Mendoza Vázquez: Violeta, Rafa y Sofi. Por el apoyo incondicional brindado, por ser una guía y un pilar en los momentos más difíciles. Por cuidarme, y por todos los buenos momentos que hemos compartido y seguiremos compartiendo en el futuro.

A la Familia Vázquez Navarro: Jorge, Marisol y Mati. Por su cariño, comprensión y total apoyo. Por hacer de la vida algo placentero y por darme el privilegio de convertirme en tía por primera vez.

A la Familia Vázquez Morales: Luis Daniel, Geraldine, y mis sobrinos gatunos Rodolfo y Goyo. Por todos sus consejos, cariño y paciencia. Por ser mis compañeros de viajes y fiestas. Gracias por tanto.

A todos los miembros de la Familia Torres por acogerme con gran cariño cuando llegué a vivir a la Ciudad de México, y por hacer de este proceso algo mucho más fácil. Especialmente a mis abuelitos Luis y Amalia. A mi tía Lucy, Mary, Paty, Chayo. A mis primos Caro, Mario, Julio, David, Dani, Sonia, Ángel, Diana. Gracias por todo.

A todos los miembros de la familia Vázquez por siempre estar al pendiente. Porque a cada uno lo caracteriza tener un gran corazón. Especialmente a mis abuelitos Dani y Mari, a mis tíos Francisco y Lilia, Lucía y Ramón. A todos mis primos, que considero mis hermanos. Gracias por su completo apoyo y cariño.

A mi “madre” académica Sergio Romero, por ser una guía en este viaje. Por enseñarme tantas cosas. Por los grandes momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio. Sin duda alguna aún tengo muchas cosas que aprender de ti, gracias por tu infinito cariño, apoyo y paciencia.

A Ricardo y Bryan, mis “hermanitos” académicos y compañeros de este viaje. Hicieron de mi estancia en el laboratorio y el proceso de terminar la tesis algo divertido y llevadero. Gracias por ser mis confidentes, consejeros y compañeros de fiesta. Por soportarme en mis peores días. Los quiero con todo el corazón.

A la Dra. Marcia Hiriart por brindarme su apoyo y la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio. Y a todos mis ex compañeros, maestros y amigos del laboratorio BL-102 del Instituto de Fisiología Celular. Especialmente a Myrian y Carlos, por devolverme la confianza en mí misma y por el amor a la ciencia, por todas sus enseñanzas y paciencia. A mis “padrinos” académicos, Neyvis y Yusvel por ser siempre tan lindas personas. A Andrea García Farré por todas las historias chistosas y ser una gran compañera de laboratorio.

A la Dra. Alicia González Manjarrez por brindarme la primera experiencia real dentro de un laboratorio de investigación. Y a todos mis ex compañeros y amigos del laboratorio 301 Oriente. Especialmente a Geovani López, por sus enseñanzas académicas y personales, por forjarme un carácter fuerte. A Mijail, por ser un gran amigo y compañero de mezcales. A Alan, por enseñarme un mundo que no conocía y brindarme su amistad sincera.

A todos “los moros” biólogos: Dinora, Almita, Diana, Titina, Mau, Luis y Manu. Por ser los primeros amigos que hice al llegar a la Facultad de Ciencias. Porque aprendí tanto de ustedes, por todas las historias divertidas e inolvidables.

A mis compañeros de carrera: Arlen, Betty, Fátima, Giselle, Abiram y Mata. Gracias por ser buenos amigos y permitirme mantener la cordura dentro del mundo “biomédigo”. Por las horas de estudio y risas.

A Cinthia, Mariana, Karla, Nancy y Vero. Por enseñarme el significado de la amistad verdadera. Porque cada momento que pasamos juntas es especial, y porque a pesar del tiempo o la distancia sé que puedo confiar ciegamente en ustedes.

A Iván, Felipe, Jan y Astrid. Por hacer de Groningen algo inolvidable.

A Fabrizio Guzmán, por abrirme un mundo nuevo. Por todos los momentos que pasamos juntos.

A Sergio Rodríguez, por compartir conmigo de las experiencias más especiales y únicas que he tenido en mi vida. Gracias por tu cariño, no hay día que no piense en tí.

A todos mis maestros de vida, fuera y dentro de la escuela. Gracias por hacer de mí, la persona que hoy soy.

A mi tutor, el Dr. Daniel Alejandro Fernández. Por ser el mejor tutor y maestro que alguien puede tener. Por su paciencia, comprensión y apoyo. Por abrirme las puertas de su laboratorio y por contagiarme su amor y pasión por el mundo de las proteínas. Gracias por tener siempre una sonrisa y una gran actitud.

A todos mis compañeros del LFQIP, especialmente a Lau y Julio por ser mis compañeros de comelonas, por sus consejos y tantas risas. A Karlita, por organizar los entrenamientos físicos extremos y hacer de las tardes de martes y jueves algo muy divertido. A Andrea, Haven, Aaron, Hugo, Jorge, Mariana, Diego, Banda, Saira, Fátima, Renán, los peluchóforos etc. por los miércoles de amistad y las noches de fiesta. Gracias a todos y cada uno de los miembros de esta “anarcocomuna”, por toda su “buena ondez” y por hacer de mi estancia en el laboratorio algo muy placentero. A la Dra. Georgina Garza-Ramos por todos sus consejos, por ser la mejor “tía” académica. Al Dr. Alejandro Sosa por sus pláticas interesantes y divertidas.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	4
Plegamiento de proteínas.....	5
Plegamiento tipo barril TIM.....	6
Proteínas monoméricas.....	8
Estudio de proteínas monoméricas con la arquitectura de barril TIM.....	9
Súper Familia de las Aldo-ceto Reductasas.....	10
Aldosa reductasa de <i>Homo sapiens</i>	13
Reductasa A del ácido 2,5-diceto- <i>D</i> -glucónico de <i>Corynebacterium sp</i>	14
AKR11B de <i>Bacillus subtilis</i>	15
Justificación.....	16
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Materiales y métodos.....	17
Selección de las proteínas.....	17
Clonación y expresión de los genes.....	22
Purificación.....	22
Determinación de la concentración de proteína.....	23
Determinación del estado oligomérico.....	23
Determinación de la actividad enzimática y parámetros catalíticos.....	25
Dispersión dinámica de Luz.....	26
Fluorescencia intrínseca.....	27
Dicroísmo circular.....	27
Rampa de temperatura.....	28
Calorimetría Diferencial de Barrido.....	29
Denaturalización por agentes químicos.....	31
Análisis y comparación de las estructuras cristalográficas.....	32
Resultados y discusión.....	35
Conclusiones.....	84
Perspectivas.....	86
Bibliografía.....	87

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
2,5-DKGRA	Reductasa A del ácido 2,5-diceto- <i>D</i> -glucónico
Å	Angstroms
ACR	Aldo-ceto Reductasas
ADA	Desaminasa de adenosina
AR	Aldosa reductasa
ASA	Área accesible al solvente
C_m^{app}	Concentración media de desnaturalización aparente
CME	Centro de Masa Espectral
C_p^{exc}	Capacidad calorífica en exceso
D	Estado desnaturalizado de las proteínas
DC	Dicroísmo circular
DHA	Dihidroxiacetona
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
<i>DL</i> -GAL	<i>DL</i> -Gliceraldehído
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E_A	Energía de activación
FI	Fluorescencia intrínseca
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GdnHCl	Hidrocloruro de guanidinio
HisF	Imidazol glicerol fosfato sintasa
IGPS	Indol-3-glicerolfosfato sintasa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
K	Kelvin
k_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
<i>Lm</i> TIM	TIM de <i>Leishmania mexicana</i>
<i>Mj</i> TIM	TIM de <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
N	Estado nativo de las proteínas
PDB	Banco de datos de proteínas
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRAI	5'-fosforribosil antranilato isomerasa
R	Constante universal de los gases
R_s	Radio de Stokes
TIM	Triosafofosfato isomerasa
T_m^{app}	Temperatura media de desnaturalización aparente
V_{max}	Velocidad máxima de catálisis
ΔC_p	Cambio de capacidad calorífica a presión constante
ΔG	Cambio de energía libre de Gibbs
ΔG_D	Cambio de energía libre de Gibbs de desplegamiento
ΔH	Cambio de entalpía
λ_{max}	Longitud de onda de máxima emisión
$t_{1/2}$	Tiempo medio de desnaturalización
3 α -HSD	3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

RESUMEN

La estructura $(\beta/\alpha)_8$, descrita por primera vez en la enzima Triosafosfato Isomerasa (TIM) es también conocida como plegamiento tipo barril TIM y es uno de los arreglos estructurales de proteínas más abundantes en la naturaleza. Se estima que aproximadamente el 10% de las estructuras reportadas en la Base de Datos de Proteínas (PDB) posee este tipo de arquitectura. Los barriles TIM son funcionalmente muy versátiles, ya que son capaces de catalizar cinco de los seis tipos de reacciones enzimáticas conocidas.

La caracterización fisicoquímica del plegamiento de barriles TIM es relevante para determinar la estabilidad que es posible obtener en proteínas “naturales” que adoptan esta topología. Esto es importante para la comparación con las propiedades de los barriles TIM diseñados *de novo*, los cuales representan un punto de partida ideal para la creación de proteínas con aplicaciones nuevas en la medicina y la industria. Con el objetivo de estudiar las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad termodinámica de barriles TIM monoméricos naturales, se seleccionaron dos proteínas pertenecientes a la superfamilia de las Aldo-ceto Reductasas. Las proteínas caracterizadas fueron la Aldosa reductasa (AR) de *Homo sapiens* y la Reductasa A del ácido 2,5-diceto-D-glucónico (2,5-DKGRA) de *Corynebacterium sp.*, las cuales forman parte de un grupo representativo de las proteínas monoméricas con plegamiento de barril $(\beta/\alpha)_8$ que existen normalmente en la naturaleza. AR y 2,5-DKGRA mostraron espectros de fluorescencia y dicroísmo circular compatibles con el de proteínas nativas, lo cual se acompañó de la presencia de actividad catalítica para los sustratos probados Dihidroxiacetona y DL-Gliceraldehído.

Se realizó el estudio del desplegamiento de estas proteínas con agentes físicos (temperatura), y químicos (urea e hidrocloreuro de guanidinio). En ambos casos, AR y 2,5-DKGRA mostraron irreversibilidad en sus procesos de desplegamiento, lo cual fue corroborado mediante mediciones espectroscópicas (dicroísmo circular y espectroscopía de fluorescencia), calorimétricas (calorimetría diferencia del barrido) y medición de actividad enzimática. Aun cuando el proceso de desplegamiento de las proteínas mostró ser irreversible, se observaron diferencias significativas en el desplegamiento de ellas. AR mostró valores de T_m^{app} , C_m^{app} y ΔG_D^{app} más elevados en comparación con 2,5-DKGRA.

Tras hacer el análisis estructural de ambas proteínas, no se encontró una diferencia importante en el número de interacciones electrostáticas que estabilizan su estructura. Sin embargo, el volumen que ocupan las cavidades en 2,5-DKGRA es de casi el doble que en AR, por lo que esta característica estructural podría relacionarse con la diferencia observada en la susceptibilidad a la desnaturalización de estas proteínas. De igual manera, se realizó la comparación de los barriles monoméricos naturales con la proteína sTIM-11 diseñada *de novo* la cual presenta el mismo tipo de plegamiento y estado oligomérico, encontrando diferencias notables entre sus valores de ΔH y T_m . La comparación de proteínas naturales con aquéllas diseñadas *de novo* resulta útil para establecer estrategias nuevas que permitan el diseño de proteínas con propiedades novedosas. De hecho, existen numerosos estudios realizados con proteínas diseñadas *de novo* (mini proteína FSD-1, proteína Top7, $\alpha 3D$, etc.) que demuestran que las proteínas diseñadas a partir de métodos computacionales se pliegan de forma distinta a las proteínas naturales.

INTRODUCCIÓN

La célula es la unidad estructural y funcional de los seres vivos. Ésta se compone principalmente por agua, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Figura 1). De estos componentes, las proteínas sobresalen por su importancia y abundancia. Las proteínas son heteropolímeros constituidos de aminoácidos capaces de pasar de una conformación desordenada conocida como el estado desplegado, a una estructura tridimensional bien definida, estable y funcional a través de un proceso denominado plegamiento. Las proteínas son las responsables de realizar prácticamente la totalidad de los procesos internos de la célula, por lo que poseen una enorme diversidad de formas estructurales que les permiten desempeñar su función biológica (Nelson y Cox, 2008). Algunos ejemplos de las actividades que realizan las proteínas, son el uso de la energía solar para la creación de moléculas complejas durante la fotosíntesis (Johnson *et al.*, 2016), la detección ultra sensible de moléculas de pequeño tamaño (receptores olfativos) (Firestein *et al.*, 2001), y luz (rodopsina) (Rosenbaum *et al.*, 2009), la conversión de gradientes de pH en enlaces químicos (ATP sintasa) (Yoshida *et al.*, 2001) y la transformación de energía química en trabajo (actina y miosina) (Spudich *et al.*, 2001). Se estima por ejemplo, que nuestras propias células sintetizan cerca de 30,000 tipos distintos de proteínas, desde pequeñas hormonas peptídicas como el glucagón con tan solo 29 aminoácidos, hasta proteínas de gran tamaño como la titina con más de 34,000 residuos (Goodsell, 2010).

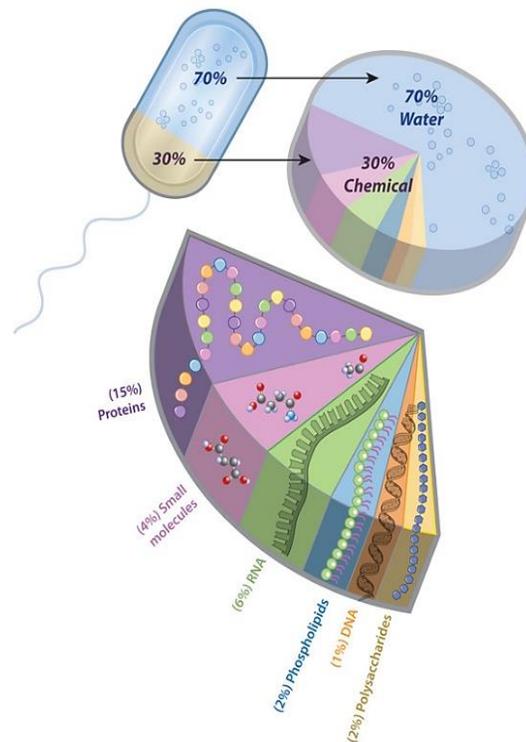


Figura 1. Composición química de una célula bacteriana
Tomada de Nature Education ©, 2010.
(<http://www.nature.com/scitable/topicpage/what-is-a-cell-14023083>).

La estructura primaria de las proteínas está constituida por su secuencia de aminoácidos, y es la responsable de determinar sus propiedades estructurales y funcionales. Anfinsen demostró que la Ribonucleasa A es capaz de plegarse *in vitro* hasta alcanzar su estructura nativa a partir únicamente de su secuencia lineal de aminoácidos (Anfinsen *et al.*, 1961). La estructura secundaria de las proteínas se define por la conformación local que adquiere la cadena polipeptídica y se compone principalmente por hélices α y hojas β , que se conectan entre sí a través de asas. La estructura terciaria se refiere a la organización tridimensional de los elementos de estructura secundaria en dominios y motivos estructurales. A este tipo de arreglo tridimensional se le conoce como plegamiento. Finalmente, el último nivel de organización de las proteínas está dado por la estructura cuaternaria. Ésta ocurre en algunas proteínas que contienen varias cadenas polipeptídicas diferentes (subunidades), que se asocian en complejos multiméricos de una manera específica y ordenada (Kuriyan *et al.*, 2013).

Plegamiento de proteínas

La formación de proteínas en la célula consiste principalmente de tres etapas: la biosíntesis de la cadena polipeptídica, su plegamiento en una estructura tridimensional, y en algunos casos, su modificación post-traducciona (glicosilación, acetilación, fosforilación, etc.). El primero y el tercero de estos procesos han sido estudiados exhaustivamente, sin embargo, el segundo de ellos, es comprendido en menor medida. El plegamiento de proteínas representa uno de los problemas más complejos y desafiantes de la biología molecular moderna. Este problema fue abordado por primera vez hace 56 años por Levinthal, quien señaló que si una proteína pequeña se plegara al azar explorando todas las conformaciones posibles a partir del estado desplegado hasta llegar al estado de mínima energía, dicho proceso tomaría más tiempo que la edad calculada del Universo (Dagget *et al.*, 2003). Tomando en cuenta lo anterior, resulta evidente que las proteínas deben plegarse a través de mecanismos definidos sin la necesidad de explorar todas las conformaciones espaciales posibles. Inicialmente, se propuso que durante el proceso de plegamiento ocurre la formación rápida de elementos locales de estructura secundaria, los cuales funcionan como andamios para la formación subsecuente de los elementos de estructura terciaria (Kim y Baldwin, 1982). Dentro de este marco de referencia, se han propuesto algunos mecanismos que ayudan a explicar cómo ocurre el proceso de plegamiento de las proteínas. El primero de ellos es el de difusión-colisión, el cual considera que las proteínas están formadas por varios “microdominios elementales”, y que cada uno de éstos es lo suficientemente pequeño para que puedan explorarse rápidamente todas sus alternativas conformacionales durante el proceso de plegamiento. Estos microdominios se mueven difusivamente bajo la influencia de ciertas fuerzas al azar internas o externas, que ocasionan colisiones entre ellos. Dichas colisiones eventualmente dan origen a la coalescencia de pares de microdominios y agregados mayores (microdominios altamente ordenados o subdominios). El paso final del proceso de plegamiento involucra la formación de estructura terciaria, el empacamiento de las cadenas laterales y la isomerización de prolina (Karplus y Weaver, 1976). El segundo modelo propone que durante las etapas tempranas de la formación de la estructura nativa de una proteína, ocurre un proceso de nucleación. El crecimiento de este núcleo de plegamiento es facilitado por la adición de

segmentos de la cadena polipeptídica cercanos en secuencia a dicho núcleo (Wetlaufer, D.B, 1973). Finalmente, el tercer mecanismo propuesto señala que el plegamiento de proteínas involucra la participación del colapso hidrofóbico en el proceso, así como la presencia de un estado intermedio de glóbulo fundido (Ptitsyn, O.B., 1987).

Cabe señalar, que la mayoría de los estudios de plegamiento realizados se han centrado principalmente en proteínas monoméricas modelo, de aproximadamente 100 aminoácidos. Estas proteínas son marginalmente estables con valores de $\Delta G_D = 15$ a 30 kJ mol^{-1} , y se pliegan en una escala corta de tiempo (milisegundos a segundos) a través de mecanismos concertados que carecen de conformaciones intermedias. Sin embargo, ha sido demostrado para proteínas más grandes y multiméricas, que éstas se pliegan más lentamente, con la presencia de intermediarios y son más propensas a la agregación durante sus procesos de desplegamiento, y por lo tanto, no aptas para la estimación de sus valores de estabilidad termodinámica (Bruselmann *et al.*, 2013).

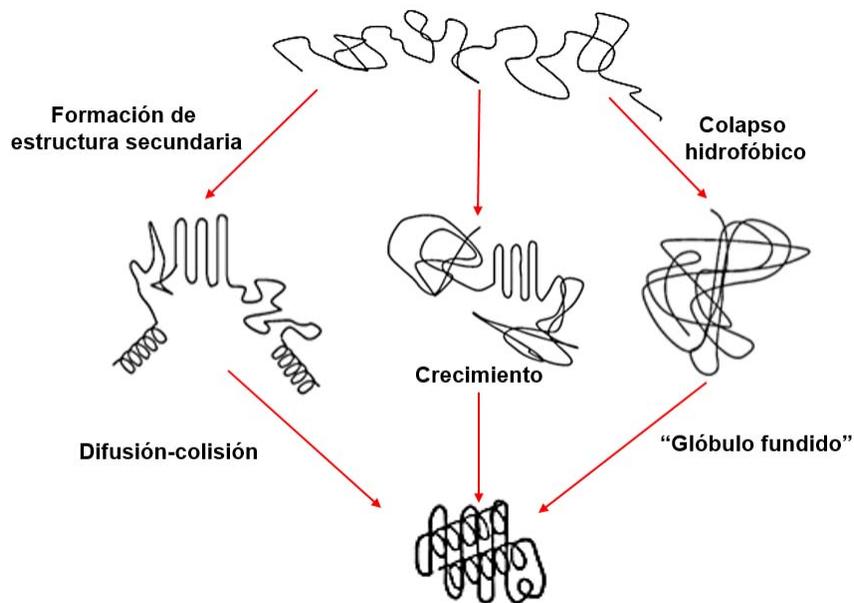


Figura 2. Representación de los tres modelos clásicos que explican el plegamiento de proteínas. Modificada de Fersht, 1999.

Plegamiento tipo barril TIM

La estructura $(\beta/\alpha)_8$, descrita por primera vez en la enzima Triosafosfato Isomerasa (TIM) es también conocida como plegamiento tipo barril TIM y es uno de los arreglos estructurales de proteínas más abundantes en la naturaleza. Se estima que aproximadamente el 10% de las estructuras reportadas en la Base de Datos de Proteínas (PDB) posee este tipo de arquitectura. La amplia distribución de este tipo de plegamiento resulta interesante para el estudio de sus propiedades estructurales, fisicoquímicas, enzimáticas y evolutivas (Wierenga, 2001).

El plegamiento de barril TIM consiste en un patrón alternado de 8 hélices alfa y 8 hebras beta. Las 8 hebras beta paralelas forman una hoja elíptica cerrada la cual se encuentra rodeada en el exterior por las 8 hélices alfa. Cada elemento de estructura secundaria está

conectado entre sí a través de asas, de manera que existen ocho asas $\beta\alpha$, que conectan el extremo carboxilo de las hebras con las hélices, y ocho asas $\alpha\beta$ que conectan el extremo carboxilo de las hélices con las hebras (Figura 3). Todas las enzimas con este tipo de estructura tridimensional, poseen el sitio activo en la cara C-terminal del barril β central dentro de las asas $\beta\alpha$, en tanto que las asas $\alpha\beta$ en el extremo N-terminal se han correlacionado principalmente con la estabilidad global del barril TIM (Höcker *et al.*, 2001).



Figura 3. Estructura tridimensional del plegamiento tipo barril TIM. Se señalan en rojo las hélices α , en verde las hebras β y en amarillo las asas (Modificada de Wierenga, 2001).

Este tipo de plegamiento es funcionalmente muy versátil, ya que los barriles TIM son capaces de catalizar cinco de los seis tipos de reacciones enzimáticas conocidas, pueden funcionar como oxidoreductasas, transferasas, liasas, hidrolasas e isomerasas (Nagano *et al.*, 2002), como se muestra en la Figura 4. De hecho, algunas de las enzimas más eficientes poseen un plegamiento de barril TIM, como es el caso de la triosafosfato isomerasa, la cual es una enzima oligomérica glucolítica que cataliza la isomerización del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), y es considerada como un catalizador perfecto debido a que su cinética está cerca del límite de difusión. Otro ejemplo es la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa, la cual cataliza la síntesis de orotidina 5'-monofosfato y posee la velocidad de reacción más alta reportada para cualquier enzima (Wierenga, 2001).

Además de la amplia distribución y gran variedad de reacciones enzimáticas que las proteínas con plegamiento de barril TIM son capaces de catalizar, este tipo de estructura representa un andamiaje muy estable para el diseño e ingeniería de proteínas, con numerosas aplicaciones en los campos de la biología sintética, diagnóstico e imagenología (Currin *et al.*, 2015). Existen estudios en donde los barriles TIM se han utilizado como andamio para la interconversión de las actividades catalíticas o de la especificidad por ciertos sustratos de enzimas, mediante diseño racional o evolución dirigida (Höcker *et al.*, 2001).

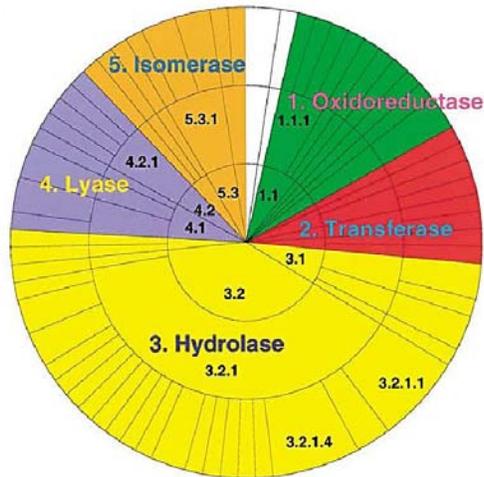


Figura 4. Distribución de las actividades enzimáticas catalizadas por enzimas con plegamiento de barril TIM. Los números señalan la clasificación E.C (Enzyme Commission number). En la porción vacía de la gráfica se señalan los barriles TIM para los cuales no se ha reportado actividad enzimática. Modificada de Nagano *et al.*, 2002.

Proteínas monoméricas

Un estudio de las proteínas presentes en *E.coli* reportadas en la base de datos de secuencias de SWISS-PROT, demostró que los monómeros representan el estado oligomérico minoritario en la célula (19.4%), en contraste con los dímeros (38.2%) y los tetrameros (21%).

Algunas de las características funcionales que se han relacionado con la abundancia de las proteínas monoméricas en la célula son las siguientes (Goodsell *et al.*, 2000):

1. *Difusión rápida:* Algunas funciones proteicas requieren la difusión rápida de las proteínas a su sitio de acción dentro o fuera de la célula (Por ejemplo: ferredoxina, citocromo c, hormonas y toxinas).
2. *Estabilidad a bajas concentraciones:* Se ha observado que las proteínas oligoméricas son inestables a bajas concentraciones, y tienden a disociarse. Por lo que los péptidos que se secretan en bajas cantidades son usualmente monoméricos (Por ejemplo: hormonas y toxinas).

En contraste, la abundancia de las proteínas oligoméricas pudiera explicarse por las ventajas que éstas ofrecen en términos de estabilidad y regulación (Goodsell *et al.*, 2000):

1. *Función morfológica:* Algunas funciones proteicas requieren de la formación de complejos estables de gran tamaño. Los oligómeros simétricos con subunidades idénticas son utilizados ampliamente en las proteínas. Por ejemplo, en las cápsides virales o en la subunidad β de la DNA polimerasa III bacteriana, un dímero que

posee tres dominios simétricos similares en cada subunidad, los cuales son responsables de la alta procesividad de la enzima.

2. *Función cooperativa*: Las asociaciones alostéricas y multivalentes representan un mecanismo de regulación de la actividad de ciertas enzimas (por ejemplo: hemoglobina, α -actinina).
3. *Estabilidad contra la desnaturalización*: Las proteínas que forman complejos oligoméricos grandes poseen una mayor cantidad de interacciones internas capaces de estabilizar su estructura en ambientes extremos de altas presiones, temperaturas, salinidad y acidez (por ejemplo: lactato deshidrogenasa de *Deinococcus radiodurans*, glucosa deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*).
4. *Reducción de área superficial expuesta al solvente*: esta reducción disminuye la cantidad de agua que se requiere para hidratar las proteínas, y por tanto, el volumen que ocupan éstas en el citoplasma de la célula. Además, la reducción del área superficial expuesta hacia el solvente representa un mecanismo de protección contra la degradación proteolítica, y se ha propuesto que también participa en la difusión de los sustratos hacia el sitio activo de las enzimas (por ejemplo: la insulina y la proinsulina forman hexámeros en los gránulos de almacenamiento).

Estudio de proteínas monoméricas con la arquitectura de barril TIM

Aunque se sabe que las proteínas con plegamiento de barril TIM participan en una amplia variedad de reacciones, en la mayoría de los casos estas enzimas funcionan como dímeros, multímeros monofuncionales (TIM) o multifuncionales (PRAI, IGPS, subunidad α de la triptófano sintasa, fosfoglicerato cinasa, HisF y la TIM de *Thermotoga maritima*). Se ha encontrado que algunas de estas enzimas como la PRAI (Eder y Kirschner, 1992), la IGPS (Sanchez *et al.*, 1997), la subunidad α de la triptófano sintasa (Crisanti y Matthews, 1981), e HisF (Carstensen *et al.*, 2012) son capaces de expresarse en su estado monomérico e independiente del resto del complejo multienzimático. Por lo que han sido utilizadas como modelo para el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los barriles TIM monoméricos. Estos estudios indican que la estabilidad termodinámica de los barriles TIM monoméricos es moderada con valores de $\Delta G_D = 10 - 15 \text{ kcal mol}^{-1}$. Aunque por otro lado, también se han caracterizado otros barriles monoméricos mucho menos estables, como es el caso de la aldolasa de *Staphylococcus aureus*, la cual tiene un valor de $\Delta G_D = 2.15 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Rudolph *et al.*, 1992) y el de la desaminasa de adenosina de *Mus musculus* $\Delta G_D = 5.78 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Frieden *et al.*, 2005).

Se ha observado que este tipo de proteínas comparte un alto grado de complejidad en sus vías de plegamiento, con la presencia de al menos un intermediario, y la irreversibilidad en sus procesos de desnaturalización inducido por temperatura (Saab-Rincón *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha utilizado ingeniería de proteínas para convertir a la triosafosfato isomerasa que es un homodímero obligado, en un monómero funcional. Sin embargo, todas las

variantes estudiadas a la fecha poseen una actividad catalítica muy baja (Borchert *et al.*, 1994) (Norledge *et al.*, 2001) (Saab-Rincón *et al.*, 2001).

La caracterización fisicoquímica de los barriles TIM monoméricos encontrados en la naturaleza es también importante ya que la caracterización de las proteínas naturales representa un punto de partida para la comparación con las proteínas diseñadas *de novo*. En un estudio reciente se reportó la caracterización experimental de 33 diseños de barriles TIM monoméricos (Huang *et al.*, 2016). En este trabajo se utilizó el programa Rosetta para la realización de los diseños, los cuales se construyeron a partir de la repetición de cuatro unidades simétricas de $\beta\alpha\beta\alpha$. Se estimó el valor de estabilidad para uno de los diseños llamado sTIM-11, el cual mostró ser poco estable a temperatura ambiente con un $\Delta G^0 = 4.2$ kcal mol⁻¹ pero con un valor de T_m considerablemente elevado de 88 °C.

Con el objetivo de explorar la estabilidad de otros barriles TIM monoméricos naturales e incrementar el conocimiento que se tiene sobre sus propiedades fisicoquímicas, en este trabajo se seleccionaron tres proteínas con este tipo de plegamiento y estado oligomérico. Los criterios utilizados para llevar a cabo la selección, entre los cuales se encuentran sus propiedades fisicoquímicas, estructurales, así como su importancia médica y/o biotecnológica, se detallan en la sección de materiales y métodos.

Las proteínas seleccionadas fueron la aldosa reductasa (AR) de *Homo sapiens*, la reductasa A del ácido 2,5-diceto-*D*-glucónico (2,5-DKGRA) de *Corynebacterium sp.* y la AKR11B de *Bacillus subtilis*. Estas proteínas forman parte de la súper familia de las aldoceto reductasas, y de la familia 9 de barriles TIM homólogos según la clasificación de Nagano *et al.* realizada en el 2002. Cabe señalar que esta familia de proteínas se compone principalmente por barriles TIM monoméricos.

Súper familia de las Aldo-ceto Reductasas (ACRs)

Las Aldo-ceto Reductasas (ACRs) forman parte de una superfamilia de enzimas dependientes de NAD (P) con actividad de oxidorreductasa, capaces de catalizar una amplia variedad de sustratos tales como aldehídos alifáticos y aromáticos, cetonas, monosacáridos, esteroides, prostaglandinas, hidrocarburos policíclicos aromáticos e isoflavonoides. Estas enzimas participan en una amplia gama de reacciones de importancia fisiológica en vertebrados, invertebrados, plantas, protozoarios, hongos, eubacterias y arqueas (Jez J.M *et al.*, 1997). Típicamente, los miembros de esta superfamilia son proteínas monoméricas $(\beta/\alpha)_8$ con una longitud promedio de 320 aminoácidos y utilizan NAD (P) para metabolizar sus sustratos en el sitio activo, en el cual poseen una tétrada catalítica compuesta por una tirosina, una lisina, un ácido aspártico y una histidina (Figuras 5 y 6).

