



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES BASADAS EN T<sub>v</sub>TIM:**

**ANDAMIO DE CRISTALIZACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS en la especialidad de BIOLOGÍA INTEGRATIVA**

PRESENTA:

**Marcel Gustavo Alamán Zárate, I. Bt.**

DIRECTORES:

**Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro** Langebio, Cinvestav Irapuato

**Dr. Jaime Ortega López** Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav Zacatenco

COMITÉ TUTORIAL:

**Dra. Rossana Arroyo Verástegui** Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav Zacatenco

**Dr. José Juan Ordaz Ortiz** Langebio, Cinvestav Irapuato

**Dr. Robert Winkler** Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Cinvestav Irapuato

Irapuato, Guanajuato.

## Lugar de realización

El presente Trabajo de Investigación se realizó en el laboratorio 4 “Bioquímica Estructural” de la Unidad de Genómica Avanzada del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Bajo la co-dirección del **Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro**, Investigador Titular en la Unidad de Genómica Avanzada CINVESTAV -IPN y el **Dr. Jaime Ortega López**, Investigador Titular 3-C adscrito al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV -IPN. La asesoría de la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui**, Investigadora Titular adscrita al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular CINVESTAV -IPN; del **Dr. José Juan Ordaz Ortiz**, Investigador Titular en la Unidad de Genómica Avanzada CINVESTAV -IPN y el **Dr. Robert Winkler** Investigador Titular en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato CINVESTAV-IPN

## Resumen

El ensamblaje de proteínas en cristales regulares y ordenados es crítico para la cristalización de proteínas. El uso de etiquetas grandes como la Proteína de Unión a Maltosa o Tiorredoxina, pueden conferir estabilidad, solubilidad y ayudar la purificación de proteínas. El uso de las etiquetas antes mencionadas durante la expresión heteróloga de proteínas ha favorecido la formación de redes al fusionarse a proteínas renuentes a la cristalización, funcionando como andamios de cristalización. La triosafosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) se seleccionó como andamio de cristalización, para cristalizar cuatro proteínas de estructura desconocida. Se realizaron las fusiones traduccionales a TvTIM usando un *linker* rígido (rico en alaninas) y un *linker* flexible (rico en glicinas) de el inhibidor 1 de cisteína-proteinasas de *Entamoeba histolytica* (EhICP1, 13.4 kDa), dos proteínas de unión a DNA de cadena sencilla de *Arabidopsis thaliana* (OSB1, 30.5 kDa; SSB1, 23.2 kDa) y la Enolasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtEno1, 55.2 kDa). Los resultados obtenidos sugieren que la expresión heteróloga en de las fusiones con el andamio TvTIM es posible, pero no así la cristalización, dado que los datos de difracción muestran únicamente densidad electrónica correspondiente a la TvTIM.

---

## Abstract

The self-assembly of proteins into regular and well-ordered crystals is critical for protein crystallography, but it is rather difficult and becomes a challenge for many proteins. The use of large tags, such as Maltose Binding Protein or Thioredoxin can confer stability, solubility, and help for biochemical purification. During heterologous expression, the use of this tags has confirmed the formation of crystal lattices when fused to recalcitrant proteins. The *Trichomonas vaginalis* triosephosphate isomerase (TvTIM) was selected as a scaffold to crystallise four proteins with unknown structure. *Entamoeba histolytica*'s cysteine proteinase inhibitor 1 (EhICP1, 13.4 kDa), two *Arabidopsis thaliana*'s single DNA strand binding proteins (OSB1, 30.5 kDa; SSB1, 23.2 kDa) and *Arabidopsis thaliana*'s enolase 1 (AtEno1, 55.2 kDa) were translationally fused to TvTIM using two linkers; a rigid (alanine-rich) and a flexible (glycine-rich). The results suggest that bacterial heterologous expression of TvTIM fused to EhICP1 is feasible, but not crystallization, since the diffraction data only showed electronic density due to TvTIM.

# Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de **CONACYT** a través del proyecto **FONS.INST./48/2016** otorgado al Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro y a la beca de posgrado **No. de Apoyo 436823** otorgada a Marcel Gustavo Alamán Zárte durante la realización de la maestría en el periodo de 1 marzo de 2016 a 28 febrero de 2018.

A **CINVESTAV-LANGEBIO** por las facilidades en el uso de equipos e instalaciones, necesarias para realizar este proyecto.

Al **Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro** por contribuir en mi formación profesional a través de su apoyo y guía. Gracias por permitirme integrarme a su grupo de trabajo.

Al **Dr. Jaime Ortega López** por su apoyo desde que estaba en la licenciatura, sus consejos y su dirección, me han permitido alcanzar otro logro en mi desarrollo profesional.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por permitirme participar durante un mes en su laboratorio, gracias por los consejos y las críticas tan constructivas que siempre compartió.

Al **Dr. Robert Winkler** por la disposición, las sugerencias y las críticas que tuvo durante los tutoriales y en el desarrollo de mi proyecto.

Al **Dr. José Juan Ordaz Ortiz** por la orientación brindada durante los tutoriales, siempre dando un consejo preciso.

A la **Ing. Corina Elizabeth Díaz Quezada** por el apoyo metodológico, en la purificación proteínas y la disposición a ayudarme durante el desarrollo del proyecto.

A la **M. en C. Alma Yazmín Fuentes Pascasio**, **Ing. Paola Libertad García Medel** y **M. en C. Pedro Jiménez Sandoval**, por confiarme sus construcciones, gracias por las sugerencias y la disposición a ayudar en el desarrollo del proyecto.



## Agradecimientos personales

A los miembros del Laboratorio 4: **Elizabeth, Víctor, Humberto, Noé, Pedro, Libertad, Antolín, Yazmín, Eduardo, Javier, Enrique, Yunúen y Eunice**. Les agradezco por haberme acompañado en el transcurso de la maestría, su amistad y compañía. *It's funny, you work so hard, you do everything you can to finish in a place, and when you finally get your chance to leave, you find a reason to stay.*

A los Integraboys: **Lalo C, Lalo M, Falcón, Pablo y Juanes**. Gracias por su amistad y compañía, por las pláticas, las hamburguesas y los consejos. Mucho éxito en sus empresas futuras.

Al Grupo de la 1, **Lalito, Víctor, Antolín y Fran** gracias por la compañía durante las comidas, por los buenos momentos, hicieron tan llevadera mi estancia en el laboratorio que sería un ingrato al no ponerlos aquí. Gracias de corazón, se han vuelto en unos amigos invaluable.

A mis **padres y hermano**, la vida plantea decisiones difíciles, siempre hay conflictos que afrontar, barreras que superar. Sin ustedes todo sería imposible, “el aroma de una flor permanece en la mano de quien la regala” gracias por el regalo tan grande que me han dado, ser mi familia. El sentimiento es inconmensurable y soy pobre de palabras. Los quiero, gracias.

***Слава Богу***

*"El niño es realista, el muchacho, idealista; el hombre, escéptico,  
y el viejo, místico".* Johann W. Goethe

Dedicado a G.Z.†



# Contenido

Lugar de realización	2
Resumen	II
Agradecimientos	III
Agradecimientos personales	IV
Contenido	VI
Índice de Figuras	X
Índice de Tablas	XII
Glosario de abreviaturas	XIII
1 Introducción	1
1.1 Cristalografía de rayos X	1
1.1.1 Difracción de rayos X	2
1.1.2 Cristalografía de proteínas	3
1.1.3 Problemas frecuentes en cristalografía de proteínas	4
1.2 Proteínas de fusión y <i>linkers</i>	5
1.2.1 Andamio de cristalización	6
1.3 Triosafosfato isomerasas (TIM)	7
1.3.1 Topología de barril TIM ( $\alpha\beta$ ) <sub>8</sub>	8
1.3.2 Mecanismo de reacción	9
	VI

1.4	<i>Trichomonas vaginalis</i>	11
1.4.1	Triosafosfato isomerasas de <i>Trichomonas vaginalis</i> (TvTIMs)	11
1.5	Antecedentes	12
1.5.1	Expresión a través del promotor T7	12
1.5.2	Obtención de la estructura cristalográfica de TvTIM1 y TvTIM2	15
1.5.3	Proteínas de interés para el proyecto	18
2	Justificación	20
3	Hipótesis	21
4	Objetivos	21
4.1	General	21
4.2	Particulares	21
5	Materiales y métodos	22
5.1	Materiales	22
5.1.1	Plásmidos	22
5.1.2	Sistema de expresión y cepas bacterianas.	22
5.2	Estrategia Experimental.	23
5.3	Métodos	24
5.3.1	Subclonación de andamios en vector pET28b (+)	24
5.3.2	Subclonación de Eno1, SSB1, OSB1 y EhICP1 en los andamios	28
5.3.3	Cultivo e inducción y purificación de las fusiones	29

5.3.4	Ensayos de Cristalización	30
5.3.5	Colección de datos de difracción por rayos X	31
5.3.6	Determinación de las estructuras, refinamiento y análisis.	31
6	Resultados y Discusión	32
6.1	Armado de los plásmidos andamio y subclonación de los genes de interés	32
6.2	Expresión y purificación	34
6.2.1	Fusiones de Enolasa1	36
6.2.2	Fusiones de OSB1	39
6.2.3	Fusiones de SSB1	42
6.2.4	Fusiones de EhICP1	45
6.3	Cristalización	54
6.4	Difracción de rayos X y resolución de estructuras	57
7	Conclusiones y Perspectivas	62
7.1	Conclusiones	62
7.2	Perspectivas	62
7.3	Productos	62
	Bibliografía	66
8	Anexos	78
8.1	Secuencias	78
8.1.1	Secuencia nucleotídica de los andamios	78

8.1.2	Secuencia proteica de los andamios	79
8.1.3	Secuencia proteica de fusiones	80
8.2	Plásmidos utilizados	84
8.2.1	Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pET28b (+)	84
8.2.2	Mapa del vector pET28b (+)-TvTIMflexible	85
8.2.3	Mapa del vector pET28b (+)-TvTIMrigido	85
8.2.4	Mapa de plásmido pET28b (+)-TvTIMflexible-EhICP1	86
8.2.5	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-EhICP1	86
8.2.6	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMflex-AtEno1	87
8.2.7	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-AtEno1	87
8.2.8	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMflexible-OSB1	88
8.2.9	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-OSB1	88
8.2.10	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMflexible-SSB1	89
8.2.11	Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-SSB1	89
8.3	Datos de difracción de TvTIM (Salgado Lugo, 2011)	90

# Índice de Figuras

Figura 1. Espectro electromagnético .....	2
Figura 2. Reacción de isomerización de la triosafosfato isomerasa (TIM) .....	8
Figura 3. Diagrama de la topología del plegamiento de un barril TIM. ....	9
Figura 4. Estructura tridimensional de TIM de pollo (PDB: 1TPH Zhang y col., 1994) ....	9
Figura 5. Mecanismo de reacción de las triosafosfato isomerasas. ....	10
Figura 6. Alineamiento de aminoácidos entre TvTIM1 y TvTIM2. ....	12
Figura 7 Proceso de inducción en vectores pET .....	14
Figura 8. Interfaz de los dímeros de TvTIM1 .....	16
Figura 9. Técnica de gota colgante/vapor de difusión.....	17
Figura 10 Diseño de genes de andamios y sitio múltiple de clonación de pET28b(+)...	25
Figura 11. Comprobación de construcción de proteínas de fusión. ....	33
Figura 12. Prueba de digestión con PPS.....	34
Figura 13 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-Enolasa1 .....	36
Figura 14 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-Enolasa1 .....	37
Figura 15 Expresión y purificación por IMAC de fusiones de TvTIM y Enolasa1 .....	38
Figura 16 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-OSB1 .....	39
Figura 17 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-OSB1 .....	40

Figura 18. Expresión y purificación por IMAC de fusiones de TvTIM y OSB1 .....	41
Figura 19 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-SSB1.....	42
Figura 20 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-SSB1 .....	43
Figura 21 Expresión y purificación por IMAC de fusiones de TvTIM y SSB1 en <i>E. coli</i> BL21(DE3+) pG-KJE8.....	44
Figura 22 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-EhICP1 <sub>WT</sub> .....	46
Figura 23 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-EhICP1 <sub>WT</sub> , TvTIM-flexible- EhICP1 <sub>CxA</sub> y TvTIM-flexible-EhICP1 <sub>CxS</sub> .....	47
Figura 24 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-EhICP1 <sub>WT</sub> .....	48
Figura 25 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-EhICP1 <sub>CxA</sub> y TvTIM-rígido- EhICP1 <sub>CxS</sub> .....	49
Figura 26 Proteólisis con PPS para las construcciones de EhICP1 en el andamio TvTIM- flexible.....	50
Figura 27 Proteólisis con PPS para las construcciones de EhICP1 en el andamio TvTIM- rígido.....	51
Figura 28 Cromatogramas de la purificación de las fusiones de TvTIM con EhICP1, por Superdex 200.....	53
Figura 29 Modelo de TvTIM-flexible-EhICP1 <sub>WT</sub> por reemplazo molecular.....	58
Figura 30 Proteólisis de la fusión TvTIM-flexible-EhICP1 <sub>CxA</sub> al purificar, en gota y en tubo. .....	60



# Índice de Tablas

Tabla 1 Tamaños de plásmidos y genes usados.....	27
Tabla 2 Tamaño de las fusiones en ambos andamios.....	35
Tabla 3 Concentración de las proteínas de fusión para ensayos de cristalización.....	52
Tabla 4 Relación de cristales obtenidos durante el escrutinio de condiciones de cristalización.....	55
Tabla 5 Condiciones de cristalización que generaron microcristales.....	56
Tabla 6 Condiciones optimizadas de TvTIM-rígido-EhICP1 <sub>CXA</sub> en Buffer Crystal Screen 1 #46.....	56
Tabla 7 Características de la colección de datos de los cristales.....	57

# Glosario de abreviaturas

°C	Grados Celsius
3-PGA	3-fosfogliceraldehído ( <i>3-PhosphoGlycerAldeyde</i> por sus siglas en inglés)
Å	Ångstrøm (0.1 nm o 10 <sup>-10</sup> m) unidad usada en cristalografía por rayos X que corresponde a la energía de un fotón de 12.4 keV
Asn (A)	Asparagina
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> para expresión heteróloga de proteínas.
Cfr.	Confróntese
CP	Cisteína Proteinasa
CTAB	Bromuro de hexadecil trimetil amonio ( <i>cetyl trimethylammonium bromide</i> por sus siglas en inglés)
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> para clonación de plásmidos.
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>DesoxiriboNucleic Acid</i> por sus siglas en inglés)
DNAp	DNA plasmídico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acético (agente quelante)
EhICP1	Inhibidor 1 de Cisteína Proteinasas de <i>Entamoeba histolytica</i>
Eno1	Enolasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato ( <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate</i> por sus siglas en inglés)
Glu (E)	Ácido Glutámico
GST	Glutación-S-transferasa
His (H)	Histidina
HisTag	Etiqueta de Histidinas
IMAC	Cromatografía de afinidad a ion metálico inmovilizado ( <i>Inmovilized Metal-ion Affinity Chromatography</i> por sus siglas en inglés)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	KiloDaltons (tamaño molecular de proteína)
LB	Luria Bertani
Lys (L)	Lisina
MLM	Marcador de Longitud Molecular
MPM	Marcador de Peso Molecular
MWCO	Corte de Peso Molecular ( <i>Molecular Weight CutOff</i> ) peso molecular globular que es retenido al 90%.
OD <sub>600</sub>	Densidad Óptica celular leída a 600nm de longitud de onda. ( <i>Optic Density</i> por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de Lectura Abierta ( <i>Open Reading Frame</i> por sus siglas en inglés)
OSB1	Proteína de Unión a Cadena Sencilla Organelar 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>Organellar Single strand Binding protein 1</i> por sus siglas en inglés)
Pb	Pares de bases nitrogenadas en DNA
PEP	Fosfoenol piruvato ( <i>PhosphoEnole Pyruvate</i> por sus siglas en inglés)
PPS	PreScission Protease (Fusión comercial de GST con proteasa 3C de picornavirus)
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril Sulfato de Sodio ( <i>Sodium Duodecil Sulfate</i> por sus siglas en inglés)
SSB1	Proteína 1 de unión a cadena sencilla de <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>Single Strand Binding</i> por sus siglas en inglés)
TIM	Triosa fosfato isomerasa (refiriéndose al polipéptido).
tpi	Triosa fosfato isomerasa (por las siglas en inglés de <i>triose phosphate isomerase</i> , aludiendo al gene)
V	Volts (unidad de conducción eléctrica)

# 1 Introducción

Las proteínas juegan un papel esencial en los seres vivos, algunas proteínas tienen un papel estructural otras, un papel funcional. Para entender a profundidad su funcionamiento es importante conocer su estructura molecular. Conocer la estructura tridimensional de una proteína es importante, porque abre la posibilidad de entender la función de la proteína a partir de un análisis de su estructura, desafortunadamente determinar la estructura tridimensional no es una cuestión trivial (Chayen y Saridakis, 2008).

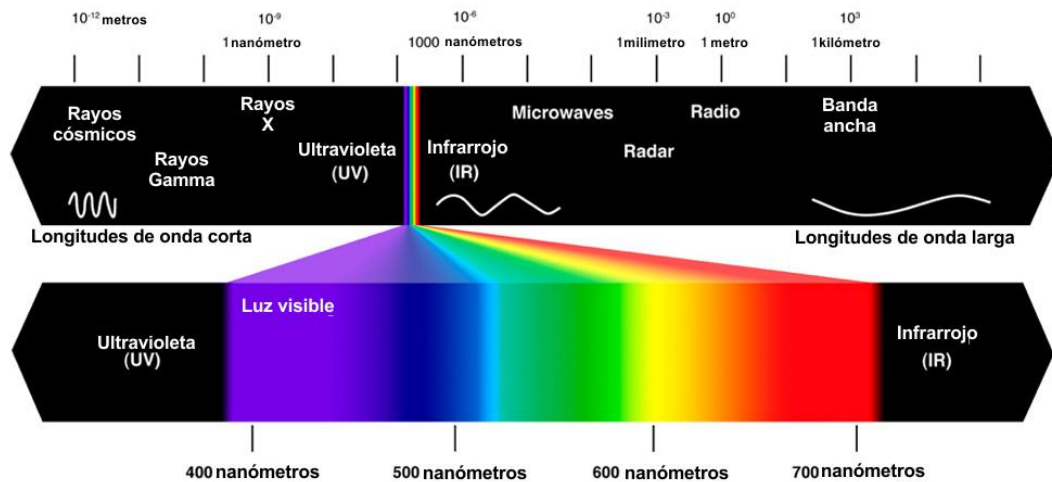
Dados los avances actuales, es posible determinar con un alto grado de certeza la estructura secundaria de una proteína, sin embargo, predecir la estructura tridimensional de una proteína es menos preciso (Coligan, 1996). A partir de las técnicas recientes en Biología Molecular y Biofísica, es posible conocer la estructura tridimensional de las proteínas, en la actualidad se conocen cerca de 130000 estructuras proteicas a nivel atómico, en gran parte debido a la cristalografía de rayos X, así la cristalografía tiene un rol primordial para ampliar el entendimiento sobre las proteínas (Rupp, 2010; Whitford, 2005).

## 1.1 Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X es una técnica experimental basada en la capacidad que tienen los rayos X de difractar en un cristal. Un cristal consiste en la repetición monótona de agrupaciones atómicas paralelas entre sí y a distancias repetitivas específicas formando una red, entre estas agrupaciones es donde los rayos X difractan (Wlodawer y col., 2008).

El espectro electromagnético se ordena en regiones con longitudes de onda descendentes, pero con frecuencias y energías ascendentes (Figura 1). Las longitudes de onda que cubren de 0.01 a 10nm corresponden a los rayos X, dado que tienen una longitud de onda similar a las distancias interatómicas dentro de un cristal ( $\sim 1\text{\AA}$ ), se utilizan los rayos X para determinar la estructura de moléculas (Zolotoyabko, 2014). En 1912 Friedrich y Knippin, obtuvieron los primeros patrones de difracción por rayos X de cristales de diamante, sal de roca y sulfuro de zinc.

Estos experimentos confirmaron la constitución atómica de la materia y los enlaces entre los átomos; sin embargo, es hasta finales de la década de 1950 cuando John Kendrew, logra resolver la primera estructura proteica por cristalografía de rayos X: mioglobina de esperma de ballena. En la actualidad, existen modelos de estructuras moleculares muy detallados, que van desde proteínas individuales, hasta ensamblajes macromoleculares complejos, todos determinados por cristalografía de rayos X (Rupp, 2010).



**Figura 1. Espectro electromagnético**

La longitud de onda para rayos X utilizada en determinación de estructuras macromoleculares es  $10^{-10}$ m, 0.1nm o 1 Ångström (Å).

### 1.1.1 Difracción de rayos X

Los átomos en un cristal interactúan con las ondas de rayos X en una forma determinada, esto genera interferencia. El patrón de difracción resultante es entonces la interferencia de los átomos en los planos del entramado. La ley de Bragg predice el ángulo de reflexión de cualquier rayo difractado de un plano atómico específico (interferencia constructiva). Al registrar múltiples patrones de difracción de rayos X en diferentes orientaciones del cristal, se puede determinar la estructura y el tamaño de celda unitaria (Shilova, 2016).

Desde el comienzo de la cristalografía se sabe, que los cristales más grandes difractan mejor que los cristales pequeños, debido a que la potencia de difracción va

relacionada al volumen del cristal. Para proteínas esto es más complicado, dado que las celdas unitarias son grandes y la densidad electrónica es baja. Es frecuente que sea difícil obtener cristales grandes, una solución a esto es la cristalografía en serie, es decir la recolección de datos a partir de los patrones de difracción de varios cristales pequeños y uniendo la información para generar un modelo (Rupp, 2010).

### 1.1.2 Cristalografía de proteínas

Las proteínas son capaces de realizar varias funciones al estar en su estructura nativa, el plegamiento de la proteína sin embargo, ocurre en el complejo ambiente celular, donde en ocasiones requiere de chaperones moleculares para evitar agregación o mal plegamiento (Shilova, 2016). Por ello los modelos de estructuras cristalográficas proveen una visión de la forma molecular y la función, además proveen la base para la biología estructural y descubrimiento de fármacos guiados por estructura (Gopal y Kumar, 2013).

Los cristales de proteínas están formados por una red periódica laxa de interacciones débiles, no covalentes y con grandes canales de solvente. Dichos canales permiten la difusión libre de moléculas pequeñas, y proveen cierta libertad conformacional para cadenas laterales de la superficie expuesta o para bucles (Rupp, 2010). La conformación más frecuente de enlaces peptídicos es *trans*, donde los C $\alpha$  átomos de aminoácidos sucesivos están opuestos. El arreglo óptimo de puentes de hidrógeno, con un esqueleto energéticamente favorable lleva a la formación de estructuras secundarias específicas: hélices- $\alpha$ , láminas- $\beta$ , vueltas, asas y otras estructuras (Rupp, 2010).

Las proteínas generalmente son difíciles de cristalizar, la ingeniería de proteínas para lograr que cristalicen no es trivial (Abdalla, 2015). El principal problema que se tiene que resolver, es obtener cristales de alta calidad. La cristalización de proteínas depende de múltiples factores, en la actualidad es difícil predecir la capacidad de una proteína para cristalizar, sin embargo, la pureza de la proteína es el factor más importante para obtener cristales óptimos para difracción. La introducción de etiquetas de expresión (*tags*) mejora la pureza de las proteínas purificadas, gracias al uso de columnas de afinidad. Debido a esto, en la actualidad la obtención de proteínas solubles y recombinantes se ha vuelto un prerrequisito para realizar estudios estructurales, funcionales y bioquímicos (Gopal y Kumar, 2013).

Los pasos generales para determinar la estructura cristalográfica de proteínas por cristalografía de rayos X son los siguientes: elección de proteína, expresión heteróloga (generalmente), clonación, expresión, purificación, cristalización, colección de patrones de difracción y determinación de la posición de los átomos (Chayen y Saridakis, 2008).

El proceso para cristalizar proteínas se puede dividir en 3 etapas (Cudney y col., 1994):

1. Escrutinio para condiciones de cristalización útiles que sirvan como guías. Consiste en identificar en extenso número de parámetros las condiciones que producen cristales.
2. Optimización de una o más condiciones iniciales para producir cristales sencillos, aptos para análisis de difracción por rayos X. En esta fase a partir de las condiciones que promueven cristalización, se evalúa el efecto para promover el crecimiento de cristales a través de cambios en el pH de la solución y la concentración del precipitante.
3. Generar colección de datos para la obtención reproducible de cristales. Una vez que se ha logrado obtener cristales apropiados para difracción de rayos X, asegurarse de que las condiciones probadas son reproducibles para la obtención de los cristales.

### **1.1.3 Problemas frecuentes en cristalografía de proteínas**

El primer problema que surge para cristalizar proteínas es conseguir una solución de proteína pura a concentraciones entre 5 y 15 mg/mL, pues en muchas ocasiones, aunque la proteína se obtenga por sobreexpresión heteróloga, la cantidad de proteína purificada es poca o con baja pureza. En caso de que se obtenga suficiente proteína en cantidad y pureza, surge el problema de conseguir cristales de alta calidad, esto es debido a que determinar las condiciones óptimas de cristalización es, como se explicó en el apartado anterior, un proceso complejo, tardado, multiparamétrico y heurístico (Chayen y Saridakis, 2008).

En la actualidad con las aproximaciones de genómica estructural, que se plantean determinar estructuras para millones de proteínas; aún no se ha logrado determinar correlaciones obvias entre el proceso de cristalización y las estructuras proteicas (Chayen y Saridakis, 2008). Las proteínas se han hecho más aptas para la cristalización mediante mutagénesis aleatoria o racional de residuos superficiales; y a través de la eliminación de colas flexibles y regiones interdominio (Chayen y Saridakis, 2008).

Algunos otros factores importantes que influyen la cristalización son la homogeneidad del estado conformacional de la proteína, la “frescura” de la muestra y los componentes adicionales en la solución de proteínas. La capacidad de cristalizar de una proteína, se ve afectada por la heterogeneidad conformacional causada por etiquetas de afinidad, regiones desordenadas, regiones transmembranales, flexibilidad de dominios y requerimiento de cofactores (Rupp, 2010).

## 1.2 Proteínas de fusión y *linkers*

Las proteínas de fusión son biomoléculas con propiedades multifuncionales, cualidades tales que pueden mejorar la solubilidad de una proteína, facilitar su purificación, expresión o plegamiento, incrementar su actividad biológica, conferir una localización o facilitar su rastreo por imagenología. Un *linker* es un conjunto de residuos que unen las partes de la proteína de fusión, sin embargo elegir el *linker* puede ser problemático, una mala elección puede llevar a un mal plegamiento de la proteína, bajos rendimientos o reducir su bioactividad (Chen y col., 2013).

En promedio los *linkers* son 7 residuos, a mayor longitud mejor acceso del solvente. Existen básicamente tres tipos de *linkers*: rígidos, flexibles y escindibles. Los *linkers* flexibles generalmente son ricos en aminoácidos polares o pequeños (Gly o Ser), que proveen buena flexibilidad y solubilidad. Son ideales cuando se desea que haya movilidad o interacciones entre los dominios de la proteína de fusión. Adicionalmente aun cuando carecen de estructuras rígidas, los *linkers* flexibles pueden funcionar de forma pasiva para mantener la distancia entre los dominios (Chen y col., 2013).

Los *linkers* rígidos exhiben estructuras rígidas al adoptar arreglos en  $\alpha$ -hélices o por contener múltiples residuos de prolina. Bajo muchas circunstancias separan más

eficientemente los dominios funcionales que los *linkers* flexibles. Los *linkers* rígidos son usados cuando la separación espacial de los dominios es crucial para mantener la estabilidad o bioactividad de las proteínas de fusión (Chen y col., 2013). Los *linkers* escindibles son diseñados para ser susceptibles a alguna proteasa particular, incorporando secuencias susceptibles a proteólisis, este tipo de *linkers* se utilizan para la activación específica *in vivo* de alguna proteína de fusión, o en otros casos para retirar un dominio de la proteína, como las etiquetas de afinidad (Chen y col., 2013).

### 1.2.1 Andamio de cristalización

Independientemente de las explicaciones de por qué muchas proteínas son difíciles de cristalizar, las posibilidades de éxito pueden mejorarse al promover la formación de contactos intermoleculares, que sean compatibles con la simetría del cristal. Existen muchos métodos de ingeniería de proteínas para mejorar la posibilidad de formar contactos cristalinos a través de mutaciones en residuos superficiales o fusionando a proteínas acarreadoras. De esta manera la proteína blanco puede ser llevada a distintas formas oligoméricas con distintas oportunidades de cristalizar, sin comprometer sustancialmente su secuencia nativa (Leibly y col., 2015).

Las proteínas de fusión pueden ser utilizadas para la cristalización de proteínas en al menos dos formas distintas; a través de la fusión de proteínas de forma heteróloga, donde el acompañante de fusión provee área superficial adicional, para promover la formación de contactos de cristal. En otra aproximación los ensamblajes proteicos interactúan y se estabilizan por unión covalente de los compañeros interaccionantes. El *linker* que une las proteínas juega distintos roles, en la primera aproximación un *linker* rígido es necesario para reducir la heterogeneidad conformacional, en la segunda aproximación un *linker* flexible se necesita de tal manera que permita la interacción nativa entre las proteínas fusionadas. Ambas aproximaciones pueden combinarse (Kobe y col., 2015).

La cristalización por andamio de cristalización consiste entonces en cristalizar una proteína de interés al fusionarla a otra proteína fácilmente cristizable (andamio), el andamio puede contribuir a la formación de una red cristalina. Por ejemplo, fragmentos de fibrinógeno y  $\alpha$ -actina han sido cristalizados al fusionarlos con glutatión-S-transferasa (GST) de *Escherichia coli* (Moon y col., 2010). Otro ejemplo destacable es la proteína de unión a



maltosa (MBP), de la cual existen cerca de 102 fusiones cristalizadas, se ha visto además que el uso de MBP no altera la estructura de la proteína fusionada (Waugh, 2016), otros ejemplos se muestran en el Cuadro 1. En general mientras la proteína a fusionar sea mucho más pequeño que el andamio al que está unido, ambos componentes podrían formar los contactos ordenados necesarios para formar un cristal (Leibly y col., 2015).

**Cuadro 1 Ejemplos de proteínas que se han usado como andamios de cristalización.**

Andamio (Tamaño)	Tamaño de Blanco
MBP (366 aa)	14-431 aa
GST (217 aa)	6-53 aa
Lisozima (163 aa)	80-308 aa*
Tiorredoxina (109aa)	100-322 aa'

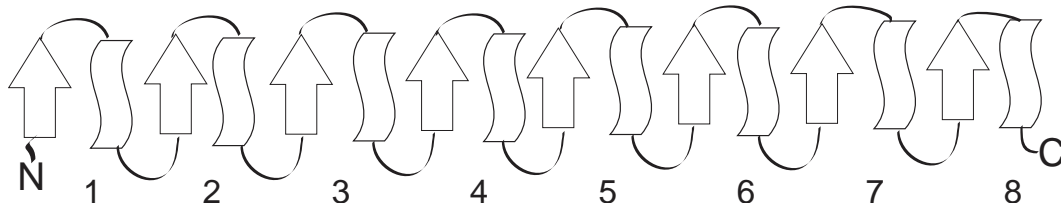
\*La proteína más grande de lisozima se logró sustituyendo residuos del blanco por los de la lisozima. 'Estructura no reportada. Modificado de (Moon y col., 2010)

### 1.3 Triosafosfato isomerasas (TIM)

Las triosafosfato isomerasas (TIMs o tpi) son enzimas glucolíticas no alostéricas (gliceraldehído 3-fosfato-cetol isomerasa; EC 5.3.1.1), que catalizan la isomerización entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (GAP) (Wierenga y col., 2010; Estrella Hernández, 2015) (Ver Figura 2). Las TIMs son de las aldosa-cetosa isomerasas más estudiadas, la reacción que catalizan permite la utilización de dihidroxiacetona fosfato durante la glicolisis. Las TIMs son definidas como enzimas perfectas, debido a que su actividad solo es limitada por la velocidad de difusión del sustrato en el medio, son enzimas homodiméricas donde el sitio catalítico se encuentra en la interfaz del dímero, los residuos catalíticos son: Asn, Lys, His y Glu (Alber y col., 1981; Wierenga y col., 2010; Whitford, 2005). La TIM pertenece a la familia de los barriles  $(\alpha\beta)_8$ , las enzimas con este plegamiento generalmente funcionan como dímeros, se ha hipotetizado que los monómeros de TIM son inestables y al formar homodímeros, se optimiza la geometría del sitio catalítico y aumenta estabilidad conformacional de la proteína, dada esta característica las TIMs se conocen como dímeros obligados (Farber, 1993; Wierenga y col., 2010).

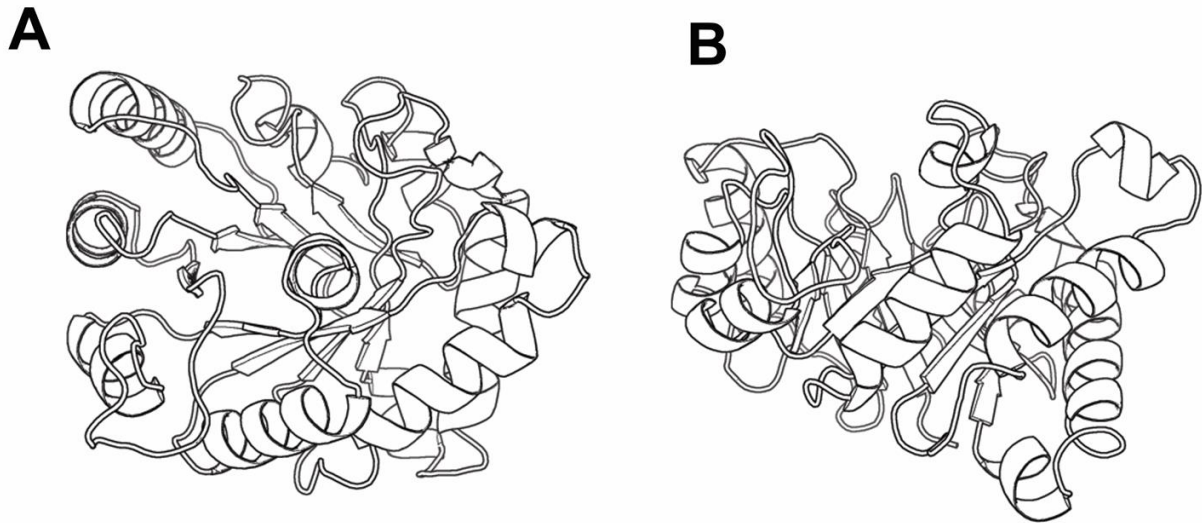


queda hacia las láminas y la cara hidrofílica interactúa con el solvente. Los bucles  $\beta\alpha$ , que conectan de lámina a hélice, suelen ser más largos que los  $\alpha\beta$  (asas que conectan de hélice a lámina). Los residuos del sitio catalítico se localizan en el asa 1 (Lys 12), asa 4 (His 95) y asa 6 (Glu 167). (Ver Figura 3) (Estrella Hernández, 2015; Kursula, 2003).



**Figura 3. Diagrama de la topología del plegamiento de un barril TIM.**

Las láminas  $\beta$  son mostradas como flechas y las hélices  $\alpha$  se muestran como hebras. Los bucles en la parte inferior de la figura son los bucles  $\alpha\beta$  y los bucles en la parte superior son los bucles  $\beta\alpha$ . Debajo se muestra la numeración de cada una de las hélices y hebras.