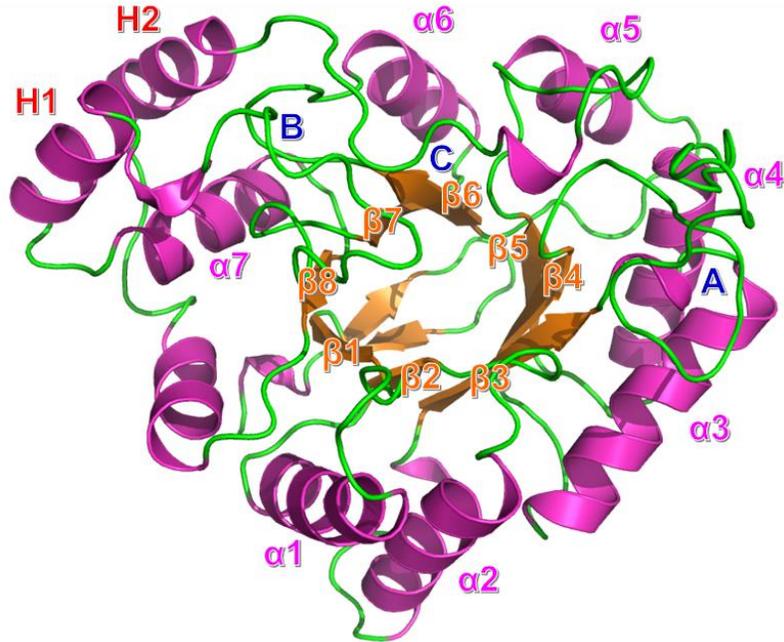


Figura 5. Estructura tridimensional común para las ACRs. Se muestra la estructura de la 3 α -HSD del hígado de rata (PDB ID: 1AFS). Se indican las hélices α y las hélices H1 y H2 en color rosa, las hebras β dentro del barril en color naranja y las asas en color verde. Se señalan las asas catalíticas A, B y C.

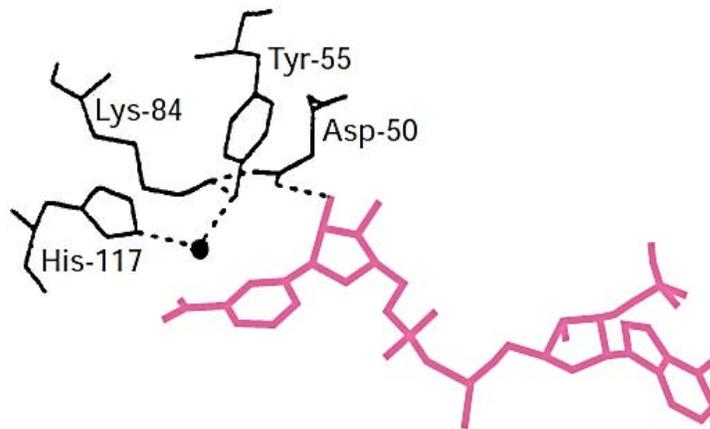


Figura 6. Sitio activo común para las ACRs. Las estructuras tridimensionales de las ACRs muestran la misma relación espacial entre los residuos formadores del sitio activo (Asp-50, Tyr-55, Lys84 y His-117), el cofactor NADP⁺ (rosa) y una molécula de agua. Se representa el sitio activo de 3 α -HSD del hígado de rata (Modificada de Jez J.M *et al.*, 1997).

La súper familia de las ACRs contiene 190 proteínas anotadas en las bases de datos, las cuales se clasifican en 16 diferentes familias (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las ACRs en sus diferentes familias.

Nombre y número de la familia	Representantes
AKR1	Aldehído reductasas, aldosas reductasas, deshidrogenasas de hidroxiesteroides y reductasas de 5 β -esteroides
AKR2	Reductasas de manosa y xilosa
AKR3	ACRs de levaduras
AKR4	Reductasas de codienona y chalconas
AKR5	Reductasas de ácido glucónico
AKR6	Subunidades β de canales de potasio dependientes de voltaje
AKR7	Reductasas de dialdehídos de aflatoxinas y semialdehídos succínicos
AKR8	Reductasas de piridoxal
AKR9	Deshidrogenasas de aril alcoholes
AKR10	ACRs de <i>Streptomyces</i>
AKR11	ACRs de <i>Bacillus</i>
AKR12	Aldehído reductasas de <i>Streptomyces</i>
AKR13	Reductasas de bacterias hipertermofílicas
AKR14	Reductasas de <i>E. coli</i>
AKR15	Reductasas de <i>Mycobacterium</i>
AKR16	Reductasas de <i>Vibrio cholerae</i>

Como se mencionó anteriormente, todos los miembros de las ACRs presentan el mismo tipo de plegamiento de barril TIM aunque con ligeras modificaciones, como lo son la presencia de dos hélices α extras (H1 y H2), una hoja β antiparalela en la región N-terminal y tres asas largas en la región C-terminal del barril que definen la especificidad de las enzimas por sus sustratos (asas A, B y C), como se muestra en la Figura 5.

Estas enzimas participan en la fase 1 del metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos, y se encargan de la reducción de aldehídos y cetonas a sus alcoholes primarios y secundarios, respectivamente. Todas las ACRs estudiadas muestran un mecanismo cinético bi-bi ordenado, en el cual el cofactor se une primero a la enzima y abandona al último el sitio activo (Penning TM., 2015).

Las enzimas seleccionadas para su caracterización termodinámica fueron la Aldosa reductasa (AR) de *Homo sapiens*, la Reductasa A del ácido 2,5-diceto-D-glucónico (2,5-DKGRA) de *Corynebacterium sp.* y la AKR11B de *Bacillus subtilis*.

- **Aldosa reductasa (AR) de *Homo sapiens***

La AR (E.C 1.1.1.21) es una enzima que cataliza una amplia variedad de sustratos carbonílicos hacia sus alcoholes correspondientes, utilizando NAD (P) como cofactor. Aunque el papel fisiológico de AR no se comprende por completo, probablemente participa en la detoxificación de varios aldehídos que se producen bajo condiciones de estrés oxidativo en la célula. Algunos de estos compuestos incluyen el 4-hidroxi-2-nonenal, el metilglioxal y los derivados glutacionados de éste.

Se ha observado que en pacientes diabéticos, la AR es la principal responsable de la conversión de glucosa a sorbitol, ya que es la primera enzima de la ruta de los polioles. El flujo de glucosa a través de esta ruta produce un desbalance que genera estrés oxidativo y estrés osmótico, la activación de la señalización de citosinas y cascadas de cinasas, así como apoptosis. Por todo lo anterior, el papel patofisiológico de la AR es clave en el desarrollo de ciertas complicaciones diabéticas, tales como angiopatía, nefropatía, retinopatía y formación de cataratas. Estudios *in vivo* e *in vitro*, demuestran un claro beneficio de la administración de inhibidores de AR en varios modelos experimentales, así como en el tratamiento de pacientes diabéticos. Basados en estas observaciones, se han realizado grandes esfuerzos desde las últimas tres décadas para desarrollar fármacos que inhiban apropiadamente a esta enzima (Steuber *et al.*, 2005).

En la tabla 2 se muestran los parámetros catalíticos obtenidos para AR con diferentes sustratos.

Tabla 2. Parámetros catalíticos reportados en la literatura para AR.

Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Glucosa ^A	615	0.614	0.94
DL-Gliceradehído ^B	0.73	137	190,000
Dihidroxiacetona ^B	2.5	54	21,000

^A (Ehrensberger *et al.*, 1989), ^B (Vander Jagt *et al.*, 1992).

La caracterización de AR se ha limitado principalmente a la identificación de nuevos compuestos con la capacidad de inhibir a esta enzima, y al estudio de éstos mediante cristalografía y calorimetría de titulación isotérmica (ITC) (Steuber *et al.*, 2007). También, se ha realizado la descripción de las propiedades electrostáticas internas, y de los desplazamientos vibratorios de Stark del sitio activo de la AR mediante herramientas computacionales (Wang *et al.*, 2015). Por otra parte, existen reportes en los cuales se han descrito las propiedades de chaperona de la α -cristalina, y su capacidad de inhibir la agregación de la AR inducida por temperatura (Andley *et al.*, 1996). Sin embargo, no existen estudios dedicados exclusivamente a la caracterización de la estabilidad y propiedades termodinámicas intrínsecas de esta proteína.

- **Reductasa A del ácido 2,5-diceto-*D*-glucónico (2,5-DKGRA) de *Corynebacterium sp.***

La 2,5-DKGRA (E.C 1.1.1.346), es una ACR monomérica dependiente de NAD (P) que cataliza la reducción del ácido 2,5-diceto-*D*-glucónico (2,5-DKG) hacia ácido 2-ceto-*L*-gulónico (2-KLG). Este último es un precursor inmediato del ácido-*L*-ascórbico (vitamina C), por lo que la 2,5-DKGRA es una enzima importante en un nuevo método industrial desarrollado para la producción de vitamina C (Sanli *et al.*, 2003).

En la tabla 3 se muestran los parámetros catalíticos obtenidos para 2,5-DKGRA.

Tabla 3. Parámetros catalíticos reportados en la literatura para 2,5-DKGRA.

Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
2,5-DKG ^C	26	8.28	318.4
5-ceto- <i>D</i> -fructosa ^C	155	5.67	36.56
Dihidroxiacetona ^C	160	1.98	12.32

^C (Miller *et al.*, 1987)

La caracterización termodinámica más completa de esta enzima reportada en la literatura se describe en la tesis doctoral titulada “Structure/function studies of 2,5-diketo-*D*-gluconic acid reductases” de Powers publicada en el año de 1996 en la cual se señala la irreversibilidad del desplegamiento térmico de esta enzima.

Además de este trabajo, existen otros reportes en los que se ha estudiado el efecto que tienen ciertas mutaciones en la interconversión de la afinidad de la enzima por el NADH (Sanli *et al.*, 2003) y su impacto en la actividad catalítica y estabilidad térmica, las cuales son clave durante la producción industrial de vitamina C (Patente US5795761 A de Powers *et al.*, 1996).

- **AKR11B de *Bacillus subtilis***

La AKR11B (EC 1.1.1.72) es uno de los dos únicos miembros reportados para la familia 11 de las ACRs. La proteína AKR11B “también llamada GSP69 (Antelmann *et al.*, 1997) o YhdN (Petersohn *et al.*, 1999)” pertenece al gran grupo de proteínas de estrés de *B. subtilis* inducidas por el factor de transcripción σ^B (Petersohn *et al.*, 1999). Este factor de transcripción se sintetiza cuando la célula se encuentra bajo estrés inducido por calor, cambios de pH, la presencia de etanol, estrés nutricional u osmótico (Hecker *et al.*, 1996). No existen estudios que se hayan realizado sobre la función específica de AKR11B, sin embargo ésta podría estar jugando un papel protector de la célula ante situaciones de estrés, al igual que se ha propuesto para otras ACRs eucariontes (Ehrensberger *et al.*, 2003). En la tabla 4 se muestran los parámetros catalíticos obtenidos para AKR11B.

Tabla 4. Parámetros catalíticos reportados en la literatura para AKR11B.

Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
DL-Gliceradehído ^D	2.2	1.37	622.7
Metilglioxal ^D	0.74	5.33	7203
Benzaldehído ^D	1.91	2.59	1356

^D(Ehrensberger *et al.*, 2004)

No existe ningún reporte en la literatura que describa las propiedades fisicoquímicas o la estabilidad para algún miembro de la familia 11 de las ACRs. Por lo que, AKR11B representa la oportunidad de explorar por primera vez las propiedades termodinámicas de un miembro de esta familia.

Justificación

Dada la amplia distribución y diversidad funcional del plegamiento tipo barril TIM, resulta interesante explorar un grupo de proteínas monoméricas con dicha arquitectura. El entendimiento de sus propiedades fisicoquímicas, así como de su estabilidad global, son importantes para describir el comportamiento fisicoquímico de los barriles TIM naturales, información clave para conocer la variabilidad existente en la estabilidad conformacional de este tipo de topología, así como en el potencial diseño e ingeniería de nuevas proteínas monoméricas con este tipo de arquitectura.

Objetivos

❖ Objetivo general

Caracterizar las propiedades cinéticas, fisicoquímicas y la estabilidad termodinámica de un grupo de proteínas monoméricas con la arquitectura de barril TIM pertenecientes a la superfamilia de las Aldo-ceto Reductasas.

❖ Objetivos particulares

- Buscar y seleccionar proteínas monoméricas con arquitectura de barril TIM.
- Subclonar, expresar y purificar las proteínas recombinantes.
- Determinar el estado de oligomerización de las enzimas.
- Determinar los parámetros catalíticos de las enzimas.
- Caracterizar el plegamiento de las proteínas seleccionadas mediante su desnaturalización con agentes físicos (temperatura) y químicos (urea e hidrocloreuro de guanidinio).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados son de la marca Sigma®.

Selección de las proteínas

Como un antecedente importante para la selección de los barriles TIM monoméricos, se tomó en cuenta la clasificación de los barriles TIM hecha por Nagano y Thornton en 2002. En este trabajo se clasificaron 900 estructuras reportadas en el PDB con la arquitectura de barril TIM, y con ayuda del servidor CATH 1.7 se agrupó a las proteínas dentro de 18 tipos de familias homólogas. En la tabla 5 se enumeran los distintos tipos de familias descritas en este trabajo, junto con el tipo de cofactores que unen (Nagano *et al.*, 2002).

Tabla 5. Clasificación de los barriles TIM en sus diferentes familias homólogas (Modificada de Nagano *et al.*, 2002).

Número	y nombre de la familia (abreviatura)	Cofactores que unen
1	Alanina racemasa (ALR)	Piridoxal-5'-fosfato
2	Dihidropteroato sintetasa (DHPS)	-
3	Proteínas fluorescentes de flavín mononucleótido (LUCL)	Flavín mononucleótido (FMN)
4	Celulasas de siete hebras (7CEL)	-
5	Enzimas de unión a fosfoenolpiruvato (PEPE)	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ y K ⁺
6	Aldolasas de clase I (ALD1)	-
7	Glicosidasas (GLYC)	-
8	Triosafofosfato isomerasa (TIM)	-
9	Oxidoreductasas dependientes de NADP ⁺ (NADO)	NADP ⁺
10	Guanin-transglicosilasa de tRNA (TRGT)	-
11	Rubisco (RUB)	Mg ²⁺
12	Superfamilia de las enolasas (ENOL)	Mg ²⁺ o Mn ²⁺
13	Oxidoreductasas de flavín mononucleótido y enzimas de unión a fosfato (FMOP)	FMN, NADP ⁺ y piridoxal-5'-fosfato.
14	Hidrolasas dependientes de metales (MHYD)	Zn ²⁺
15	Enzimas tipo xilosa isomerasa (XYLL)	Ni ²⁺ , Mn ²⁺ o Zn ²⁺
16	Aldolasas de clase II (ALD2)	Zn ²⁺
17	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PIPLC)	Ca ²⁺
18	Transferasa de ácido fosforibosil quinólico (QAPRT)	Mg ²⁺

- *Criterios generales de la selección*
 - a) Debido a que este trabajo se centra en la caracterización de barriles TIM monoméricos naturales diferentes a la triosafosfato isomerasa, no se tomó en cuenta ningún miembro de la familia 8.
 - b) El principal objetivo de este trabajo es caracterizar las propiedades intrínsecas de los barriles TIM monoméricos, por ello, se decidió no tomar en cuenta proteínas que poseían cofactores metálicos en su estructura. La razón por la cual se tomó en cuenta este criterio es porque, aunque se estima que más del 30% de las proteínas coordinan un metal para llevar a cabo su función (Gray, 2003) y éstos pueden tener un papel estructural o catalítico, se ha visto que éstos pueden tener un efecto importante en las propiedades del estado plegado de las proteínas (dinámica conformacional, estructura y estabilidad). Ha sido demostrado en ciertos estudios *in vitro* que algunas metaloproteínas retienen interacciones metal-proteína específicas después de su desplegamiento (Wittung-Stafshede, 2002). Por lo que es muy probable que los metales interactúen con las proteínas y guíen su reacción de plegamiento (Palm-Espling *et al.*, 2012).
 - c) Además de este criterio, se decidió no tomar en cuenta a las proteínas pertenecientes a la familia 7 de las glicosidasas, debido a la tendencia a la agregación que tienen estas proteínas. Este fenómeno ha sido reportado particularmente dentro de la familia de las β -glicosidasas, las cuales tienden a organizarse en estructuras multi-dominio, unidas a la superficie celular con grandes regiones hidrofóbicas en su estructura que favorecen su agregación (Asif-Shah *et al.*, 2012). Se sabe por ejemplo, que el complejo multi-enzimático del celulosoma tiende a agregarse de forma importante durante su proceso de purificación (de Almeida *et al.*, 2013).
 - d) Adicionalmente, tampoco se tomaron en cuenta las familias 3 y 4, debido a que el barril en la estructura central de las proteínas contienen siete y nueve hebras respectivamente, y nuestro interés es estudiar la estabilidad de estructuras cercanas al barril canónico ($\beta\alpha$)₈.

De las 6 familias restantes, se llevó a cabo la búsqueda de sus integrantes monoméricos siguiendo el procedimiento que se muestra en el esquema de la Figura 7. Para lo cual, se utilizó el servidor Pfam (Finn *et al.*, 2015), al cual se le proporciona como entrada (*input*) la secuencia de una proteína de interés. El programa realiza una búsqueda de las secuencias similares reportadas en las bases de datos y las agrupa en clanes. De cada familia de proteínas de Pfam existen tres archivos importantes: el primero de ellos es el alineamiento múltiple que se genera a partir de la secuencia de entrada y todas las proteínas en las que se encontró un alto grado de similitud (*seed alignment*); el segundo archivo es un modelo oculto de Markov que se construye a partir del “*seed alignment*”, utilizando la herramienta HMMER (<http://hmmer.org/>); y en el último paso, se genera un tercer archivo denominado “*full alignment*” que toma en cuenta el modelo oculto de Markov obtenido previamente y una serie de nuevas secuencias de proteínas encontradas en la base de datos del Swissprot (Finn *et al.*, 2015).

Con el fin de reconocer a los miembros monoméricos de las familias homólogas de barriles TIM, se utilizó el servidor PDBePISA (Krissinel *et al.*, 2003), que permite inferir el estado oligomérico de las proteínas a partir de sus estructuras cristalográficas, basándose en modelos fisicoquímicos de interacciones macromoleculares. PDBePISA es capaz de distinguir entre las interfases moleculares “biológicamente relevantes” (forma funcional de la proteína), de aquéllas interfases “insignificantes” (debidas al empacamiento del cristal). El programa asigna cierto puntaje a estas interfases basándose en ciertos criterios como lo son: área, composición y número de contactos residuo-átomo, índice de hidrofobicidad, distribución de cargas, y complementariedad topológica. De esta manera es capaz de discernir entre interfases biológicamente relevantes y las que no lo son, asignando así un valor del estado oligomérico más probable de la estructura cristalográfica proporcionada. De todas las proteínas filtradas, se seleccionaron únicamente aquéllas que el programa identificó como monómeros.

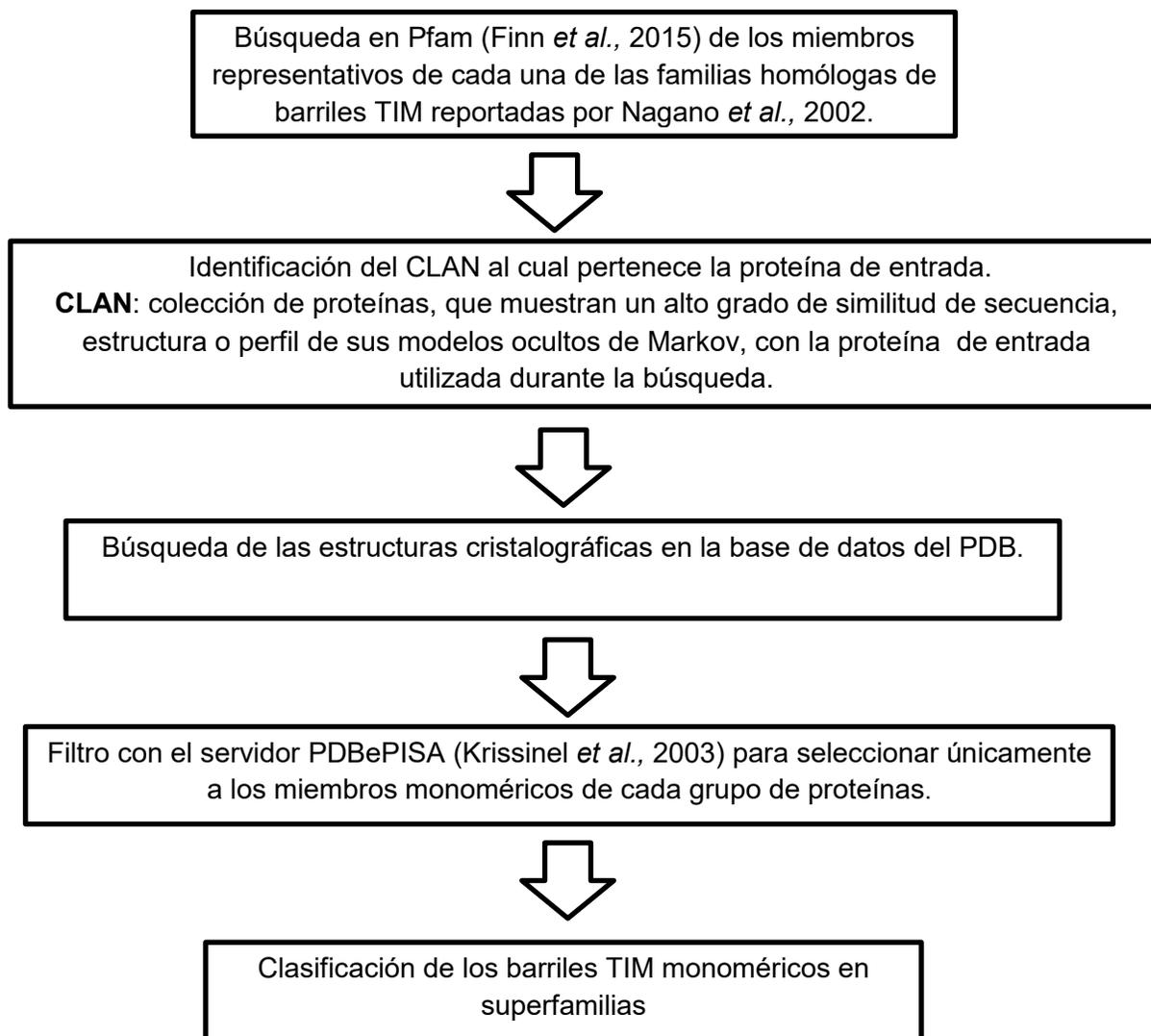


Figura 7. Esquema de búsqueda de los barriles TIM monoméricos pertenecientes a las 18 familias homólogas identificadas por Nagano *et al.*, 2012.

Después de hacer la selección general de las proteínas a través de Pfam (Finn *et al.*, 2015) y PDBePISA (Krissinel *et al.*, 2003), se encontraron 31 estructuras cristalográficas de barriles TIM monoméricos confirmados que cumplían todos los criterios establecidos, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de los barriles TIM monoméricos a través de la búsqueda en Pfam y filtro de estructuras en PDBePISA.

Número de familia homóloga de barriles TIM (Nagano <i>et al.</i> , 2002)	Enzima	Código PDB
1	Proteína hipotética de levadura YBL036C	1CT5
5	3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa	1O66
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	3ODM
	Malato sintasa	1N8I
7***	Concanavalina B	1CNV
	Narbonina	1NAR
9	17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	4WDW
	2,5-DKGRA	1HW6
	3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa	2DKN
	AKR11A	1PZ0
	AKR11B	1PZ1
	Aldosa reductasa	4PRR
	Reductasa de ovario de hámster chino	1C9W
	Proteína FR-1	1FRB
Reductasa de chalcona	1ZGD	
13	IGPS	4A2R
	Dominio conservado de la glutamato sintasa	1OFD
	Endonucleasa de daño a DNA (SacUVDE)	3TC3
	Fenilalanina hidroxilasa	4JPY
	HisA	5AHE
	HisF	1THF
	HydE	5FEP
	PRAI	1DL3
	PriA	4X2R
	Subunidad α de la triptófano sintasa	1V7Y
	Tiamina fosfato sintasa	3O16
	Transaldolasa B	3IGX
	tRNA-dihidrouridina sintasa (dominio catalítico)	4WFS
17	Fosfatidilinositol fosfolipasa C	4I9J
	Fosfolipasa C- β 2	2FJU
	Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa	2OOG

***Las proteínas que se muestran en la familia 7 no poseen actividad de glicosidasa, sino de lectina, es por ello que se tomaron en cuenta durante la selección. Sin embargo en la clasificación hecha por Nagano *et al.*, éstas se agrupan dentro de la familia de las glicosil-hidrolasas.

Como se muestra en la tabla 6, se distinguen dos familias de proteínas que poseen el mayor número de barriles TIM monoméricos. Una de ellas, es la familia 13 y la otra es la familia 9. El resto de las familias contienen muy pocos representantes. En la familia 13 de barriles TIM se encuentran las enzimas de unión a flavín mononucleótido y fosfato. Sin embargo, varios de sus miembros, como lo son: la PRAI, la subunidad α de la triptófano sintasa, IGPS e HisF han sido exhaustivamente caracterizados desde el punto de vista fisicoquímico, por lo que decidimos no escoger proteínas pertenecientes a esta familia. Debido a esto, decidimos centrarnos en la familia 9 de las Aldo-ceto reductasas (ACRs), la cual contiene un número considerable de miembros y ha sido poco explorada desde el punto de vista termodinámico.

Para la selección particular de las proteínas se establecieron nuevos criterios de selección, como se describe a continuación.

- *Criterios particulares de selección*
 - a) Punto isoeléctrico bajo: Los factores que determinan la reversibilidad del proceso de desplegamiento de las proteínas no se conocen completamente. Sin embargo, se han descrito ciertas propiedades estructurales y fisicoquímicas que correlacionan con la capacidad de las proteínas de volver a su estado nativo después de ser desnaturalizadas (reversibilidad). Entre ellas, se encuentran: el valor bajo de su punto isoeléctrico (pI), la ausencia de estructura residual en el estado desplegado, volumen pequeño de sus cavidades en el estado nativo, baja estabilidad conformacional y valor bajo de T_m (Romero-Romero *et al.*, 2015). Con la intención de incrementar la probabilidad de seleccionar proteínas cuyo desplegamiento fuera reversible, se seleccionaron proteínas con un valor ácido de pI. Debido a que, la reversibilidad del proceso de desplegamiento nos permite hacer el análisis termodinámico formal de las propiedades de las proteínas seleccionadas, y calcular parámetros como lo son los valores de ΔG , ΔH , ΔC_p , T_m , C_m y la construcción de la curva de estabilidad.
 - b) Importancia biotecnológica: Se decidió seleccionar proteínas que tuvieran un papel biológico, médico o industrial sobresaliente.

Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionaron las proteínas cuyas características se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Proteínas monoméricas con plegamiento de barril TIM pertenecientes a la familia de las Aldo-ceto reductasas seleccionadas para su caracterización fisicoquímica.

Proteína	Número de residuos	Peso molecular (kDa)	pl	Relevancia biológica/biotecnológica
AR	316	35.30	6.52^{***}	Se ha reportado ampliamente su participación en la Diabetes mellitus
2,5-DKGRA	278	29.57	4.78	Utilizada en la biosíntesis industrial de Vitamina C
AKR11B	331	37.33	4.96	Se propone que participa en procesos de detoxificación celular

^{***} A pesar que AR no posee un pl significativamente ácido como las otras dos proteínas, se decidió seleccionar esta proteína debido a su gran relevancia médica.

Clonación y expresión de los genes

Las secuencias de nucleótidos correspondientes de AKR11B, AR y 2,5-DKGRA fueron enviadas a sintetizar comercialmente a la compañía GenScript en el plásmido de almacenamiento pUC57. Posteriormente, se realizó la subclonación de los genes en el vector de sobreexpresión pET-28b (+), el cual le adiciona a la secuencia de la proteína una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal y contiene un sitio de corte para la trombina, el cual facilita la eliminación de la secuencia de histidinas durante el proceso de purificación dejando únicamente la serie residual de aminoácidos Gly-Ser-His.

Los genes de AKR11B, AR y 2,5-DKGRA se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* (New England Biolabs ®), durante 3 h en una reacción de 25 μ L (1 μ L del plásmido (3 μ g/ μ L), 2.5 μ L de amortiguador Cutsmart 10X (New England Biolabs ®), 1 μ L de *NdeI*, 1 μ L de *XhoI* (20, 000 U mL⁻¹) y 19.5 μ L de agua). El plásmido pET28b (+) se digirió utilizando el mismo protocolo anteriormente referido. Los productos se purificaron a partir de gel por kit de Qiagen ©. La relación vector: inserto utilizada en las reacciones de ligación fue de 1:3 y 1:5, en un volumen de 20 μ L utilizando 100 ng del vector pET28b (+), 2 μ L de ligasa T4 (400,000 U mL⁻¹), 2 μ L de amortiguador de ligasa T4 (New England Biolabs ®), y las concentraciones de inserto y agua correspondientes para completar el volumen; se incubaron durante dos días a 16°C. Todas las purificaciones de DNA se realizaron a cabo en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α .

Purificación de las proteínas

Las construcciones se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. A partir de una colonia aislada, se inoculó en 10 mL de medio Luria Bertani (LB) líquido + kanamicina 1X y se incubaron toda la noche a 37°C y 250 rpm. A partir de 5 mL de los precultivos, se inocularon en un litro de medio LB + kanamicina 1X y se crecieron a 37°C y 250 rpm hasta obtener una D.O. a 600 nm de aprox. 0.6 – 0.8. Estos cultivos se indujeron con 1 mM de IPTG y se incubaron toda la noche (16 h) a 37 °C y 250 rpm.

Las células inducidas se cosecharon mediante centrifugación a 8000 rpm por 20 minutos; se suspendieron en un amortiguador A (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0) adicionado con inhibidor de proteasas (PMSF 0.2 mM diluido en DMSO) y 5 mM de imidazol. Las células se lisaron por sonicación en frío (30 pulsos, con una duración de 45 segundos con 30 segundos de descanso y una amplitud de 35%) en un Ultrasonic Processor (Cole Parmer ©). Se centrifugaron a 15000 rpm a 4°C por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue filtrado con ayuda de un filtro de 0.45 μm (Millex® HV) antes de cargarlo a una columna de afinidad (HisTrap® HP), previamente equilibrada con el mismo amortiguador en el que se resuspendieron las células y acoplada a un sistema FPLC (GE ©). La proteína se eluyó con un gradiente de 80 mL de amortiguador A + imidazol 500 mM. Las fracciones correspondientes al mayor pico de absorbancia durante el transcurso del gradiente, fueron colectadas y concentradas para el siguiente paso de purificación. La proteína concentrada se dializó contra amortiguador Tris 50 mM pH 8.0 para realizar el corte de la etiqueta de histidinas, con la enzima trombina mediante el kit Thrombin Clean Cleave (Sigma-Aldrich ©). Después de un tiempo de corte con duración de 4 horas a temperatura ambiente, se recuperó la proteína mediante centrifugación y se dializó contra el amortiguador A + imidazol 5 mM, para inyectarla nuevamente a la columna de afinidad HisTrap en un último paso de purificación, pero en esta ocasión se recuperaron las fracciones iniciales que no se unieron a la columna, ya que en éstas se encuentra nuestra proteína libre de la etiqueta de histidinas.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína fue determinada por su absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific ©). El coeficiente de absortividad molar (ϵ_{280}) utilizado para la medición fue un valor teórico obtenido mediante el servidor ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) considerando la secuencia de aminoácidos de la proteína y las cisteínas en su forma reducida (Pace *et al.*, 1995).

Determinación del estado de oligomerización

La determinación del estado de asociación de las enzimas estudiadas se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna analítica Superdex 75 GL 10/300 (GE ©), acoplada a un sistema FPLC (GE ©). La elución de las proteínas se siguió con un detector de absorción de UV (λ_{280}). Se realizó una curva de calibración con proteínas de peso molecular conocido: Gama- globulina (Peso molecular (PM): 158 kDa, Radio de Stokes (R_s): 51 Å) ovoalbúmina (PM: 44 kDa, R_s : 28 Å), mioglobina (PM: 17 kDa, R_s : 19 Å), ribonucleasa A (PM: 13.7 kDa, R_s : 19.3 Å) y vitamina B12 (PM: 1.35 kDa, R_s : 8.5 Å). La columna se equilibró previamente con 3 volúmenes de columna de amortiguador A con un programa isocrático usando el mismo buffer de carga y la corrida se realizó a un flujo de 1 mL/min. Se graficaron: 1) el R_s vs. el volumen de elución R_s (Figura 8) y el logaritmo del PM vs. el volumen de elución (Figura 9); ambas series de datos se ajustaron a una regresión lineal y a partir de éstas se obtuvieron los valores necesarios para la determinación del estado oligomérico.

Tabla 8. Parámetros obtenidos del experimento de exclusión molecular de las proteínas con valores conocidos que se utilizaron para la construcción de la curva de calibración.

Proteína	Peso molecular (Da)	Radio de Stokes (Å)	Volumen de elución (mL)	1000/VE (mL ⁻¹)	Log ₁₀ (Peso molecular)	Log ₁₀ (Radio de Stokes)
Gama-globulina	158000	51	9.05	110.50	5.20	1.71
Ovoalbúmina	44000	28	10.68	93.63	4.64	1.45
Mioglobina	17000	19	12.97	77.10	4.23	1.28
RNAasa A	13700	19.3	13.74	72.78	4.14	1.29
Vitamina B12	1350	8.5	18.76	53.30	3.13	0.93

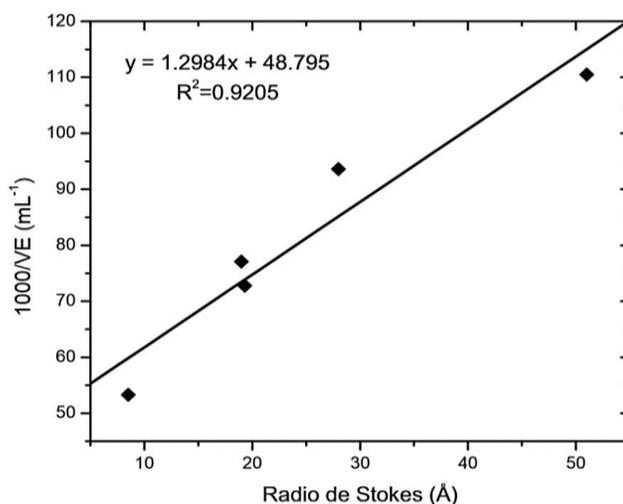


Figura 8. Dependencia de la tasa de migración con el Radio de Stokes de los estándares de calibración utilizados para la determinación del estado de oligomerización.

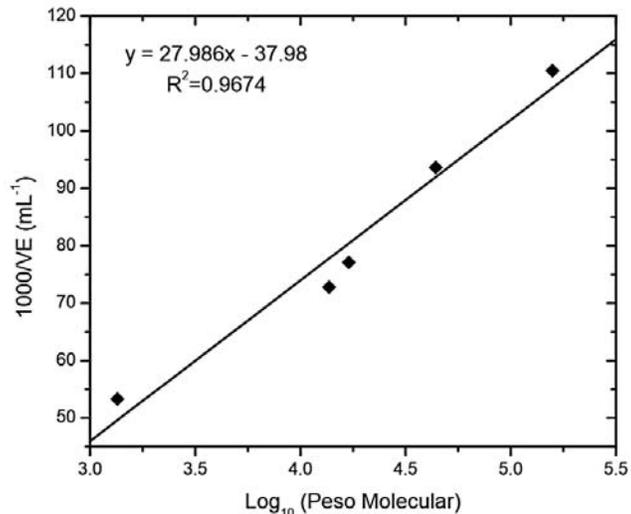


Figura 9. Dependencia de la tasa de migración con el logaritmo del peso molecular de los estándares de calibración utilizados para la determinación del estado de oligomerización.

En estos experimentos se utilizaron distintas concentraciones de proteína para corroborar que las proteínas estudiadas se mantenían como monómeros a bajas y altas concentraciones. La concentración de proteína utilizada en los experimentos fue de 0.1 mg mL⁻¹ y 2 mg mL⁻¹ en el caso de la AR, y de 0.1 mg mL⁻¹ y 0.8 mg mL⁻¹ en el caso de la 2,5-DKGRA. Los R_s y PM se determinaron por la interpolación de los volúmenes de elución a la curva de calibración realizada con las proteínas de PM y R_s conocidos. La determinación del estado oligomérico se realizó dividiendo el PM experimental sobre el PM teórico, y el número obtenido fue la cantidad de monómeros presentes en la enzima.

Determinación de la actividad enzimática y parámetros catalíticos.

En la reacción que catalizan las ACRs es necesaria la presencia del cofactor NAD (P), cuya desaparición puede ser monitoreada siguiendo la caída en la absorbancia a 340 nm. Estas enzimas son capaces de catalizar la oxidorreducción de una amplia gama de sustratos, sin embargo, en este trabajo se utilizaron los sustratos no naturales (promiscuos) *DL*-Gliceraldehído (*DL*-GAL) y Dihidroxiacetona (DHA) para la determinación de los parámetros cinéticos. La reacción para la AR se realizó en un amortiguador de fosfato de sodio monobásico 100 mM pH 7.0, en un volumen final de 1 mL por celda de reacción, con una concentración final de enzima de 40 µg mL⁻¹, 0.15 mM de NADPH (Bohren *et al.*, 1987), y variando la concentración de *DL*-GAL en un intervalo de 0 -7 mM y de DHA de 0-50 mM. Por otro lado, la reacción para la 2,5-DKGRA se realizó en un amortiguador de Bis-Tris-HCl 50 mM pH 6.4, en un volumen de 1 mL, con una concentración final de enzima de 12 µg mL⁻¹, 0.15 mM de NADPH (Miller *et al.*, 1987), y se varió la concentración de *DL*-GAL de 0-100 mM y de DHA de 0-800 mM. Los experimentos se realizaron a 25°C en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU-7500.

Para la determinación de los parámetros catalíticos, se ajustaron los datos experimentales (velocidades iniciales, v_0) obtenidos de las mediciones de la actividad catalítica a diferentes concentraciones de sustrato, al modelo cinético de Michaelis-Menten para obtener los valores de K_m y V_{max} (1):

$$v_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Donde v_0 es la velocidad inicial de la reacción, V_{max} es la velocidad máxima de la reacción, K_m es la constante de Michaelis-Menten y $[S]$ representa la concentración de sustrato.

Propiedades espectroscópicas

Para evaluar la presencia de agregados en distintas condiciones se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Por otra parte, con el fin de corroborar que las proteínas recombinantes AR y 2,5-DKGRA se encontraban correctamente plegadas, se determinó su espectro de fluorescencia para confirmar la presencia de estructura terciaria, y su espectro de dicroísmo circular (DC) para confirmar la presencia de estructura secundaria.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de DLS también conocida como espectroscopia de correlación de fotones o de dispersión de luz cuasi-elástica, es una herramienta que permite determinar los coeficientes de difusión de traslación (D_t) de macromoléculas en suspensión.

En una solución de macromoléculas, la concentración local de éstas fluctúa continuamente debido a su movimiento Browniano. De acuerdo a la primera ley de Fick, el valor de D_t se relaciona directamente con el gradiente de concentración del soluto distribuido en el solvente. Y este valor es inversamente proporcional al tamaño de la partícula, por lo que las moléculas de menor tamaño se desplazan más rápidamente que las de mayor tamaño. A partir de mediciones de DLS es posible calcular el tamaño hidrodinámico de las partículas en solución, asumiendo la geometría simple de una esfera, y la polidispersidad de las especies presentes, a partir de la desviación estándar de los valores de D_t .

La técnica de DLS ha sido utilizada ampliamente por más de medio siglo para monitorear fenómenos de agregación de proteínas en solución. Algunos ejemplos, incluyen el estudio de la influencia de varios factores en el estado de agregación, la detección de agregados indeseables en proteínas terapéuticas que puedan ocasionar algún tipo de respuesta inmunogénica durante su administración, o la identificación de soluciones en las que las macromoléculas se mantienen monodispersas durante los procesos de nucleación y crecimiento de cristales de proteínas (Lorber *et al.*, 2012).

En este trabajo se empleó esta técnica con el fin de identificar la composición del amortiguador que permitiera mantener estables a las proteínas recombinantes estudiadas en ausencia de agregación. El equipo utilizado para los experimentos de DLS fue un Zetasizer μV ® (Malvern). En todos los experimentos se utilizó una concentración final de proteína de 0.1 mg/mL. Todas las muestras fueron filtradas con ayuda de un filtro de 0.22 μm (Millex® HV) previamente a la realización de las mediciones a 20°C. En el caso de las muestras con glicerol, se realizó la corrección por viscosidad e índice de refracción.

Fluorescencia intrínseca (FI)

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado basal, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una vez excitada, la molécula pasará a un estado vibracional de menor energía. El fotón emitido por fluorescencia tiene menos energía que el absorbido. Por tanto, posee una frecuencia menor y emite a mayor longitud de onda (Skoog *et al.*, 2006).

En las proteínas existen tres aminoácidos con propiedades intrínsecas de fluorescencia, los cuales son la fenilalanina (Phe), la tirosina (Tyr) y el triptófano (Trp). Es posible excitar diferencialmente estos residuos, utilizando longitudes de onda de excitación específicas (λ_{exc}).

A $\lambda_{exc}=280$ nm, tanto el Trp como la Tyr son excitados, sin embargo a $\lambda_{exc}=260$ se observa únicamente la contribución de las tirosinas y a $\lambda_{exc}=295$ nm, la señal debida a los residuos de Trp. Estos residuos pueden utilizarse como sondas para monitorear el plegamiento de una proteína debido a que, sus propiedades de fluorescencia son sensibles al microambiente que los rodea. En el estado nativo, los residuos de Trp y Tyr se encuentran generalmente dentro de la proteína en un ambiente predominantemente hidrofóbico, sin embargo en el estado desplegado, dichos residuos son expuestos hacia el solvente.

En un ambiente hidrofóbico, las Tyr y los Trp poseen un mayor rendimiento cuántico, y por tanto una intensidad mayor en la señal de fluorescencia. En contraste, en un ambiente hidrofílico sus rendimientos cuánticos disminuyen, al igual que la intensidad en su señal fluorescente. El análisis comparativo de los espectros de emisión de este tipo de residuos aromáticos, puede sugerir cambios terciarios específicos en la proteína (Vivian y Callis, 2001).

Las mediciones de fluorescencia intrínseca (FI) se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para controlar la temperatura. La concentración de proteína en estos experimentos fue de 0.1 mg mL^{-1} . Se utilizó el amortiguador A para la realización de los experimentos. La temperatura de medición fue de 25°C . Se utilizó una celda de cuarzo de 0.5×0.5 cm, se excitó a $\lambda_{exc}=295$ y se midió la emisión en el intervalo de 310 a 400 nm, monitoreando la intensidad de fluorescencia cada 1 nm. El centro de masa espectral (CME) se calculó mediante $CME = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$, donde I_λ es la intensidad de fluorescencia para cada longitud de onda (λ).

Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que se basa en la absorción diferencial de luz circularmente polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda, por moléculas ópticamente activas. En el estudio de proteínas, se aprovecha la naturaleza quiral de los carbonos que conforman el esqueleto de la cadena polipeptídica, para el estudio de su estructura mediante el uso de esta técnica.

En las proteínas, los cromóforos de interés incluyen el enlace peptídico (absorción <240 nm), la presencia de aminoácidos aromáticos en las cadenas laterales (rango de absorción 260-320 nm), y los enlaces disulfuro (bandas de débil absorción cerca de 260 nm).

Con esta técnica, también es posible observar la contribución de cofactores de naturaleza no proteica dentro de las proteínas, como lo son las flavinas en un rango de 300-500 nm (dependiendo de su estado de oxidación), grupos hemo cerca de los 410 nm y piridoxal-5'-fosfato alrededor de los 330 nm.

El tipo de información que se puede obtener de un experimento de DC (Kelly, Sharon *et al.*, 2005) incluye la:

- Composición de estructura secundaria: Mediante una serie de algoritmos, es posible utilizar los datos de DC de UV lejano para obtener un estimado del porcentaje de hélices, hebras y giros presentes en la proteína.
- Presencia de estructura terciaria: La forma y la magnitud del espectro de DC de una proteína en el UV cercano depende del número y tipo de aminoácidos aromáticos presentes, de su movilidad, del microambiente que los rodea y de su disposición espacial. Los espectros en esta región del UV son un reflejo de la conformación global de la proteína.
- Integridad del sitio de unión a cofactores: De manera independiente ciertos cofactores orgánicos muestran señales muy débiles de DC, sin embargo al unirse a proteínas adquieren una naturaleza quiral. Por lo que es posible estudiar la integridad de los sitios de unión de los cofactores dentro de regiones espectrales específicas.
- Plegamiento de proteínas: La aproximación experimental involucra el estudio del replegamiento de proteínas desnaturalizadas. El DC se utiliza para medir la tasa de adquisición de estructura secundaria y terciaria durante el proceso de plegamiento.

Los ensayos de DC se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para el control de la temperatura. El rango de longitud de onda utilizado fue de 200-260 nm. La concentración de proteína fue 0.4 mg mL⁻¹, los experimentos se realizaron en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico, en presencia de amortiguador A a una temperatura de 25°C.

Rampa de temperatura

Los experimentos de desnaturalización por temperatura se siguieron mediante DC utilizando un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para el control de la temperatura y se determinó el cambio en la señal de elipticidad a 222 nm, como función de la temperatura. Se desnaturalizó a las proteínas elevando la temperatura a una velocidad de 1 °C min⁻¹ desde 20 hasta 75°C, la concentración de proteína utilizada fue de 0.3 mg mL⁻¹ en amortiguador A. La temperatura de la muestra fue monitoreada por un termopar localizado en el interior de la celda y se corrigió la temperatura real de la muestra. Antes y después de cada desnaturalización se obtuvo un espectro de DC para observar el cambio en la señal provocado por el proceso de desnaturalización (200- 260 nm y en las mismas condiciones referidas anteriormente). Suponiendo un proceso simple de dos estados, el valor de la variable observada en cada punto del proceso de desplegamiento, es en realidad la resultante de la fracción de proteína que se encuentra en estado nativo y la que se encuentra en estado desnaturalizado (2):

$$y_{obs} = y_N * f_N + y_D * f_D \quad (2)$$

Donde y_{obs} es la elipticidad molar en cada punto, y_N es la elipticidad molar observada para el estado nativo, y_D es la elipticidad molar observada para el estado desnaturalizado; f_N y f_D son las fracciones de proteína en el estado nativo y desnaturalizado, respectivamente.

Dado que,

$$f_N + f_D = 1 \quad (3)$$

Es posible obtener la ecuación 1 solamente en términos de f_D . Al despejar para obtener el valor de esta variable, obtenemos lo siguiente:

$$f_D = \frac{y_{obs} - y_N}{y_D - y_N} \quad (4)$$

Los datos del cambio en la señal espectroscópica en función de la temperatura fueron normalizados y se presentan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$f_D = \frac{[D]}{[N]+[D]} = \frac{(y_N+mN)-y_{obs}}{(y_N+mNT)-(y_D+mDT)}, \quad f_N=1 - f_D \quad (5,6)$$

Donde f_D es la fracción de proteína en estado desnaturalizado, f_N es la fracción de proteína en estado nativo, y_{obs} es la señal espectroscópica a una temperatura dada, $(y_N + m_N T)$ y $(y_D + m_D T)$ son los ajustes a una línea recta de la pre y post transiciones respectivamente (y es la ordenada al origen, m la pendiente y T la temperatura).

Los datos obtenidos de esta manera se ajustaron a la ecuación de Boltzmann, la cual describe una curva sigmoide con pendiente para obtener la temperatura media de desnaturalización aparente (T_m^{app}). No se utilizó la ecuación de Gibbs-Helmholtz ya que el desplegamiento de AR y 2,5-DKGRA resultó ser irreversible.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica muy poderosa que nos permite caracterizar los cambios conformacionales en las proteínas u otras biomoléculas, inducidos por un incremento gradual en la temperatura. Un calorímetro diferencial de barrido consiste básicamente de dos celdas, una de referencia (amortiguador) y una celda de muestra (proteína). En un experimento típico, ambas celdas son calentadas simultáneamente a una tasa constante y el instrumento compensa la diferencia de temperatura entre las mismas, aplicando una potencia de voltaje determinada para equilibrar la temperatura entre ellas. Por lo que, el resultado obtenido, es proporcional a la diferencia que existe en la capacidad calorífica de las dos celdas. El perfil típico obtenido de un experimento de DSC consiste en un pico (transición) el cual se atribuye a la absorción calorífica asociada con la desnaturalización de la proteína, en tanto que los valores de la pre-transición y la post-transición reflejan las capacidades caloríficas parciales de los estados nativo y desplegado, respectivamente (Sanchez-Ruiz *et al.*, 2006). Normalmente, se realiza una corrida

calorimétrica con amortiguador en ambas celdas para poder calcular la línea base instrumental. Las trazas calorimétricas se normalizan a partir de la concentración de proteína y restando la línea base instrumental y química del proceso para obtener así la capacidad calorífica en exceso (C_p^{exc}).

Los experimentos de DSC se realizaron en un equipo VP-Capillary (MicroCal, GE © Healthcare) del laboratorio de Biofísicoquímica (FQ -UNAM). Se hicieron experimentos variando la concentración de proteína (0.4 y 1.8 mg mL⁻¹) en el caso de la 2,5-DKGRA y (0.4 y 1 mg mL⁻¹) en el caso de la AR, así como la velocidad de barrido (60, 90, 120, 150, 180 K h⁻¹), en todos los casos se utilizó amortiguador A. Se corrieron líneas base (amortiguador-amortiguador) a la velocidad de barrido del experimento en curso. El rango de temperaturas usado fue de 20-80°C. Las trazas se analizaron en el software de Origin 7 Microcal LLC DSC v.7.0. en donde primero se restó la línea base del amortiguador (línea base química), se corrigió el tiempo de respuesta del equipo y los datos se normalizaron por la concentración de proteína.

Para obtener el ΔH total del proceso (ΔH_{cal}) se calculó el área bajo las curvas al que se les restó la línea base química, por lo mismo, representan la C_p^{exc} :

$$\Delta H_{cal} = \int C_p^{exc} dt \quad (7)$$

Cada traza se ajustó a un modelo de dos estados irreversible, descrito como una cinética de primer orden:



En donde la proteína nativa N pasa a un estado final F, con una constante k de velocidad que describe el proceso de desplegamiento, a este modelo se le conoce como el de Lumry-Eyring (J M Sanchez-Ruiz, 1992). La ecuación 6 supone ese modelo y describe el comportamiento de los datos:

$$C_p^{AP} = C_p^{Pre} + (C_p^{Post} - C_p^{Pre})(1 - x_N) - \Delta H \frac{dx_N}{dT} \quad (9)$$

Donde x_N es la fracción molar del estado nativo, ΔH es la entalpía de denaturalización y C_p^{Pre} y C_p^{Post} son las líneas base de pre y post-transición, respectivamente (Costas *et al.*, 2009).

A partir del ajuste de las trazas a diferentes velocidades de barrido, se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad del proceso (k) para poder realizar los gráficos de Arrhenius:

$$\frac{1}{2\pi} \ln k = \ln km - \frac{1}{Tm} - \frac{E_A}{R} * \frac{1}{T} \quad (10)$$

En donde km está dada por:

$$km = VB * \frac{E_A}{T_m} \quad (11)$$

VB es la velocidad de barrido en grados por minuto, E_A es la energía de activación, R la constante de los gases y T_m la temperatura media de desnaturalización.

a) Cálculo de los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de desnaturalización

Para realizar este cálculo se asumió que la desnaturalización de las proteínas seguía una cinética de decaimiento de primer orden como se muestra en la ecuación 12. El valor de la constante k se calculó a partir del gráfico de Arrhenius, considerando 4 velocidades de barrido distintas (60, 90, 120 y 150 K min⁻¹) y una temperatura de 25°C.

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (12)$$

En la ecuación 12, N es la cantidad de proteína desplegada, N_0 representa la cantidad de proteína nativa, k es la constante de decaimiento y t el tiempo.

A partir de la ecuación 12 es posible estimar el valor de $t_{1/2}$, ya que a este tiempo la relación N/N_0 es igual a 0.5. Por lo que al despejar de la ecuación 12, se obtiene lo siguiente:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (13)$$

Desnaturalización por agentes químicos

Las soluciones de urea e hidrocloreuro de guanidinio (GdnHCl) fueron preparadas antes de cada experimento a una concentración cercana a la deseada. La concentración real fue determinada midiendo el índice de refracción de cada solución, junto con el del amortiguador base, utilizando un refractómetro ATAGO 3T. Los índices de refracción obtenidos se introdujeron al servidor en línea: <http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>, el cual calcula la concentración, basándose en una curva patrón de la diferencia entre el índice de refracción de la solución con desnaturalizante y el amortiguador base.

Todas las mediciones de desnaturalización química se realizaron en el espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para el control de la temperatura y se determinó el cambio en la señal de elipticidad a 220 nm, como función de la concentración de agente desnaturalizante. Todos los experimentos se realizaron a 25°C en presencia de amortiguador A.

a) Determinación de los tiempos de equilibrio del proceso de desplegamiento

La determinación del tiempo que requirió el proceso de desplegamiento químico para ambas enzimas se realizó en el espectropolarímetro anteriormente referido y se determinó el cambio en la señal de elipticidad a 220 nm como función de la concentración de agente desnaturalizante. La concentración de proteína que se utilizó en ambos casos fue de 0.3

mg mL⁻¹, las muestras se incubaron a 25°C por 19, 29 y 48 horas, en el caso de la urea y a 8, 27 y 47 horas en el caso del GdnHCl.

b) Evaluación de la reversibilidad en el proceso de desplegamiento

La reversibilidad del proceso de desnaturalización se evaluó comparando la curva de desplegamiento (N→D), en la cual se utilizó proteína a 0.1 mg mL⁻¹, previamente incubada con concentraciones crecientes de agente desnaturalizante por 24 horas a 25°C, y la curva de replegamiento (D→N) en la cual se diluyó gradualmente la concentración del agente caotrópico, con amortiguador A.

Para la realización de las curvas de renaturalización en el caso de la urea, se incubaron ambas enzimas a 1 mg mL⁻¹ a 25°C a una concentración final de urea de 7 M (AR) y 5 M (2,5-DKGRA) por 24 horas. En el caso del GdnHCl, las proteínas se incubaron a 1 mg mL⁻¹ a una concentración final de 3 M de agente desnaturalizante, por el mismo intervalo de tiempo utilizado en la urea.

Los datos del cambio de la señal espectroscópica en función de la concentración de agente desnaturalizante se analizaron del mismo modo que los datos obtenidos con la rampa de temperatura, como muestran las ecuaciones (2-5) previamente descritas. Sólo que en este caso se consideró la concentración de agente caotrópico en cada punto, en vez de la temperatura. Con este tipo de análisis fue posible calcular la concentración media aparente de agente desnaturalizante (C_m^{app}) en cada caso.

c) Espectros de fluorescencia intrínseca en presencia de urea y GdnHCl

Para la realización de las curvas de desplegamiento (N→D) en urea y en GdnHCl se utilizó una concentración final de proteína de 0.1 mg mL⁻¹, y se varió gradualmente la concentración de agente desnaturalizante. Las muestras fueron incubadas por 24 horas a 25°C previas a la medición de los espectros de fluorescencia. Para la construcción de las curvas de renaturalización (D→N), las proteínas fueron incubadas por 24 horas a 25°C en urea 5 M, y en el caso del GdnHCl a 2.5 M (AR) y 3 M (2,5-DKGRA). Posteriormente, se diluyó gradualmente la concentración de agente caotrópico utilizado y se incubaron las muestras por segunda ocasión, en las mismas condiciones referidas anteriormente.

Las mediciones de fluorescencia intrínseca (FI) se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS ©) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience ®) para controlar la temperatura. Se utilizó amortiguador A, la temperatura de medición fue de 25°C, se utilizó una celda de cuarzo de 0.5 x 0.5 cm, y se excitó a $\lambda_{exc}=295$ y se midió la emisión en el intervalo de 310 a 400 nm, monitoreando la intensidad de fluorescencia cada 1 nm. El centro de masa espectral (CME) se calculó mediante $CME = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$, donde la I_λ es la intensidad de fluorescencia para cada longitud de onda (λ).

d) Cálculo de los valores de ΔG_D^{app} a partir de las curvas de desnaturalización con agentes químicos

Para calcular los valores de ΔG_D^{app} de cada una de las proteínas estudiadas, se tomaron en cuenta las curvas de desnaturalización obtenidas a diferentes concentraciones de agente desnaturalizante (urea o GdnHCl). La variable espectroscópica que se tomó en cuenta para evaluar el cambio de N→D fue la señal de DC a 220 nm. Para realizar el cálculo de ΔG_D^{app} se asumió un modelo de dos estados reversible. A partir de las mediciones de

DC, se estimó el valor de la constante de equilibrio de desplegamiento k_{eq} (ecuación 14) para cada concentración de agente desnaturizante.

$$k_{eq} = \frac{y - y_N}{y_D - y} \quad (14)$$

En donde y es la señal de DC a cada concentración de agente desnaturizante, y_N la señal de DC de la proteína en estado nativo, y y_D la señal de DC de la proteína en estado desplegado.

Con cada valor de k_{eq} , se calculó el valor de ΔG para cada concentración de agente desnaturizante, utilizando la ecuación 15.

$$\Delta G = -RT \ln k_{eq} \quad (15)$$

En donde ΔG es la energía libre de Gibbs, R representa la constante de los gases ideales, T la temperatura (25°C) y k_{eq} la constante de equilibrio de desplegamiento. A partir de los valores de ΔG calculados (variable dependiente) y de las concentraciones de agente desnaturizante (variable independiente), se construyó un gráfico, el cual se ajustó a la ecuación de una línea recta (ecuación 16). A partir de este ajuste, se tomó el valor de la intersección "b", el cual representa finalmente el valor del ΔG_D en agua.

$$y = mx + b \quad (16)$$

Con el objetivo de hacer una comparación de los valores de ΔG_D , se utilizó un segundo método para estimar este parámetro. En el cual se consideró la ecuación 17.

$$\Delta G^{H_2O} = m * C_m \quad (17)$$

En donde la energía libre de Gibbs de desnaturalización se obtiene a partir de la multiplicación del valor m de desnaturalización, por el valor de la concentración media de agente desnaturizante (C_m). Para calcular los valores del parámetro m , se utilizaron las relaciones matemáticas descritas por Myers *et al.*, 1995 que se presentan a continuación.

- GdnHCl :

$$m = (0.18)(\Delta ASA_{np}) + (0.5)(\Delta ASA_p)$$

- Urea :

$$m = (0.15)(\Delta ASA_{np}) + (0.08)(\Delta ASA_p)$$

(18)

En donde los valores del área accesible al solvente polar ΔASA_p y no polar ΔASA_{np} se calcularon según las ecuaciones 19 y 20. En las cuales se utilizaron los valores de ΔASA_{extp} (ASA polar considerando la cadena de proteína desplegada o extendida) y de ΔASA_{extnp} (ASA no polar considerando la cadena de proteína desplegada o extendida) obtenidos a partir del servidor en línea Vadar 1.8 (<http://vadar.wishartlab.com>).

$$\Delta ASA_p = ASA_{extp} - ASA_p \quad (19)$$

$$\Delta ASA_{np} = ASA_{extnp} - ASA_{np} \quad (20)$$

Análisis y comparación de las estructuras cristalográficas

En todos los análisis se utilizaron las estructuras cristalográficas reportadas en la base de datos del PDB. Los códigos de identificación para cada una de ellas son los siguientes: AR de *Homo sapiens* (PDB ID: 4PRR obtenida a 1.01 Å), 2,5-DKGRA de *Corynebacterium sp.* (PDB ID: 1HW6 obtenida a 1.9 Å), AKR11B de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 1PZ1 obtenida a 2.2 Å), subunidad α de la triptófano sintasa de *Escherichia coli* (PDB ID: 1V7Y obtenida a 2.5 Å), desaminasa de adenosina (ADA) de *Mus musculus* (PD ID: 3MVI obtenida a 1.6 Å), subunidad HisF de *Thermotoga maritima* (PDB ID: 1THF obtenida a 1.45 Å) y la proteína diseñada *de novo* sTIM-11 (PDB ID: 5BVL obtenida a 1.99 Å).

a) Cálculo de la presencia de poros, túneles y cavidades

Se usó el programa MOLE 2.0 (<http://mole.upol.cz/>) (Berka *et al.*, 2012) para realizar la búsqueda de túneles, cavidades, y el volumen de las estructuras cristalográficas. Se utilizó el valor del radio atómico preestablecido en el programa y se realizó una trayectoria aleatoria de búsqueda.

b) Cálculo del número de puentes de hidrógeno y puentes salinos

Se utilizó una rutina clásica del programa Chimera 1.8 (Pettersen *et al.*, 2004) para determinar el número de puentes de hidrógeno presentes en las proteínas seleccionadas. Por otra parte, se utilizó el servidor en línea Salt Bridges in Protein Structures (SBPS) (<http://cluster.physics.iisc.ernet.in/sbps/>) (Gurusaran *et al.*, 2014) para determinar el número de puentes salinos presentes en la proteína tomando en cuenta un rango de 2-4 Å.

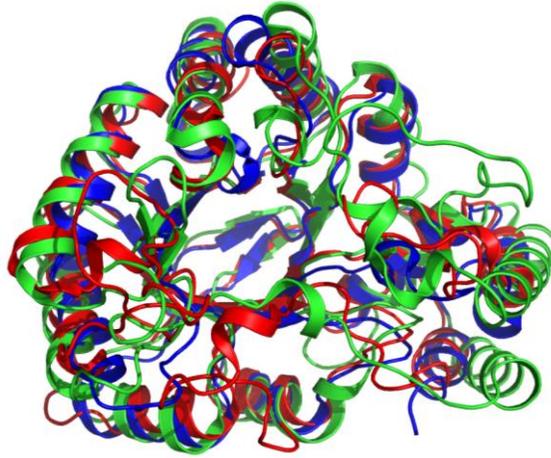
c) Estimación del estado oligomérico, cálculo de la energía libre de formación del oligómero y del área accesible al solvente (ASA)

Para realizar este análisis, se utilizó el servidor en línea PDBePISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver) (Krissinel *et al.*, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Alineamiento estructural y de secuencia de las proteínas seleccionadas*

(a)



(b)

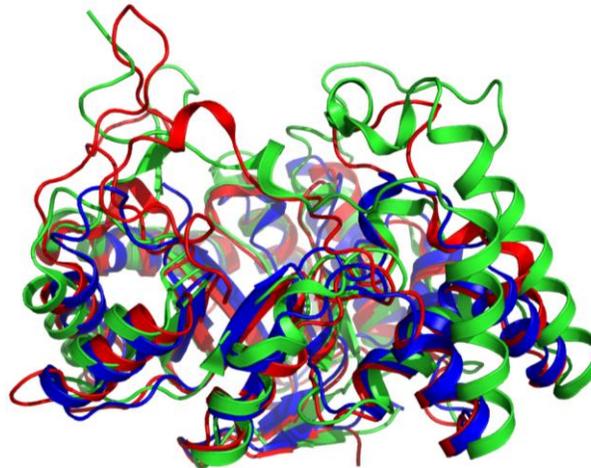


Figura 10. Alineamiento estructural de AR (PDB ID: 4PRR) (●), 2,5-DKGRA (PDB ID: 1HW6) (●) y AKR11B (PDB ID: 1PZ1) (●). Se muestra la vista superior (a) y lateral (b) de los alineamientos estructurales.