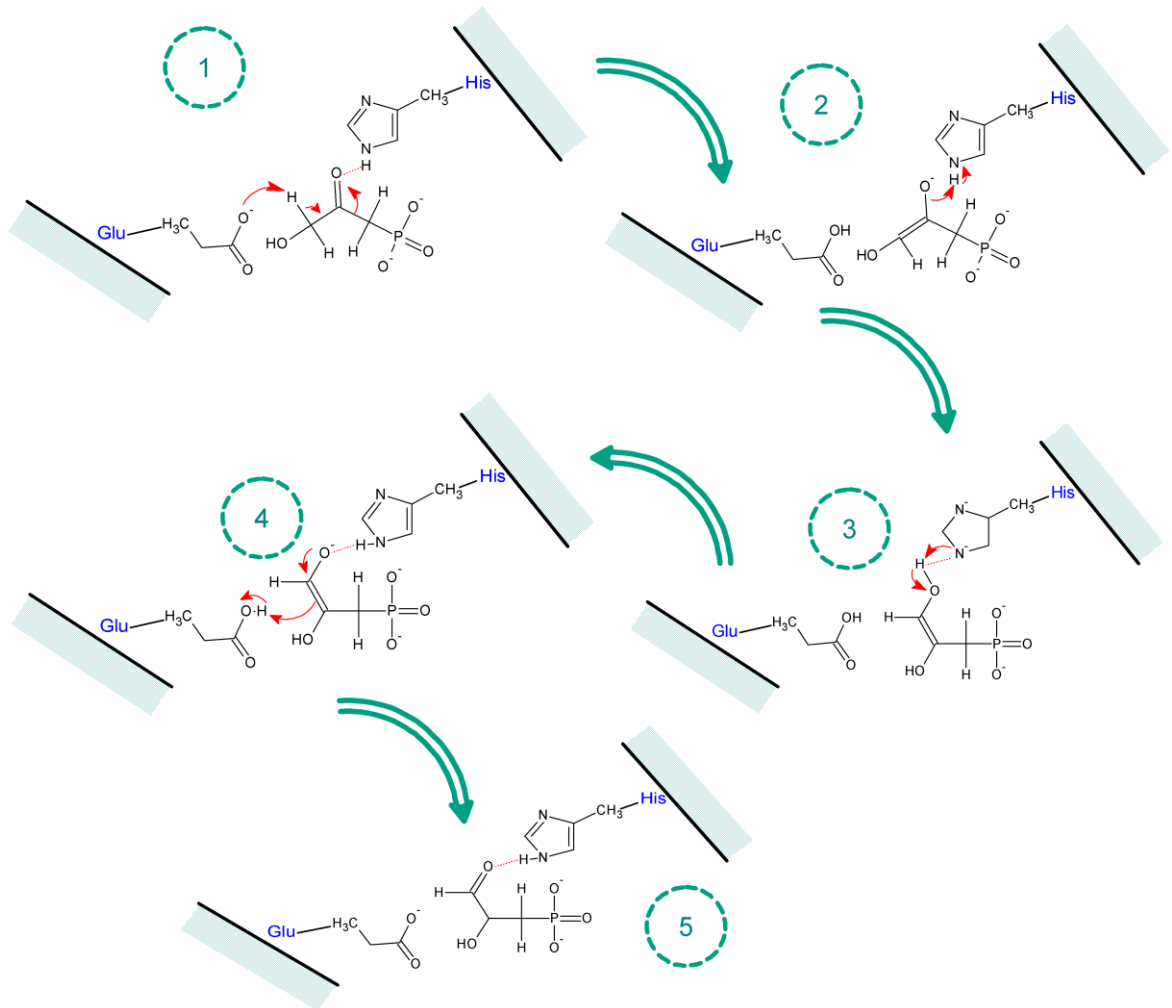
**Figura 4. Estructura tridimensional de TIM de pollo (PDB: 1TPH Zhang y col., 1994)**

A) Vista a través del eje del barril. El sitio activo en el extremo carboxilo terminal de las láminas  $\beta$  se encuentra de frente. B) Rotación del eje  $90^\circ$  sobre el eje horizontal de la parte A, se muestra una vista lateral del barril. El sitio activo se encuentra arriba. Figura realizada en PyMol (Schrödinger, 2015).

### 1.3.2 Mecanismo de reacción

Durante la reacción de isomerización de las TIM un residuo de lisina (Lys12) proporciona la carga necesaria para la unión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), esta lisina se une al sitio activo con el oxígeno del carbonilo, para que la DHAP forme un puente de hidrogeno con la cadena neutra de la cadena lateral del grupo imidazol de la histidina (His95). La cadena lateral del glutamato (Glu 165) está cargada y facilita la abstracción de

un protón del carbono 1 del DHAP (Figura 5-1). En este estado la histidina forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo C2 del intermediario enediolato que lleva a la protonación del átomo (Figura 5-2). Al protonarse el átomo de oxígeno se forma una cadena lateral imidazol en la histidina con carga negativa y funciona como base fuerte (Figura 5-3). La abstracción de un protón del grupo hidroxilo unido al carbono C1 resulta en la formación de un segundo intermediario enediol (Fig. 5-4), con este intermediario inestable se pasa al producto final a partir de la donación de un protón desde el glutamato al carbono C2 (Figura 5-5) (Whitford, 2005; Estrella Hernández, 2015).



**Figura 5. Mecanismo de reacción de las triosafosfato isomerasas.**

La isomerización de DHAP entre GA3P, se lleva a cabo por un proceso de ceto-enol tautomerización a través de un intermediario enediol. El anión de glutamato funciona como una base fuerte, efectuando una desprotonación del carbono 1 removiendo hidrógeno. El mismo glutamato es el ácido que vuelve a protonar en el carbono 2 utilizando el mismo hidrógeno (McMurry y Begley, 2005).

## **1.4 *Trichomonas vaginalis***

*Trichomonas vaginalis* (*T.vaginalis*) es el agente etiológico de la tricomoniasis, además es el agente no viral de transmisión sexual más frecuente (Medécigo Micete y col., 2009; Nievas y col., 2017). Es un protozoo unicelular flagelado, típicamente piriforme y ocasionalmente ameboideo; se le ubica en el tracto urogenital humano, se presenta como trofozoíto aerotolerante, anaeróbico, se desarrolla óptimamente en condiciones microaeróbicas. Tiene forma ovalada, presenta 4 flagelos, un gran núcleo, aparato parabasal, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, axostilo central y cuenta con hidrogenosomas (Harp y Chowdhury, 2011; Bachmann y col., 2011).

*T. vaginalis* es un parásito obligado que fagocita células epiteliales y eritrocitos, es ingerido por macrófagos. El mecanismo de patogénesis es multifactorial, involucra la acción coordinada del citoesqueleto, moléculas de adhesión, elementos de evasión de la respuesta inmune, y otras modificaciones en su hábitat: cambios en la microbiota vaginal, pH, Hierro, Zinc, poliaminas (putrescina, espermidina), temperatura, la respuesta inmune del propio hospedero y la modulación de expresión de genes en el hospedero (Quan y col., 2014; Figueroa-Angulo y col., 2012b).

La cepa modelo G3 de *T. vaginalis* cuenta con un genoma de 176 Mb dispuesto en seis cromosomas, con sesenta mil genes codificantes de proteínas que llevan funciones como tráfico membranal, endocitosis, y fagocitosis (Harp y Chowdhury, 2011). Los factores de virulencia de *T. vaginalis* se han relacionado con variaciones en la expresión de antígenos de superficie, secreción de proteasas, actividad hemolítica e interacciones con la microflora vaginal (Lewis, 2010; Figueroa-Angulo y col., 2012b).

### **1.4.1 Triosafosfato isomerasas de *Trichomonas vaginalis* (TvTIMs)**

*T. vaginalis* cuenta con dos genes funcionales para TIMs codificados en su genoma, los cuales han sido denominados como *tp1* (vg83581.m00073) y *tp2* (vg97417.m00128), las proteínas que codifican son TvTIM1 y TvTIM2 respectivamente. A nivel de secuencia de ácidos nucleicos presentan un 97.6% de identidad y al igual que otras TIM, las TvTIM son homodímeros funcionales, constituidos de 252 aminoácidos que difieren entre sí solamente por cuatro residuos (98.4% identidad): 18 (E/Q), 24 (I/V), 45 (I/V) y 239 (P/A) (Figura 6).

La triosafosfato isomerasa (TIM) funciona como un dímero muy estable. El comportamiento termodinámico de las TIMs de *Trichomonas vaginalis* (TvTIMs) es muy particular, dado que a diferencia de otras TIM's, las TvTIM's presentan monómeros estables (Estrella Hernández, 2015). Como ya se ha mencionado anteriormente, la TIM es una enzima citoplasmática con función glucolítica que, en la mayoría de los organismos participa en las rutas de glicólisis, gluconeogénesis y pentosas fosfato. En el caso particular de *Trichomonas vaginalis* la actividad glucolítica de TvTIM es regulada positivamente por glucosa, además se ha localizado en el citoplasma y la superficie del parásito (Miranda-Ozuna y col., 2016) .



**Figura 6. Alineamiento de aminoácidos entre TvTIM1 y TvTIM2.**

Tanto TvTIM1 como TvTIM2, cuentan con 252 aminoácidos, ambas proteínas difieren en cuatro residuos: 18,24,45 y 239 (sombreados en letras rojas). Los residuos catalíticos se muestran subrayados en azul (K12, H94 y E166). En la parte superior de la secuencia se muestran los elementos de estructura secundaria: hélices- $\alpha$  (espirales verdes) y láminas- $\beta$  (flechas azules) (Lara-Gonzalez y col., 2014). Imagen realizada a partir de los datos de Phyre2 (Kelley y col., 2015).

## 1.5 Antecedentes

### 1.5.1 Expresión a través del promotor T7

En la actualidad existen una enorme cantidad de sistemas de expresión disponibles, que han sido diseñados para varias aplicaciones (Berlec y Strukelj, 2013) . En este proyecto

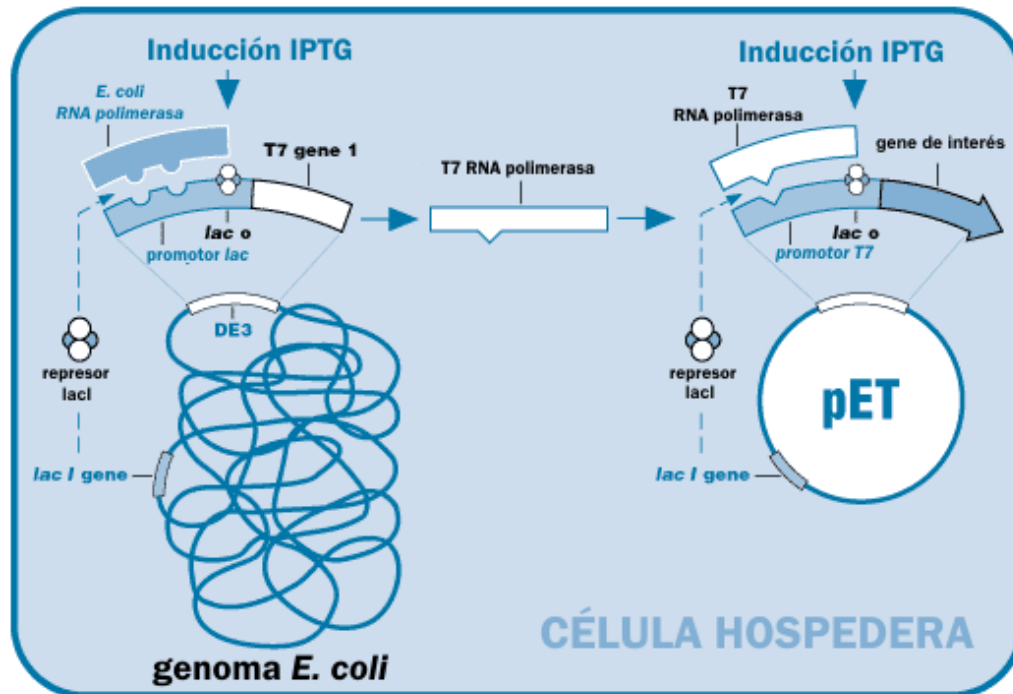
se utilizaron vectores de expresión tipo pET, que permiten la expresión de la proteína recombinante a través del promotor del bacteriófago T7; el sistema de expresión a través del promotor T7 que utilizan los plásmidos pET se basan en el mecanismo que Studier y sus colaboradores describieron por primera vez. Los sistemas pET contienen promotores híbridos, sitios múltiples de clonación, sitios de corte de proteasas, etiquetas de fusión. Para la expresión por medio del sistema pET se requiere una cepa hospedera lisogenizada por el fragmento del fago DE3 que codifique la T7 RNA polimerasa (bacteriófago T7 gene 1), además la cepa debe encontrarse bajo el control del promotor lacUV5 inducible por IPTG (Studier y Moffatt, 1986; Novagen, N/A).

Dentro de la topología del plásmido pET, el gene de interés es clonado *downstream* del promotor del bacteriófago T7, eliminando así la expresión basal de productos tóxicos del gene en ausencia de la T7 RNA polimerasa pues los 20 nucleótidos que componen el promotor no son reconocidos por ninguna polimerasa de *E. coli*. Algunos vectores pET contienen ya sea *upstream* o *downstream* del gene de interés, alguna etiqueta de purificación o secuencia de reconocimiento de proteasas. Para inducir la expresión del gene de interés es necesario que el hospedero exprese la T7 RNA polimerasa, ya sea que lo obtenga por infección con T7 o esté codificado en el genoma de la cepa, en el caso de contener la información en el genoma la expresión es a partir del promotor lacUV5 inducible con IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) y el represor LacI.

Una copia del gene *lacI* se encuentra en el genoma de la cepa de *E. coli*, éste reprime al promotor lacUV5 en la célula y al promotor híbrido T7/lac en el plásmido pET. La transcripción de T7 RNA polimerasa ocurre al unirse IPTG y liberar LacI tetramérico del operón *lac*, la transcripción del gene de interés del promotor T7/lac (reprimible por LacI) es iniciada, una vez que el IPTG libera LacI, por la T7 RNA polimerasa, se inicia entonces el proceso de traducción del gene de interés, una vez que empieza a producirse T7 RNA polimerasa, dado que el promotor T7 es una secuencia de 20 nucleótidos no reconocida por la RNA polimerasa de la bacteria (Sørensen y Mortensen, 2005; Cantrell, 2003). En la Figura 7 se presenta de forma esquemática del proceso de inducción de los vectores pET.

Para la expresión a través del promotor de T7, la cepa *E. coli* BL21 (DE3+) es el hospedero más común y robusto, capaz de crecer en medio mínimo, la cepa no es patógena, haciendo seguro su manejo al ser incapaz de sobrevivir en tejidos y causar enfermedades. *Escherichia coli* BL21 es deficiente en 2 proteasas que pueden interferir en

la recuperación de la proteína recombinante y el sistema del promotor T7 lacO. Existen derivados de *E. coli* BL21 que incluyen mejoras tales como: mayor estabilidad de plásmidos con secuencias repetidas, mejoramiento de la formación de puentes disulfuro en el citoplasma, niveles de expresión proteica ajustable, genes con codones poco comunes en *E. coli* y mutantes para expresión soluble (Sørensen y Mortensen, 2005; Gräslund y col., 2008).



**Figura 7 Proceso de inducción en vectores pET**

Se muestran los componentes más importantes del sistema de expresión de proteínas en los vectores pET a través del promotor del bacteriófago T7. Se muestra del lado derecho de la figura la topología del plásmido pET, se observa la posición del gene de interés *downstream* al promotor T7. En el lado izquierdo de la figura se ilustra el genoma de la célula *E. coli*, en el dibujo se representa a partir de un cuadro blanco la presencia del fragmento del fago DE3, característica que permite a la célula expresar la proteína usando el promotor T7. El control de expresión del vector pET se lleva a cabo a través del promotor y operón lac, antes de transcribir el gene de interés, debe estar presente el gene de la T7 RNA polimerasa en el genoma de la célula hospedera de *E. coli*, dónde se cuenta con un promotor inducible que se activa con Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo de lactosa que desplaza al repressor lacI del promotor lac, por lo tanto se expresa la T7 RNA polimerasa y empieza a transcribir el gene de interés. Por otra parte dicho control se presenta también dentro del plásmido pET a partir del operón lac dentro del promotor T7/lac, dónde la unión del repressor lacI en sitio reduce la transcripción de la T7 RNA polimerasa, y la adición de IPTG permite la transcripción del gene de interés a partir del reconocimiento de la secuencia del promotor T7 por parte de la T7 RNA polimerasa expresada por la cepa (Causey, 2003; Jonasson y col., 2002; Novagen, 2011b; Studier & Moffatt, 1986). Imagen traducida de Novagen, 2011b

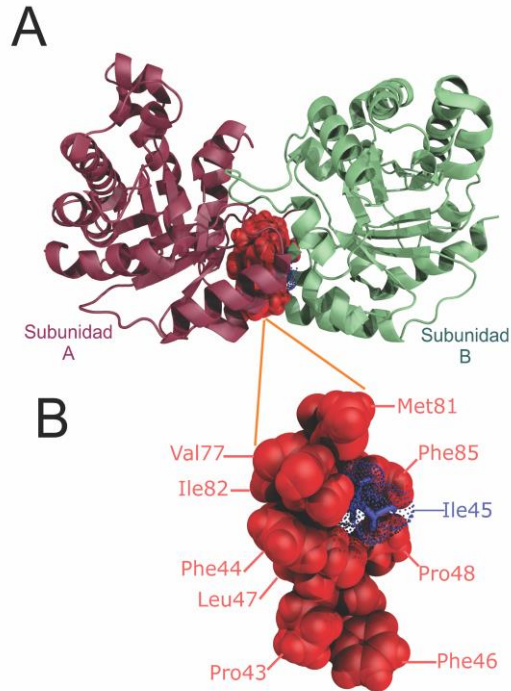


## 1.5.2 Obtención de la estructura cristalográfica de TvTIM1 y TvTIM2

Como se mencionó en la Introducción, en *T. vaginalis* existen codificados dos genes funcionales para TIM's (*tvtim1* y *tvtim2*), actualmente las estructuras cristalográficas de ambas proteínas se conocen (Miranda-Ozuna y col., 2016). Ambos genes codifican proteínas de 27 kDa (TvTIM1 y TvTIM2), sin embargo, aun cuando entre ellos existe un alto grado de identidad (97.6%), TvTIM1 presenta dímeros más estables y menos propensos a disociarse, en comparación a TvTIM2 (Miranda-Ozuna y col., 2016; Figueroa-Angulo y col., 2012a).