	10	20	30	40	50																																								
AKR11B	ME	Y	T	S	I	A	D	T	G	I	E	A	S	R	I	G	L	G	T	W	A	I	G	G	T	M	W	G	G	T	D	E	K	T	S	I	E	T	I	R	A	A	L	D	Q	G	I	T		
AR	MA	S	R	L	L	L	N	N	G	A	K	M	P	I	L	G	L	G	T	W	K	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DKGRA	MT	V	P	S	I	V	L	N	D	G	N	S	I	P	Q	L	G	Y	G	V	F	K	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	60	70	80	90	100																																								
AKR11B	M	I	D	T	A	P	A	Y	G	F	G	Q	S	E	E	I	V	G	K	A	I	K	E	Y	-	-	-	-	G	K	R	D	Q	V	I	L	A	T	K	T	A	L	D	W	K	N	N	Q	L	
AR	H	I	D	C	A	H	V	Y	-	-	Q	N	E	N	E	V	G	V	A	I	Q	E	K	L	R	E	Q	V	V	K	R	E	E	L	F	I	V	S	K	L	W	C	T	Y	H	-	-	-	-	
DKGRA	H	I	D	T	A	A	I	Y	-	-	G	N	E	E	G	V	G	A	A	I	A	-	-	-	-	A	S	G	I	A	R	D	D	L	F	I	T	T	K	L	W	N	D	R	H	-	-	-	-	
	110	120	130	140	150																																								
AKR11B	F	R	H	A	N	R	A	R	A	R	I	V	E	E	V	E	N	S	L	K	R	L	Q	T	D	Y	I	D	L	Y	Q	V	H	W	P	D	P	L	V	P	-	-	-	-	-	-	-	-		
AR	-	-	-	-	E	K	G	L	V	K	G	A	C	Q	K	T	L	S	D	L	K	L	D	Y	L	D	L	Y	L	I	H	W	P	T	G	F	K	P	G	K	E	F	F	P	L	D	E	S	G	N
DKGRA	-	-	-	-	D	G	D	E	P	A	A	A	I	A	E	S	L	A	K	L	A	L	D	Q	V	D	L	Y	L	V	H	W	P	T	P	A	A	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

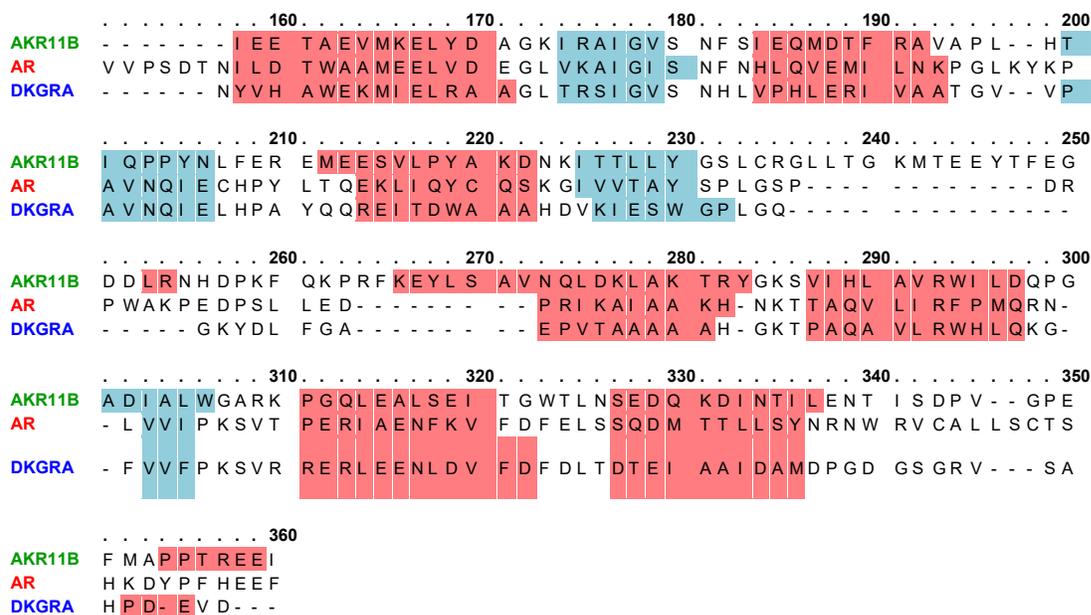


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencia de AR, 2,5-DKGRA y AKR11B. Los segmentos en color salmón señalan los elementos de estructura secundaria que corresponden a hélices, y en color azul claro se indican las hebras β .

Tabla 9. Comparación de los valores de porcentaje de identidad de secuencia (%) y RMSD de AR, 2,5-DKGRA y AKR11B.

	AR		2,5-DKGRA		AKR11B	
	%	RMSD	%	RMSD	%	RMSD
AR	-	-	37.18	1.213 Å	25.70	1.588 Å
2,5-DKGRA	-	-	-	-	25.67	3.123 Å
AKR11B	-	-	-	-	-	-

Al comparar las secuencias de aminoácidos de las proteínas seleccionadas, se encontró que éstas comparten un porcentaje de identidad que no supera el 40% (Tabla 9). La diferencia observada refleja el hecho de que, aun cuando estas proteínas se agrupan dentro de la misma superfamilia de las ACRs, éstas pertenecen a familias distintas dentro de la misma, por un lado AR pertenece a la familia 1, AKR11B a la familia 11 y la 2,5-DKGRA a la familia 5. El agrupamiento diferencial de estas proteínas se relaciona con que cada una de

las proteínas posee una distribución distinta, así como variaciones importantes en las asas catalíticas A, B y C (Hyndman *et al.*, 2002).

En la figura 11 se indican los elementos de estructura secundaria dentro del alineamiento múltiple de secuencia. De manera general, se observa una distribución similar de hélices y hebras β , aunque también se aprecian variaciones en la longitud de estos elementos dentro de las estructuras de AR, 2,5-DKGRA y AKR11B.

Tras analizar los datos se encontró la mayor similitud estructural entre AR y 2,5-DKGRA, ya que su valor de RMSD fue de 1.213 Å, aun cuando su porcentaje de identidad de secuencia fue del 37.18 %. Este fenómeno se ha descrito en general para los barriles TIM ya que, las proteínas que presentan este tipo de plegamiento no poseen un alto grado de identidad de secuencia. Sin embargo, ciertos estudios sugieren que este plegamiento parece no estar determinado por los detalles en la secuencia de aminoácidos, sino por ciertas características generales como lo son la distribución de residuos polares y no polares (Wallace *et al.*, 2002). En contraste, se encontró la diferencia estructural más grande entre 2,5-DKGRA y AKR11B, ya que su valor de RMSD es superior a 3 Å y su porcentaje de identidad de secuencia no supera el 30 %.

Subclonación de los genes en un vector de expresión

Una vez que se recibieron los genes de la compañía GenScript, los cuales se encontraban dentro del vector de almacenamiento pUC57, se liberaron mediante el corte con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* y se subclonaron en el vector de expresión pET-28b(+). Tras la ligación, se analizó la construcción con digestiones sencillas y dobles (Figura 12).



Figura 12. Digestión de las construcciones de los genes de AR, AKR11B y 2,5-DKGRA con el vector de expresión pET-28b (+). **(1)**: Marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder, New England BioLabs ®), **(2)**: construcción de AR sin digerir, **(3)**: construcción de AR digerida con *XhoI*, **(4)**: construcción de AR digerida con *NdeI*, **(5)**: construcción de AR digerida con *XhoI* y *NdeI*, **(6)**: construcción de AKR11B sin digerir, **(7)**: construcción de AKR11B digerida con *XhoI*, **(8)**: construcción de AKR11B digerida con *NdeI*, **(9)**: construcción de AKR11B digerida con *XhoI* y *NdeI*, **(10)**: construcción de 2,5-DKGRA sin digerir, **(11)**: construcción de 2,5-DKGRA digerida con *XhoI*, **(12)**: construcción de 2,5-DKGRA digerida con *NdeI*, **(13)**: construcción de 2,5-DKGRA digerida con *XhoI* y *NdeI*, **(14)**: marcador de peso molecular.

Sobreexpresión de las enzimas

Para observar la sobreexpresión de las proteínas se hicieron pruebas en volumen pequeño (10 mL). Tras la realización de éstas, se encontró que todas las proteínas se sobreexpresaban correctamente. Sin embargo, en todos los casos, la mayor parte de la proteína se observó en la fracción insoluble (Figura 13).

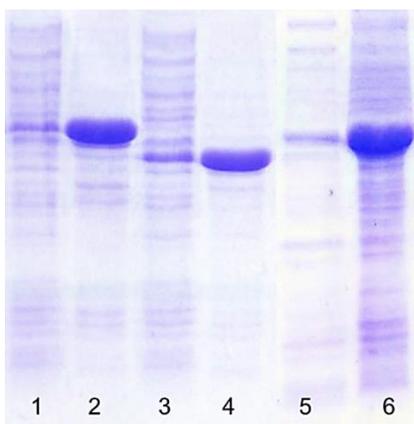


Figura 13. Pruebas de sobreexpresión en volumen pequeño de las ACRs. Carril (1): Sobrenadante de AKR11B, (2): fracción insoluble de AKR11B, (3): sobrenadante de 2,5-DKGRA, (4): fracción insoluble de 2,5-DKGRA, (5): sobrenadante de AR, (6): fracción insoluble de AR.

- *Sobreexpresión de AR y 2,5-DKGRA de forma soluble*

Al inicio se decidió utilizar el protocolo establecido en el laboratorio para purificar a la enzima trifosfato isomerasa, en el cual se utiliza un amortiguador base que contiene 35 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0. Sin embargo, al utilizar este protocolo para las ACRs, el rendimiento obtenido fue muy bajo, como se describe a continuación en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Tabla de purificación de AR obtenida con el protocolo de purificación de las TIMs. Los valores de actividad total y específica se calcularon utilizando 2 mM de *p*-nitrobenzaldehído como sustrato.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad total ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Número de veces purificada (n)	Rendimiento (%)
Antes de la columna HisTrap (Sobrenadante)	30	16.7	501.12	11718.68	23.38	1	100
Después de la columna HisTrap (con His Tag)	7	0.73	5.12	316.6	61.87	2.64	2.7
Después de la columna HisTrap (sin His Tag)	7	0.37	2.55	1305.46	510.94	21.84	11.14

Tabla 11. Tabla de purificación de 2,5-DKGRA obtenida con el protocolo de purificación de las TIMs. Los valores de actividad total y específica se calcularon utilizando 30 mM de DHA como sustrato.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad total ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Número de veces purificada (n)	Rendimiento (%)
Antes de la columna HisTrap (Sobrenadante)	30	19.63	589.02	97567.37	165.64	1	100
Después de la columna HisTrap (con His Tag)	5	1.20	6.03	3328.63	552.47	3.34	3.42
Después de la columna HisTrap (sin His Tag)	5	0.13	0.625	1961.41	3138.26	18.94	2.01

La utilización de condiciones no adecuadas durante la expresión, purificación y almacenamiento de las proteínas puede alterar su estructura, favoreciendo procesos de agregación que se acompañan generalmente de la pérdida concomitante de su actividad biológica. Para solucionar este problema, pueden utilizarse una amplia variedad de co-solventes en el amortiguador que faciliten su correcto plegamiento y solubilidad.

Los co-solventes ejercen sus efectos desestabilizando los agregados, o favoreciendo la estabilidad de las proteínas nativas (Bondos *et al.*, 2003). Debido a que, las condiciones de purificación utilizadas no parecían ser las óptimas para AR y 2,5-DKGRA, se decidió probar distintas condiciones en la composición del amortiguador para evaluar si en alguna de ellas, se lograba tener una mayor concentración de proteína soluble y en cantidades suficientes para realizar su caracterización.

En estas pruebas se utilizó únicamente 2,5-DKGRA por cuestiones de simplicidad y cantidad de proteína disponible. Para evaluar el fenómeno de agregación se usó la técnica de DLS. El equipo utilizado (Materiales y métodos) tiene un límite de detección en un rango de 0.15 nm a 1.0 μm de radio hidrodinámico. 2,5-DKGRA tiene un R_s calculado de $\sim 31 \text{ \AA}$ (3.1 nm), por lo que cae dentro del límite de detección del equipo. Se decidió utilizar esta técnica debido a que resulta útil para reconocer agregados grandes en condiciones donde la proteína no se encuentra en su estado monomérico nativo. Se usó una relación proteína: buffer de 10:100, con una concentración final de proteína de 0.1 mg mL^{-1} . A continuación, se presenta la tabla 12, en donde se describe detalladamente el radio hidrodinámico de la proteína en cada una de las condiciones de amortiguador probadas. En todos los casos, se describe únicamente el tamaño de las especies con más del 90% de porcentaje en masa.

Tabla 12. Estudio del fenómeno de agregación por DLS de 2,5-DKGRA en distintos amortiguadores. Se muestran únicamente las especies con más del 90% de porcentaje en masa. El amortiguador base en todos los casos fue Tris 20 mM, pH 8.0, y la concentración final de proteína utilizada fue de 0.1 mg mL⁻¹.

Tipo de cosolvente presente en el amortiguador	Radio hidrodinámico de la proteína (nm)
Tris 20 mM	9.33 ± 1.74
Glucosa 0.5 M, L-arginina 0.2 M	12.89 ± 1.51
Glucosa 0.5 M, CaCl ₂ 100 mM	11.76 ± 1.99
Glucosa 0.5 M, DTT 1 mM	3.878 ± 0.75
Glicerol 10%	6.75 ± 0.42
Glicerol 10%, glicina 0.1%	10.72 ± 3.11
Glicerol 10%, sorbitol 10%	31.02 ± 14.72

Como se muestra en la tabla 12, en la mayoría de las condiciones probadas se observa un fenómeno de agregación de la proteína. Excepto en la condición que contiene Glucosa 0.5 mM y DTT a una concentración de 1 mM. Ya que en ésta el radio hidrodinámico promedio de las especies presentes en solución concuerda con el valor teórico del tamaño de la proteína, es decir, que en esta condición la proteína se encuentra en su estado monomérico nativo.

Con el objetivo de encontrar un amortiguador de la composición más sencilla posible que permitiera purificar ambas proteínas sin la presencia de tantos aditivos, se encontró que la composición óptima de éste era Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0. Se decidió utilizar esta condición para la purificación, almacenamiento y para realización del resto de los experimentos de ambas proteínas, como se describe detalladamente más adelante.

- *Pruebas de sobreexpresión de AKR11B para obtenerla en la fracción soluble*

La primera prueba que se realizó para obtener a la proteína AKR11B en la fracción soluble fue inducir a 18°C durante 8 horas, con 0.5 mM de IPTG. Se tomaron alícuotas cada dos horas para evaluar si a tiempos menores de inducción era posible obtener a la proteína soluble. Sin embargo en ninguno de los tiempos sondeados esto se logró. (Figura 14).

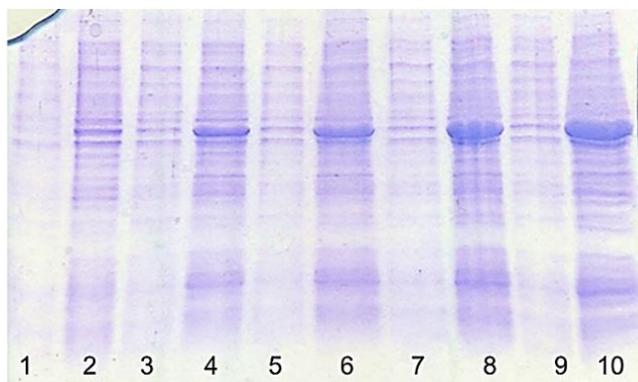


Figura 14. Pruebas de sobreexpresión de AKR11B a 18°C. Carril (1): sobrenadante antes de inducir, (2): pastilla antes de inducir, (3): sobrenadante a las 2 horas post-inducción (p.i), (4): fracción insoluble 2 horas p.i, (5): sobrenadante 4 horas p.i, (6): fracción insoluble 4 horas p.i, (7): sobrenadante 6 horas p.i, (8): fracción insoluble 6 horas p.i, (9): sobrenadante 8 horas p.i, (10): fracción insoluble 8 horas p.i.

La segunda prueba que se realizó fue solubilizar la pastilla obtenida a 18°C de la prueba anterior, con un amortiguador que contiene 0.5 M de NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris, 0.1% Tritón X100, pH 8.0; cuya utilización ya había sido reportada durante la purificación de esta enzima (Ehrensberger, *et al*, 2003). Tras disolver la pastilla en este amortiguador, las células se rompieron por sonicación en volumen pequeño, se centrifugaron, se recuperó el sobrenadante y se corrió un gel de SDS-PAGE para evaluar si se obtenía cierta fracción soluble. Sin embargo, como se muestra en la Figura 15, la cantidad de proteína en el sobrenadante es mínima en comparación con la de la fracción insoluble.

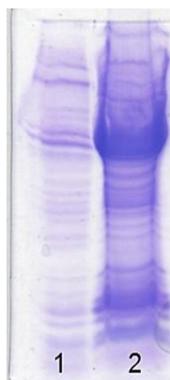


Figura 15. Prueba de solubilización de AKR11B con Tritón X100. Carril (1): Sobrenadante recuperado tras la solubilización de la proteína con el detergente, (2) fracción insoluble recuperada tras la solubilización de la proteína con el detergente.

La última prueba realizada para obtener AKR11B de forma soluble, fue romper las células con ayuda de una FRENCH® Press con 3 ciclos a 1000 psi, para evaluar si el método de rompimiento de las células estaba afectando la cantidad de proteína soluble que se obtenía (Figura 16). Sin embargo, tampoco se logró obtener una cantidad suficiente de proteína en

esta condición. Por lo que, la proteína AKR11B no logró obtenerse de manera soluble en ninguna de las condiciones probadas.

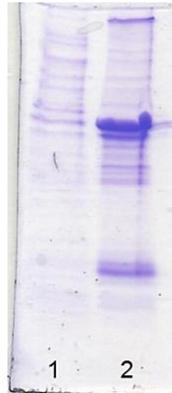


Figura 16. Prueba de rompimiento de las células con la FRENCH[®] Press en presencia de Tritón X100. Carril **(1)**: Sobrenadante recuperado tras la solubilización de la proteína con el detergente y la ruptura con la prensa de FRENCH[®] Press, **(2)**: fracción insoluble recuperada tras la solubilización de la proteína con el detergente y la ruptura con la prensa francesa.

Purificación de las enzimas

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas para la solubilización de AR y 2,5-DKGRA se procedió a obtenerlas en estado puro.

Los pasos de purificación para las dos enzimas, se siguieron por cromatografía acoplada a un sistema de FPLC. A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a cada etapa de purificación (Figuras 17 y 18).

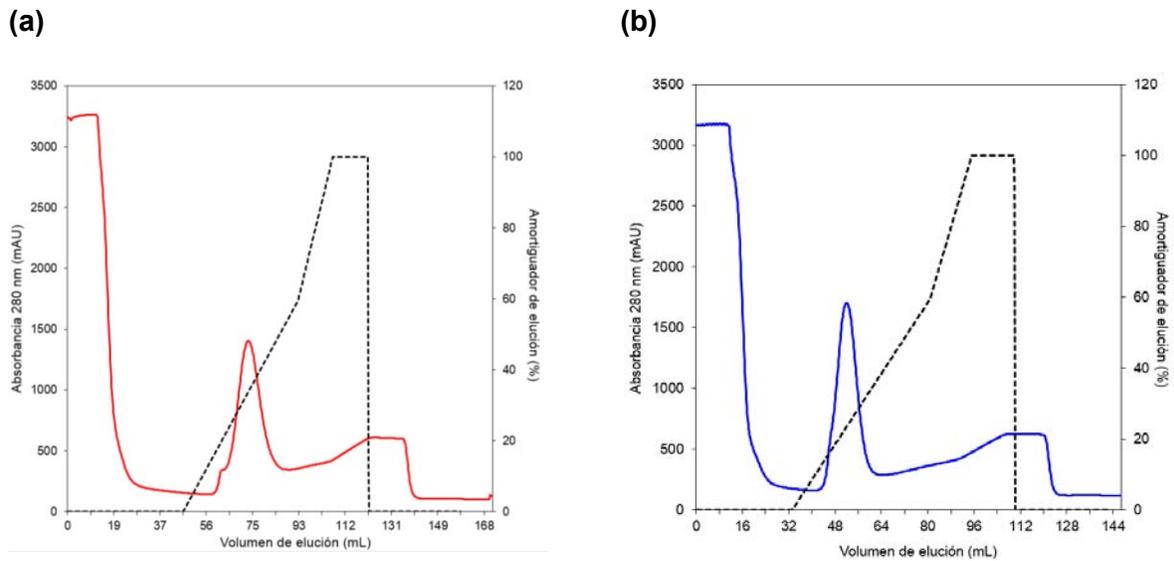


Figura 17. Primer paso de purificación para AR **(a)** en rojo y 2,5-DKGRA **(b)** en azul utilizando una columna de afinidad HisTrap® HP. El pico de elución de 60-90 mL en (a) y de 47-64 mL en (b), corresponden a las proteínas correspondientes con etiqueta de histidinas. Amortiguador de elución: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, Imidazol 500 mM, pH 8.0.

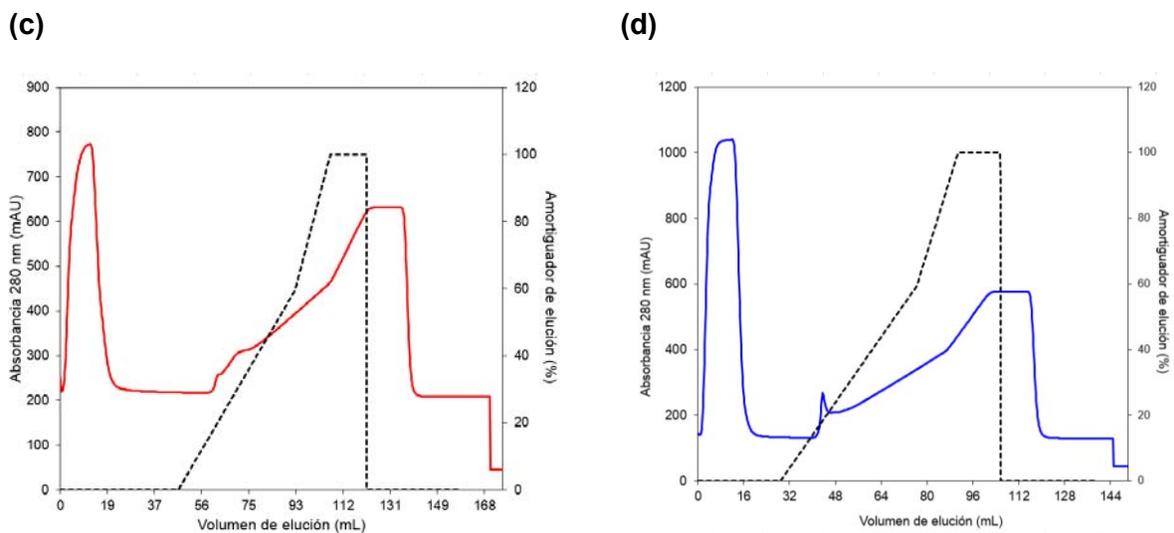


Figura 18. Segundo paso de purificación para AR **(c)** en rojo y 2,5-DKGRA **(d)** en azul utilizando una columna de afinidad HisTrap® HP. Se muestran los cromatogramas de las proteínas después del corte con el kit de trombina. El pico de elución de 0-20 mL en (a) y de 0-17 mL en (b), corresponden a las proteínas sin la etiqueta de histidinas. Amortiguador de elución: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, Imidazol 500 mM, pH 8.0

El proceso de purificación se siguió en cada paso mediante geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y por medición de actividad específica (Figura 19, Tablas 13 y 14).

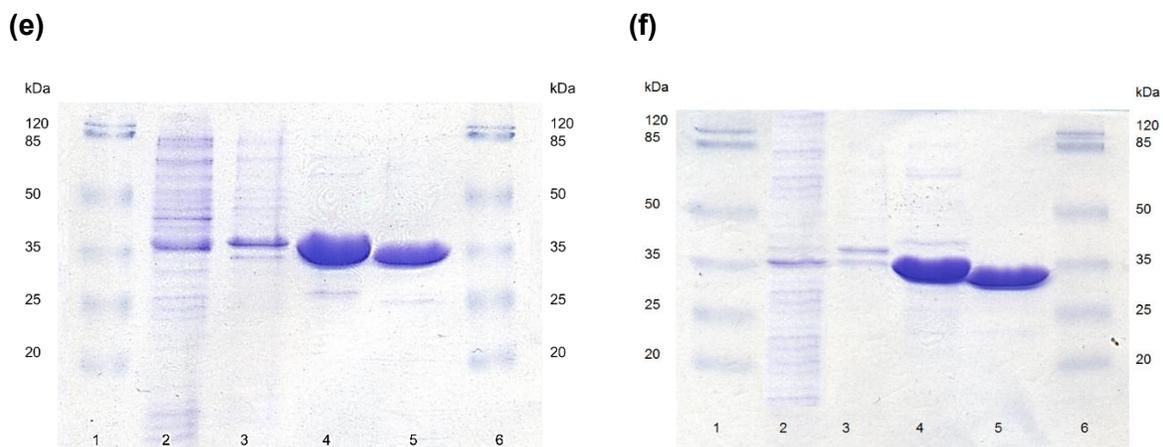


Figura 19. Pasos de purificación de AR **(e)** y 2,5-DKGRA **(f)**. Carril **(1)**: Marcador de peso molecular, **(2)**: sobrenadante después de sonicar, **(3)**: pastilla después de sonicar, **(4)**: proteína con etiqueta de histidinas (después de la primera columna His Trap), **(5)**: proteína después de cortar con trombina (después de la segunda columna His Trap), **(6)**: marcador de peso molecular.

Tabla 13. Tabla de purificación de AR obtenida con el protocolo en presencia del amortiguador Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1mM, pH 8.0. Los valores de actividad total y específica se calcularon utilizando 4 mM de DHA como sustrato.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad total ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Número de veces purificada (n)	Rendimiento (%)
Antes de la columna HisTrap (Sobrenadante)	22	12.5	275	6466.04	23.51	1	100
Después de la columna HisTrap (con His Tag)	16	1.151	18.416	2786.82	151.33	6.43	43.1
Después de la columna HisTrap (sin His Tag)	29.5	0.596	17.582	3130.60	178.05	7.57	48.41

Tabla 14. Tabla de purificación de 2,5-DKGRA obtenida con el protocolo en presencia del amortiguador Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1mM, pH 8.0. Los valores de actividad total y específica se calcularon utilizando 75 mM de DHA como sustrato.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad total ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Número de veces purificada (n)	Rendimiento (%)
Antes de la columna HisTrap (Sobrenadante)	21	34.5	724.5	112111.13	154.74	1	100
Después de la columna HisTrap (con His Tag)	8.5	2.657	22.5845	20151.76	892.28	5.77	17.97
Después de la columna HisTrap (sin His Tag)	22.5	0.892	20.07	20839.03	1038.32	6.71	18.59

Parámetros catalíticos de AR y 2,5-DKGRA

- *Comparación de los parámetros catalíticos obtenidos con los reportados en la literatura*

En este trabajo se utilizaron enzimas recombinantes expresadas y purificadas a partir de células de *E. coli* y las secuencias originales de nucleótidos de AR y 2,5-DKGRA fueron optimizadas para el uso de codones. Es importante tener esto en cuenta, debido a que los parámetros catalíticos contra los que se compara fueron determinados a partir de extractos celulares de músculo esquelético en el caso de AR, y de células de *Corynebacterium sp.* en el caso de 2,5-DKGRA.

Otro aspecto que hay que tomar en cuenta es que para ninguna de las enzimas se utilizaron sus sustratos fisiológicos, los cuales son la aldolasa en el caso de la AR y el ácido 5-diceto-D-glucónico en el caso de la 2,5-DKGRA. Si no que se utilizaron sustratos promiscuos, como lo son la DHA y el DL-Gliceraldehído para la determinación de los parámetros cinéticos, los cuales se encuentran disponibles de manera comercial.

➤ AR

Los datos experimentales obtenidos de tres lotes diferentes de la proteína AR, para los cuales se les calcularon los parámetros catalíticos, se muestran en la Figura 20. En la tabla 15, se muestra la comparación de los parámetros catalíticos obtenidos en este trabajo con los reportados previamente en la literatura.

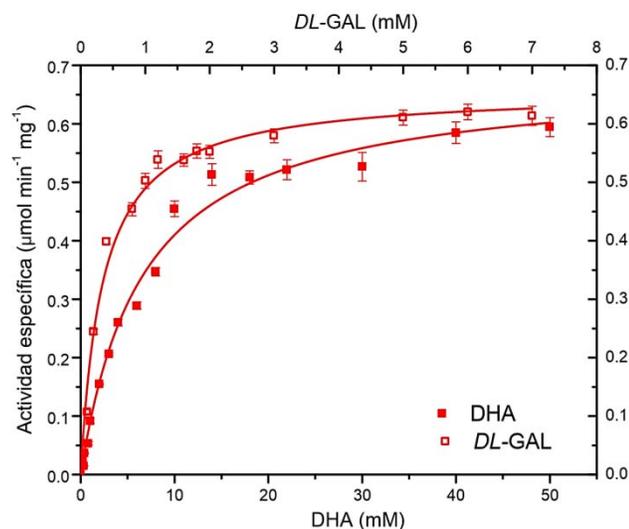


Figura 20. Cinética enzimática de AR. Los valores se determinaron a 25°C, pH 7.0 y diferentes concentraciones de DL-GAL (0-7 mM) y DHA (0-50 mM); los datos se ajustaron a una regresión no lineal con la ecuación de Michaelis- Menten. Las barras de error corresponden a los 3 diferentes lotes de proteína en los que se determinaron los parámetros catalíticos.

Tabla 15. Comparación de los parámetros catalíticos reportados en la literatura para AR, y los obtenidos en este trabajo (valores en rojo).

Sustrato	K_m^A (mM)	K_m (mM)	k_{cat}^A (min ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	Eficiencia catalítica (M ⁻¹ s ⁻¹) ^A	Eficiencia catalítica (M ⁻¹ s ⁻¹)
DL-GAL	0.73	0.34	137	26.47	190,000	1298
DHA	2.5	6.63	54	24.01	21,000	472.3

^A Los parámetros catalíticos se muestran en condiciones oxidantes para la AR de músculo esquelético humano (Vander Jagt *et al.*, 1992).

Los valores reportados en la literatura y los valores obtenidos son muy diferentes en términos de k_{cat} y de eficiencia catalítica. Sin embargo, esto podría deberse a la presencia del DTT en la enzima durante la determinación de las actividades enzimáticas. Debido a la inestabilidad de la proteína y su tendencia a la agregación durante el proceso de purificación, se decidió mantener en todo momento a AR en la presencia de este agente reductor a una concentración de 1 mM.

Existe evidencia experimental que señala la sensibilidad de la AR a la oxidación (Branlant *et al.*, 1982). Se ha demostrado que la oxidación de esta enzima induce una “activación” de la misma, así como cambios en su comportamiento cinético y en su susceptibilidad ante ciertos inhibidores (Del Corso *et al.*, 1989).