La estructura de ambas TvTIMs fue resuelta por difracción de rayos X, la diferencias que existen entre ambas TvTIMS son cuatro aminoácidos: 18 (E/Q), 24 (I/V), 45 (I/V) y 239 (P/A). Mientras que los residuos 18 (E/Q) y 239 (P/A) se encuentran expuestos al solvente, los residuos 24 (I/V) y 45 (I/V) están en la región hidrofóbica de la proteína. De particular interés es el residuo 45, ya que se sitúa en la interfaz del barril TIM (Figura 8-A). El residuo 45, encaja dentro de la cavidad hidrofóbica del otro monómero, de tal modo que estas interacciones unen las dos subunidades en una interacción “*ball and socket*”. En la interacción los residuos I45/V45 de TvTIM1 y TvTIM2 respectivamente funcionan como la esfera (*ball*); la cavidad (*socket*) está formada por los residuos P43,F44,F46,L47,P48, V77,M81,I82 e I85 (Figura 8-B). Las cadenas de estos residuos forman una cavidad en la cual los residuos ramificados isoleucina y valina, tienen espacio para ubicar sus grupos metilo (Salgado Lugo, 2011).

La cristalización de las TvTIM se realizó por el método de la gota colgante utilizando el kit comercial Hampton Crystal Screen, se observó que el crecimiento de los cristales fue a diferentes velocidades, en las condiciones 9, 18, 41, 43 y 46 del kit Crystal Screen I y las condiciones 5, 22, 25, 37 y 45 para el kit Crystal Screen 2, la formación de cristales ocurrió en un lapso de dos horas después del montaje de gotas. Por otra parte, para las condiciones 4, 20, 39, 40, 42 del kit Crystal Screen I y las condiciones 13, 14 23, 38 y 48 del kit Crystal Screen 2, la formación de cristales ocurrió dos semanas después del montaje de los cristales. En total durante el proceso de cristalización se obtuvieron cristales en 11 condiciones de Crystal Screen 1 y en 10 condiciones de Crystal Screen 2 (Salgado Lugo, 2011).

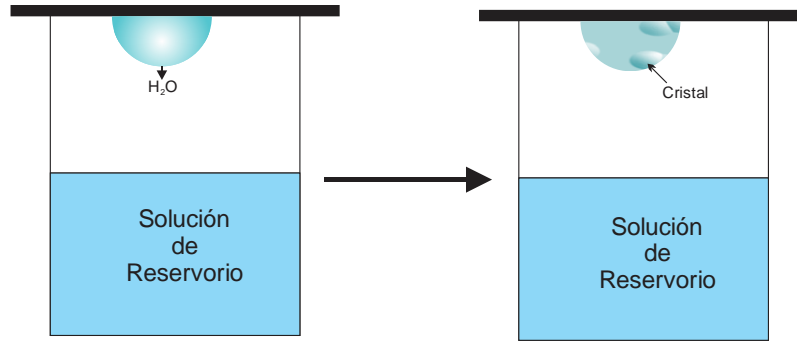


**Figura 8. Interfaz de los dímeros de TvTIM1**

Representación en cintas de la TvTIM1 (A), se muestra en colores distintos cada subunidad y en representación de esferas el residuo 45 y los aminoácidos que lo rodean. Los aminoácidos que rodean al residuo 45 de la subunidad A se muestran en color rojo (B), mientras que el residuo I45 de la subunidad B se muestra en azul (Lara-Gonzalez y col., 2014). Figura realizada en PyMol (Schrödinger, 2015).

### 1.5.2.1 Método de cristalización por Gota colgante

Como se mencionó en la Introducción, los cristales de proteínas son autoensamblajes periódicos de macromoléculas grandes y generalmente flexibles, unidos por interacciones intermoleculares débiles. Los cristales son generalmente frágiles y sensibles a cambios ambientales. Para que ocurra la cristalización es necesario que la solución de proteína esté sobresaturada, en la sobresaturación la nucleación puede ocurrir y formarse cristales mientras la solución llega a un equilibrio termodinámico (Cudney y col., 1994; Lattman y Loll, 2008). La técnica más común para crecer cristales de proteínas es por difusión de vapor, donde el vapor de agua se equilibra entre la gota que contiene proteína y una solución precipitante en un reservorio con mayor concentración de agente precipitante. Las condiciones en la solución que contiene la proteína son manipuladas por difusión a través del aire, la nucleación ocurre cuando la concentración de la proteína incrementa por la reducción del volumen, causado por el equilibrio de vapor de agua de la gota que contiene la proteína en una solución higroscópica (Figura 9).



**Figura 9. Técnica de gota colgante/vapor de difusión**

Representación esquemática del proceso de cristalización por difusión de vapor, por el método de gota colgante. Del lado izquierdo, se observa la gota colgando del cubreobjetos, la gota está compuesta de la solución de proteína y solución del reservorio. Por procesos de difusión de vapor, el agua de la gota quedará en equilibrio con el sistema, se deshidratará la gota, propiciando saturación de la proteína y generando puntos de nucleación que eventualmente generarán cristales (lado derecho).

El paso más crítico al determinar la estructura tridimensional de las proteínas por difracción de rayos X, es obtener cristales únicos y grandes, adecuados para estudios de difracción. Las condiciones óptimas de crecimiento de cristales, para macromoléculas biológicas generalmente son difíciles de predecir *a priori*. El número de variables que afectan la cristalización es alto: concentración, temperatura, pH, fuerza iónica, aditivos y precipitantes; por lo tanto, el número total de condiciones combinatorias a probar hace privativo una búsqueda exhaustiva. Una aproximación para sobrellevar esta situación es utilizar el método factorial incompleto de Carter & Carter, en donde una matriz amplia es probada y a partir de ella se analizan entramados más finos. La experiencia previa indica que una vez que las condiciones aproximadas de cristalización han sido halladas, es relativamente fácil optimizar las condiciones para obtener cristales adecuados para estudios cristalográficos (Cudney y col., 1994; Jancarik y Kim, 1991). Basado en esto, existen múltiples kits con varias condiciones de cristalización para iniciar el escrutinio.

### 1.5.2.2 Problema de fases y Reemplazo molecular

Cuando se obtiene el patrón de difracción de un cristal por rayos X, el patrón consiste en miles de puntos; dado que los detectores solamente miden intensidades en el tiempo, es posible determinar la posición e intensidad de cada punto, sin embargo, las fases de las ondas, que formaron cada punto, deben ser también determinadas para producir un mapa de densidad electrónica, a esto se le conoce como "problema de fases" (Vázquez-Contreras, 2003; Rupp, 2010).

Para resolver este problema existe una aproximación matemática donde a partir de las reflexiones se calcula una fase; otro método: reemplazo isomórfico, consiste en irradiar dos o más versiones del mismo cristal, donde uno se deriva del otro por la presencia de iones de metales pesados. La introducción de un átomo pesado cambia la intensidad de difracción y a partir de la perturbación es posible deducir los valores de fase (Read, 2010; Rupp, 2010).

El método de reemplazo molecular consiste en utilizar las coordenadas XYZ de una estructura similar y conocida para proveer fases a una estructura desconocida, esta estrategia provee fases iniciales estimadas de la nueva estructura a partir de la ya conocida (Yeates y Kent, 2012). Este método es adecuado cuando se tiene un modelo relacionado con la estructura de interés (Evans y McCoy, 2008). Tal es el caso de la TvTIM que como se mencionó anteriormente ya cuenta con estructuras resueltas.

### **1.5.3 Proteínas de interés para el proyecto**

#### **1.5.3.1 Enolasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (Eno1)**

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene 3 genes para enolasas (ENO1, ENO2, ENO3) la ENO1 es una enzima de 477 aa, importante durante el desarrollo de embriones en plástidos, donde la conversión de 3-PGA a PEP, sirve como precursor para acetil coenzima A y ácidos grasos. En *Arabidopsis thaliana* además, la enolasa 1 se une a mRNA, esta doble función aún no ha sido explicada (Köster y col., 2017)

La enzima enolasa (EC 4.2.1.11) cataliza la conversión de 3-fosfoglicerato (3-PGA) en fosfoenol piruvato (PEP), en un solo paso de deshidratación, el PEP es central durante la glicolisis y el ciclo de Calvin-Benson. Es una de las enzimas más estudiadas en la línea de ingeniería de proteínas. Esta enzima presenta un plegado de 8 hélices- $\alpha$  y 8 láminas- $\beta$ , con una estructura muy similar a un barril TIM (Fuentes-Pascacio, 2015).

#### **1.5.3.2 Proteína de Unión a Cadena Sencilla Mitocondrial 1 de *Arabidopsis thaliana* (SSB1) y Proteína de Unión a Cadena Sencilla Organelar 1 de *Arabidopsis thaliana* (OSB1)**

Una proteína de unión a cadena sencilla se une a hebras separadas de DNA y estabiliza la región abierta para facilitar la replicación, reparación y recombinación (Rédei,

2008; Edmondson y col., 2005). El genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* es cercano a 367kb, se sabe que la población de ADN mitocondrial es heterogénea entre moléculas de hebra sencilla y doble (Zaegel y col., 2006)

La proteína de unión a cadena sencilla 1, SSB1 (At4g11060) codifica para una proteína localizada en la mitocondria, con capacidad de unirse a DNA de cadena sencilla, se ha observado que tiene una función homóloga a la SSB de *E. coli*, por lo que se ha propuesto su participación en la recombinación de DNA mitocondrial (Edmondson y col., 2005). La proteína organelar de unión a cadena sencilla 1, OSB1, pertenece a una familia de proteínas mitocondriales y cloroplastídicas de *Arabidopsis thaliana*, que se unen a cadenas sencillas de DNA que cuentan con un motivo nuevo para unirse a DNA. OSB1 es necesaria para la estabilidad del DNA mitocondrial, ya que permite la transmisión estequiométrica de mtDNA de forma correcta, la proteína se expresa primariamente en células gametofíticas (Zaegel y col., 2006).

### **1.5.3.3 Inhibidor de cisteína proteinasas de *Entamoeba histolytica* (EhICP1)**

El parásito *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amebiasis, basa su proceso de infección a través de cisteína proteinasas (CP's) de la familia de la papaína. Sin embargo, se ha observado la existencia de dos isotipos de ICP (Inhibidores de cisteína proteinasas). Los ICP pertenecen a una clase de inhibidores de CP's con pesos moleculares pequeños (11 a 15 kDa) llamados "chagasinas", éstos inhiben CP's de la familia de papaína, con una afinidad en el rango de nanomolar a picomolar, similar a las cistatinas (Casados-Vázquez y col., 2011; Riekenberg y col., 2005).

Se ha propuesto que los dos isotipos (EhICP1 y EhICP2) están implicadas en el tráfico o interferencia con la actividad de CP's, al regular negativamente la secreción de CP y la virulencia del parásito. EhICP2 se localiza en lisosomas y fagosomas, mientras que EhICP1 ese encuentra en el citosol. Esto sugiere que la actividad de EhICP1 es inhibir CP's previo a una ruta secretoria, EhICP1 además podría prevenir que CP's dañen a la célula en caso de que algún precursor de CP's sea activado, o proteger a la célula de CP's activos liberados por algún lisosoma (Sato y col., 2006). Las ICPs o chagasinas están conformadas por 8 láminas- $\beta$ , hélice- $\alpha$  y tres hebras móviles en el mismo extremo que se une a CP (Sato y col., 2006).

## 2 Justificación

Conocer la estructura tridimensional de las proteínas es importante para entender los procesos biológicos que se llevan a cabo en las células, así también para aplicaciones como diseño de fármacos (Wlodawer y col., 2008). La técnica comúnmente utilizada para conocer la estructura de las proteínas, es la cristalografía de rayos X, sin embargo el paso más crítico al determinar la estructura tridimensional de las proteínas por esta metodología, es obtener cristales únicos y grandes, adecuados para estudios de difracción (Jancarik y Kim, 1991).

Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de cristales para macromoléculas biológicas en general es difícil de predecir, además muchas proteínas por sus características son renuentes a cristalizar. Tal es el caso de 4 proteínas (SSB1, OSB1, Eno1, EhICP1), que se trabajan en el laboratorio de Bioquímica Estructural (García-Medel, 2016; Fuentes-Pascacio, 2015; Jiménez-Sandoval, 2016). Para ello se propuso una aproximación para cristalizar estas proteínas, diseñando distintas formas de ensamblaje de una misma proteína acarreadora o andamio, a la cual nuestras proteínas de interés puedan ser unidas. El andamio mejoraría la posibilidad de formar contactos cristalinos y así las proteínas de interés co-cristalizarán con el andamio.

Aunque existen proteínas que parecen ser efectivas para funcionar como andamios de cristalización (MBP y GST), otras proteínas pueden ser igualmente o más efectivas. Hasta el momento el esfuerzo para encontrar alternativas para MBP o GST ha sido insuficiente y el repertorio puede ser expandido al emplear anticuerpos, ankyrinas u otras proteínas (Waugh, 2016). En este trabajo se propone el uso de TvTIM como andamio, dada su propensión y facilidad de cristalizar. A partir del uso de dos *linkers* habrán de fusionarse las proteínas de interés, obteniéndose cristales óptimos para difracción de rayos X. De esta manera utilizando técnicas de reemplazo molecular será posible conocer la estructura de las proteínas de interés. El conocer la estructura de Eno1, SSB1, OSB1 y EhICP1, ampliará el entendimiento de la función de estas proteínas, permitiéndonos proponer nuevas hipótesis, encaminadas a entender la dinámica de su funcionamiento en sus organismos de origen.

### **3 Hipótesis**

TvTIM es capaz de establecer una red (*lattice*) que permitirá cristalizar proteínas fusionadas en el extremo carboxilo terminal. Las estructuras podrán por tanto ser resueltas por reemplazo molecular.

### **4 Objetivos**

#### **4.1 General**

Comprobar que TvTIM puede ser usado como andamio de cristalización.

#### **4.2 Particulares**

- Determinar condiciones de expresión y purificación de proteínas de fusión.
- Establecer condiciones de cristalización para las fusiones.
- Resolver las estructuras de las fusiones.

## 5 Materiales y métodos

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Plásmidos

Para este proyecto se diseñaron genes sintéticos clonados en los plásmidos pUC57-tvtimFlexible (GenScript Lot. 1527355-2/B70079) y pUC57-tvtimRigido (GenScript Lot.1527355-1/B70075). Estos plásmidos contienen los genes tvtimRigido y tvtimFlexible clonados entre los sitios *NcoI* y *XhoI* (Figura 10-A). Para la secuencia revisar Anexo 8.1.

Como plásmido de expresión se utilizó el vector pET28b(+) (Novagen,) de 5368 pb que presenta control a través de las señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7, cuenta con dos etiquetas de polihistidinas a ambos extremos del sitio múltiple de clonación, el marcador de selección es la resistencia a Kanamicina, promotor de T7 RNA polimerasa y sitios de restricción *NcoI* y *XhoI* (Figura 10-B) (Blaber, Dr., 1997; Novagen, 2011; Novagen, 1998b; Novagen, 1998a) (Ver. Anexo 8.5.1 para el mapa del plásmido).

Los genes candidatos a subclonar en los andamios de cristalización (ENO1, SSB1, OSB1, EhICP1), se tenían clonados en el plásmido pET19b(+) (Novagen, 1998a) entre los sitios *NdeI* y *BamHI* (Fuentes-Pascacio, 2015; García-Medel, 2016; Jiménez-Sandoval, 2016). Cabe destacar que para EhICP1 se utilizaron tanto la versión silvestre (EhICP1<sub>WT</sub>), como dos mutantes de sustitución de cisteínas: EhICP1<sub>CxA</sub> (sustitución de cisteínas por alaninas) y EhICP1<sub>CxS</sub> (sustitución de cisteínas por serinas). (Anexo 8.1.3.1 las cisteínas subrayadas en color negro).

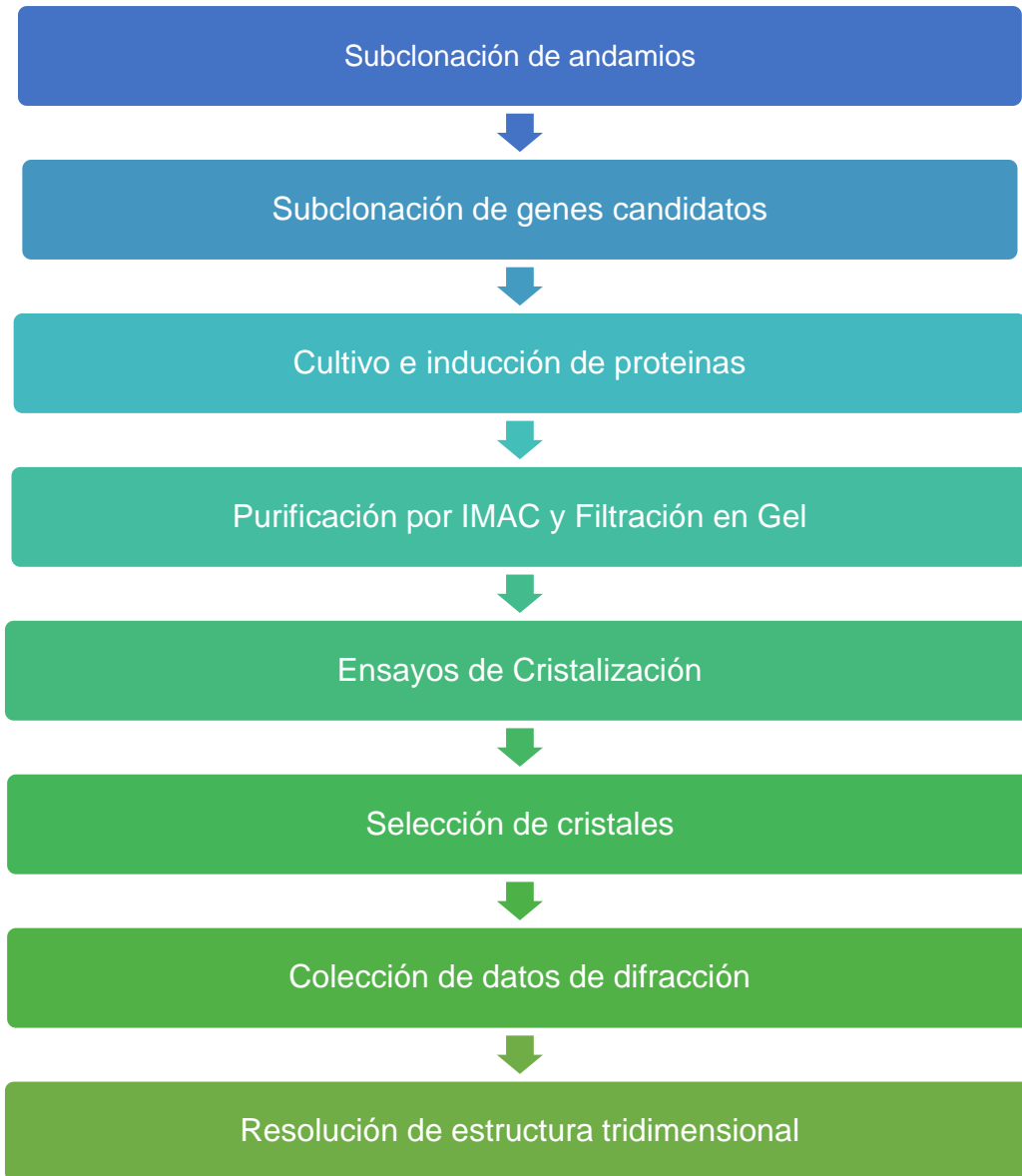
#### 5.1.2 Sistema de expresión y cepas bacterianas.

Para expresar los andamios se eligió *E. coli*, por ser un sistema de expresión muy conocido, de fácil manejo y rápida propagación al tener un tiempo corto de duplicación (LaVallie, 2001; Jana y Deb, 2005; Nicholl, Desmond S. T, 2008; Qing y col., 2004). Se utilizaron dos cepas de *E. coli*, para el armado del andamio y la subclonación de los genes de las proteínas blanco, se usó la cepa DH5 $\alpha$  y para la expresión de las proteínas de fusión la cepa BL21(DE3+) (LaVallie, 2001; Casali, 2003).



## 5.2 Estrategia Experimental.

La estrategia general para la subclonación, expresión, purificación, cristalización y resolución de la estructura de las proteínas de fusión se muestra a continuación.



## 5.3 Métodos

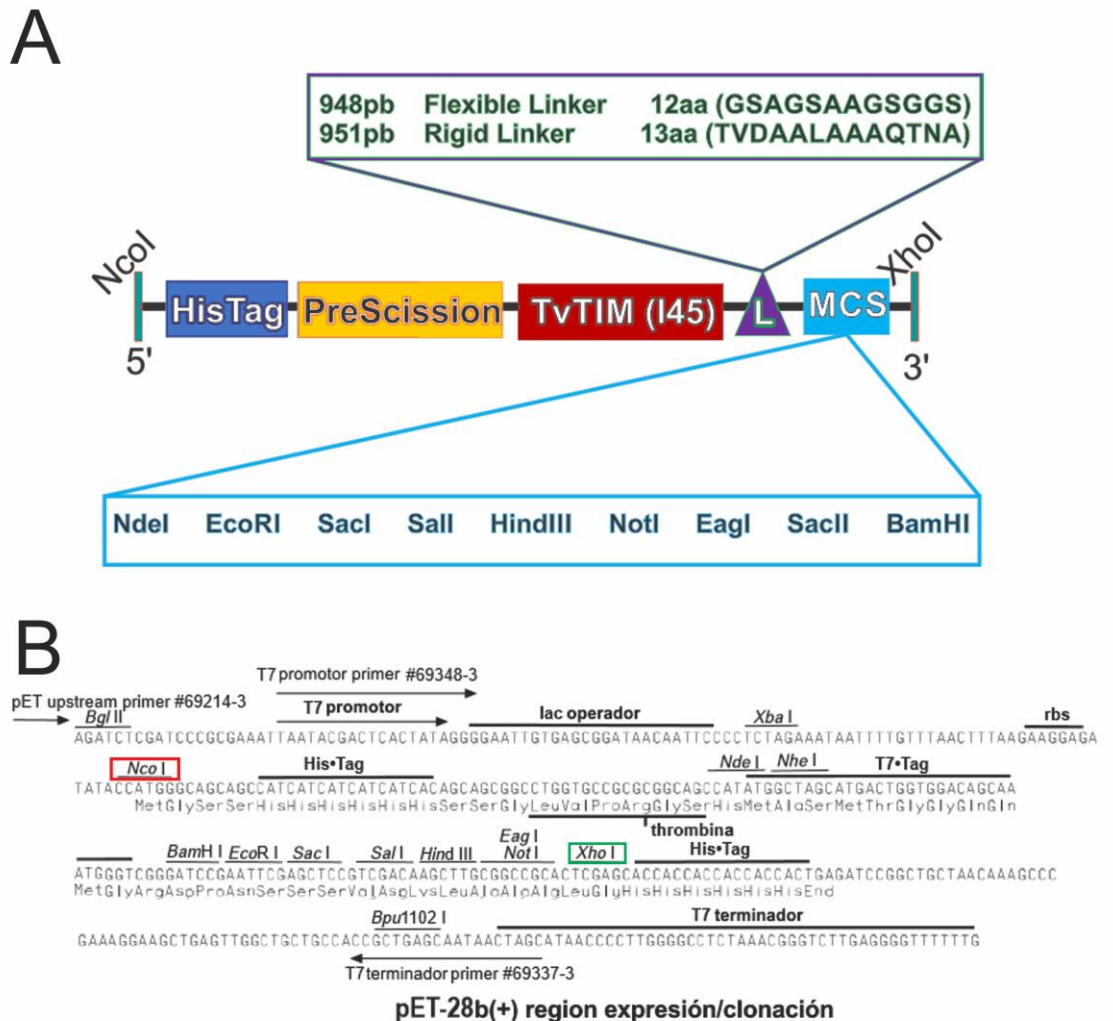
### 5.3.1 Subclonación de andamios en vector pET28b (+)

Se transformaron los plásmidos pET28b(+) (Novagen), pUC57-tvtimFlexible (GenScript) y pUC57-tvtimRigido (GenScript) en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por el método de choque térmico (Sambrook y Russell, 2001). A partir de las colonias que crecieron en las placas se seleccionó una de cada construcción, se inocularon tubos de medio LB adicionado con el respectivo antibiótico sugerido por el proveedor (100  $\mu$ g/mL de ampicilina para pUC57-tvtimFlexible y pUC57-tvtimRigido. 50  $\mu$ g/mL de kanamicina para pET28b (Causey, 2003; Novagen, 2011; GenScript,)). Los tubos se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche (16 horas aproximadamente) en una incubadora Innova 4000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, New Jersey). Se extrajo DNA plasmídico (DNAp) siguiendo las instrucciones del proveedor por medio del kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit de ThermoScientific (ThermoScientific, 2014). La integridad del DNAp purificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (0.2  $\mu$ g/mL Bromuro de Etidio, 0.5X TBE, 50 minutos a 95 V). Las imágenes se capturaron en un fotodocumentador BioRad® ChemiDocXR (BioRad, Milán) mediante el software QuantityOne v:4.6.5 (BioRad).

Mediante un análisis de restricción se corroboró que los plásmidos estuvieran completos y tuvieran los sitios de restricción necesarios para la clonación. En las construcciones pUC57-tvtimFlexible y pUC57-tvtimRigido, los genes de los andamios se diseñaron para ser clonados entre los sitios de restricción *Nco*I y *Xho*I (Figura 10-A), como se observa en la Figura 10-B ambos sitios de restricción se encuentran también en pET28b (+) por lo tanto fue necesario comprobar que los tres plásmidos presentaran los sitios de restricción.

El análisis de restricción se realizó con las enzimas *Nco*I y *Xho*I de NewEnglandBiolabs™, ambas usan el mismo buffer ("Buffer CutSmart®"), por lo tanto se realizó la reacción de restricción en el cuarto de cultivo a 37°C siguiendo las indicaciones del proveedor (New England BioLabs, 2014). Finalizada la reacción de restricción, se cargaron en un gel de agarosa al 1% (0.2  $\mu$ g/mL Bromuro de Etidio) y se corrieron con 0.5X TBE a 95V por 50 minutos. Se reveló el gel usando un fotodocumentador BioRad®

ChemiDocXR y las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software QuantityOne v:4.6.5. El tamaño de los fragmentos obtenidos se comparó con el tamaño teórico esperado. La presencia de fragmentos con los tamaños esperados indicó que los plásmidos cumplían las condiciones (Ver Tabla 1), 948pb para el inserto tvtimFlexible, 951pb para el inserto tvtimRigido, 5.3 kpb para pET28b(+) y 2.7 kpb para pUC57.



**Figura 10** Diseño de genes de andamios y sitio múltiple de clonación de pET28b(+)

(A) Los genes de los andamios tienen en el extremo 5' un sitio *NcoI* y un sitio *XhoI* en el extremo 3'. Siguiendo al sitio *NcoI* comienza la etiqueta de polihistidinas (HisTag) seguido por un sitio de reconocimiento para PreScission™ Protease (Walker y col., 1994). Posteriormente comienza el gene de TvTIM (I45) seguido por el *linker* (L) y finalmente un Sitio Múltiple de Clonación (MCS). (B) El sitio múltiple de clonación de pET28b(+) cuenta con un sitio *NcoI* (rojo) antes de la primera etiqueta de polihistidinas y un sitio *XhoI* (verde) antes de la segunda etiqueta de polihistidinas. Modificado a partir de Novagen, .

Una vez comprobada la integridad de los plásmidos se realizó la clonación por digestión utilizando *NcoI* y *XhoI* para digerir pUC57tvimFlexible, pUC57tvimRigido y pET28b(+). El plásmido linealizado y los insertos se ligaron a una relación 3:1 (inserto a plásmido) con 10 unidades de T4 DNA Ligase (New England Biolabs, 2014b) siguiendo las indicaciones del proveedor (16°C, toda la noche). Las ligaciones se transformaron en células quimiocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  y se crecieron en placas de LB (adicionadas con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina), el tamizaje de las clonas positivas se realizó a partir de PCR de colonia (Invitrogen Taq DNA Polymerase PCR Buffer 1X, 1.5 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad Taq Polimerasa,  $\approx$ 1  $\mu$ M dNTP's) utilizando los oligonucleótidos "T7 promotor" y "T7 terminador" del sistema pET (Novagen, 2011b) según las indicaciones del proveedor. Aquellas clonas que amplificaban un producto de 950pb aproximadamente, fueron consideradas positivas, crecidas en medio LB (adicionado con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina) y se purificaron los plásmidos por el método de CTAB (Del Sal y col., 1988).

Se realizó un análisis de restricción a los plásmidos purificados, en reacciones de 15 $\mu$ L utilizando *NcoI/XhoI* según las indicaciones del proveedor (Buffer CutSmart), las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 1% en las condiciones antes descritas, se revelaron y analizaron. Aquellos plásmidos que liberaran fragmentos de 948pb o 951pb eran considerados clonas positivas de tvimFlexible y tvimRigida respectivamente (Tabla 1.). Con tres plásmidos de cada construcción se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , se purificaron los plásmidos por GeneJET Plasmid Miniprep Kit y se mandaron a secuenciar (Labsergen, Langebio) con los oligonucleótidos "T7 promotor" y "T7 terminador". Las secuencias recibidas se alinearon contra la secuencia nucleotídica de los andamios (Biomatters, 2009) y se observaron diferencias en las secuencias. Simultáneamente se tradujeron las secuencias en tres marcos de lectura abiertos (ORF) (Gasteiger y col., 2003) y se realizó una búsqueda con BLAST (Madden y col., 1996). De aquellas secuencias de aminoácidos que tenían 100% de identidad con la secuencia de TvTIM y que además contaban con todos los nucleótidos del sitio múltiple de clonación (Anexo 8.1.1 región celeste) se eligió un plásmido de cada andamio y se continuó trabajando. Las construcciones resultantes de aquí en adelante serán nombradas pET28b(+)-TvTIMrigido y pET28b(+)-TvTIMflexible.

**Tabla 1 Tamaños de plásmidos y genes usados**

Plásmido/Gene	Tamaño (pb)
pET28b(+) <sup>c</sup>	5368
pUC57-tvtimFlexible <sup>c</sup>	3648
pUC57-tvtimRigido <sup>c</sup>	3651
<sup>N</sup> pET28b(+) <sup>x</sup>	5231
<sup>N</sup> pUC57 <sup>x</sup>	2700
<sup>N</sup> tvtimFlexible <sup>x</sup>	948
<sup>N</sup> tvtimRigido <sup>x</sup>	951
pET28b(+)-tvtimRigido <sup>c</sup>	6176
pET28b(+)-tvtimFlexible <sup>c</sup>	6173
Eno1	1434
SSB1	525
OSB1	684
<i>Ehl</i> CP1 (wt,mut.CxA, mut. CxS)	312

<sup>c</sup> Forma circularizada; <sup>x</sup> Extremo cohesivo *Xho*I; <sup>N</sup> Extremo cohesivo *Nco*I

### 5.3.2 Subclonación de Eno1, SSB1, OSB1 y EhICP1 en los andamios

Como se explicó en la sección de Materiales, todos los genes de las proteínas de interés estaban clonados en pET19b entre los sitios *NdeI/BamHI*. A partir de los plásmidos se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se crecieron en agar LB (adicionado con 100  $\mu$ g/mL de Ampicilina), posteriormente se creció una colonia de cada construcción en medio LB (adicionado con 100  $\mu$ g/mL de Ampicilina), a partir de los cultivos se purificó plásmido por GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Se hizo análisis de restricción con las enzimas *NdeI* y *BamHI* para corroborar que los fragmentos liberados correspondieran al tamaño esperado.

Estos plásmidos pET19 se digirieron con las enzimas *NdeI/BamHI* en NEB Buffer 3.1 siguiendo las indicaciones del proveedor (New England BioLabs, 2013), a su vez se digirieron los plásmidos pET28b(+)-TvTIMrigido y pET28b(+)-TvTIMflexible con las mismas enzimas (*NdeI/BamHI*). Los fragmentos se purificaron y clonaron por el método de STRU (Bellini y col., 2011), utilizando concentradores Corning® Spin-X® UF (100K MWCO) de 500  $\mu$ L, con 1000ng de los plásmidos receptores (pET28b(+)-TvTIMrigido y pET28b(+)-TvTIMflexible) y 1200ng de los plásmidos donadores (pET19b-Eno1, pET19b-OSB1, pET19b-SSB1, pET19b-EhICP1wt, pET19b-EhICP1mut CxA, pET19b-EhICP1mut CxS). Las ligaciones se realizaron con T4 DNA Ligase, se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se plaquearon en LB (adicionado con 50  $\mu$ g/mL de Kanamicina).

Las clonas candidatas fueron analizadas por PCR de colonia (Invitrogen Taq DNA Polymerase PCR Buffer 1X, 1.5 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>,  $\approx$ 1 unidad Taq Polimerasa, 1  $\mu$ M dNTP's) utilizando los oligonucleótidos "T7 promotor" y "T7 terminador" del sistema pET, siguiendo las instrucciones del proveedor. Aquellas clonas que amplificaban un fragmento mayor a 1000pb eran consideradas positivas. Las clonas positivas se crecieron en medio LB (adicionado con 50  $\mu$ g/mL), a partir de los cultivos se extrajo DNA plasmídico por el método de CTAB (Del Sal y col., 1988). Posteriormente se realizaron dos análisis de restricción a los plásmidos purificados.

Siguiendo las indicaciones del proveedor, el primer análisis de restricción se realizó utilizando *NcoI/XhoI* (Buffer CutSmart), para liberar el fragmento del andamio

fusionado al gen clonado. El segundo análisis de restricción consistió en digerir los plásmidos con *NdeI/BamHI* (NEB Buffer 3.1) para liberar el fragmento del gen clonado. Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 1% en las condiciones antes descritas, se revelaron y analizaron los geles. Aquellos plásmidos que liberaban un fragmento mayor a 1000pb para la digestión con *NcoI/XhoI* y un fragmento del tamaño del gen clonado con la digestión *NdeI/BamHI* (Ver Tabla 1), se mandaron a secuenciar (Labsergen, Langebio) con el oligonucleótido “T7 terminador” del sistema pET.

Las secuencias se tradujeron en tres ORF's (Gasteiger y col., 2003) y se realizó una búsqueda con BLAST (Madden y col., 1996) con las secuencias de aminoácidos. De aquellas secuencias de aminoácidos que tenían 100% de identidad con la secuencia de la proteína clonada, se eligió una construcción de cada proteína en cada andamio y se procedió a la expresión. Para ello los plásmidos se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3+).