La AR posee siete residuos de cisteína en su estructura (Figura 21), de los cuales tres se encuentran expuestos en la superficie de la proteína (Cys-80, Cys-298 y Cys-303). Se ha propuesto que el residuo Cys-298, tiene un papel muy importante en la activación de la enzima durante su oxidación. Para estudiar el papel de estos residuos de cisteína, se realizó un estudio en el que se generaron tres mutantes en las posiciones 80, 298 y 303 de la AR (Petrash *et al.*, 1992). De los resultados obtenidos, se concluyó que ninguno de estos tres residuos es esencial para la actividad catalítica de la enzima, debido a que las tres mutantes son activas para todos los sustratos probados. Sin embargo, parece que la mutación de éstos ocasiona una disminución notable de la eficiencia catalítica. La alteración más importante que se observó fue para la mutación C298S, en la cual se detectó una caída abrupta del valor de la eficiencia catalítica de la enzima. Se propone que la perturbación del grupo tiol del residuo Cys-298, puede afectar directa o indirectamente las propiedades de solvatación del sitio activo, debido a su proximidad con el anillo de nicotinamida del cofactor NAD (P), el cual se encuentra a una distancia de aprox. 4 Å. Debido a que las mediciones de la actividad enzimática para AR se realizaron en presencia de DTT, es altamente probable que se haya afectado el estado de oxidación del residuo Cys-298, y que ésta sea la principal causa por la cual se obtuvieron valores notablemente bajos de los parámetros catalíticos, en comparación con los valores obtenidos de la enzima en su estado oxidado.

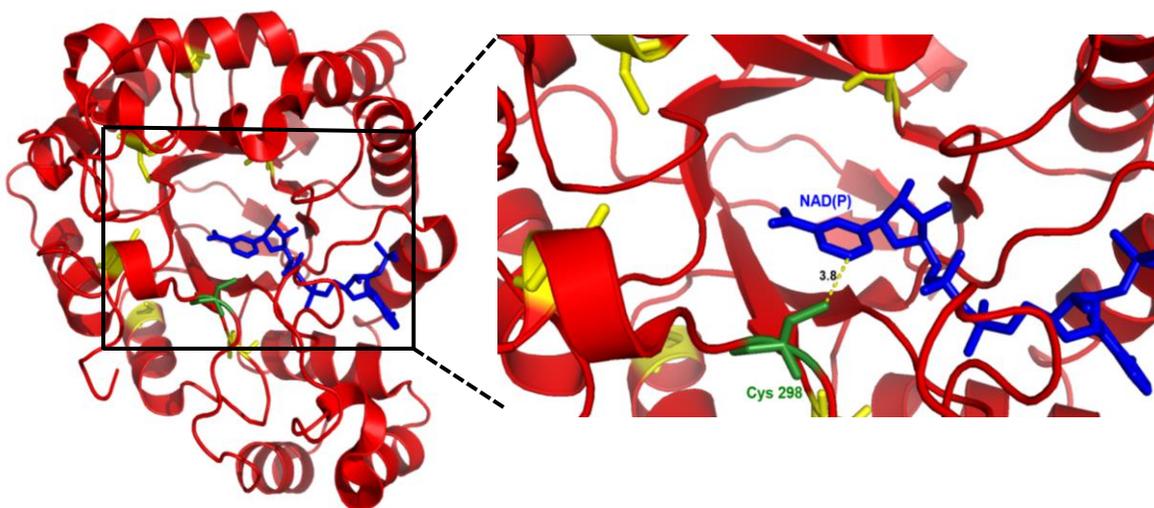


Figura 21. Estructura cristalográfica de AR. Se muestran en color amarillo los residuos de cisteína, el residuo Cys-298 en color verde y el cofactor en color azul. Se presenta un acercamiento al sitio activo de la enzima donde se indica la distancia del residuo Cys-298 al NAD (P).

➤ 2,5-DKGRA

Al igual que en el caso de la AR, se utilizaron la DHA y el *DL*-GAL como sustratos para la determinación de los parámetros catalíticos de la 2,5-DKGRA. Es importante señalar que ninguno de éstos son los sustratos “naturales” que cataliza esta enzima normalmente. Su sustrato natural y por el cual recibe su nombre, es el ácido 5-diceto-*D*-glucónico (2,5-DKG), sin embargo éste no fue utilizado debido a que no es posible obtenerlo de manera

comercial. Dado que el objetivo principal de este trabajo no es la caracterización cinética de estas proteínas sino su caracterización fisicoquímica, se decidió utilizar la DHA y el DL-GAL, los cuales se obtuvieron comercialmente de Sigma®.

Los parámetros catalíticos obtenidos para tres lotes diferentes de la proteína 2,5-DKGRA se muestran en la figura 22. En la tabla 16 se muestra la comparación de los parámetros catalíticos obtenidos en este trabajo, con los reportados previamente en la literatura.

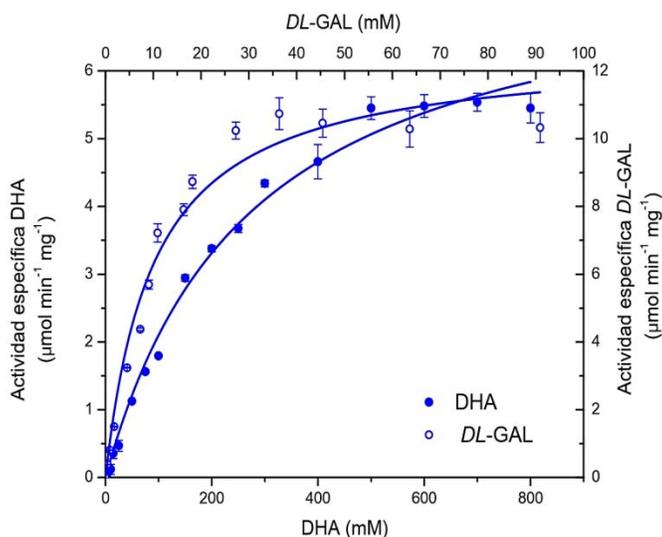


Figura 22. Cinética enzimática de 2,5-DKGRA. Los valores se determinaron a 25°C, pH 6.4 y diferentes concentraciones de DL-GAL (0-50 mM) y DHA (0-800mM); los datos se ajustaron a una regresión no lineal con una cinética tipo Michaelis- Menten. Las barras de error corresponden a los 3 diferentes lotes de proteína en los que se determinaron los parámetros catalíticos.

Tabla 16. Comparación de los parámetros catalíticos reportados en la literatura para 2,5-DKGRA, y los obtenidos en este trabajo (valores en azul).

Sustrato	K_m^c (mM)	K_m (mM)	k_{cat}^c (min ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	Eficiencia catalítica (M ⁻¹ s ⁻¹) ^c	Eficiencia catalítica (M ⁻¹ s ⁻¹)
DHA	160	273.18	178.2	230.63	12.32	14.04

^c (Miller *et al.*, 1987).

Como se observa en la Tabla 16, los valores de K_m , k_{cat} y eficiencia catalítica reportados y obtenidos para la DHA están dentro del mismo orden de magnitud. Se realizó únicamente la comparación con este sustrato, debido a que no existen reportes de la actividad catalítica de esta enzima para el DL-GAL.

En comparación con la AR, la 2,5-DKGRA no mostró ningún efecto significativo en el valor de sus parámetros catalíticos debido a la presencia de DTT durante las mediciones de actividad enzimática. En contraste con los siete residuos de Cys que AR presenta en su

estructura, la 2,5-DKGRA no contiene ningún residuo de este tipo, lo cual puede explicar la diferencia observada.

Finalmente, como se mencionó anteriormente, ninguno de los sustratos probados son los sustratos naturales de la enzima, por lo que los valores de K_m y eficiencia catalítica reflejan la poca afinidad y capacidad de catalizar que tiene la 2,5-DKGRA por la DHA y el *DL*-GAL.

Comparación de los parámetros cinéticos de AR y 2,5-DKGRA

Se observó una clara diferencia en la utilización de DHA y *DL*-GAL para ambas enzimas. Por un lado el *DL*-GAL, mostró valores más altos de eficiencia catalítica en comparación con DHA. Aunque al comparar las enzimas, se encontró que AR tiene una mayor afinidad y eficiencia catalítica para los dos sustratos utilizados, en comparación con 2,5-DKGRA como se muestra en la tabla 17 (Parámetros catalíticos).

Tabla 17. Parámetros catalíticos de AR (rojo) y 2,5-DKGRA (azul) para *DL*-GAL y DHA como sustratos.

Sustrato	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)		K_m (mM)		k_{cat} (min^{-1})		Eficiencia catalítica ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	DHA	<i>DL</i> -GAL	DHA	<i>DL</i> -GAL	DHA	<i>DL</i> -GAL	DHA	<i>DL</i> -GAL
AR	0.68 ± 0.02	0.75 ± 0.018	6.63 ± 0.61	0.34 ± 0.04	24.01	26.47	60.35	1298
2,5-DKGRA	7.8 ± 0.32	11.58 ± 0.53	273.18 ± 26.6	11.11 ± 1.66	230.63	328.16	14.07	472.3

Determinación del estado de oligomerización

A partir de las curvas de calibración construidas, se determinó el R_s y los PM experimentales. La determinación del estado oligomérico se realizó dividiendo el PM experimental sobre el PM teórico, y el número resultante redondeado fue la cantidad de monómeros presentes en la enzima (Tabla 18). Se muestran los cromatogramas para AR y 2,5-DKGRA a diferentes concentraciones de proteína (Figura 23).

Tabla 18. Estado oligomérico de AR y 2,5-DKGRA.

Proteína	Peso molecular Teórico (Da)	VE (mL)	1000/VE (mL ⁻¹)	Peso molecular experimental (Da)	Número de monómeros (n)	Radio de Stokes (Å)
AR (2 mg/mL)	35302.82	11.41	87.64	30814.80	0.87	29.92
AR (0.1 mg/mL)	35302.82	11.38	87.87	31406.17	0.89	30.10
2,5-DKGRA (0.8 mg/mL)	29568.19	11.24	88.97	34365.62	1.16	30.94
2,5-DKGRA (0.1 mg/mL)	29568.19	11.21	89.21	35045.46	1.19	31.12

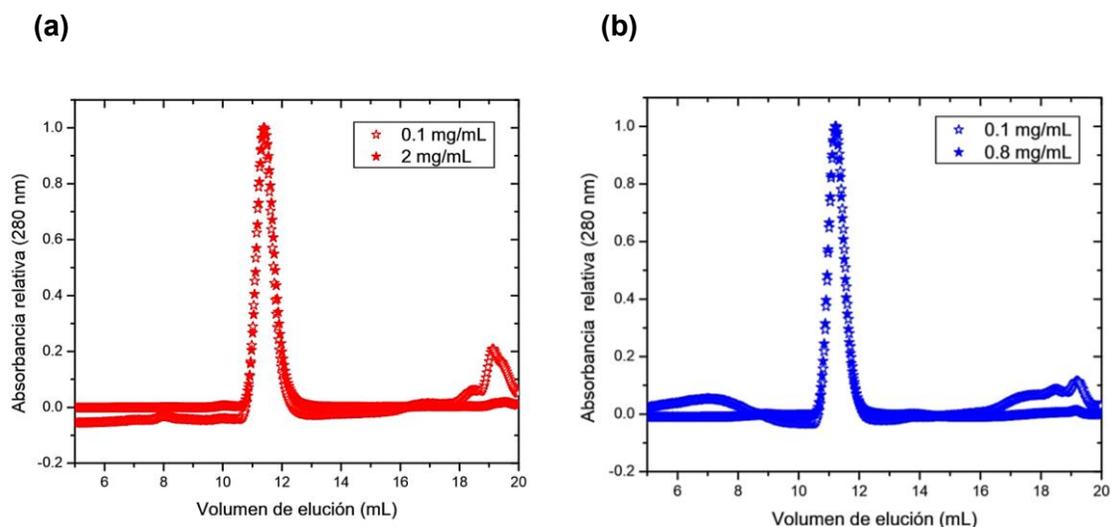


Figura 23. Cromatogramas de exclusión molecular analítica de AR (a) en rojo y 2,5-DKGRA (b) en azul. Se muestran datos normalizados de absorbancia a 280 nm. Amortiguador de elución: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0.

Mediante experimentos de exclusión molecular se confirmó que el estado oligomérico de AR y 2,5-DKGRA es monomérico. También se observó que las proteínas eluían al mismo tiempo sin importar la concentración de proteína utilizada (Figura 23). Lo cual corrobora que la proteína se mantiene como un monómero compacto tanto a concentraciones bajas (0.1 mg mL⁻¹), como a concentraciones 20 veces más altas (AR) u 8 veces más altas (2,5-DKGRA).

Mediciones espectroscópicas

- *Fluorescencia intrínseca*

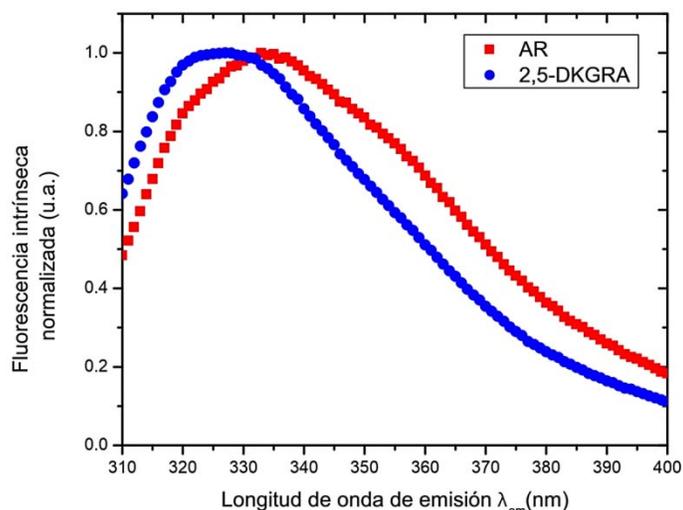


Figura 24. Espectros de emisión de fluorescencia de AR (rojo) y 2,5-DKGRA (azul) excitando a 295 nm.

Ambas proteínas presentan un máximo de emisión cercano a 330 nm, el cual es un indicativo de que los triptófanos se encuentran ocultos del solvente en un ambiente predominantemente hidrofóbico, lo cual nos confirma que las proteínas recombinantes están correctamente plegadas con la presencia de estructura terciaria. En la tabla 19, se muestra un resumen de los datos obtenidos a partir de los experimentos de fluorescencia intrínseca con las proteínas en su estado nativo.

Tabla 19. Parámetros de los espectros de emisión de fluorescencia de AR y 2,5-DKGRA.

Proteína	Número de triptófanos (n)	λ_{max} (nm)	Centro de Masa Espectral (CEM) (nm)
AR	6	333	344.81
2,5-DKGRA	6	327	340.42

- *Dicroísmo circular*

Los espectros de DC obtenidos para AR y 2,5-DKGRA muestran las propiedades características de proteínas que poseen hélices α y hebras β , con mínimos en 220 nm y 208 nm, respectivamente. La deconvolución de los espectros de DC se realizó en el

programa CDNN (Applied Photophysics ©), en la tabla 20 se indican los porcentajes de estructura secundaria obtenidos para cada enzima.

Se realizó la comparación de los valores de estructura secundaria calculados a partir de los experimentos de DC, con los porcentajes obtenidos a partir de la estructura cristalográfica de las proteínas.

AR mostró un contenido de hélices α del 37% por DC y del 34% de acuerdo a su estructura, en tanto que el contenido de hebras β estimado por DC y estructura fue del 15%.

Para la 2,5-DKGRA el porcentaje de hélices α obtenido por DC fue del 33% y a partir de su estructura fue del 37%. Por otro lado, el contenido de hebras β estimado por DC fue del 17% y de su estructura del 16%. Por lo que, los porcentajes de estructura secundaria estimados mediante DC y datos estructurales fueron muy similares entre sí.

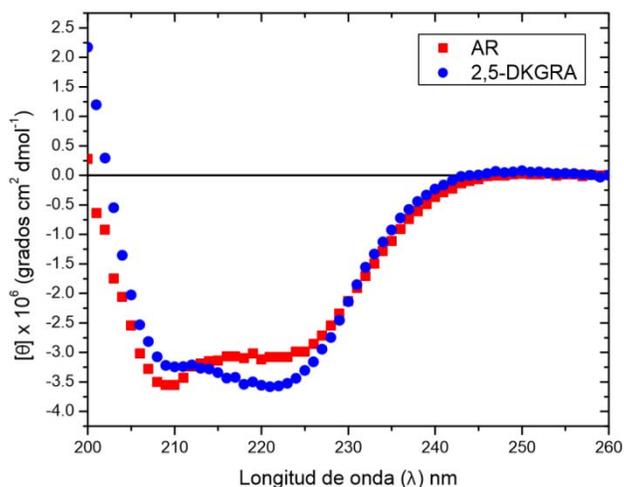


Figura 25. Espectros de dicroísmo circular nativo de AR y 2,5-DKGRA a 20°C; amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.3 mg/mL.

Tabla 20. Deconvolución de los espectros de DC para ambas enzimas. Se muestran los porcentajes de estructura secundaria para cada enzima

Tipo de estructura (%)	AR	2,5-DKGRA
Hélices α	37 \pm 2	33 \pm 0.4
Hebras β	15 \pm 1	17 \pm 0.5
Giros β	16 \pm 0.4	17 \pm 0.1
Random coil	30 \pm 0.9	33 \pm 0.3
Total	100	100

Desplegamiento térmico

- *Dicroísmo circular*

Una vez confirmada la presencia de estructura secundaria y terciaria, se analizó la estabilidad de ambas proteínas. Para ello, se utilizó la temperatura como agente desnaturante. En primer lugar, se realizó un experimento en el cual se siguió el cambio en la elipticidad a 222 nm al aplicar una rampa de temperatura (Figura 26). El proceso de desnaturalización térmica para AR y para 2,5-DKGRA resultó irreversible, sin embargo se observó una sola transición sigmoide que se ajustó a la ecuación de Boltzmann.

A pesar de que con este tipo de análisis solamente se obtienen parámetros aparentes, ya que la presencia de agregados impide realizar el análisis termodinámico formal del desplegamiento, es posible obtener información relevante de este experimento. Los valores de las temperaturas medias aparentes de desnaturalización (T_m^{app}) de ambas proteínas mostraron valores muy diferentes (AR: 327.35 K o 54.2°C y 2,5-DKGRA: 318.45 K o 45.3°C), lo cual resulta interesante debido a que aunque el tipo de plegamiento que presentan es el mismo, y comparten un alto grado de identidad estructural, su estabilidad a la desnaturalización térmica es considerablemente distinta. Cuando se evaluó la presencia de estructura residual de las proteínas en el estado desplegado, se encontró que AR pierde por completo su estructura y se agrega de forma muy notoria en la celda. En tanto que 2,5-DKGRA conserva cierto grado de estructura en el estado desplegado, y no sufre una agregación tan visible como la observada en AR.

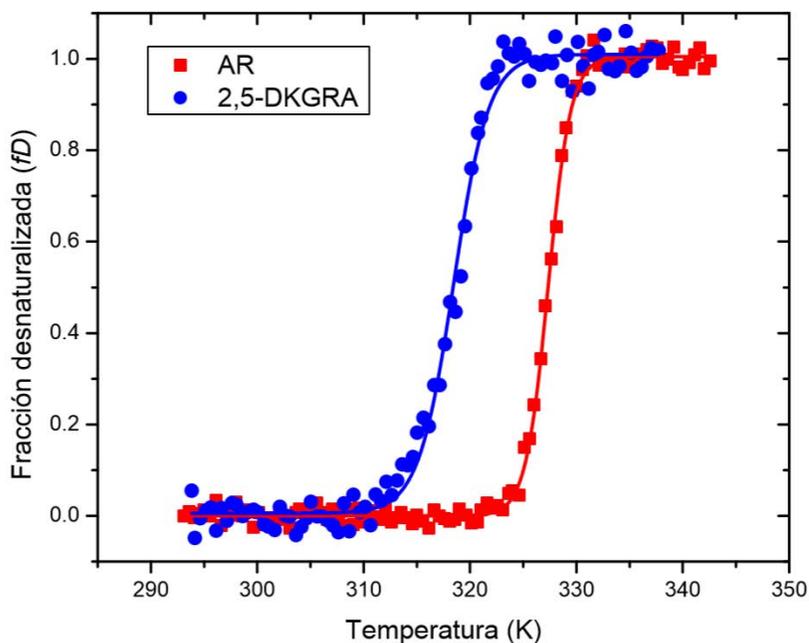


Figura 26. Rampa de temperatura seguida por DC. Desnaturalización térmica seguida por el cambio en la elipticidad a 222 nm (velocidad de calentamiento: 1°C min⁻¹). Las líneas continuas muestran el ajuste a la ecuación de Boltzmann en datos normalizados.

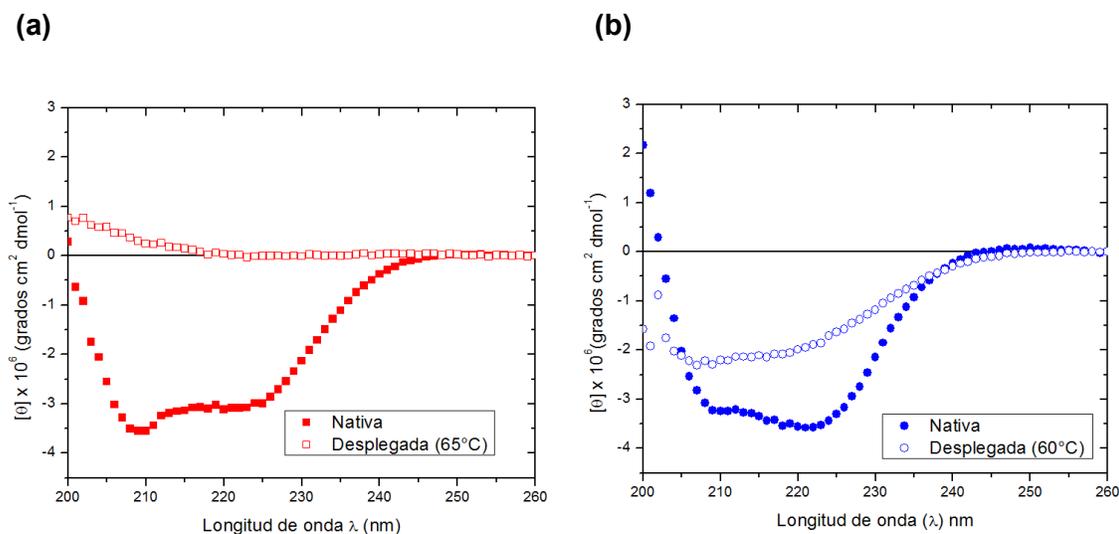
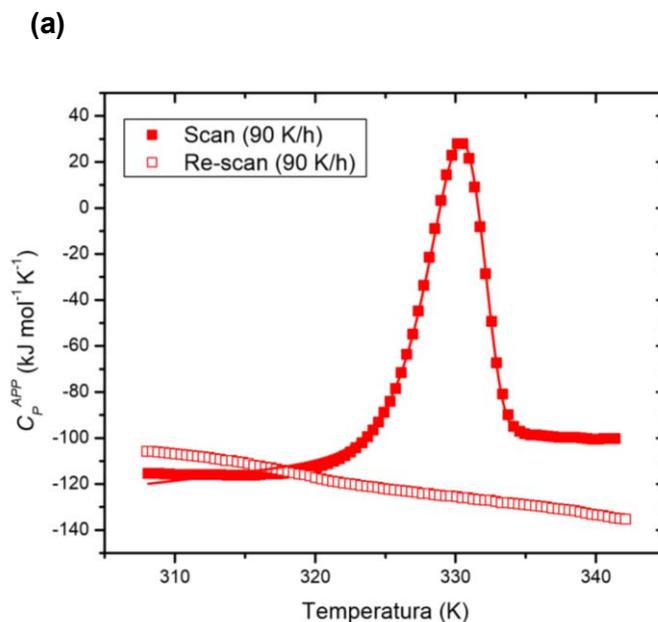


Figura 27. Espectros de DC para AR (a) en rojo y 2,5-DKGRA (b) en azul antes de la desnaturalización térmica (símbolos llenos) y en el estado desplegado (símbolos vacíos); amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.3 mg/mL.

- *Calorimetría diferencial de barrido*

Otra de las técnicas utilizadas para estudiar la termoestabilidad de las proteínas fue DSC. Como primer punto, se analizó la reversibilidad del proceso de desplegamiento. Al igual que en DC, el proceso observado para ambas enzimas, fue irreversible. Las trazas para AR y 2,5-DKGRA (Figura 28), se muestran a continuación.



(b)

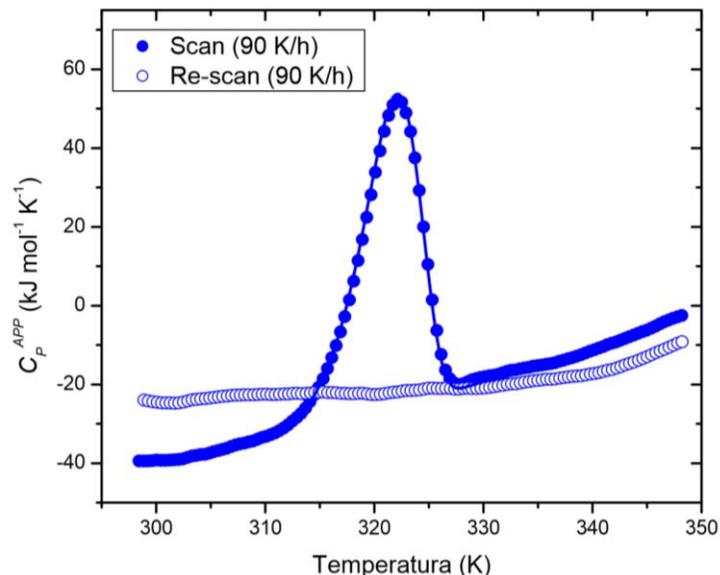


Figura 28. Análisis de la reversibilidad del proceso de desplegamiento térmico para AR (a) en rojo y 2,5-DKGRA (b) en azul por DSC. En ambos casos, los símbolos llenos muestran la primera traza que se obtuvo durante el calentamiento, y los símbolos vacíos indican la segunda traza realizada una vez que se enfrió la proteína; (velocidad de barrido 90 K h⁻¹; amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL⁻¹).

Posteriormente, se analizó la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido. En las Figuras 29 y 30 se observa el corrimiento de la T_m de las trazas calorimétricas de acuerdo a la velocidad de barrido para AR y 2,5-DKGRA, cada traza fue ajustada al modelo de dos estados irreversible (ver materiales y métodos).

En la tabla 21 se hace la comparación de los valores de T_m^{app} obtenidos mediante el desplegamiento térmico de las proteínas evaluado por DC y DSC. Se observa una correspondencia de los valores obtenidos por ambos métodos para AR y 2,5-DKGRA.

Tabla 21. Comparación de los valores de T_m^{app} obtenidos por DC y DSC para AR y 2,5-DKGRA.

	AR		2,5-DKGRA	
	DC	DSC	DC	DSC
T_m^{app} (K)	327.35	329.6	318.45	321.2

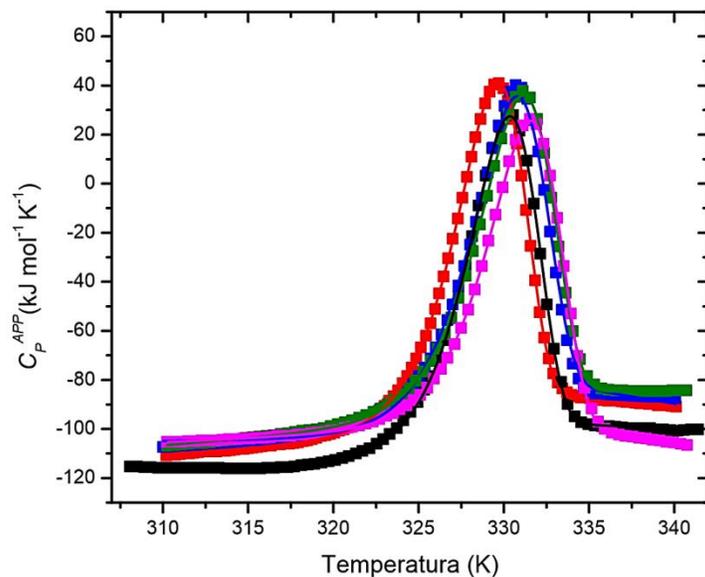


Figura 29. Trazas calorimétricas de AR obtenidas a 6 velocidades distintas de barrido. 60 ($--\blacksquare--$), 90 ($--\blacksquare--$), 120 ($--\blacksquare--$), 150 ($--\blacksquare--$) y 180 K h^{-1} ($--\blacksquare--$). (Amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

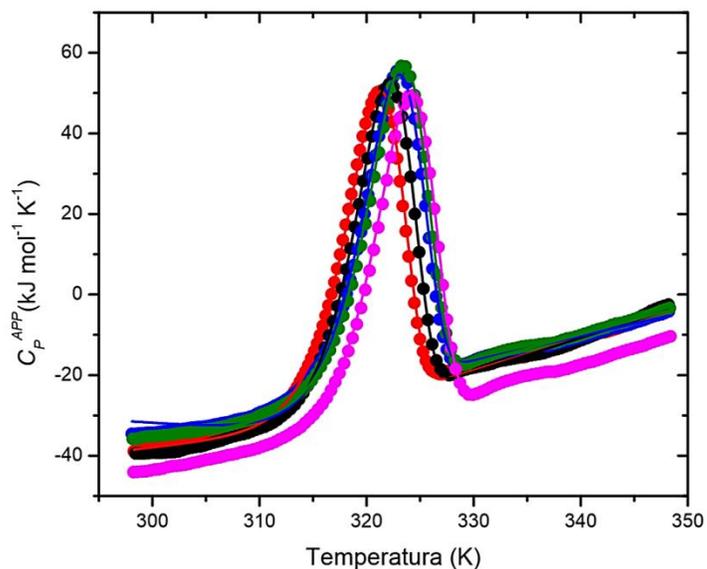


Figura 30. Trazas calorimétricas de 2,5-DKGRA obtenidas a 6 velocidades distintas de barrido. 60 ($--\bullet--$), 90 ($--\bullet--$), 120 ($--\bullet--$), 150 ($--\bullet--$) y 180 K h^{-1} ($--\bullet--$). (Amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; concentración de proteína: 0.4 mg mL^{-1}).

Tabla 22. Valores de T_m^{app} contra la velocidad de barrido. Los errores presentados corresponden a los del ajuste.

Velocidad de barrido (K h ⁻¹)	T_m^{app} (K)	
	AR	2,5-DKGRA
60	329.6 ± 0.005	321.2 ± 0.01
90	330.3 ± 0.007	322.1 ± 0.014
120	330.8 ± 0.004	323.1 ± 0.013
150	331.1 ± 0.008	323.4 ± 0.013
180	331.6 ± 0.006	324.2 ± 0.012

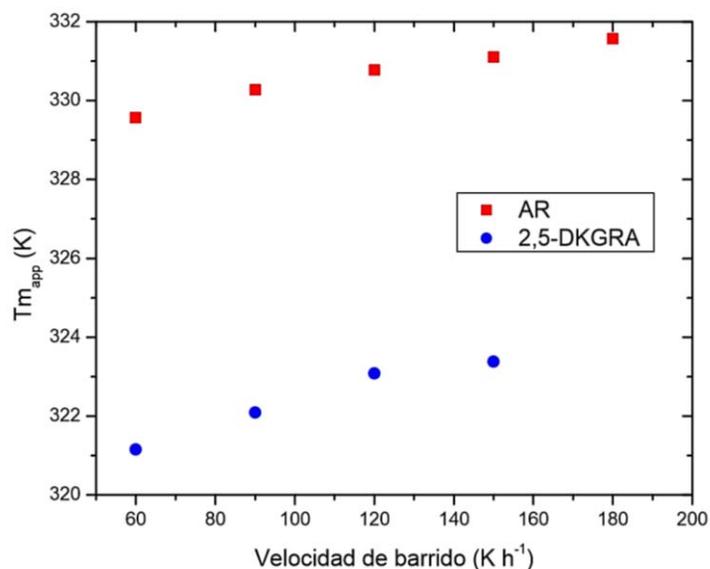


Figura 31. Valores de las velocidades de barrido contra la T_m^{app} . Se observa el incremento en el valor de la T_m^{app} al aumentar la velocidad de barrido.