### **5.3.3 Cultivo e inducción y purificación de las fusiones**

A partir de la transformación de la cepa *E. coli* BL21(DE3+) con los plásmidos de las construcciones, se lavaron las cajas y se inocularon 100 mL de medio LB adicionado con 50 µg/mL de Kanamicina, el medio se creció a 37 °C, 220 rpm, durante toda la noche en una incubadora Orbital Shaker Incubator (mrc). Con el cultivo se inocularon 1000 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de Kanamicina, y se indujo la expresión a 0.5 mM de isopropil-β-D-tiogalactosidasa (IPTG) cuando la OD<sub>600</sub> fue entre 0.6 y 0.8. Se incubó el cultivo a 16°C durante 18 horas a 220 rpm (Qing y col., 2004) en una incubadora Incubator Shaker Series (New Brunswick, USA). El protocolo de purificación utilizado está basado en el reportado por Estrella Hernández, 2015; Salgado Lugo, 2011.

Finalizado el tiempo de inducción, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm (Beckmann JA-10) por 12 minutos para obtener pastilla de células, la pastilla se resuspendió en 30 mL de Buffer de Lisis (20 mM Tris-HCl pH. 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 2 mM PMSF), el lisado se incubó en agitación a 4°C por 30 minutos con 5 mg/mL de lisozima, posteriormente se sonicó el lisado, durante 10 ciclos de 30 segundos en sonicación, por 1 minuto de reposo (Branson Sonifier 450, Duty Cycler 80, Output Control 7). Se centrifugó el lisado a 10000 rpm (Beckman JA-20) por 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante se complementó con 2 mM de PMSF, posteriormente se pasó por un filtro de 0.22  $\mu$ M (Millex-GV PVDF, Millipore). El filtrado equivalente a un litro de cultivo, se cargó a una columna de HisTrap™FF de 1 mL (GE LifeSciences) previamente equilibrada con buffer de lisis, se realizaron 3 lavados secuenciales con 20 volúmenes de columna del buffer de lisis adicionado con 10 mM de imidazol, 20 mM imidazol y 40 mM imidazol con 500 mM de NaCl.

Se eluyeron las proteínas con 5 volúmenes de columna de buffer de lisis con 500 mM de Imidazol, se dializó la elución en 1 Litro de 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA y 5 mM DTT, con 0.1 mg de PPS por mg de proteína purificada (GE Healthcare, 2012; Walker y col., 1994). La remoción de la etiqueta de histidinas se llevó a cabo por filtración en gel (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl y 5 mM DTT) en una columna pre-empacada Superdex 200 10/300 GL (GE LifeSciences) a un flujo de 0.5 mL/min en un equipo ÄktaPure (GE LifeSciences), los cromatogramas de la purificación fueron adquiridos y analizados por el software UNICORN7 v.7.0.2 (GE Health and LifeSciences).

Se recuperaron aquellas fracciones correspondientes a la fusión de interés, se confirmó su pureza por observación al correr las muestras a 120V por 40 minutos (Buffer de Laemli 2X) en SDS-PAGE al 12% (Acrilamida %T=30, %C=3). Aquellas muestras que presentaban una única banda, correspondiente al tamaño de la proteína de fusión, se juntaron y se concentraron en concentradores de proteína tipo Pierce de 10K MWCO (ThermoFisherScientific) hasta alcanzar una concentración mínima de 5 mg/mL, medida en NanoDrop1000 (ThermoFisherScientific).

### **5.3.4 Ensayos de Cristalización**

A partir de las purificaciones, se eligieron aquellas proteínas que se obtuvieran mayoritariamente en la como proteína soluble y de forma más pura (>90% en SDS-PAGE). Para los ensayos de cristalización se probaron una serie de condiciones comerciales de Hampton® Research del Kit "Crystal Screen 1" y "Crystal Screen 2". Estas condiciones están constituidas básicamente por 3 componentes: un agente precipitante, una sal y una solución amortiguadora. Los dos kits conforman un total de 98 condiciones diferentes Crystal Screen 1 (50 condiciones) y Crystal Screen 2 (48 condiciones).



A partir de las proteínas purificadas y concentradas se llevaron a cabo pruebas de cristalización bajo el método de difusión de vapor por gota colgante, antes descrito. Se probaron 96 condiciones de Crystal Screen 1 y 2 en placas Linbro de 24 pozos, utilizando cubreobjetos siliconizados (FisherScientific,USA), se sellaron con DowCorning 7 Release Compound según lo descrito por Jancarik y Kim,. En cada pozo se probó una relación en gota de proteína:solución de 1:1. Para aquellas condiciones con cristales pequeños se probó a optimizar las condiciones probando cuatro relaciones proteína a buffer. Todas las placas se incubaron a 21°C y se realizó una observación periódica en estereomicroscopio (SMZ800 10X Nikon), hasta la aparición de cristales.

### **5.3.5 Colección de datos de difracción por rayos X**

Aquellas condiciones donde los cristales cumplían con los requisitos de tamaño y calidad, los cristales fueron recuperados en asas de nylon de 0.2µM, lubricadas en una solución que contenía el 80% de la solución de cristalización suplementada con 20% de glicerol, los cristales recuperados fueron congelados con nitrógeno líquido en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO). Se recuperaron cerca 10 cristales de cada proteína cristalizada, los cristales se difractaron a una resolución entre 1 y 4 Å, en el Advanced Photon Source (Chicago).

### **5.3.6 Determinación de las estructuras, refinamiento y análisis.**

El tratamiento de los datos fue a partir de la Suite CCP4 (Winn y col., 2011), las imágenes colectadas se indexaron en iMOSFLM para calcular la densidad electrónica y así construir, por remplazo molecular, la estructura de las fusiones TvTIM1 utilizando como estructura molde (PDB:4O4V). El reemplazo molecular se llevó a cabo por medio del programa PHASER de la suite de CCP4, y el refinamiento se realizó con Phenix (Adams y col., 2010) y Coot (Emsley y col., 2010).

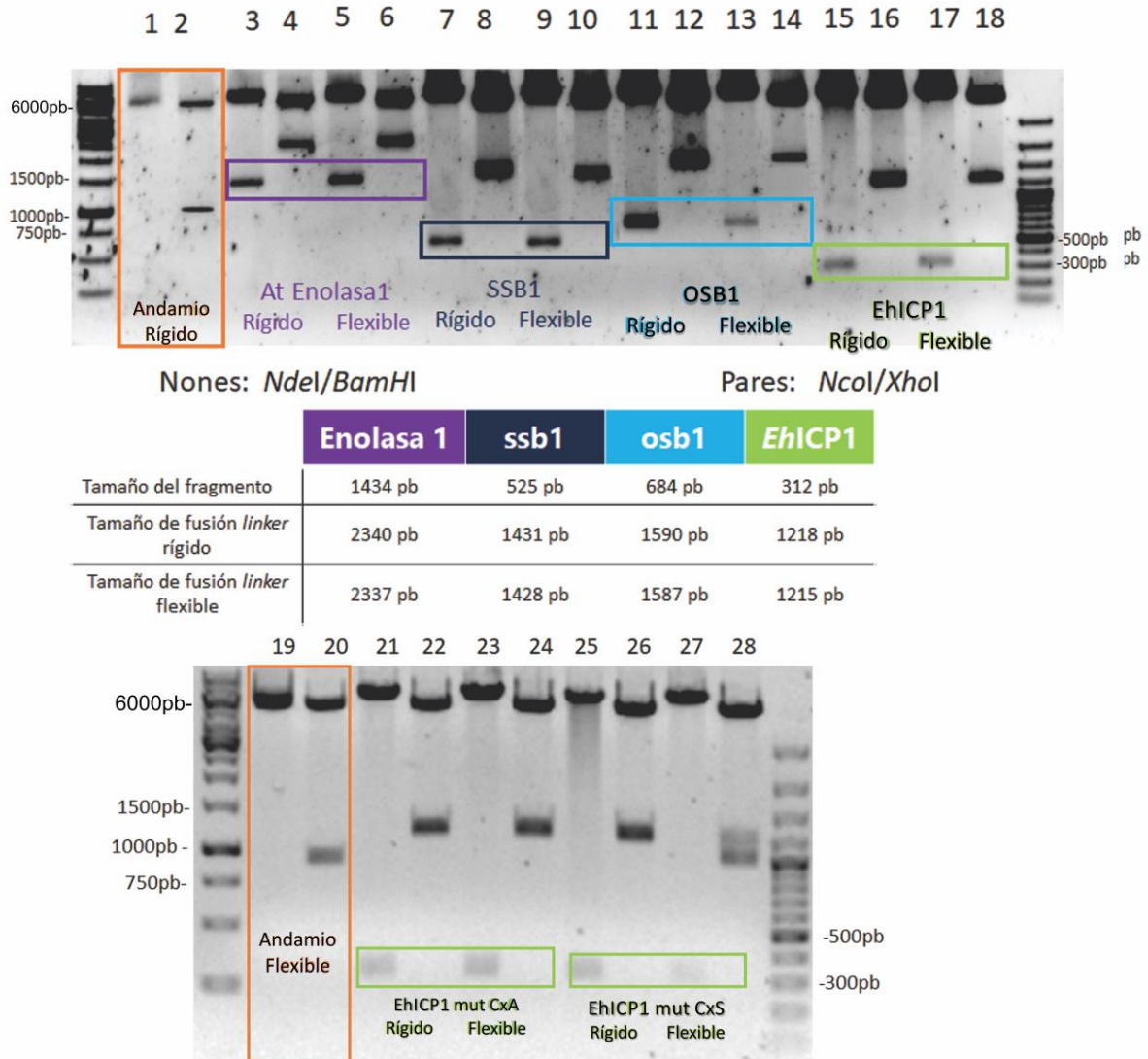
## 6 Resultados y Discusión

### 6.1 Armado de los plásmidos andamio y subclonación de los genes de interés

Realizando la metodología descrita anteriormente se clonaron los andamios en el plásmido pET28b(+), en la Figura 11, se observa en los Carriles 1 y 19 que las construcciones al ser digeridas con *NdeI/BamHI* corresponden aproximadamente al tamaño del plásmido (Tabla 1), puesto que la porción que es escindida es solo de unas cuantas pares de bases, no se resuelve en el gel (Figura 10-B, Anexo 8.1.1). Los fragmentos liberados al digerir los plásmidos de los andamios con *NcoI/XhoI* (Figura 11. Carriles 2 y 20) se observa que se liberan fragmentos cercanos a 1000pb que corresponden al tamaño esperado de los genes de andamio (Tabla 1).

En lo referente a las fusiones se observa en los Carriles impares (Figura 11. Carriles: 3,5,7,9,11,13,15,17,21,23,25 y 27), que al digerir las construcciones con *NdeI/BamHI*, éstas liberan fragmentos de tamaño aproximado al gen fusionado (bandas dentro de los cuadros), el tamaño se puede comparar con la tabla inscrita en la Figura 11 o con la Tabla 1. Este primer resultado es indicativo de que los genes están clonados de forma adecuada. En lo concerniente a los Carriles pares (Figura 11. Carriles: 2,6,8,10,12,14,16,18,22,24,26 y 28) se observa que todas las construcciones generan fragmentos mayores a 1000pb al digerirse con *NcoI/XhoI*, este resultado confirma la amplificación por PCR (no mostrado) con los oligonucleótidos “T7 terminador” y “T7 promotor”, en la tabla inscrita en la Figura 11 se muestra el tamaño teórico de los fragmentos.

Por ejemplo, las fusiones de EhICP1 al ser digeridas con *NdeI/BamHI* (Figura 11 Carriles: 15,17,21,23,25 y 27) liberan un fragmento de 312pb aproximadamente, esto corresponde con el tamaño esperado del gen clonado; a su vez, al digerir con *NcoI/XhoI*, las construcciones liberan fragmentos de aproximadamente 1200pb que corresponden a la suma del andamio (~950pb) y el gene EhICP1 clonado (~ 300pb).

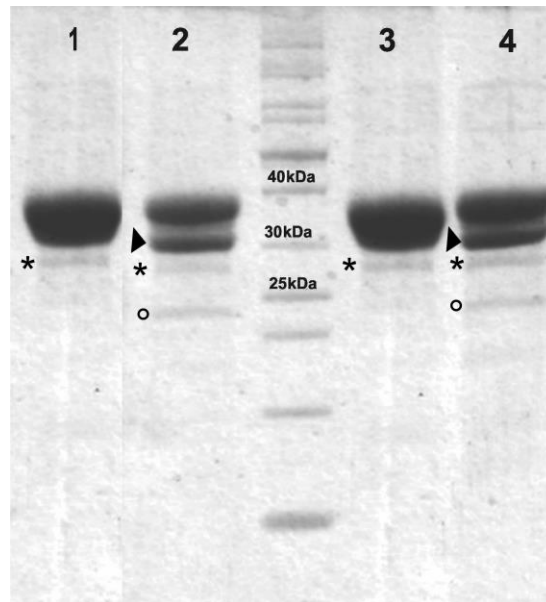


**Figura 11. Comprobación de construcción de proteínas de fusión.**

Los Carriles impares o nones corresponden a digestiones con *NdeI/BamHI*, por otra parte los Carriles pares corresponden a las digestiones con *NcoI/XhoI*. En cuadros naranjas se presentan el andamio rígido (Carriles 1 y 2) y el andamio flexible (Carriles 19 y 20), en cuadros morados las fusiones de Enolasa 1 en el andamio rígido (Carriles 3 y 4) y el andamio flexible (Carriles 5 y 6). En cuadros azules se resaltan los fragmentos liberados de las fusiones de SSB1 en el andamio rígido (Carriles 7 y 8) y el andamio flexible (Carriles 9 y 10). En cuadros celestes se muestran los fragmentos liberados fusiones de OSB1 en el andamio rígido (Carriles 11 y 12) y el andamio flexible (Carriles 13 y 14). Finalmente, en cuadros verdes se resaltan los fragmentos liberados de las fusiones de EhICP1 silvestre en el andamio rígido (Carriles 15 y 16) y en el andamio flexible (Carriles 17 y 18); EhICP1 mutante CxA en el andamio rígido (Carriles 21 y 22) y andamio flexible (Carriles 23 y 24); EhICP1 mutante CxS en el andamio rígido (Carriles 25 y 26) y andamio flexible (Carriles 27 y 28). En la parte central se muestra una tabla comparativa de los tamaños esperados tras las digestiones. Los marcadores utilizados fueron GeneRuler 1kb (izquierda) y GeneRune 100bp (derecha) (ThermoFisherScientific).

## 6.2 Expresión y purificación

Siguiendo la metodología del apartado “Cultivo, Inducción y purificación”. Una vez que se comprobaron las construcciones de los andamios, se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3+) con los plásmidos, para purificar y comprobar que el sitio de reconocimiento para la PPS funcionara.



**Figura 12. Prueba de digestión con PPS.**

Proteína andamio TvTIM-flexible purificada por IMAC (1), la proteína TvTIM-flexible purificada y dializada con PPS (2), el MPM PageRuler, la proteína TvTIM-rígido purificada (3) y la proteína TvTIM-rígido purificada y dializada con PPS (4).

Como se observa en la Figura 12, la metodología de purificación por IMAC permite obtener las proteínas en elevado grado de pureza, se observan bandas tenues (marcadas con asteriscos) en todos los Carriles, con un tamaño menor a 30 kDa que no es afectado por el tratamiento con PPS (Asteriscos en Carriles 2 y 4). Los tamaños de los andamios (Carriles 1 y 3) corresponden aproximadamente con los tamaños teóricos calculados (32kDa Cfr. Tabla 2), así mismo tras el tratamiento con PPS, se observa una disminución en el tamaño de la proteína (Figura 12. Flechas en Carriles 2 y 4), que corresponde aproximadamente al andamio tras la pérdida de la HisTag (29 kDa).

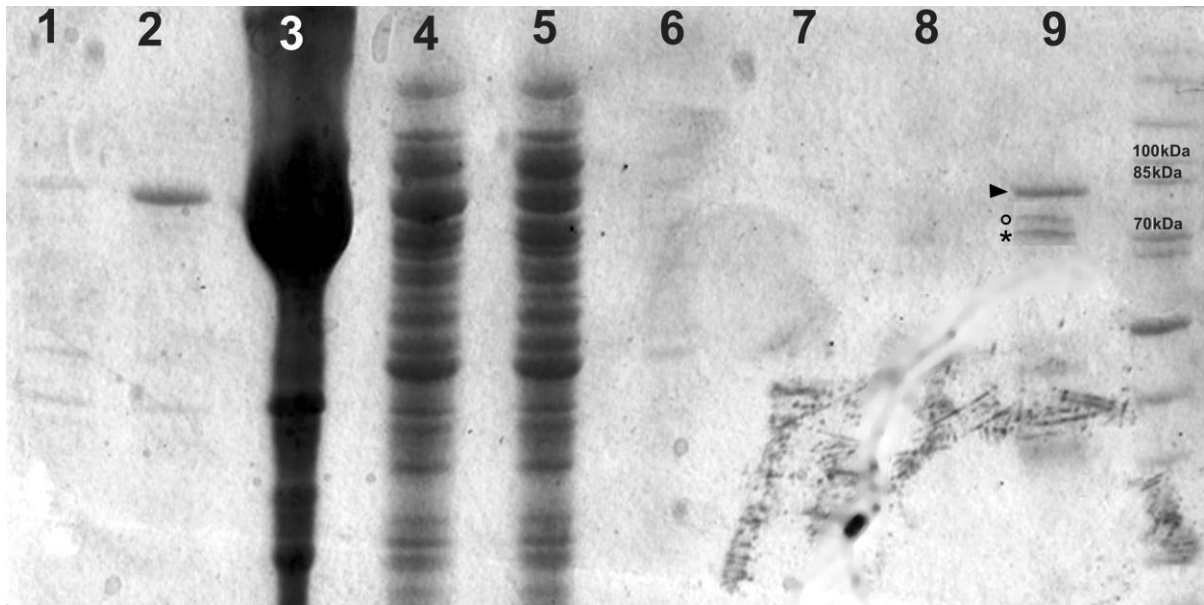
Tras el tratamiento con PPS se observa bandas cercanas a los 25 kDa (marcados por círculos en los Carriles 2 y 4), el tamaño superior correspondería a una posible degradación o proteólisis durante la diálisis. Una vez corroborado que la PPS escinde la HisTag, se procedió a expresar y purificar todas las fusiones, observar su pureza y solubilidad. El proceso de selección consistió en expresar todas las proteínas con un protocolo estándar, que se utilizó para los andamios de la Figura 12 y es descrito en la metodología. Aquellas proteínas que usando el protocolo se obtuvieron de forma soluble y pura, se trabajaron hasta cristalización y difracción. Simultáneamente se hicieron pruebas de optimización para purificar las demás proteínas, sin embargo, por cuestiones de tiempo, no se pudieron concertar protocolos óptimos de purificación.