En la figura 31 se observa la dependencia del valor de la T_m^{app} con la velocidad de barrido, lo cual sugiere que el proceso de desplegamiento de ambas enzimas está bajo control cinético. La estabilidad cinética de las proteínas se relaciona con la existencia de una

barrera energética elevada que separa el estado nativo, de estados no funcionales (proteína desplegada, o desnaturalizada irreversiblemente). Se propone que dicha barrera garantiza el mantenimiento de la función biológica de las proteínas en una escala de tiempo fisiológicamente relevante (Sanchez-Ruiz, *et al.*, 2010).

Para profundizar este análisis, se construyó un gráfico de Arrhenius tomando en cuenta todas las velocidades de barrido empleadas (Figura 32). La coincidencia entre los valores obtenidos a diferentes velocidades de barrido y la calidad del ajuste, indican que el modelo describe adecuadamente los datos experimentales.

A partir del gráfico de Arrhenius se obtuvo el valor de la constante de primer orden (k), con la cual fue posible estimar los valores de vida media de desnaturalización ($t_{1/2}$) para AR y 2,5-DKGRA. Una forma en la cual es posible evaluar la estabilidad cinética de las proteínas es calculando su valor de $t_{1/2}$ debido a que, se propone que el incremento de este parámetro se relaciona con la minimización de la exposición de las proteínas a estados desplegados, evitando procesos de agregación y degradación (Brasemann *et al.*, 2013).

El valor de $t_{1/2}$ a 25°C considerando 4 velocidades de barrido distintas (ver materiales y métodos) para AR fue de 76 ± 16 años ($k = 2.26 \cdot 10^{-8}$) y de 18 ± 3 días ($k = 2.74 \cdot 10^{-5}$) para 2,5-DKGRA, lo cual refleja que la estabilidad cinética de ambas proteínas es completamente distinta. En un contexto biológico, el valor de $t_{1/2}$ indica que las dos proteínas estudiadas poseen barreras energéticas lo suficientemente altas que aseguran su funcionalidad en una escala de tiempo relevante en la célula.

Los valores de la E_A obtenidos a partir del gráfico de Arrhenius para AR ($443.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) y 2,5-DKGRA ($330.3 \text{ kJ mol}^{-1}$) mostraron una diferencia de $\sim 100 \text{ kJ mol}^{-1}$, reflejando un estado de transición energéticamente más costoso en AR. La E_A representa la energía necesaria para pasar del estado nativo al estado de transición antes de alcanzar el estado desplegado. Se encontró que los valores de E_A para los monómeros estudiados muestran un mayor grado de similitud con los valores reportados para TIMs diméricas, que para TIMs tetraméricas (Tabla 23).

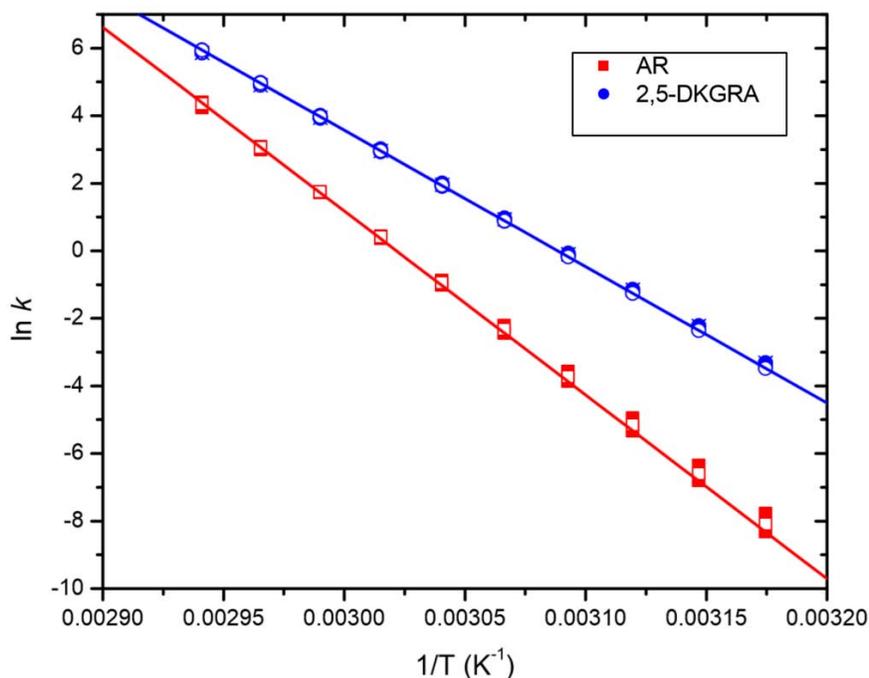


Figura 32. Gráfico de Arrhenius para AR y 2,5-DKGRA a diferentes velocidades de barrido (símbolos superpuestos). La pendiente está definida por $m = -E_A/R$.

Para estimar los valores de la E_A se utilizaron dos métodos: el de Arrhenius anteriormente referido, el cual asume un modelo de dos estados irreversible, y considera una constante de primer orden (k), que describe la conversión cinética de N a D. El otro método empleado, fue el de Lumry-Eyring, en el cual se promedian los valores de la E_A obtenidos de las trazas calorimétricas a distintas velocidades de barrido, ajustadas al modelo de dos estados irreversible.

Tabla 23. Valores de E_A determinados por dos métodos distintos de AR, 2,5-DKGRA, LmTIM (dímero) y MjTIM (tetramero).

Método	AR (kJ mol ⁻¹)	2,5-DKGRA (kJ mol ⁻¹)	LmTIM ^A (kJ mol ⁻¹)	MjTIM ^B (kJ mol ⁻¹)
Arrhenius	443.5 ± 8.4	330.3 ± 3.8	315 ± 3	953.5 ± 6.4
Lumry-Eyring	443.47 ± 9.7	329.1 ± 4.6	312 ± 5	973.3 ± 5.5

^A (Costas *et al.*, 2009), ^B Muñiz-Trejo Ricardo (Tesis de Licenciatura Fac. Ciencias, UNAM)

- *Determinación de la entalpía total de desplegamiento (ΔH_{tot})*

El valor del cambio de entalpía durante el desplegamiento de proteínas refleja el efecto de dos componentes principales. El primero de ellos, es la ruptura de las interacciones internas

que estabilizan la estructura de las proteínas (Van der Waals, puentes de hidrógeno, puentes salinos, etc.), y el segundo de ellos es la hidratación de los grupos que se encuentran ocultos en el estado nativo, y son expuestos hacia el solvente durante el desplegamiento (Hilser *et al.*, 1996).

Para calcular el valor del ΔH_{tot} se estimó el área bajo la curva de las trazas de DSC. Los valores obtenidos son 714.78 kJ mol⁻¹ para AR y 575.6 kJ mol⁻¹ para 2,5-DKGRA. El valor paramétrico calculado a partir de estudios del desplegamiento de proteínas globulares está en aproximadamente 1205 kJ mol⁻¹ (288 kcal mol⁻¹) para una proteína de 300 aminoácidos (Robertson *et al.*, 1997). Tomando esto en cuenta, los valores obtenidos para AR y 2,5-DKGRA son relativamente bajos, lo cual indica que las proteínas estudiadas poseen un número menor de interacciones electrostáticas que estabilizan su estructura nativa, e interacciones con las moléculas de agua en el estado desplegado diferenciales en comparación con otras proteínas globulares de una longitud similar.

Desplegamiento inducido por agentes químicos

Otra forma por la cual es posible estudiar el mecanismo de plegamiento y estabilidad de las proteínas es mediante el uso de agentes caotrópicos. Para la realización de estos experimentos, se utilizaron urea e hidrocloreuro de guanidinio (GdnHCl). Estos dos tipos de agentes desnaturizantes interactúan de manera diferencial con las proteínas. En el caso de la urea, algunos estudios sugieren que ésta ejerce sus efectos desestabilizadores de manera directa, formando puentes de hidrógeno con las regiones polares de las proteínas, particularmente con los grupos peptídicos. Aunque también puede actuar de forma indirecta, alterando la estructura y red de interacciones de las moléculas de agua que rodean a la proteína, facilitando la exposición del núcleo hidrofóbico hacia el solvente (Bennion *et al.*, 2003). Por otro lado, el GdnHCl es una sal que interactúa directamente con la proteína y no es capaz de cambiar las propiedades estáticas de la solución. El promedio del momento dipolar generado por el GdnHCl es mucho más grande que el generado por las moléculas de agua, lo que ha dado origen a la especulación de que el desplegamiento de proteínas por este agente está asociado con las interacciones de tipo Coulomb que existen entre el GdnHCl y la proteína (Camilloni *et al.*, 2008).

- *Determinación de los tiempos de equilibrio*

Con el fin de evaluar el tiempo requerido para que las enzimas alcancen el equilibrio durante su proceso de desplegamiento inducido por agentes químicos, se realizaron mediciones monitoreando el cambio en la señal de DC a 220 nm como función de la concentración de agente desnaturizante. Se realizaron mediciones a las 19, 29 y 48 horas, a una concentración de proteína de 0.3 mg mL⁻¹ a 25 °C en el caso de la urea (Figura 33).

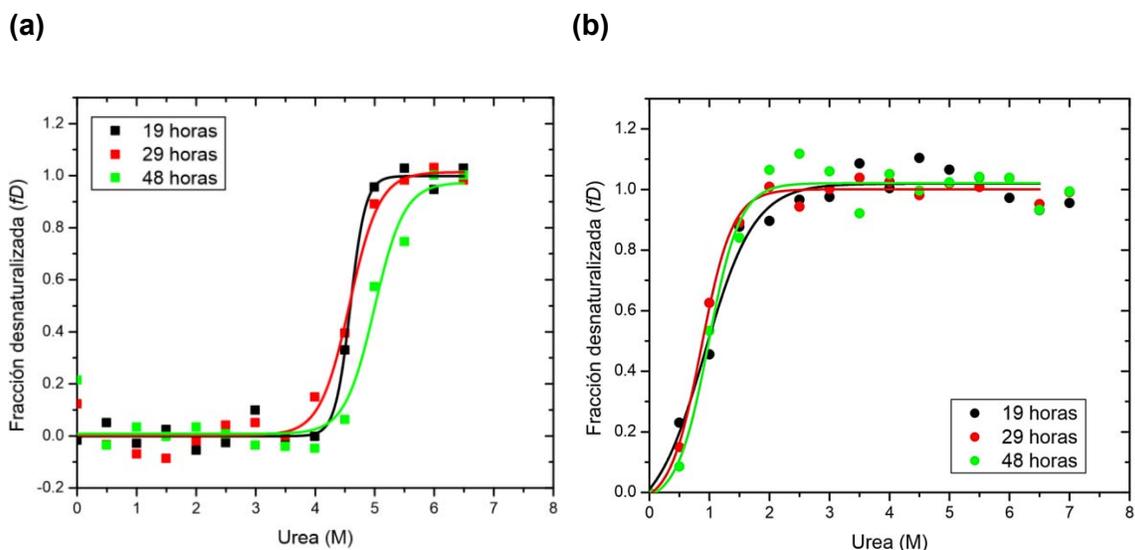


Figura 33. Determinación de los tiempos de equilibrio del desplegamiento inducido por urea de AR **(a)** y 2,5-DKGRA **(b)**. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann.

En el caso del GdnHCl, se realizaron mediciones a las 8, 27 y 47 horas, en las mismas condiciones referidas para la urea (Figura 34).

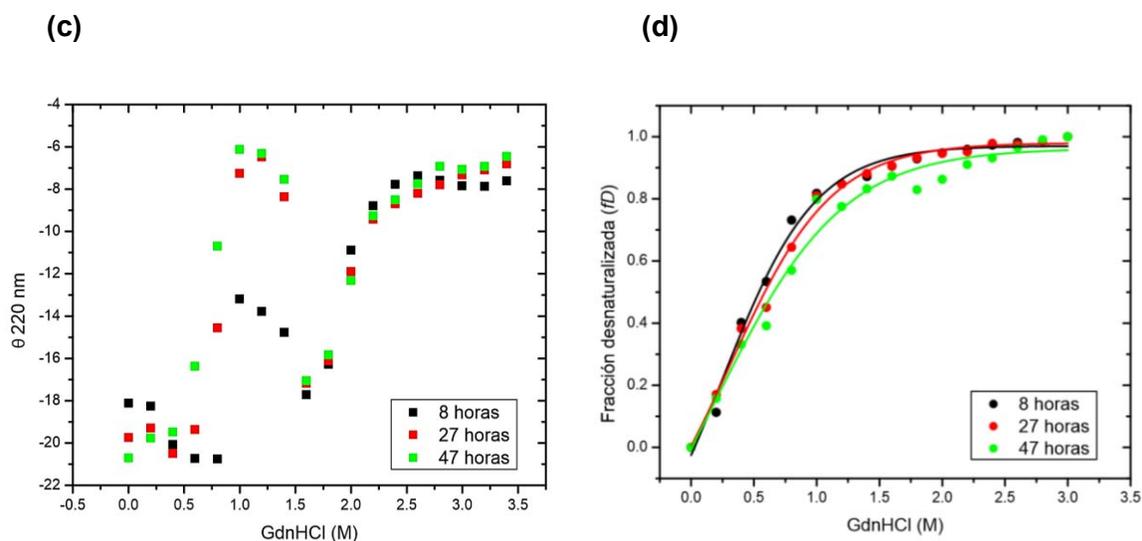


Figura 34. Determinación de los tiempos de equilibrio del desplegamiento inducido por GdnHCl de AR **(c)** y 2,5-DKGRA **(d)**. Los datos de AR no pudieron ajustarse a la ecuación de Boltzmann, por lo que se presentan los datos crudos de elipticidad obtenidos a 220 nm. Para 2,5-DKGRA sí fue posible realizar el ajuste, el cual se muestra en líneas continuas.

Tras estos experimentos se determinó que en los dos agentes caotrópicos, ambas proteínas alcanzaban el equilibrio tras 24 horas de incubación. Esta aproximación inicial permitió observar la diferencia en las propiedades de estabilidad que existen entre ambas

proteínas. En la condición con urea, AR muestra un valor de C_m^{app} considerablemente mayor en comparación con 2,5-DKGRA, la cual pierde gran parte de estructura con concentraciones menores a 1 M de agente desnaturante.

En presencia de GdnHCl, AR mostró un comportamiento inusual en el rango de concentraciones de 0-1.5 M. Sin embargo, a concentraciones mayores a 1.5 M se recupera el comportamiento observado para las otras enzimas, con la pérdida concomitante de señal de DC a medida que incrementa la concentración de GdnHCl hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente, tal y como se ha observado comúnmente en otras proteínas, se encontró una diferencia importante en el efecto que tienen la urea y el GdnHCl en la desnaturalización de ambas proteínas. La urea pareciera tener un efecto “más suave” sobre ellas, en comparación con el GdnHCl. Ya que esta sal dió señales espectroscópicas más ruidosas y se requirió menos concentración de ésta para desnaturar por completo a las proteínas.

- *Evaluación de la reversibilidad del proceso de desplegamiento por agentes químicos*

Con el objetivo de evaluar la reversibilidad del proceso de desplegamiento, se realizaron curvas de desnaturalización y renaturalización con los dos agentes caotrópicos referidos anteriormente. Si el proceso es reversible, ambas curvas deben ser superponibles lo cual nos indicaría que el camino que sigue la proteína al desplegarse y al replegarse es el mismo y que los datos observados no dependen de la trayectoria. En contraste, si el proceso es irreversible, ambas curvas deben ser distintas y por lo tanto no superponibles, debido a que las especies en el proceso no están en equilibrio, sino que se están desviando hacia un estado de agregación. La ventaja más importante de obtener un proceso reversible, es la posibilidad de calcular parámetros termodinámicos relevantes como lo son los valores de ΔG , ΔH , ΔC_p , valores de T_m , C_m y la construcción de la curva de estabilidad. Como se muestra en las figuras 35 y 36, el desplegamiento de AR y 2,5-DKGRA por agentes químicos mostró ser irreversible.

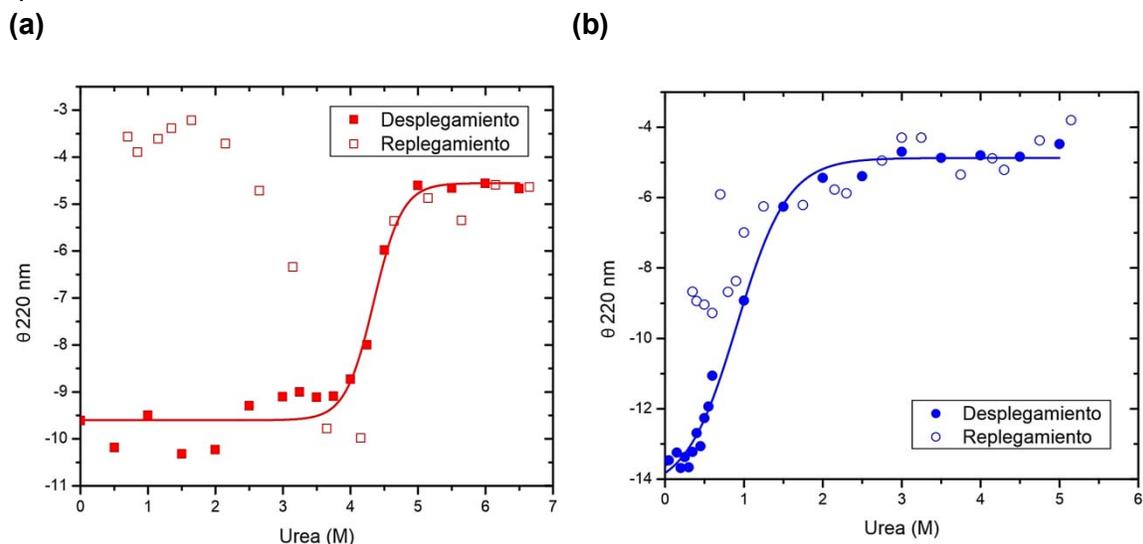


Figura 35. Irreversibilidad del desplegamiento inducido por urea seguido por DC a 220 nm. En (a) se presentan las curvas para AR en rojo y en (b) para 2,5-DKGRA en azul. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann.

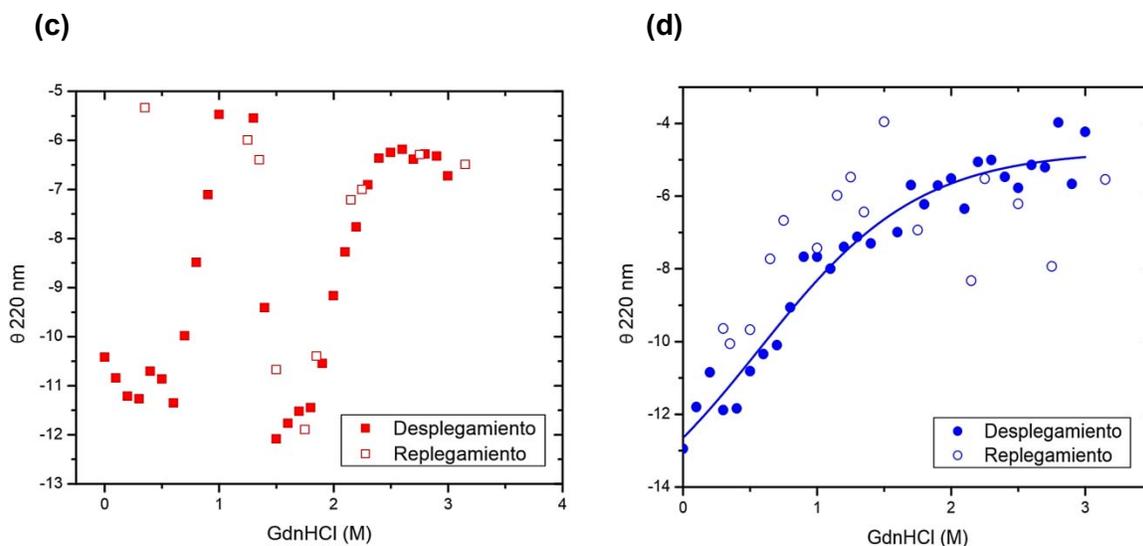
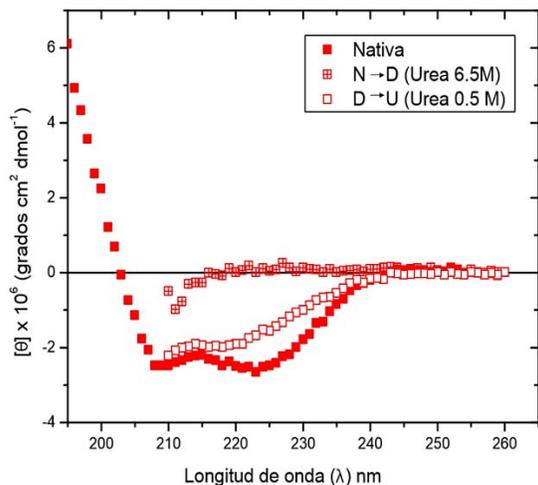


Figura 36. Irreversibilidad del desplegamiento inducido por GdnHCl seguido por DC a 220 nm. En (c) se presentan las curvas para AR en rojo y en (d) para 2,5-DKGRA en azul. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann.

- *Espectros de DC de las especies presentes en el proceso de desplegamiento y replegamiento*

Una vez que se determinó la irreversibilidad del proceso de desplegamiento para ambas proteínas se evaluaron los espectros de DC en el estado nativo, estados intermedios y finales durante los procesos de desnaturalización y renaturalización con urea y GdnHCl (Figuras 37 y 38). Esto se realizó con el objetivo de estudiar la presencia de estructura secundaria residual en estados intermedios o finales durante el desplegamiento y replegamiento de las proteínas con agentes químicos.

(e)



(f)

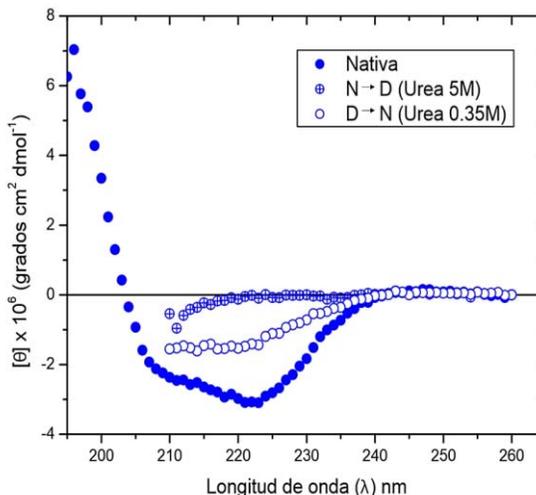


Figura 37. Espectros de DC del desplegamiento y replegamiento inducidos por urea. En (e) se muestran los datos para AR en rojo y en (f) para 2,5-DKGRA en azul. En el recuadro se señala la concentración de urea presente en cada muestra; amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL.

En la Figura 37 se observa que durante el desplegamiento a concentraciones elevadas de urea en AR (6.5 M) y 2,5-DKGRA (5 M) hay una pérdida total de la señal de DC, y por lo tanto de estructura secundaria. En tanto que en condiciones de renaturalización en presencia de urea existe cierta recuperación de la señal de DC sin embargo, ésta no es compatible con la de proteínas nativas, por lo que se corroboró de esta manera que el desplegamiento de las proteínas con este agente caotrópico es irreversible.

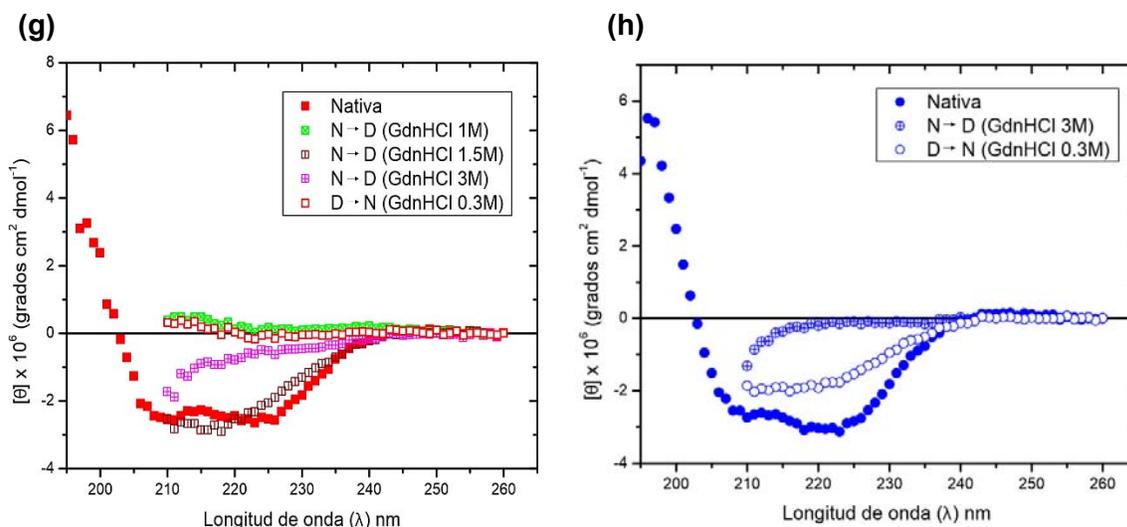


Figura 38. Espectros de DC del desplegamiento y replegamiento inducidos por GdnHCl. En (g) se muestran los datos para AR en recuadros y en (h) para 2,5-DKGRA en círculos azules. En el recuadro se señala la concentración de GdnHCl presente en cada muestra; amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL.

Debido al comportamiento inusual de AR en presencia de GdnHCl, se tomaron espectros de DC a distintas concentraciones de agente desnaturante en donde se observó el mayor cambio de la señal espectroscópica según los experimentos de reversibilidad (Figura 36 (c)). En la figura 38 (g) se aprecia que a 1 M de GdnHCl, AR muestra una pérdida total de la señal de DC, sin embargo, a una concentración de 1.5 M su espectro es más parecido al que muestra en el estado nativo. Este comportamiento podría ser un indicativo de la presencia de especies intermediarias estables y detectables por DC durante el proceso de deplegamiento de esta proteína. Cabe señalar que para corroborar el comportamiento inusual de AR en presencia de GdnHCl, el experimento se realizó tres veces. La presencia de especies intermediarias en la ruta plegamiento de otros barriles TIM monoméricos ha sido descrita para la subunidad α de la triptófano sintasa, la IGPS y la PRAI. Estos estudios han demostrado la existencia de intermediarios termodinámicamente estables que retienen estructura en un 50% de acuerdo a mediciones de CD (Gu *et al.*, 2007).

Por otro lado, durante el proceso de replegamiento de AR no se observó la recuperación de estructura secundaria al diluir la concentración de GdnHCl presente en la muestra.

En el caso de la 2,5-DKGRA se observó que la proteína pierde completamente su estructura secundaria a 3 M de agente desnaturante en condiciones de desplegamiento, y no hay una recuperación significativa o compatible de su espectro de DC en condiciones renaturalizantes.

- *Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca (FI) de las especies presentes en el proceso de desplegamiento y replegamiento*

Con el fin de estudiar la estructura terciaria de las especies presentes durante el desplegamiento y replegamiento de AR y 2,5-DKGRA, se tomaron espectros de FI variando la concentración de agente desnaturizante.

Tanto la urea como el GdnHCl afectaron las posiciones de los picos y la intensidad de la fluorescencia observada (Figuras 39, 40, 41 y 42). La longitud de onda de emisión máxima (λ_{em}) en todos los casos se corrió hacia el rojo de un valor de aprox. 330 nm en la proteína nativa, hacia 350 nm al alcanzar concentraciones elevadas de agente desnaturizante, lo cual es un indicativo de que los residuos de triptófano están expuestos hacia el solvente y la proteína está desnaturizada. Este mismo comportamiento se observó en el corrimiento de los valores de los centros de masa espectral (CEM). El CEM es un parámetro que mide los cambios promedio de intensidad de emisión y longitudes de onda por efecto de cambios en el medio ambiente de la especie fluorescente, por lo que su valor es un indicativo de cómo varía el ambiente de los triptófanos de la proteína, en la ausencia y presencia de agente desnaturizante. Comparado con la urea, el GdnHCl recorrió los valores de las λ_{em} y de los CEM a concentraciones más bajas de agente caotrópico.

➤ Urea

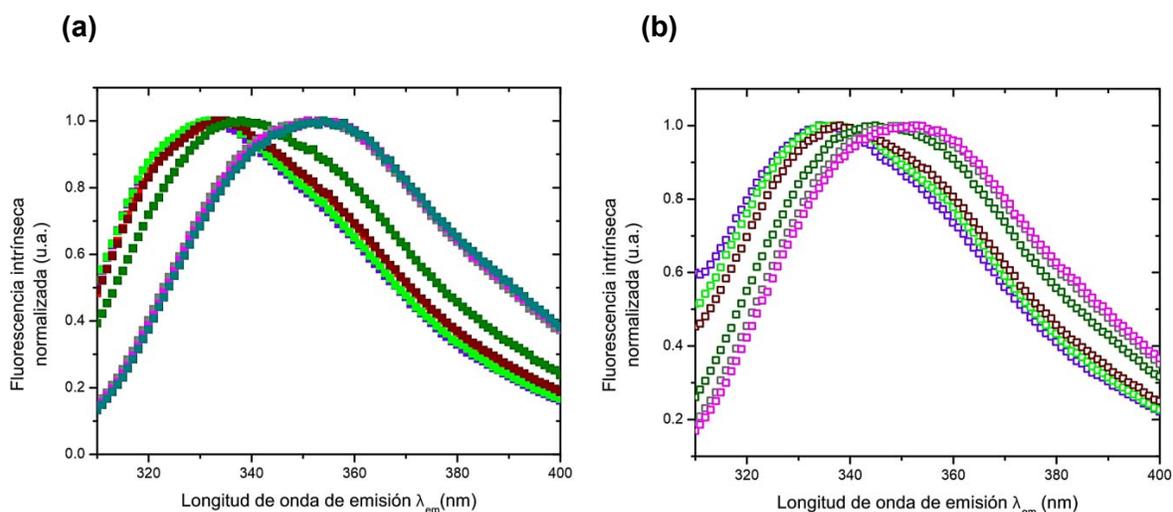


Figura 39. Espectros de emisión de FI de AR durante el desplegamiento (a) y replegamiento (b) inducido a distintas concentraciones de urea. Desplegamiento: 0 M (---■---), 1 M (---■---), 2 M (---■---), 3 M (---■---), 4 M (---■---), 5 M (---■---), 6 M (---■---) y 7 M (---■---). Replegamiento: 1.5 M (---□---), 2.5 M (---□---), 3.5 M (---□---), 4.5 M (---□---), 5.5 M (---□---) y 6.5 M (---□---). Amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL.