**Tabla 2 Tamaño de las fusiones en ambos andamios**

Andamio	Proteína	kDa (con HisTag)	kDa (Sin HisTag)
Rígido	---	32.6	29
Rígido	EhICP1 <sub>WT</sub>	43.8	40.2
Rígido	EhICP1 <sub>CxA</sub>	43.7	40.1
Rígido	EhICP1 <sub>CxS</sub>	43.8	40
Rígido	SSB1	53.6	50
Rígido	OSB1	61	57.3
Rígido	Eno1	85.7	82
Flexible	---	32.2	28.6
Flexible	EhICP1 <sub>WT</sub>	43.5	39.8
Flexible	EhICP1 <sub>CxA</sub>	43.4	39.7
Flexible	EhICP1 <sub>CxS</sub>	43.4	39.8
Flexible	SSB1	53.3	49.6
Flexible	OSB1	60.7	57
Flexible	Eno1	85.3	81.6

Datos calculados por ExPASy ProtParam (Gasteiger y col., 2005)

## 6.2.1 Fusiones de Enolasa1



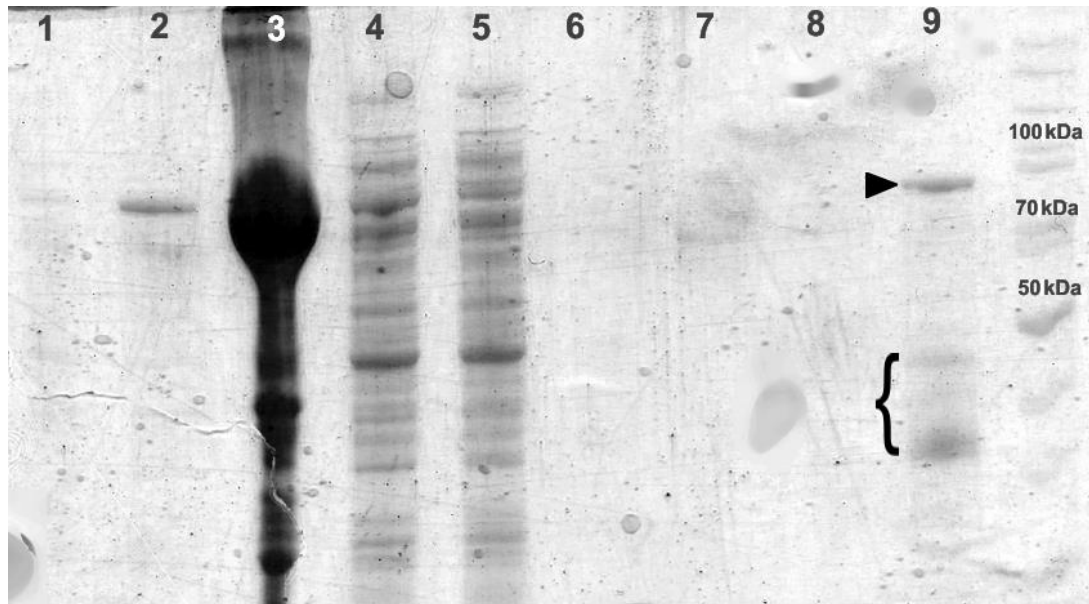
**Figura 13 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-Enolasa1**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Insoluble (3), Fracción Soluble (4), Fracción no adsorbida a IMAC (5), Lavado 1 (10 mM Imidazol) (6), Lavado 2 (20 mM Imidazol) (7), Lavado 3 (40 mM Imidazol) (8), Elución (500 mM Imidazol) (9), MPM PageRuler.

En la Figura 13 se observa que la fusión TvTIM-flexible-Enolasa1 tiene el tamaño esperado de 85 kDa (Carriles 2 y 9, Cfr. Tabla 2.); la mayor parte de la proteína expresada se encuentra en la fracción no soluble (Carril 3) y puesto que la proteína soluble es tan escasa se observan pocas diferencias entre el Carril 4 y el 5. La proteína de interés que está en la fracción soluble (Carril 4) en su mayoría se adsorbe a IMAC, así como algunos contaminantes, por lo tanto, la proteína eluida de IMAC (Carril 9), presenta la banda de interés (Carril 9 flecha) y dos bandas contaminantes cercanas a 70 kDa (Carril 9 asterisco y círculo). Debido al resultado, se decidió hacer otro paso de purificación por intercambio iónico, sin embargo, no fue posible separar las dos bandas contaminantes de la proteína de interés (Datos no mostrados).

Para el caso de la fusión TvTIM-rígido-Enolasa1, en la Figura 14 se observa un comportamiento similar al andamio flexible (Figura 13.), el tamaño aproximado es de 85 kDa (Figura 14. Carriles 2 y 9), mucha proteína se encuentra en la fracción no soluble (Figura 14. Carril 3), en la fracción soluble (Carril 4) existe poca proteína, la cual se adsorbe a la columna IMAC, ya que la fracción no adsorbida (Carril 5) es casi idéntica a

la fracción soluble. Finalmente, al igual que el caso con el andamio flexible, la elución presentó una banda correspondiente al tamaño esperado (Flecha Carril 9) y contaminantes de tamaño menor a 50 kDa (Llave Carril 9). Al igual que en el andamio Flexible, los contaminantes no pudieron ser retirados por un posterior paso de intercambio iónico, ni por filtración en gel, debido a los tamaños aparentes de las contaminantes.



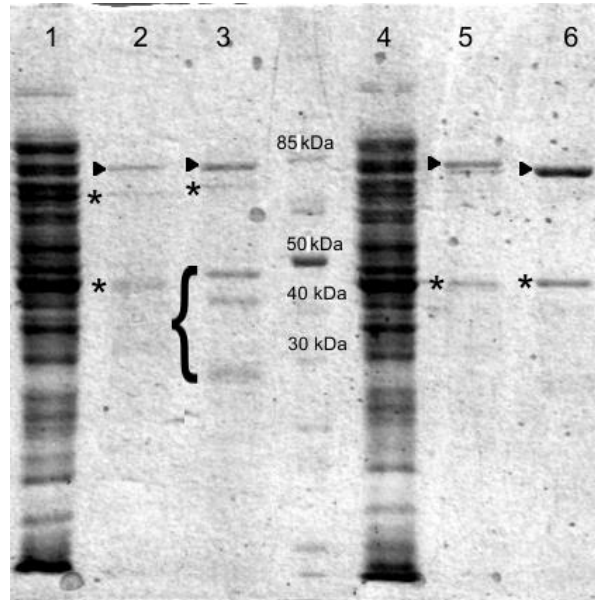
**Figura 14 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-Enolasa1**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Insoluble (3), Fracción Soluble (4), Fracción no adsorbida a IMAC (5), Lavado 1 (10 mM Imidazol) (6), Lavado 2 (20 mM Imidazol) (7), Lavado 3 (40 mM Imidazol) (8), Elución (500 mM Imidazol) (9), MPM PageRuler

Se probó la expresión en *E. coli* (DE3+) pG-KJE8, sin embargo, no se observó un aumento significativo de la proteína en la fracción soluble. Una cualidad emergente que se esperaba del andamio era mejorar la solubilidad de las proteínas fusionadas, como el caso de MBP (Kapust y Waugh, 1999), aunque la solubilidad que presenta Eno1 fusionada a TvTIM es mayor que la observada en Eno1 fusionada únicamente con HisTag (Fuentes-Pascacio, 2015), la cantidad tan reducida de proteína soluble, nos llevó a intentar mejorar la recuperación y la pureza a través de un cambio de buffer.

Se probaron 2 búferes, partiendo de un mismo lote de cultivo, el primer búfer utilizado fue el descrito en la metodología (20 mM Tris-HCl pH. 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 2 mM PMSF) y el segundo fue con 100 mM Na-Pi adicionado con 10 mM de Imidazol y 2 mM de PMSF (Fuentes-Pascacio, 2015). Una vez purificadas por IMAC y

concentradas las proteínas, se observa que el Buffer de Na-Pi (Figura 15. Carriles 3 y 4 flechas) tiene mejor recuperación en comparación al Buffer de Tris pH 8.0 (Figura 15. Carriles 2 y 5 flechas). Sin embargo, en ambos casos siguen existiendo contaminantes (Carriles 2, 3, 5, 6 asteriscos y llave).



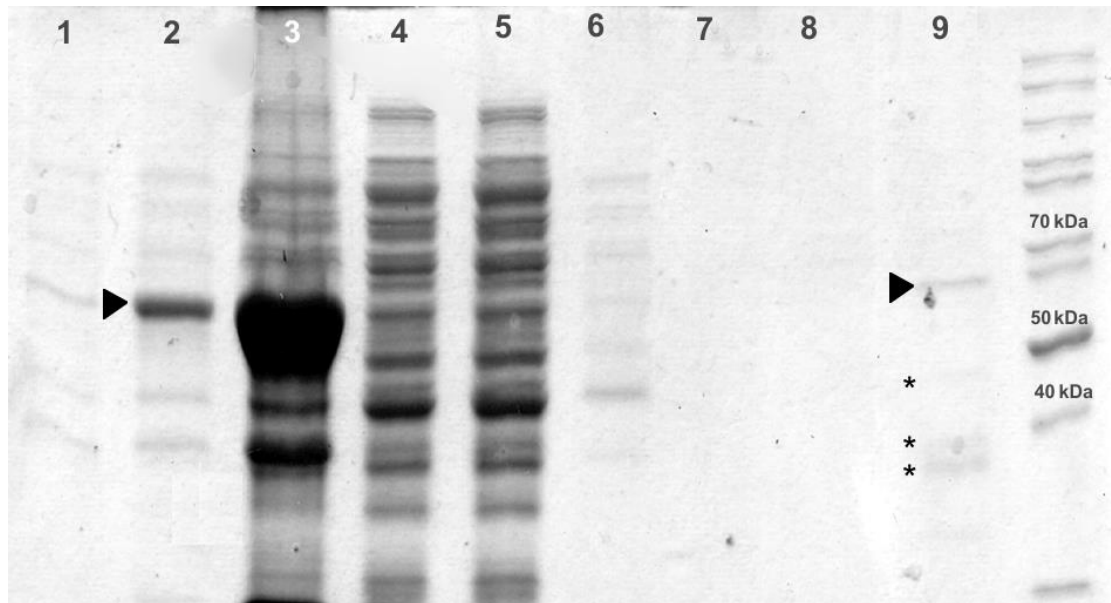
**Figura 15 Expresión y purificación por IMAC de fusiones de TvTIM y Enolasa1**

Fracción Soluble TvTIM-flexible-Eno1 (1), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-Eno1 en Buffer Tris pH 8.0 (2), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-Eno1 en Buffer Na-Pi (3), Fracción Soluble TvTIM-rígido-Eno1 (4), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-rígido-Eno1 en Buffer Tris pH 8.0 (5), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-Eno1 en Buffer Na-Pi (6), MPM PageRuler.

Debido a que las fusiones eran mayoritariamente insolubles, por cuestiones de tiempo y disposición de materiales ya no se realizaron posteriores intentos para mejorar la expresión, purificación y posterior cristalización. Quedó pendiente probar otras cepas de expresión de *E. coli* (DE3+) como Rossetta u Origami, que favorecen el replegamiento de las proteínas, o pkJE7 que cuenta con chaperones moleculares y en principio disminuirían la proteína de los cuerpos de inclusión. Otras cepas por probar serían C43 o C41 en caso de que las fusiones llegaran a ser tóxicas para la célula (Casali, 2003) . El paso siguiente es optimizar el protocolo de purificación cambiando la composición de los búferes, utilizando detergentes, cambiando la fuerza iónica o modificando el pH se puede aumentar la recuperación de la proteína en fracción soluble (Abdalla y col., 2016).



## 6.2.2 Fusiones de OSB1



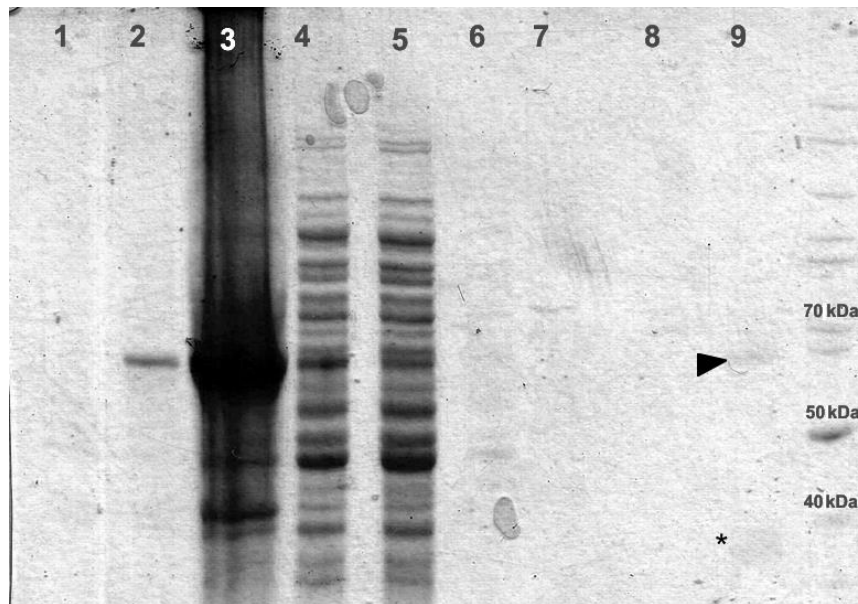
**Figura 16 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-OSB1**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Insoluble (3), Fracción Soluble (4), Fracción no adsorbida a IMAC (5), Lavado 1 (10 mM Imidazol) (6), Lavado 2 (20 mM Imidazol) (7), Lavado 3 (40 mM Imidazol) (8), Elución (500 mM Imidazol) (9), MPM PageRuler

En la Figura 16 se muestra la purificación por IMAC de la proteína de fusión TvTIM-flexible-OSB1, ésta tiene el tamaño esperado de 61 kDa aproximadamente (Flechas Carril 2 y 9, Cfr. Tabla 2), se observa en la fracción insoluble una gran cantidad de proteína (Figura 16. Carril 3), no se observan diferencias destacables entre la fracción no adsorbida a la columna (Carril 5) y la fracción soluble (Carril 4), sugiriendo que la poca proteína soluble se adsorbe a la columna IMAC, junto a algunos contaminantes. Finalmente se observa la elución de la escasa proteína soluble cercana a 60 kDa (Flecha Carril 9) y la aparición de contaminantes en forma de bandas con tamaño cercano o menor a 40 kDa (Asteriscos Carril 9).

En el caso de la purificación de TvTIM-rígido-OSB1 (Figura 17.) se observa la sobreexpresión de una banda de 60 kDa aproximadamente (Carril 2), al igual que con las proteínas anteriormente presentadas, existe mucha proteína en la fracción insoluble (Carril 3), de la proteína que se consigue en forma soluble (Carril 4), la mayor parte corresponde a proteínas contaminantes que no son adsorbidas a la columna IMAC (Carril 5). Eso explica la poca recuperación que se logra en la elución (Flecha Carril 9), que

presenta una banda contaminante menor a 40 kDa (Asterisco Carril 9), al igual que la purificación de la fusión TvTIM-flexible-OSB1.



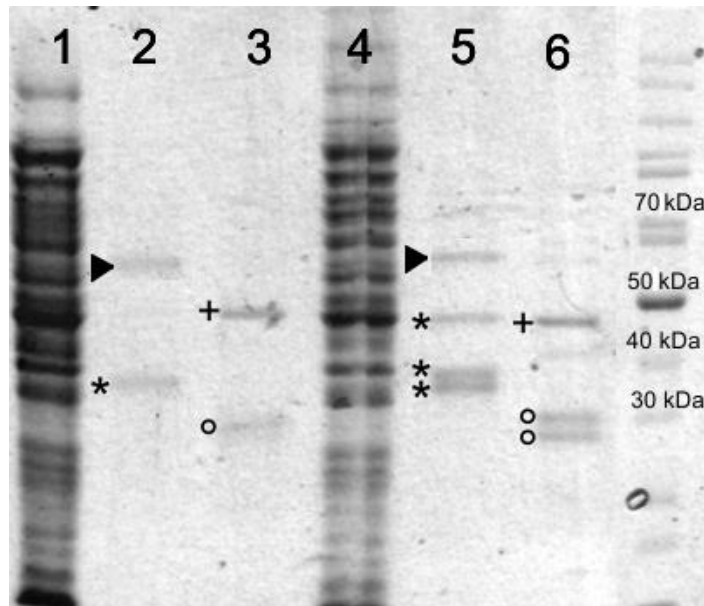
**Figura 17 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-OSB1**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Insoluble (3), Fracción Soluble (4), Fracción no adsorbe a IMAC (5), Lavado 1 (10 mM Imidazol) (6), Lavado 2 (20 mM Imidazol) (7), Lavado 3 (40 mM Imidazol) (8), Elución (500 mM Imidazol) (9), MPM PageRuler

Puesto que la recuperación de las fusiones de OSB1 por IMAC era muy poca, se probó aumentar la recuperación en fracción soluble. Expresando las fusiones en *E. coli* (DE3+) pG-KJE8 no se observó un aumento significativo de la proteína en la fracción soluble. Ante este resultado se intentó aumentar la recuperación de la proteína de la fracción soluble (Figura 18. Carriles 1 y 4), cambiando el buffer de lisis a 20 mM HEPES pH 8.0, 10% Glicerol, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 600 mM NaCl (García-Medel, 2016).