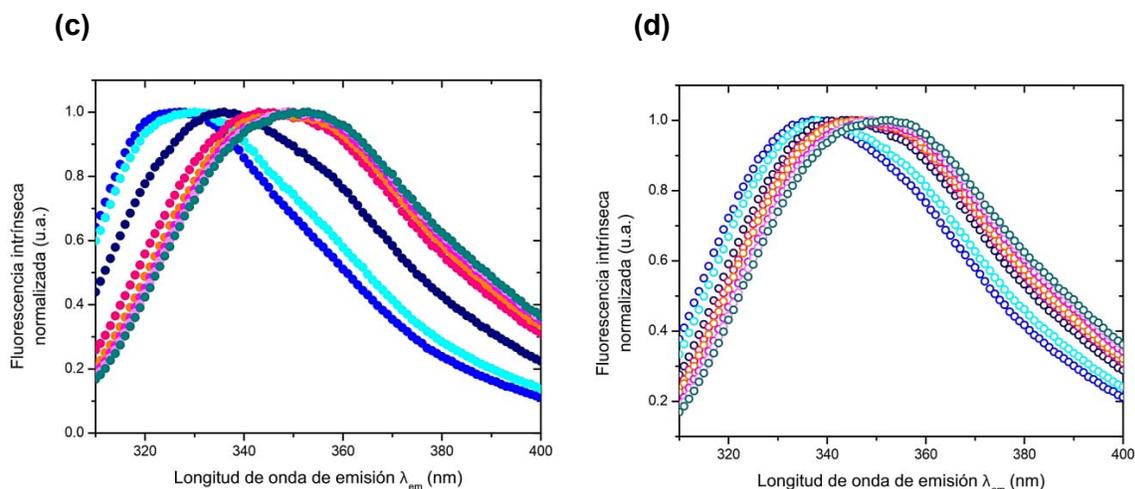


Figura 40. Espectros de emisión de FI de 2,5-DKGRA durante el desplegamiento (c) y repliegamiento (d) inducido a distintas concentraciones de urea. Desplegamiento: 0 M (---●---), 0.5 M (---○---), 1 M (---●---), 1.5 M (---●---), 2 M (---●---), 2.5 M (---●---), 3 M (---●---) y 3.5 M (---●---). Repliegamiento: 0.65 M (---○---), 0.85 M (---○---), 1.15 M (---○---), 1.35 M (---○---), 1.65 M (---○---), 2.15 M (---○---), 2.65 M (---○---) y 3.15 M (---○---). Amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL.

Tabla 24. Resumen de los valores de λ_{\max} y CEM para AR y 2,5-DKGRA durante los procesos de desplegamiento y repliegamiento a distintas concentraciones de urea.

DESPLEGAMIENTO (N→D)				REPLEGAMIENTO (D→N)		
	Urea (M)	λ_{\max} (nm)	CEM (nm)	Urea (M)	λ_{\max} (nm)	CEM (nm)
AR	0	333	344.81	1.5	334	345.85
	1	332	343.74	2.5	338	346.65
	2	332	343.87	3.5	338	347.84
	3	334	344.97	4.5	345	351.33
	4	338	347.75	5.5	352	353.32
	5	354	354.37	6.5	353	354.01
	6	351	354.77	-	-	-
	7	354	355.04	-	-	-
2,5-DKGRA	0	327	340.42	0.65	337	346.94
	0.5	330	342.06	0.85	338	348.31
	1	336	346.63	1.15	343	350.38
	1.5	343	351.20	1.35	345	351.40
	2	349	352.57	1.65	347	351.91
	2.5	350	353.28	2.15	349	352.97
	3	350	353.71	2.65	349	353.52
	3.5	353	353.96	3.15	353	353.85

En presencia de urea (Tabla 24), AR no mostró un cambio significativo en sus valores de λ_{\max} y CEM en un rango de 0-4 M, lo cual concuerda con los datos obtenidos por DC que confirman que en este rango de concentraciones, la proteína conserva un alto grado de estructura secundaria. Para la 2,5-DKGRA, se preserva un alto grado de estructura terciaria en un rango de 0-1 M de urea, sin embargo, a concentraciones mayores hay un corrimiento de la señal fluorescente a 350 nm, este valor es característico para las proteínas en estado desplegado.

En las condiciones de renaturalización, para AR se observa que hay una ligera recuperación del valor de λ_{\max} en concentraciones bajas de urea (1.5-3.5 M), sin embargo no hay una correspondencia total de estos valores con los de la curva de desnaturalización, lo cual confirma la irreversibilidad del proceso de desplegamiento para esta enzima. En el caso de la 2,5-DKGRA, tampoco hay recuperación la señal de fluorescencia en condiciones renaturalizantes, por lo que se confirma para esta enzima de igual manera, la irreversibilidad del desplegamiento inducido por urea.

➤ Hidrocloruro de guanidinio (GdnHCl)

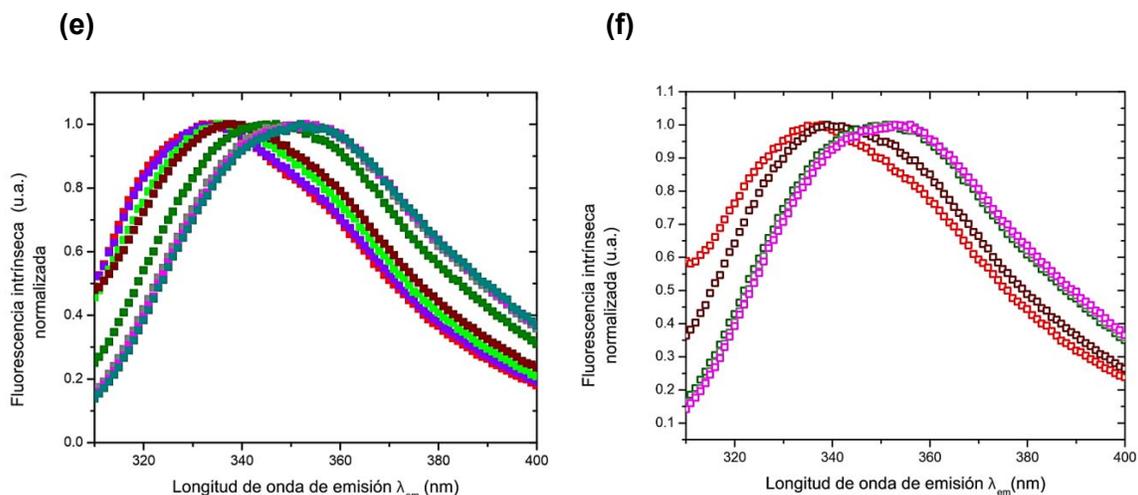


Figura 41. Espectros de emisión de FI de AR durante el desplegamiento (e) y replegamiento (f) inducido a distintas concentraciones de GdnHCl. Desplegamiento: 0 M (---■---), 0.5 M (---■---), 1M (---■---), 1.5 M (---■---), 2 M (---■---), 2.5 M (---■---), 3 M (---■---) y 3.5 M (---■---). Replegamiento: 0.8 M (---□---), 1.75 M (---□---), 2.25 M (---□---), 2.75 M (---□---), y 3.25 M (---□---). Amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL.

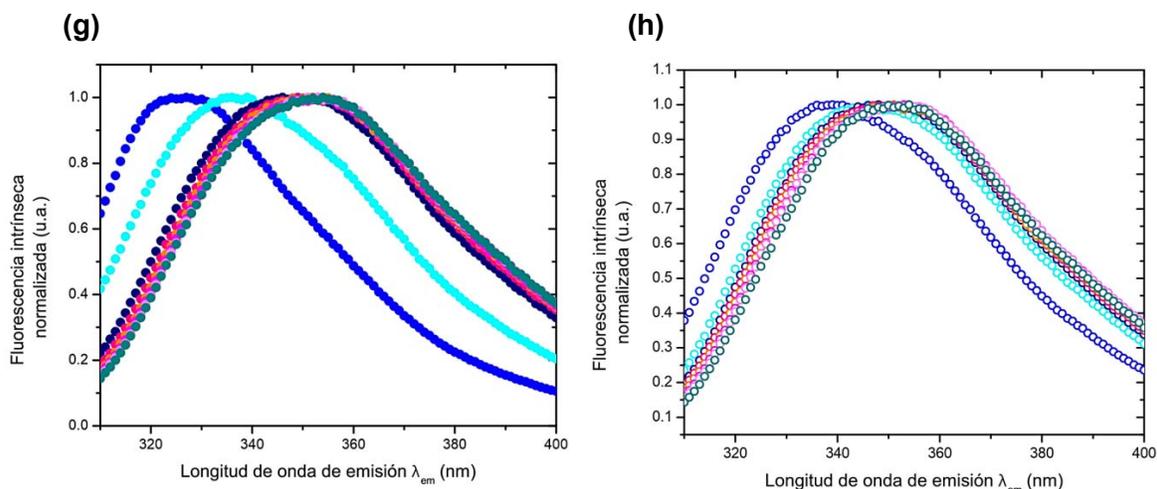


Figura 42. Espectros de emisión de FI de 2,5-DKGRA durante el desplegamiento (g) y repliegamiento (h) inducido a distintas concentraciones de GdnHCl . Desplegamiento: 0 M (---●---), 0.5 M (---●---), 1 M (---●---), 1.5 M (---●---), 2 M (---●---), 2.5 M (---●---), 3 M (---●---) y 3.5 M (---●---). Repliegamiento: 0.65 M (---○---), 0.85 M (---○---), 1.15 M (---○---), 1.35 M (---○---), 1.65 M (---○---), 2.15 M (---○---), 2.65 M (---○---) y 3.15 M (---○---). Amortiguador: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0; se utilizó la proteína a una concentración de 0.1 mg/mL.

Tabla 25. Resumen de los valores de λ_{\max} y CEM para AR y 2,5-DKGRA durante los procesos de desplegamiento y repliegamiento a distintas concentraciones de GdnHCl.

DESPLÉGAMIENTO (N→D)				REPLÉGAMIENTO (D→N)		
	GdnHCl (M)	λ_{\max} (nm)	CEM (nm)	GdnHCl (M)	λ_{\max} (nm)	CEM (nm)
AR	0	334	344.77	0.8	338	346.64
	0.5	335	345.18	1.75	339	349
	1	335	346.36	2.25	351	353.58
	1.5	337	347.25	2.75	352	354.11
	2	347	351.44	3.25	356	354.47
	2.5	352	353.97	-	-	-
	3	353	354.43	-	-	-
	3.5	352	354.64	-	-	-
2,5-DKGRA	0	327	339.97	0.65	339	347.85
	0.5	336	346.50	0.85	346	351.65
	1	346	352.33	1.15	348	352.86
	1.5	352	353.43	1.35	353	353.33
	2	354	353.99	1.65	351	353.76
	2.5	353	354.24	2.15	354	354.14
	3	353	354.52	2.65	354	354.34
	3.5	354	354.63	3.15	354	354.57

En presencia de GdnHCl (Tabla 25), AR no mostró un cambio significativo en sus valores de λ_{\max} y CEM en un rango de 0-1.5 M. Para la 2,5-DKGRA, se preserva un alto grado de estructura terciaria en un rango de 0-0.5 M de GdnHCl, sin embargo, a concentraciones mayores hay un corrimiento de la señal fluorescente a 350 nm. En condiciones renaturalizantes, en ninguno de los casos se observó la recuperación total de la señal de fluorescencia, lo cual confirma la irreversibilidad del proceso de desplegamiento inducido por GdnHCl para AR y 2,5-DKGRA.

- *Cálculo de los valores de C_m^{app}*

Como se refirió anteriormente, el proceso de desnaturalización con agentes químicos de AR y 2,5-DKGRA mostró ser irreversible. Debido a esto, únicamente fue posible estimar los valores de concentración media de desnaturalización aparente C_m^{app} , los cuales se obtuvieron a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann (Figuras 43 y 44). La única condición en la que no pudo realizarse dicho ajuste, fue con los datos de desnaturalización con GdnHCl de AR, debido al comportamiento inusual de la proteína en presencia de este agente desnaturalizante.

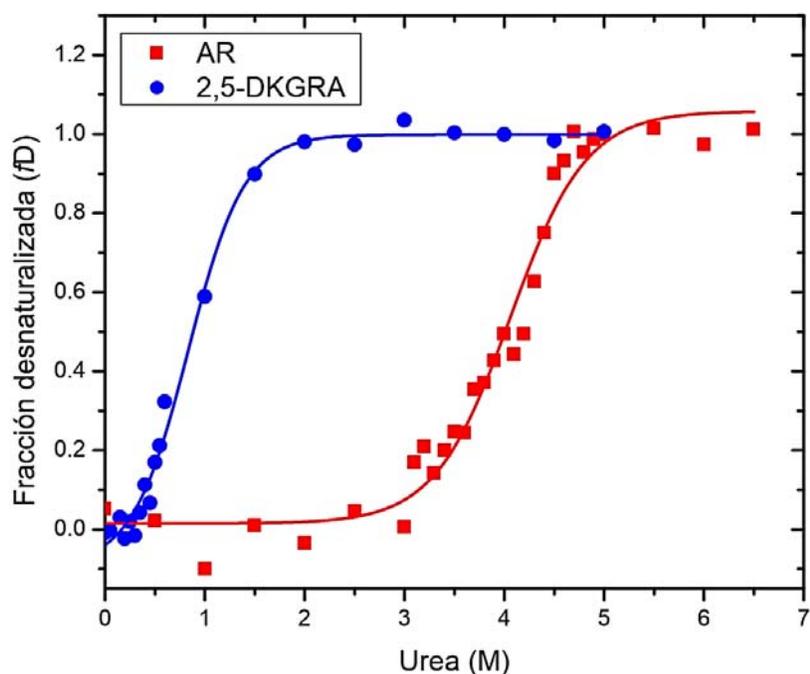


Figura 43. Desnaturalización de AR y 2,5-DKGRA inducida por urea seguida por DC. Las líneas continuas muestran el ajuste a la ecuación de Boltzmann en datos normalizados.

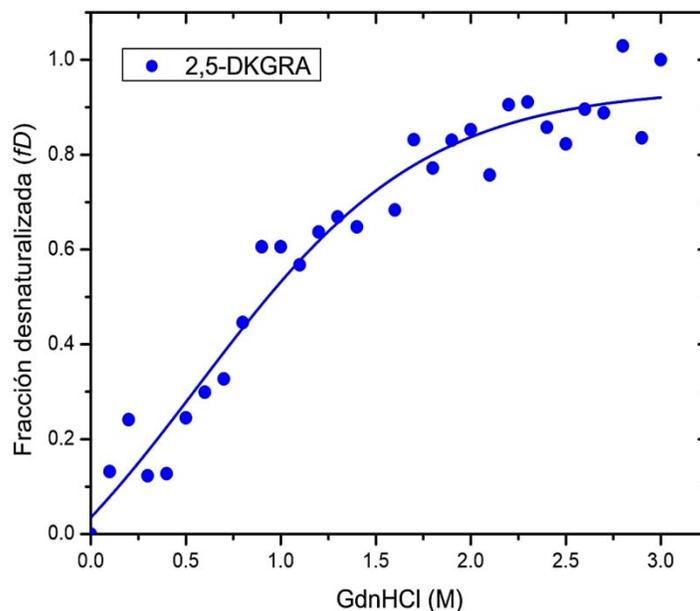


Figura 44. Desnaturalización de 2,5-DKGRA inducida por GdnHCl seguida por DC (220 nm). Las líneas continuas muestran el ajuste a la ecuación de Boltzmann en datos normalizados.

Los valores de C_m^{app} obtenidos de la desnaturalización con urea para AR ($C_m^{app} = 4.06 \pm 0.05$ M) y para 2,5-DKGRA ($C_m^{app} = 0.83 \pm 0.03$ M) varían de manera significativa y concuerdan con la diferencia observada en la estabilidad de ambas proteínas durante su desnaturalización térmica. Finalmente, el valor de C_m^{app} obtenido para 2,5-DKGRA en GdnHCl fue de 0.56 ± 0.033 M.

Aunque no fue posible calcular un valor de ΔG para las proteínas estudiadas es claro que el efecto de los perturbantes en sus estructuras es muy diferente. Por una parte, AR muestra una mayor resistencia a la desnaturalización por agentes químicos en comparación con 2,5-DKGRA. El proceso de desplegamiento inducido por agentes químicos en AR mostró ser completamente irreversible con la pérdida total de estructura secundaria y se acompañó de un fenómeno de agregación muy evidente. En comparación, 2,5-DKGRA tiene una estabilidad marginal a la presencia de agentes caotrópicos, sin embargo no se apreció un fenómeno de agregación tan evidente como el de AR.

Como se mencionó anteriormente, la urea y el GdnHCl desnaturalizan a las proteínas de manera diferencial. Se observó que el GdnHCl es un agente más eficiente para la desnaturalización de ambas proteínas, sin embargo éste proporcionó señales espectroscópicas mucho más ruidosas que la urea.

- Cálculo de los valores de ΔG^{app} a partir de las curvas de desnaturalización con agentes químicos

Con el fin de calcular un valor aproximado de la estabilidad termodinámica de AR y 2,5-DKGRA, se estimó el valor de ΔG_D^{app} a partir de las curvas de desnaturalización en presencia de agentes químicos, y considerando los valores obtenidos de C_m^{app} junto con el valor paramétrico de m calculado como se refiere en Myers *et al.*, 1995 (Ver materiales y métodos).

Tabla 26. Valores de ΔG_D^{app} de AR y 2,5-DKGRA.

	AR		2,5-DKGRA	
	Urea	GdnHCl	Urea	GdnHCl
ΔG_D^{app} (kcal mol ⁻¹) ^A	7.3	ND	2.5	1.9
ΔG_D^{app} (kcal mol ⁻¹) ^B	20	ND	3.15	4.7

^AValores calculados a partir de las curvas de desnaturalización en presencia de agentes químicos (Ecuaciones 14-16). ^BValores calculados considerando los valores de C_m^{app} y el parámetro m de desnaturalización (Ecuaciones 17-20). ND: No determinado.

Como se muestra en la tabla 26, los valores estimados de ΔG_D^{app} para AR y 2,5-DKGRA son similares a los reportados para otros barriles TIM monoméricos, los cuales varían desde 2.15 hasta 15 kcal mol⁻¹. Sin embargo, la diferencia más notable es la que se observa entre los valores de estabilidad termodinámica calculados para AR y 2,5-DKGRA. Por una parte, AR muestra un valor más elevado de ΔG_D^{app} en comparación con 2,5-DKGRA, lo cual se relaciona con las diferencias observadas en sus valores de T_m^{app} y C_m^{app} .

Los dos métodos utilizados para el cálculo del ΔG_D^{app} mostraron una variación considerable entre ellos. Sin embargo en el caso del método B, que considera los valores del ΔASA polar y no polar para el cálculo de m , se ha descrito que aunque estos parámetros correlacionan de buena manera, en algunos casos, pueden existir variaciones grandes entre éstos que puedan afectar el cálculo del valor del ΔG_D . Además de que, para el caso de proteínas con mecanismos de plegamiento distintos al de dos estados, el valor de m puede verse significativamente reducido (Pace, 1986).

Análisis y comparación de las estructuras cristalográficas de AR y 2,5-DKGRA con otros barriles TIM monoméricos naturales

- *Cálculo de la presencia de poros, túneles y cavidades*

Las regiones de baja densidad de empaquetamiento de los átomos dentro de una proteína pueden clasificarse como cavidades, túneles y poros. Estructuralmente, una cavidad se define como un espacio vacío oculto dentro de una proteína. Las cavidades pueden comunicarse con el ambiente exterior a través de canales que conducen a la superficie, o pueden estar completamente aisladas del medio exterior. Las cavidades suelen constituir sitios de reacción enzimática, ya que proporcionan un ambiente altamente controlado. Los túneles o canales, por otra parte representan vías accesibles capaces de conducir ligandos desde la superficie de la proteína al interior de una cavidad. En tanto que un poro es considerado como una canal a través del cual pasa una biomacromolécula de un punto a otro dentro de una superficie. La mayoría de los poros sirven como vías de transporte muy selectivas a través de membranas (MOLE 2.0, User Manual) (Figura 45).

Las cavidades, túneles o canales y poros son características estructurales de las proteínas que poseen funciones biológicas importantes, como lo son la alta selectividad de los canales iónicos, el canal de salida de los polipéptidos formados en el ribosoma, o los sitios activos en las enzimas que determinan la entrada de los sustratos u otros ligandos (Berka *et al.*, 2012). Este tipo de características estructurales tienen origen en regiones de las proteínas en donde no existe un empaquetamiento estrecho de los átomos. Por lo que, la presencia de cavidades internas en las proteínas les brinda la flexibilidad conformacional necesaria para que lleven a cabo su función biológica (Cioni, 2006).

El estrecho empaquetamiento de los átomos en las proteínas es uno de los determinantes más importantes que les confiere estabilidad en el estado nativo. El valor promedio de la densidad de empaquetamiento en el interior de una proteína es cercano a 0.75, sin embargo la eficiencia de este empaquetamiento no es uniforme en toda la estructura, ya que varía en un rango de 0.66-0.84 (Richards *et al.*, 1974). Los defectos locales de este empaquetamiento se muestran como cavidades, y cuando éstas se presentan de forma abundante pueden reducir significativamente la estabilidad de la estructura de una proteína (Lee *et al.*, 2000). Sin embargo, estas cavidades pueden estar ocupadas por moléculas de agua, las cuales son capaces de compensar la estabilidad de la proteína en regiones donde existe una reducción de las interacciones hidrofóbicas o de van der Waals (Takano *et al.*, 2003). Hay evidencia que sugiere que un puente de hidrógeno formado por moléculas de agua al interior de las cavidades estabiliza el plegamiento en promedio 0.6 kcal mol⁻¹. La capacidad que tienen estas cavidades para acomodar una o más moléculas de agua depende de varios factores como lo son, su tamaño y grado de hidrofobicidad (Cioni, 2006). Tomando en cuenta lo anterior, se realizó el análisis de la presencia de túneles, poros y cavidades de AR, y 2,5-DKGRA y se comparó contra las estructuras cristalográficas de algunas de las enzimas monoméricas con arquitectura de barril TIM para las cuales hay reportes de estabilidad: subunidad α de la triptófano sintasa, imidazol glicerol fosfato sintasa (HisF) y desaminasa de adenosina (ADA). En la tabla 27 se muestra un resumen de los

valores obtenidos tras el análisis en el programa MOLE 2.0 de las estructuras cristalográficas.

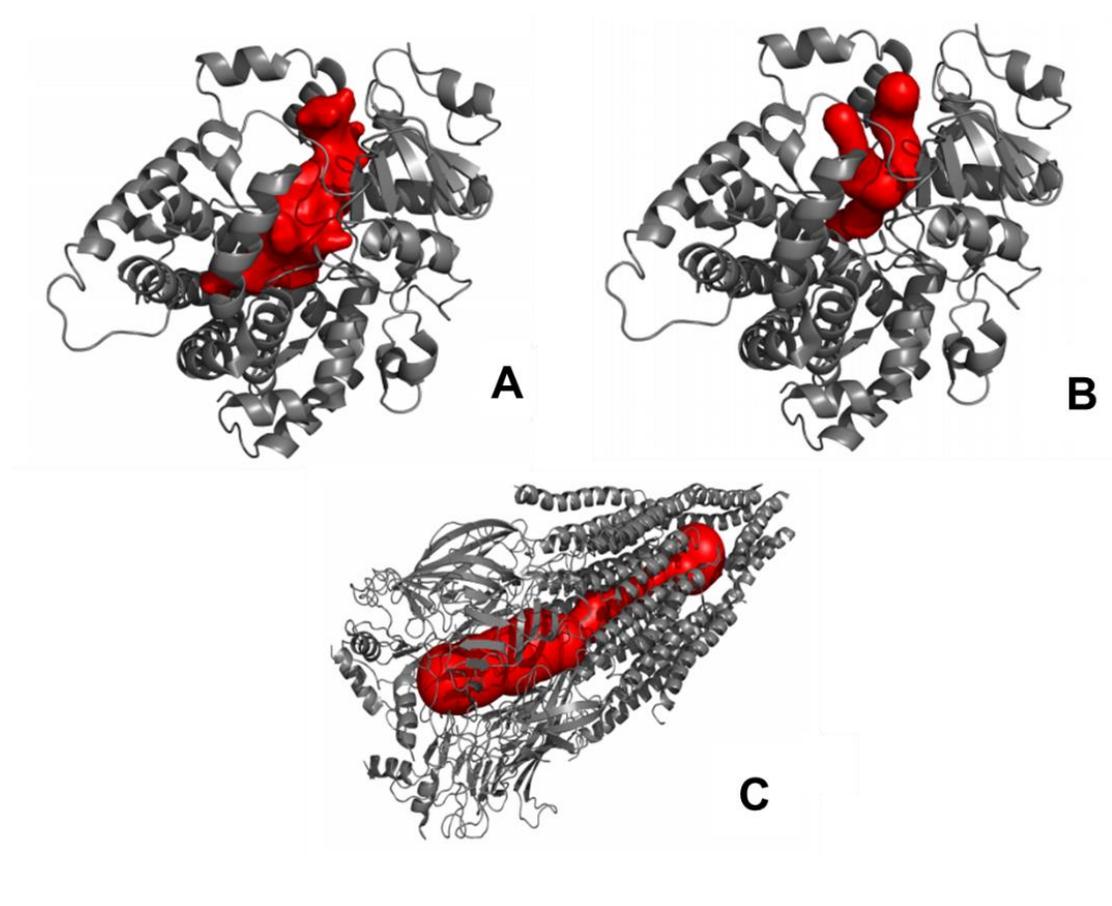


Figura 45. Representación gráfica de una cavidad (A), de un túnel (B) y un poro (C) dentro de la estructura de una proteína. Tomada y modificada de MOLE 2.0 User Manual https://webchem.ncbr.muni.cz/Platform/AppsBin/Mole2_manual.pdf.

Tabla 27. Volúmenes moleculares y número de túneles, poros y cavidades contenidas en barriles TIM monoméricos.

Tipo de componente espacial	AR	2,5-DKGRA	Subunidad α de la Trp-sintasa	HisF	ADA
Número de residuos	315	278	268	253	349
ΔG^D (kcal mol ⁻¹)	ND	ND	15.4 ^A	12.6 ^B	5.78 ^C
Número de túneles	2	10	7	5	13
Suma total de la longitud de los túneles (Å)	19.86	122.39	97.3	75.72	120.05
Suma de los índices de hidrofobicidad de los túneles	-1.06	2.56	2.75	0.49	-1.3
Número de cavidades	4	7	14	5	13
Volumen normalizado de las cavidades (Å ³) ^N	4.47	8.44	15.66	10.17	9.96

^A (Matthews *et al.*, 1999), ^B (Carstensen *et al.*, 2012), ^C (Frieden *et al.*, 2005). ND: No determinado, ^N Valores normalizados por el número de aminoácidos presentes en las proteínas.

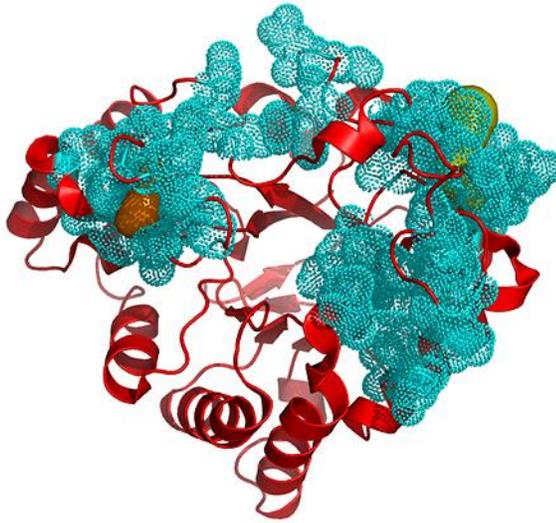
Tras hacer la comparación de poros, túneles y cavidades en las proteínas, se encontraron las siguientes diferencias:

- El volumen que ocupan las cavidades en la estructura de 2,5-DKGRA es de casi el doble en comparación con AR. De igual manera, el número y longitud de los túneles en 2,5-DKGRA es considerablemente mayor en comparación con AR (Figura 46). De acuerdo al planteamiento de que entre mayor número y volumen de cavidades posee una proteína es menor su estabilidad (Lee *et al.*, 2000), esta propiedad se ve reflejada en los valores reducidos de T_m^{app} y C_m^{app} que presenta 2,5-DKGRA con respecto a AR.
- El índice de hidrofobicidad de los túneles de AR es menor en comparación con el de 2,5-DKGRA, lo cual sugiere que dentro los túneles de AR hay un mayor número de moléculas de agua que estabilizan en mayor grado la estructura de AR en comparación con 2,5-DKGRA. Sin embargo, al analizar las estructuras cristalográficas de las proteínas (cabe señalar que ambas estructuras se resolvieron

a una resolución menor a 2 Å) se encontró que dentro de los 2 túneles de AR había 7 moléculas de agua, y en los 6 túneles de 2,5-DKGRA había 8 moléculas de agua

- El volumen que ocupan las cavidades en la subunidad α de la triptófano sintasa, HisF y ADA se mantiene en un valor más o menos constante. Sin embargo, no se observa una relación clara entre estos volúmenes con los valores de ΔG^D , ya que la proteína con el menor valor de estabilidad termodinámica (ADA) posee un volumen de cavidades muy similar al de las otras dos proteínas con valores más elevados de ΔG^D .

(a)



(b)

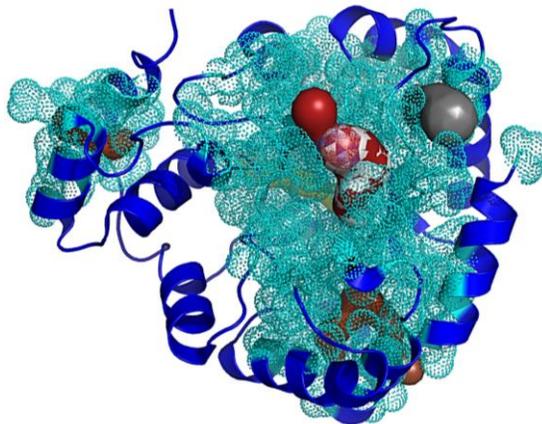


Figura 46. Cavidades y túneles dentro de las estructuras de AR (a) y 2,5-DKGRA (b). Se muestran las cavidades en color cian y los túneles en distintos colores según el análisis realizado en MOLE 2.0

- *Cálculo del número de puentes de hidrógeno y salinos en las estructuras*

Los puentes de hidrógeno contribuyen de una manera muy importante a la estabilidad de las proteínas. El número promedio de puentes de hidrógeno que se forman en una proteína plegada es de 1.1 por residuo, el 65% de éstos involucran la presencia del enlace peptídico, 23% se forman entre estos enlaces y las cadenas laterales de aminoácidos, y sólo el 12% ocurre únicamente entre las cadenas laterales (Stickle *et al.*, 1992). Por otro lado, los puentes salinos, son mucho menos abundantes. Se sabe que cuando éstos se forman en la superficie de las proteínas, contribuyen con poco menos de 1 kcal mol⁻¹ a la estabilidad global de las proteínas (Pace *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando este tipo de interacciones se forma en un ambiente hidrofóbico, puede contribuir hasta con más de 4 kcal mol⁻¹ a la estabilidad total de la proteína (Anderson *et al.*, 1990). Utilizando la herramienta de análisis de estructura de Chimera 1.8 (Pettersen *et al.*, 2004) y el programa Salt Bridges in Protein Structures (SBPS) (Gurusaran *et al.*, 2014), se determinó el número total de puentes de hidrógeno y puentes salinos en las estructuras cristalográficas (Tabla 28).

Tabla 28. Número de puentes de hidrógeno y puentes salinos presentes en barriles TIM monoméricos.

Tipo de enlace	AR	2,5-DKGRA	Subunidad α de la Trp-sintasa	HisF	ADA
Número de residuos	315	278	268	253	349
ΔG^D (kcal mol ⁻¹)	ND	ND	15.4 ^A	12.6 ^B	5.78 ^C
Número de puentes de hidrógeno por residuo ^N	0.99	0.84	0.73	0.93	1.07
Número de puentes salinos por residuo ^N	0.09	0.06	0.14	0.118	0.17

^A (Matthews *et al.*, 1999), ^B (Carstensen *et al.*, 2012), ^C (Frieden *et al.*, 2005). ND: No determinado, ^N Valores normalizados por el número de aminoácidos presentes en las proteínas.

Tras hacer la comparación del número de puentes de hidrógeno y puentes salinos en las proteínas, se encontraron las siguientes diferencias:

- El número de puentes de hidrógeno por residuo se mantiene en un valor más o menos constante en todas las estructuras analizadas.
- La 2,5-DKGRA muestra el menor número de puentes salinos por residuo en comparación con el resto de las estructuras.

- La diferencia en el número de interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura de AR y 2,5-DKGRA es mínima.

A pesar de que existe un gran número de reportes sobre el plegamiento de proteínas, no queda claro el papel que tienen las interacciones electrostáticas en la estabilidad térmica y en el valor de ΔG . Ciertos estudios de proteínas de organismos mesófilos, termófilos e hipertermófilos han brindado cierta información al respecto. En general, se ha observado que el número de residuos ionizables está incrementado en proteínas hipertermófilas, indicando que los residuos cargados pueden ser considerados como elementos estabilizadores del estado nativo de las proteínas. Aunque por otra parte, también existen otros reportes que sugieren que los grupos cargados pueden funcionar de manera inversa, desestabilizando la estructura global de las proteínas (Hendsch *et al.*, 1994). La dificultad de identificar el papel de las interacciones electrostáticas en la estabilidad de las proteínas se asocia con el hecho de que existe una relación entre los efectos de desolvatación de estos grupos, con la estabilización local que llevan a cabo a partir de interacciones carga-carga (Roca *et al.*, 2007).

- *Cálculo del área accesible al solvente (ASA) en las estructuras*

El efecto hidrofóbico tiene una gran importancia en el plegamiento y estabilidad de las proteínas. Se considera que gran parte de la estabilidad de ciertas proteínas se relaciona con sus propiedades hidrofóbicas y en especial, con las interacciones de sus superficies con el agua que las rodea.

Algunas de las propiedades de las interacciones hidrofóbicas que ocurren en las proteínas son las siguientes (Kauzmann, 1959):

- a) Las interacciones hidrofóbicas son estabilizadas en mayor medida por contribuciones entrópicas: por cada cadena lateral alifática no-polar que abandona un ambiente acuoso y se integra a una región no-polar de la proteína, se espera una ganancia de $20 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ en el valor total de la entropía.
- b) La transferencia de una cadena lateral alifática del agua hacia una región no-polar de la proteína es endotérmica.
- c) El cambio de energía libre de transferencia de un ambiente acuoso a uno no-polar dentro de la proteína es un proceso exérgico.
- d) Las interacciones hidrofóbicas que involucran las cadenas laterales alifáticas de los aminoácidos son más estables a temperatura ambiente que a 0°C .

Para analizar las propiedades hidrofóbicas de las proteínas y su efecto en la estabilidad, se realizó un análisis con el programa PISA para determinar los valores del ASA y porcentaje de hidrofobicidad de las proteínas seleccionadas (Vogt *et al.*, 1997) (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis del Área Accesible al Solvente (ASA) de barriles TIM monoméricos.

Característica	AR	2,5-DKGRA	Subunidad α de la Trp-sintasa	HisF	ADA
ΔG^D (kcal mol ⁻¹)	ND	ND	15.4 ^A	12.6 ^B	5.78 ^C
ASA total del monómero (Å ²)	13326.8	11277.4	12172.9	11229.1	13804.7
Hidrofobicidad (%)	43.99	48.56	52.24	45.06	40.97

^A (Matthews *et al.*, 1999), ^B (Carstensen *et al.*, 2012), ^C (Frieden *et al.*, 2005). ND: No determinado.

Tras hacer la comparación de los valores del ASA y porcentaje de hidrofobicidad en las proteínas, se encontraron las siguientes diferencias:

- AR mostró un valor mayor del ASA en comparación con 2,5-DKGRA.
- El porcentaje de hidrofobicidad en AR es menor que en 2,5-DKGRA.
- La relación entre el valor del ASA, el porcentaje de hidrofobicidad y el valor de estabilidad (ΔG) no muestra una tendencia clara para las proteínas analizadas.

El empacamiento de los residuos hidrofóbicos dentro de las proteínas es una de las características que les confiere estabilidad en el estado nativo. Después de hacer el análisis estructural del ASA total del monómero y el porcentaje de hidrofobicidad en las proteínas, no se encontró una tendencia clara que explicara las diferencias observadas en sus parámetros de estabilidad (valores de T_m^{app} o C_m^{app}), o en los valores de estabilidad termodinámica (ΔG^D) de las estructuras analizadas.

Análisis y comparación de los barriles TIM monoméricos naturales, AR y 2,5-DKGRA con el barril s-TIM11 diseñado *de novo*

Se realizó la comparación de los barriles TIM monoméricos naturales estudiados con respecto a sTIM-11, la cual es una proteína diseñada *de novo* a partir de la repetición simétrica de cuatro subunidades, que presenta el mismo tipo de arquitectura y estado oligomérico (Huang *et al.*, 2016), aunque con una longitud de aminoácidos considerablemente menor con respecto a AR y 2,5-DKGRA. En la figura 47 se muestran las trazas calorimétricas obtenidas por DSC para AR, 2,5-DKGRA y sTIM-11. La diferencia más notable entre ellas, es el área bajo la curva (valor de ΔH) que existe entre las tres proteínas, y el valor de la T_m .

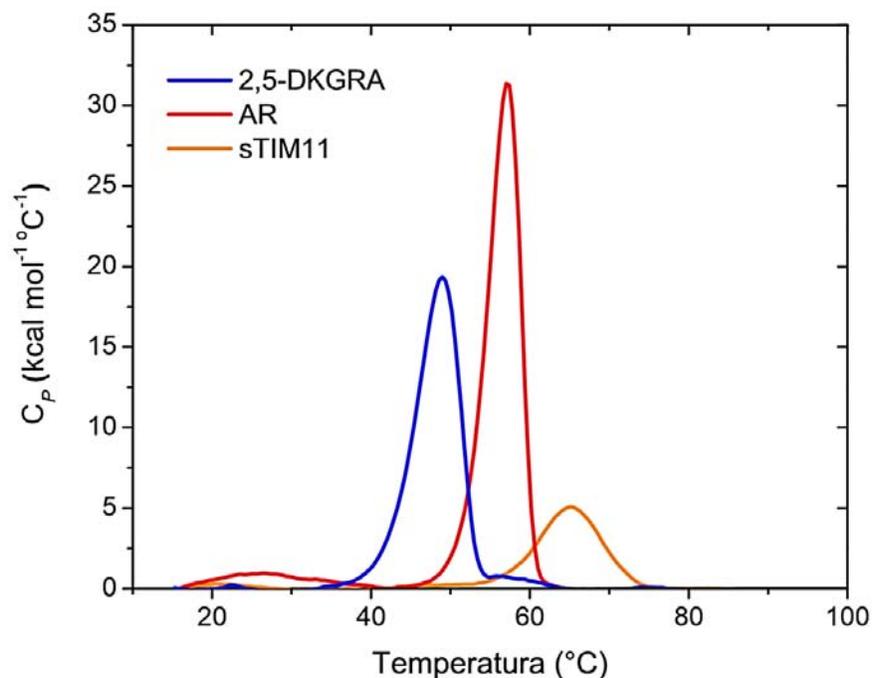


Figura 47. Trazas calorimétricas obtenidas de 2,5-DKGRA (azul), AR (rojo) y sTIM-11 (naranja) a una velocidad de barrido de 90 K h⁻¹. (Amortiguador AR y 2,5-DKGRA: Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0, amortiguador sTIM11: Fosfato de sodio monobásico 10 mM, pH 8.0. La concentración de proteína utilizada en todos los casos fue de 0.4 mg mL⁻¹).

- *Diferencia en el valor del ΔH de las proteínas estudiadas*

Aun cuando el proceso de desplegamiento térmico de AR y 2,5-DKGRA resultó irreversible, se estimó un valor promedio del ΔH a partir del área bajo la curva de las trazas calorimétricas obtenidas por DSC a distintas velocidades de barrido. Este parámetro se comparó contra el valor de entalpía de sTIM-11 obtenido a partir del desplegamiento reversible de esta proteína.

El valor de ΔH es un indicativo del número de interacciones favorables que estabilizan el estado plegado de las proteínas. El valor estimado a partir del área bajo la curva de las trazas calorimétricas ($\Delta H_{\text{calorimétrico}}$) para AR fue de $\Delta H = 187.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, en 2,5-DKGRA $\Delta H = 139.25 \text{ kcal mol}^{-1}$ y el calculado para sTIM-11 fue de $\Delta H = 67.34 \text{ kcal mol}^{-1}$. Con lo anterior, se observa que el valor de la entalpía en los barriles TIM monoméricos naturales es casi tres veces más grande en comparación con el barril diseñado *de novo*. Con el objetivo de relacionar la diferencia observada en el valor de la entalpía con datos estructurales, se realizó la comparación de las estructuras tridimensionales de las proteínas y se encontró lo siguiente:

- El número de puentes de hidrógeno por residuo en las estructuras de AR, 2,5-DKGRA y s-TIM11 es prácticamente idéntico.

- El número de puentes salinos por residuo presentes en sTIM-11 es muy parecido al que posee AR, y corresponde a casi el doble de los que se observan en la estructura 2,5-DKGRA.
- El volumen que ocupan las cavidades en 2,5-DKGRA es muy similar al de s-TIM11, la cual muestra un valor de estabilidad marginal (ΔG).

De las observaciones anteriores, resulta evidente que la diferencia en el número de interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas que aquí se comparan, no es principal la responsable de la diferencia en los valores de entalpía obtenidos para barriles monoméricos naturales y diseñados *de novo*.

- *Diferencia en el valor de T_m de las proteínas estudiadas*

Durante la descripción de la estabilidad de las proteínas es fácil confundir los conceptos de estabilidad termodinámica y termorresistencia. La estabilidad termodinámica de las proteínas se define como la diferencia que existe en el valor de la energía libre entre las especies plegadas y desplegadas (ΔG). En tanto que la termorresistencia se describe por el valor de la T_m . Ambos parámetros pueden obtenerse a partir de la construcción de la curva de estabilidad, sin embargo esto no siempre es posible debido a que no todas las proteínas muestran reversibilidad en su proceso de desplegamiento.

Al describir la estabilidad de una proteína, los parámetros de ΔG y T_m pueden tener ciertas limitaciones. Sin embargo, el problema principal que enfrentan es que estos parámetros se correlacionan pobremente. Es común utilizar la variación de la T_m (ΔT), como una medida fiel de la estabilidad, implicando que existe una proporcionalidad con la estabilidad termodinámica (ΔG). Sin embargo, como Becketl y Schellman demostraron en 1987, la relación entre el cambio del valor de la T_m y el ΔG sólo es lineal cuando se asume que las porciones de las dos curvas de estabilidad utilizadas para medir el incremento en la temperatura (ΔT), se comportan como líneas rectas paralelas que cruzan en la abscisa. Sin embargo, en la mayoría de los casos esto no es cierto. Una causa común de ello, es el cambio simultáneo de la entalpía de plegamiento y el ΔC_p . Cualquier cambio en la curvatura ($-\Delta C_p/T$) hará que las porciones de ambas curvas no sean paralelas. El otro gran factor limitante, es la utilización de altas temperaturas de desplegamiento para evaluar la estabilidad de las proteínas. Lo cual se debe a que el proceso de desnaturalización no siempre es reversible, y generalmente se asocia con fenómenos de agregación (Sanfelice *et al.*, 2015).

Esta falta de correlación entre el valor de la T_m y el valor del ΔG es clara para la proteína sTIM-11, la cual presenta un valor considerablemente alto de termorresistencia con una T_m de aprox. 88 °C, pero un valor de ΔG muy bajo de 4 kcal mol⁻¹. En el caso de AR y 2,5-DKGRA no fue posible estimar el valor de estabilidad termodinámica debido a la irreversibilidad del proceso de desplegamiento.

Tomando en cuenta los análisis de las estructuras cristalográficas de sTIM-11, AR y 2,5-DKGRA, parece que la contribución de los puentes de hidrógeno y salinos no es la responsable de la diferencia observada en los valores de ΔG , ΔH y T_m . Debido a que, aun

cuando sTIM-11 posee un número considerable de este tipo de interacciones electrostáticas en su estructura, muestra una estabilidad termodinámica marginal a temperatura ambiente y un valor de ΔH significativamente reducido en comparación con los barriles monoméricos naturales. En la tabla 30 se muestra la comparación de ciertos parámetros de estabilidad y de estructura de las proteínas que aquí se describen. Una de las propiedades estructurales que podrían asociarse con la elevada termoestabilidad de sTIM-11, es el número de puentes salinos que posee en su estructura. La resistencia a la desnaturalización térmica (valor de T_m) y química (valor de C_m) de AR y sTIM-11 es considerablemente mayor a la que muestra 2,5-DKGRA, la cual posee un número de puentes salinos considerablemente menor.

Sin duda, la construcción de las curvas de estabilidad de AR y 2,5-DKGRA hubiera sido clave en la identificación de las propiedades que determinan la estabilidad termodinámica de estos barriles TIM monoméricos. La evaluación del valor de ΔC_p , nos hubiera brindado información relevante acerca de las interacciones agua-proteína entre los estados plegados y desplegados de estas proteínas. De hecho, existen reportes que proponen que la presencia de estructura residual en el estado desplegado y su impacto en el valor del ΔC_p , puede contribuir de forma muy importante en la estabilidad global de las proteínas (Hart *et al.*, 2014).

Tabla 30. Comparación de los valores de estabilidad y estructura de los barriles TIM monoméricos estudiados y el barril sTIM-11 diseñado *de novo*.

	AR	2,5-DKGRA	sTIM-11
Número de residuos	315	278	194
ΔG^D (kcal mol⁻¹)	ND	ND	4.2^A
ΔH (kcal mol⁻¹)	187.5	139.25	67.34^B
T_m (°C)	54.2	45.3	88^A
C_m GdnHCl (M)	ND	0.56	2^A
C_m Urea (M)	4.06	0.86	ND
Número de túneles	2	10	8
Suma total de la longitud de los túneles (Å)	19.86	122.39	76.01
Suma de los Índices de hidrofobicidad de los túneles	-1.06	2.56	1.09
Número de cavidades	4	7	8
Volumen normalizado de las cavidades ^N (Å ³)	4.47	8.44	6.47
Número de puentes de hidrógeno por residuo ^N	0.99	0.84	1.05
Número de puentes salinos por residuo ^N	0.09	0.06	0.16
ASA total del monómero (Å ²)	13326.8	11277.4	8733.9

^A Huang *et al.*, 2016. ^B Valor obtenido por el M.C.Sergio Romero-Romero. ND: No determinado. ^N Valores normalizados por el número de aminoácidos presentes en las proteínas.

CONCLUSIONES

- A partir de este estudio se estableció el protocolo óptimo para la expresión y purificación de las ACRs monoméricas AR y 2,5-DKGRA. La condición más favorable que se encontró fue en presencia de un amortiguador con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 8.0. La estandarización de la composición del amortiguador previno el fenómeno de agregación observado y permitió obtener cantidades suficientes de las proteínas para realizar su caracterización fisicoquímica.
- La AR y 2,5-DKGRA mostraron espectros de fluorescencia y dicroísmo circular compatibles con el de proteínas α/β nativas, lo cual se acompañó de la presencia de actividad catalítica para los sustratos promiscuos DHA y *DL*-GAL. En el caso de AR, se observó una disminución significativa de la eficiencia catalítica asociada presumiblemente a la presencia de DTT durante las mediciones de actividad.
- El desplegamiento térmico de las proteínas resultó irreversible, aunque a partir de éste fue posible estimar los valores de las T_m^{app} para ambas enzimas, mostrando una marcada diferencia de aproximadamente 10°C en su termorresistencia. AR mostró un valor de 54.2 °C en el valor de su T_m^{app} , en tanto que el valor para 2,5-DKGRA fue de 45.3°C.
- Los resultados obtenidos por DSC mostraron que el proceso de desplegamiento para ambas enzimas está controlado cinéticamente, con una dependencia del valor de la T_m con la velocidad de barrido.
- Los valores de las E_A obtenidos para AR (443.5 kJ mol⁻¹) y 2,5-DKGRA (330.3 kJ mol⁻¹) mostraron una diferencia de aproximadamente 100 kJ mol⁻¹, reflejando un estado de transición energéticamente más costoso en AR. Los valores de E_A para los monómeros estudiados muestran un mayor grado de similitud con los valores reportados para TIMs diméricas, que para TIMs tetraméricas.
- El desplegamiento con agentes químicos mostró ser irreversible, al igual que en el caso del desplegamiento térmico. Sin embargo, a partir de estos experimentos fue posible estimar valores de ΔG_D^{app} para cada una de las proteínas. Encontrando que AR mostraba un valor de estabilidad termodinámica considerablemente mayor, en comparación con 2,5-DKGRA.
- Tras realizar la comparación estructural de las proteínas, se encontró que el número de interacciones electrostáticas en las estructuras de 2,5-DKGRA era muy similar, aunque el volumen que ocupan las cavidades y los túneles en las proteínas era muy distinto y podía relacionarse con las diferencias observadas en los valores de T_m , C_m , ΔG_D^{app} , E_A , y ΔH obtenidos.

- También se llevó a cabo la comparación de las propiedades fisicoquímicas de los barriles TIM monoméricos naturales estudiados con el barril sTIM-11 diseñado *de novo*, y se encontraron grandes diferencias entre sus valores de ΔH y T_m .
- Los dos barriles TIM monoméricos estudiados, aun cuando se clasifican dentro de la misma superfamilia de proteínas y poseen estructuras muy semejantes mostraron estabilidades muy diferentes. Sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente, esto se relaciona con el hecho de que cada proteína representa una entidad única, con una secuencia definida de aminoácidos, interacciones específicas entre éstos y paisajes conformacionales propios. Por lo que es probable que la función y estabilidad de las proteínas esté vinculada con las presiones evolutivas a las cuales los organismos que las poseen han estado expuestos.

PERSPECTIVAS

- Explorar condiciones de expresión y solubilización para AKR11B.
- Seleccionar y hacer la caracterización fisicoquímica de otras proteínas monoméricas pertenecientes a la superfamilia de las ACRs o a otras familias homólogas de barriles TIM.
- Hacer la caracterización cinética de AR en ausencia de DTT.
- Caracterizar por DSC u otras técnicas la región “ruidosa” dentro del desplegamiento químico inducido por GdnHCl (0.5-1.5 M) de AR.
- Estudiar mediante desnaturalización por presión hidrostática y mutagénesis dirigida el efecto que tienen las cavidades y los túneles en la estabilidad global de AR y 2,5-DKGRA. Mutar los aminoácidos presentes en estas regiones de bajo empaquetamiento dentro de las proteínas, por otros aminoácidos más voluminosos, nos permitiría evaluar directamente el papel que tienen las cavidades y los túneles en la diferencia observada en la estabilidad de AR y 2,5-DKGRA.

BIBLIOGRAFÍA

Alber T., Banner D.W., Bloomer A.C., Petsko G.A., Phillips D., Rivers P.S. 1981. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 293, 159-171.

Antelmann H., Bernhardt, J., Schmid R., Mach H., Voelker U., Hecker M. 1997. First steps from a two-dimensional protein index towards a response regulation map for *Bacillus subtilis* electrophoresis. *Electrophoresis* 18, 1451-1463.

Bennion B.J., Daggett V. 2003. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *PNAS* 100, 5142–5147.

Bondos S. E., Bicknell A. 2003. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry* 316, 223–23.

Borchert T. V., Abagyan R., Jaenicke R., Wierenga R.K. 1994. Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *PNAS.* 91, 1515-1518.

Bränden C.I. 1991. The TIM barrel-the most frequently occurring folding motif in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 978-983.

Brasemann E., Chaney J., Clark P. 2013. Folding the proteome. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 337–344.

Camilloni C., A. Guerini R., I. Eberini E. G., Broglia R.A. 2008. Urea and guanidinium chloride denature protein in different ways in molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* 94, 4654–4661.

Carstensen L., Zoldak G., Schmid F. X., Sterner R. 2012. Folding mechanism of an extremely thermostable ($\beta\alpha$) 8-barrel enzyme: a high kinetic barrier protects the protein from denaturation. *ACS Publications* 51, 3420–3432.

Cioni P. 2006. Role of protein cavities on unfolding volume change and on internal dynamics under pressure. *Biophysical Journal* 91, 3390–3396.

Costas M., Rodríguez-Larrea D., De Maria L., Borchert T. V., Gómez-Puyou A., Sanchez-Ruiz J. M. 2009. Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J. Mol. Biol.* 385, 924–937.

Currin A., Swainston N., Day P.J., Kell D.B. 2015. Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. *Chemical Society Reviews* 44, 1172-1239.

Daggett V., Fersht. 2003. The present view of the mechanism of protein folding. *Nature Reviews* 4, 297-502.

Eberhard M., Tsai-Pflugfelder M., Bolewska K., Hommel U., Kirschner K. 1995. Indoleglycerol phosphate synthase-phosphoribosyl anthranilate isomerase: Comparison of

the bifunctional enzyme from *Escherichia coli* with engineered monofunctional domains. *Biochemistry* 34, 5419-5428.

Eder J., Kirschner K. 1992. Stable substructures of eight fold barrel proteins: fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry* 31, 3617-3625.

Ehrensberger A. H., Wilson D. K. 2004. Structural and catalytic diversity in the two family 11 Aldo-keto Reductases. *J. Mol. Biol.* 337, 661–673.

Ehrensberger A., Wilson D. K. 2003. Expression, crystallization and activities of the two family 11 aldo-keto reductases from *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst.* 59, 375-377.

Fersht, A.R. 1999. Structure and mechanism in protein science. Segunda Edición. W.H. Freeman and Co., Estados Unidos, 324-347.

Finn Robert D., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S. R., Mistry J., Mitchell A. L., Potter S.C., Punta M., Qureshi M., Sangrador V. A., Salazar G. A., Tate J., Bateman A. 2015. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 1-7.

Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218.

Goodsell D. 2010. The machinery of life. Segunda Edición. Springer Science Business Media. Estados Unidos, 10-13.

Goodsell D., Olson A. 2000. Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 105–53.

Gray, H.B. 2003. Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3563–3568.

Grimshaw C.E, Shahbaz M., Putney. 1990. Mechanistic basis for nonlinear kinetics of aldehyde reduction catalyzed by aldose reductase. *Biochemistry* 29, 9947-9955.

Haber E. y Anfinsen, C. 1961. Regeneration of enzyme activity by air oxidation of reduced subtilisin-modified ribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry* 236, 422-424.

Hart K. M., Harms M. J., Schmidt, B. H., Elya C., Thornton J. W., Marqusee S. 2014. Thermodynamic system drift in protein evolution. *PLOS Biology* 12, -12.

Hecker, M., Schumann, W., Voelker, U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19, 417–428.

Höcker B., Jürgens C., Wilmanns M., Sterner R. 2001. Stability, catalytic versatility and evolution of the ($\beta\alpha$) 8-barrel fold. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 376–381.

Huang P., Boyken S. E., Baker D. 2016. The coming of age of de novo protein design. *Science*, Nature 537, 320–327.

Huang P., Feldmeier K., Parmeggiani F., Fernandez-Velasco D. A., Höcker B., Baker D. 2016. De novo design of a four-fold symmetric TIM-barrel protein with atomic-level accuracy. *Nature Chemical Biology* 12, 29-36.

Hyndman D., Bauman R., Vladi V., Heredia, Trevor M., Penning. 2003. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions* 143-144, 621-631.

Ibarra-Molero B., Sanchez-Ruiz J. M. 2006. Differential scanning calorimetry of proteins: an overview and some recent developments. *Springer Series in Biophysics. Advanced Techniques in Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Capítulo 2, 27-29.

Jez J. M., Melanie J. Bennett M. J., Schlegel Brian. 1997. Comparative anatomy of the aldo–keto reductase superfamily. *Biochem. J.* 326, 625–63.

Johnson M. P. 2016. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* 60, 255–27.

Kannan R., Sreekumar P. G., Hinto David R. 2012. Novel roles for α -crystallins in retinal function and disease. *Prog Retin Eye Res.* 31, 576-604.

Karel B., Ondřej H., David S., Navrátilová V. 2012. MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels. *Nucleic Acids Research* 40, 222-227.

Karplus M., Weaver D. 1993. Protein folding dynamics: The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Science* 3, 650-668.

Kauzmann W. 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 14, 1-63.

Kelly S. M., Jess T. J., Price Nicholas C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751, 119 – 139.

Kim, Baldwin. 1982. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annual Review of Biochemistry* 51, 459-489.

Krissniel E., Henrick K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, 1-10.

Kuriyan J., Konforti B., Wemmer D. 2013. The molecules of life: physical and chemical principles. *Primera Edición. Estados Unidos*, 131-136.

Lee C., Park S.H., Lee M.Y., Yu M.H. 2000. Regulation of protein function by native metastability. *Proc Natl Acad Sci.* 97, 7727–7731.

Lorber B., Fischer F., Bailly M., Roy H., Kern D. 2012. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and molecular biology education* 40, 372-382.

Manickam G., Mani S., Raju N., Helliwell J. R., Kanagaraj S. 2014. Do we see what we should see? Describing non-covalent interactions in protein structures including precision. *IUCrJ* 1, 74–81.

Matthews C.R., Crisanti M.M. 1981. Urea-induced unfolding of the subunit of tryptophan synthase: evidence for a multistate process. *Biochemistry* 20, 784-792.

Miller J.V., Estell D.A., Lazarus R.A. 1987. Purification and characterization of 2, 5-diketo-gluconate reductase from *Corynebacterium sp.* *The Journal of Biological Chemistry* 262, 9016-9020.

Mohammad A. S., Tapan K.C., Saroj M. 2012. Strategy for purification of aggregation prone β -glucosidases from the cell wall of yeast: a preparative scale approach. *New Biotechnology* 29, 311-320.

Myers J. K., Pace C. N. 1996. Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophysical Journal* 71, 2033-2039.

Nagano N., Orengo C. A., Thornton J.M. 2002. One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and Functions. *J. Mol. Biol.*, 321, 741–765.

Nelson D.L., Michael M. Cox. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. Primera Edición. Estados Unidos.

Niu W., Shu Q., Chen Z., Mathews S., Di Cera E., Frieden C. 2010. The role of Zn²⁺ on the structure and stability of murine adenosine deaminase. *J Phys Chem B*. 114, 16156–16165.

Norledge B.V., Lambeir A.M., Abagyan R.A., Rottmann A., Fernandez A.M., Filimonov V.V., Peter M.G., Wierenga R.K. 2001. Modeling, mutagenesis, and structural studies on the fully conserved phosphate-binding loop (loop 8) of triosephosphate isomerase: toward a new substrate specificity. *Proteins* 42, 383-389.

Oleg B. Ptitsyn. 1987. Protein folding: hypotheses and experiments. *Journal of Protein Chemistry* 6, 273-293.

Palm-Espling M.E., Moritz S. N., Wittung-Stafshede P. 2012. Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1594–1603.

Petersohn A., Antelmann H., Gerth U., Hecker M. 1999. Identification and transcriptional analysis of new members of the sB regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145, 869-880.

Petrash M. J., Harter T. M., Devine C. 1992. Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 24833-24840.

Petrova T., Steuber H., Hazemann I., Cousido-Siah A., Mitschler A., Chung R., Oka M., Klebe G., El-Kabbani O., Joachimiak A., Podjarny A. 2005. Factorizing selectivity determinants of inhibitor binding toward aldose and aldehyde reductases: structural and thermodynamic properties of the aldose reductase mutant Leu300Pro-fidarestat complex. *J. Med. Chem.* 48, 5659-5665.

Pettersen E.F., Goddard T. D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D. M., Meng E.C., Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605–1612.

Rainer R., Diebendritt R., Kiefhaber T. 1992. Reversible unfolding and refolding behavior of a monomeric aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Protein Science* 1, 654-666.

Richards F. M. 1974. The interpretation of protein structures: total volume, group volume distributions and packing density. *J. Mol. Biol.* 82, 1-14.

Robertson A. D., Murphy K. P. 1997. Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem. Rev.* 97, 1251–1268.

Romero-Romero S., Costas M., Rodríguez-Romero A., Fernández-Velasco D.A. 2016. Reversibility and two state behaviour in the thermal unfolding of oligomeric TIM barrel proteins. *Phys. Chem.* 17, 20699-20714.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., Kobilka, B. K. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363.

Saab-Rincón G., Juárez Víctor R., Osuna J., Sánchez F., Soberón X..2001. Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Engineering* 14, 149-155.

Sánchez Del Pino M. M., Fersht A.R. 1997. Nonsequential unfolding of the β/α barrel protein indole-3-glycerol-phosphate synthase. *Biochemistry* 36, 5560–5565.

Sanchez-Ruiz J.M. 2010. Protein kinetic stability. *Biophys Chem.* 148, 1–15.

Sanfelicea Domenico, Temussi Piero Andrea. 2016. Cold denaturation as a tool to measure protein stability. *Biophysical Chemistry* 208, 4–8.

Sanli G., Banta S., Anderson S., Blaber M. 2004. Structural alteration of cofactor specificity in *Corynebacterium* 2, 5-diketo-D-gluconic acid reductase. *Protein Science* 13, 504–512.

Skoog D., Holler F. J. y Crouch S.R. 2006. Principles of instrumental analysis. Sexta edición. Connecticut, USA. Cengage Learning.

Sonavane S., Chakrabarti P. 2008. Cavities and atomic packing in protein structures and interfaces. *PLoS Computational Biology* 4, 1-15.

Spudich, J. A. 2001. The myosin swinging cross-bridge model. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 387–392.

Steuber H., Zentgraf M., Podjarny A., Heine A., Klebe G. 2006. High resolution crystal structure of aldose reductase complexed with the novel sulfonyl-pyridazinone inhibitor exhibiting an alternative active site anchoring group. *J. Mol. Biol.* 356, 45–56.

Stickle, D. F., Presta L. G., Dill K. A., Rose G. D. 1992. Hydrogen bonding in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 226, 1143-1159.

Takano K., Yamagata Y., Yutani K. 2003. Buried water molecules contribute to the conformational stability of a protein. *Protein Eng.* 16, 5–9.

Trevor M. Penning. 2015. The ald-keto reductases (AKRs): overview. *Chem. Biol. Interact.* 234, 236–246.

Vander D. L., Robinson B., Taylor K. K., Hunsaker L. A. 1992. Reduction of trioses by NADPH-dependent ald-keto reductases aldose reductase, methylglyoxal and diabetic complications. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 4364-4369.

Vivian, J.T., Callis, P.R. 2001. Mechanisms of tryptophan fluorescent shifts in proteins. *Biophysical Journal* 80, 2093–2109.

Wang M., Hu J., Zhang Z. 2016. The folding of de novo designed protein DS119 via molecular dynamics Simulations. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2-14.

Wang X., Zhang J. Z. H., He X. 2015. Quantum mechanical calculation of electric fields and vibrational Stark shifts at active site of human aldose reductase. *The Journal of Chemical Physics* 143, 184111-10.

Wetlaufer, D. 1973. Nucleation, rapid folding, and globular Intrachain regions in proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70, 697-701.

Wierenga R.K. 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters* 492, 193–198.

Wilmanns M., Priestle J. P., Niermann T., Jansonius J. N. 1992. Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme phosphoribosylanthranilate isomerase: indoleglycerolphosphate synthase from *Escherichia coli* refined at 2.0 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* 223, 477-507.

Wittung-Stafshede P. 2002. Role of cofactors in protein folding. *Acc. Chem. Res.* 35, 201–208.

Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T. 2001. ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 669–677.

Zou T., Williams N., Ozkan S. B., Ghosh K. 2014. Proteome folding kinetics is limited by protein half-life. *PLOS ONE* 9(11): e112701.