A partir de un mismo lote de expresión, se purificaron las fusiones de OSB1 por IMAC utilizando el buffer de Tris pH 8.0 descrito en la metodología y el búfer con HEPES. Como se observa en la Figura 18, el cambio de buffer propicia que se purifique una banda de aproximadamente 50 kDa (Cruces Carriles 3 y 6) y bandas menores a 30 kDa (Círculos Carriles 3 y 6). El tamaño de las bandas pequeñas (Círculos Carriles 3 y 6) correspondería aproximadamente al tamaño de TvTIM con HisTag (~32 kDa) o OSB1 (~28 kDa), sin embargo, la única forma de que así fuera es que toda la proteína de fusión purificada

haya sufrido proteólisis. Lo más probable entonces es que todas las bandas observadas en las purificaciones con HEPES, sean en realidad contaminantes y que las condiciones del búfer no permitan una adsorción tan eficiente a la columna IMAC como con el búfer Tris; debido tal vez a que a pH 8.0 el rango de amortiguamiento del HEPES está casi al límite (6.8-8.2) y no permite una buena interacción del HisTag con el níquel del IMAC.



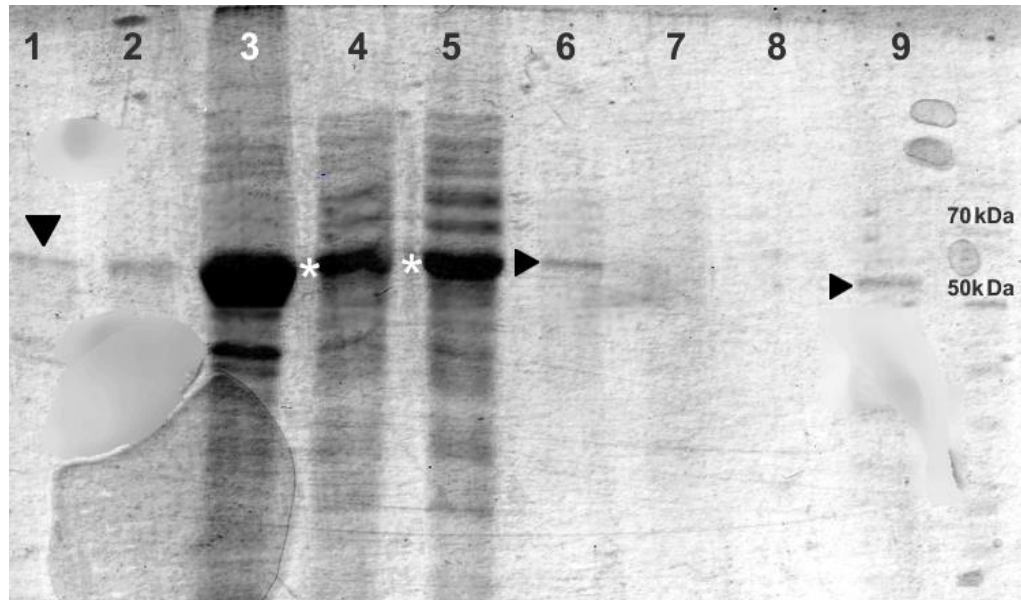
**Figura 18. Expresión y purificación por IMAC de fusiones de TvTIM y OSB1**

Fracción Soluble TvTIM-flexible-OSB1 (1), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-OSB1 en Buffer Tris pH 8.0 (2), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-OSB1 en Buffer HEPES 8.0 (3), Fracción Soluble TvTIM-rígido-OSB1 (4), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-rígido-OSB1 en Buffer Tris pH 8.0 (5), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-OSB1 en Buffer HEPES 8.0 (6), MPM PageRuler.

Por otra parte, como ya se había observado en las Figuras 16 y 17, con búfer Tris se purifica una banda de 60 kDa (Figura 18. Flechas Carriles 2 y 6) que concuerda con las fusiones de TvTIM con OSB1, además se purifican bandas contaminantes (Asteriscos Carriles 2 y 6). Debido a que la cantidad de proteína que se recuperaba con el buffer Tris era muy baja, al realizar posteriores pasos de purificación con columnas de Heparina, la proteína ya no se lograba recuperar. Por lo tanto, al igual que las fusiones con Eno1, se decidió aplazar la optimización de las fusiones con OSB1 para posteriores pruebas de purificación y cristalización, en aras de finalizar primero con otras proteínas más prometedoras. La solubilidad de una proteína en ocasiones se ve afectada por la presencia de ácidos nucleicos, dado que OSB1 es una proteína de unión a ácidos nucleicos, queda pendiente probar L-Arginina y L-Glutamina para incrementar la

solubilidad, así también probar otras cepas de expresión y condiciones de crecimiento (Abdalla, 2015).

### 6.2.3 Fusiones de SSB1



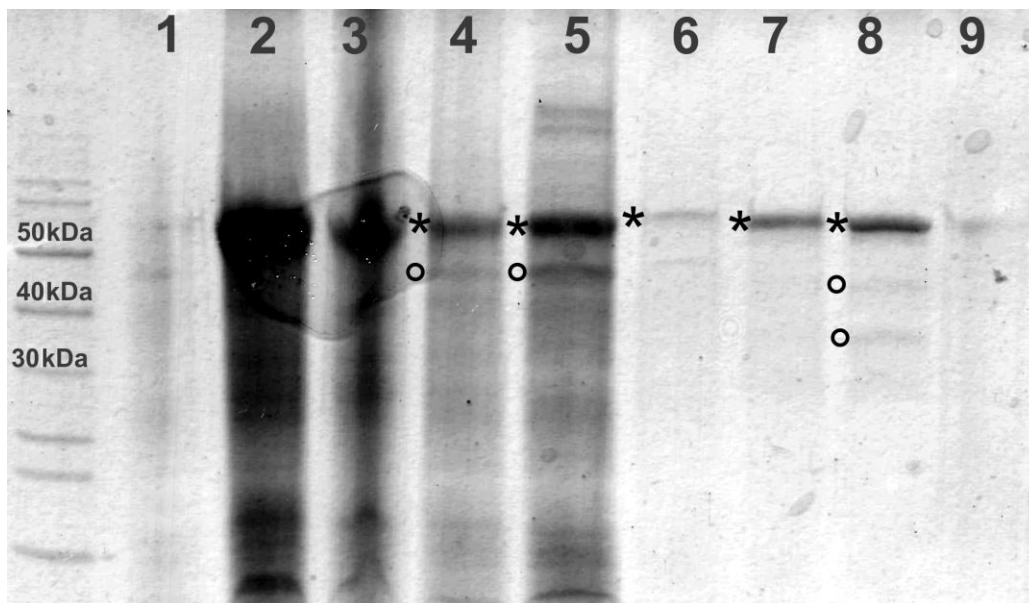
**Figura 19 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-SSB1**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Insoluble (3), Fracción Soluble (4), Fracción no adsorbida a IMAC (5), Lavado 1 (10 mM Imidazol) (6), Lavado 2 (20 mM Imidazol) (7), Lavado 3 (40 mM Imidazol) (8), Elución (500 mM Imidazol) (9), MPM PageRuler

La purificación por IMAC de la fusión TvTIM-flexible-SSB1 se muestra en la Figura 19. Se observa que se logra sobreexpresar una proteína de 53 kDa aproximadamente (Carril 2), con cierto grado de expresión basal o *leaking* (Flecha Carril 1). Mucha proteína queda en la fracción insoluble (Carril 3), de la proteína soluble (Asterisco Carril 4), la mayor parte no se fija en la columna IMAC (Asterisco Carril 5), puesto que ambas muestras tienen un patrón muy similar. Esto podría sugerir que la banda de los asteriscos no es la proteína de fusión.

La unión de la proteína a la resina de níquel es más débil que en otras fusiones o la proteína de 53 kDa no es la fusión, dado que se observa que en el primer lavado con 10 mM de Imidazol (Flecha Carril 6), una parte de la proteína con el tamaño de interés es eluída. Sin embargo, al final se logra eluir parte de la proteína de 53 kDa con 500 mM de

Imidazol (Flecha Carril 9), si se considera la cantidad de proteína en la fracción soluble (Carril 4) la recuperación es muy baja (Carril 9).



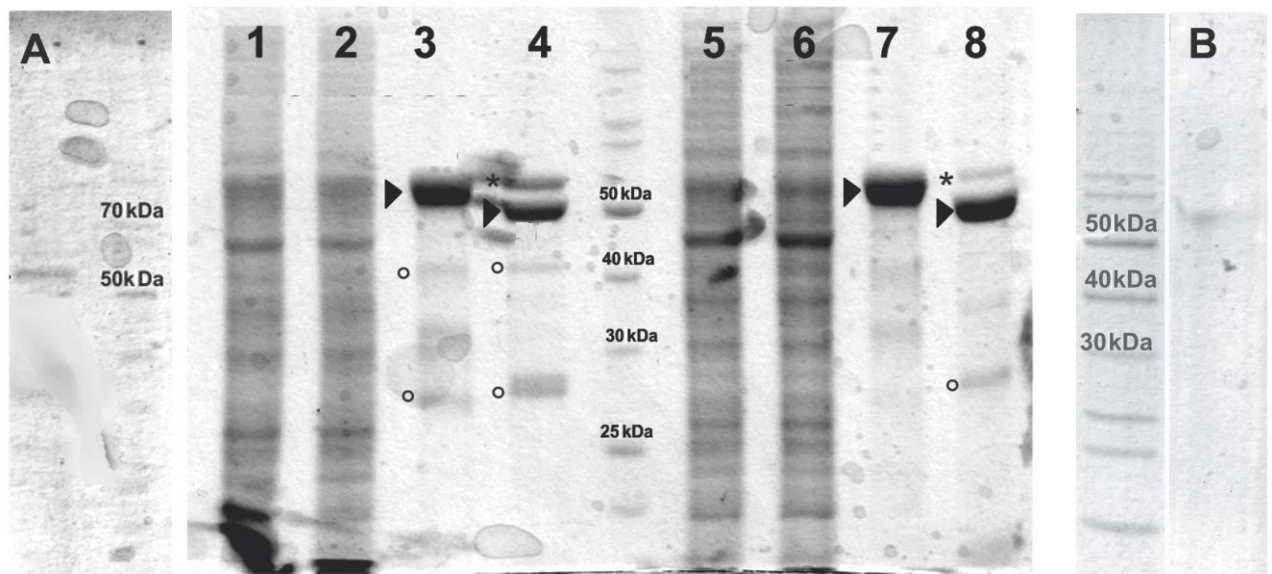
**Figura 20 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-SSB1**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Insoluble (3), Fracción Soluble (4), Fracción no adsorbida a IMAC (5), Lavado 1 (10 mM Imidazol) (6), Lavado 2 (20 mM Imidazol) (7), Lavado 3 (40 mM Imidazol) (8), Elución (500 mM Imidazol) (9), MPM PageRuler

En la Figura 20 se muestra la purificación por IMAC de TvTIM-rígido-SSB1. Se observa sobreexpresión de una proteína cercana a los 53 kDa (Carril 2), la cantidad de proteína mantenida en la fracción insoluble (Carril 3) es muy similar a la fracción que se logró solubilizar (Asterisco Carril 4). La proteína en cuestión no se une bien a la resina de IMAC, pues se observa que gran parte de la proteína de 53 kDa queda en la fracción no unida (Asterisco Carril 5), a su vez desde el primer lavado (Asterisco Carril 6), la proteína empieza a eluir. Finalmente, las bandas más intensas se obtienen en el lavado con 20 mM de Imidazol (Asterisco Carril 7) y con 40 mM de Imidazol (Asterisco Carril 8). Durante toda la purificación se observa la presencia de una banda contaminante cercana a 45kDa (Círculos Carriles 4, 5 y 8).

Al igual que se realizó con las fusiones de Enolasa 1 y OSB1, se probó a optimizar la recuperación de SSB1 (suponiendo que la proteína de 53 kDa aproximadamente lo sea), para ello se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3+) pG-KJE8 (Takara,), esta cepa tiene un plásmido que expresa chaperones moleculares (dnaK-

dnaJ-grpE, groES-groEL), con esto se esperaba disminuir la cantidad de proteína no soluble (posiblemente mal plegada y en cuerpos de inclusión) y mejorar la recuperación de las fusiones. En la Figura 21 se observa que, al cambiar cepa, la recuperación por IMAC es mucho mejor que al expresar en *E. coli* BL21(DE3+) (Carril 3 vs Carril A y Carril 7 vs Carril B).



**Figura 21 Expresión y purificación por IMAC de fusiones de TvTIM y SSB1 en *E. coli* BL21(DE3+) pG-KJE8**

Fracción Soluble TvTIM-flexible-SSB1 (1), Fracción No Soluble TvTIM-flexible-SSB1 (2), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-SSB1 (3), Proteólisis con PPS de TvTIM-flexible-SSB1 (4), Fracción Soluble TvTIM-rígido-SSB1 (5), Fracción No Soluble TvTIM-rígido-SSB1 (6), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-rígido-SSB1 (7), Proteólisis con PPS de TvTIM-rígido-SSB1 (8), Elución (500 mM de Imidazol) de TvTIM-flexible-SSB1 en *E. coli* BL21 (DE3+) (A), Elución(500 mM de Imidazol) de TvTIM-rígido-SSB1 en *E. coli* BL21 (DE3+) (B), MPM PageRuler.

Si bien al incrementarse la recuperación, también aumenta la cantidad de otras proteínas contaminantes (Círculos Figura 21 carriles 3, 4, 7 y 8); para el caso del andamio flexible se observan una proteína cercana a 40 kDa y otra proteína entre 25 y 30 kDa (Círculos Carril 3 y 4), el tamaño de esta proteína concordaría con la TvTIM (27 kDa), esto sugiere que existe proteólisis de la fusión, sin embargo, no se observa la ocurrencia de ninguna banda en un tamaño cercano a la SSB1 (23 kDa). Por las características de la construcción, si la banda de 27 kDa fuera TvTIM, se esperaría una disminución de tamaño tras la proteólisis con PPS, pues la HisTag se encuentra en el extremo amino de

TvTIM, sin embargo, el tamaño no varía tras la proteólisis con PPS (Círculos Carriles 3 y 4).

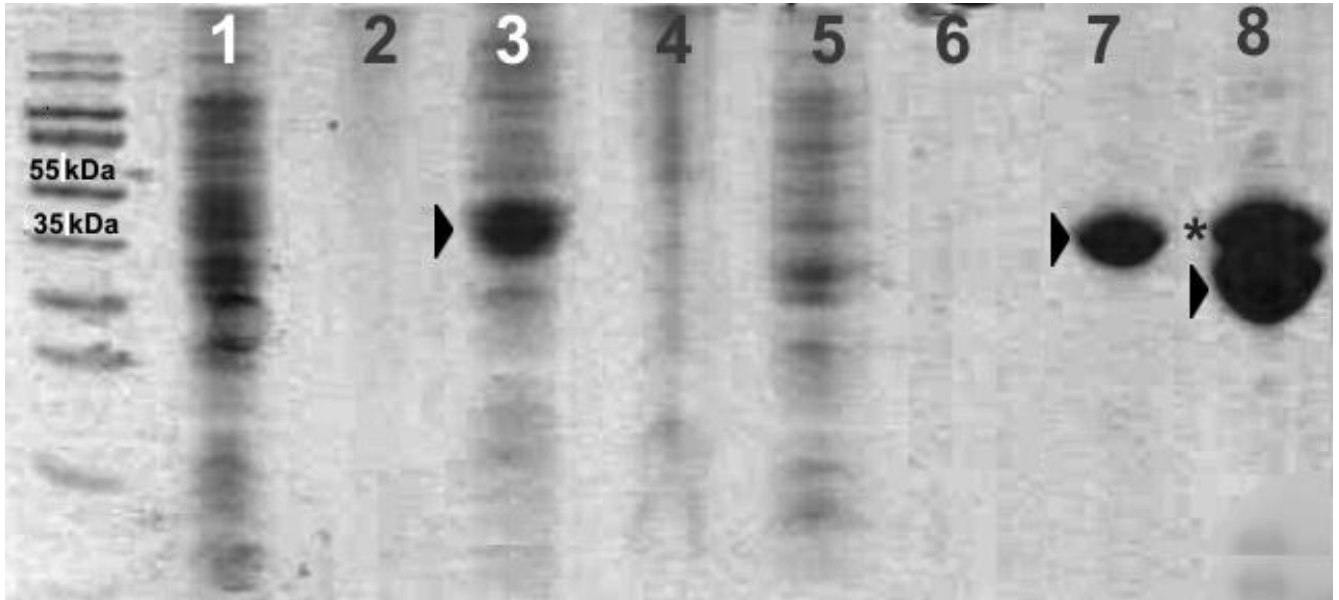
El caso del andamio rígido es similar al andamio flexible, al aumentar la recuperación (Carril 7 y B) aparece una banda cercana a los 27 kDa (Círculo Carril 8), a diferencia del andamio flexible, previo a la proteólisis con PPS la banda de 27 kDa no estaba definida (Carril 7). En caso de que la banda de 27 kDa (Círculo Carril 8) fuera TvTIM, es posible que durante la proteólisis con PPS, la fusión se hubiera separado. Para corroborar la identidad de la banda sería necesario realizar inmunoelectrotransferencias (Western Blots) Anti-TvTIM, Anti-HisTag o Anti-SSB1, el reconocimiento por Anti-HisTag o Anti-SSB1 comprobaría que la banda de 53 kDa en realidad es SSB1; y el reconocimiento por Anti-TvTIM hablaría de una posible proteólisis durante la purificación.

Una vez determinada la cepa de expresión, el paso siguiente es probar otro proceso de purificación en una columna de intercambio iónico o afinidad a Heparina, sin embargo, debido a que las fusiones de EhICP1 presentaban mejores características, se aplazó la optimización de la purificación de las fusiones de SSB1. Después de las fusiones con EhICP1, las fusiones con SSB1 son las más prometedoras para cristalizar, cabe destacar que la solubilidad de las fusiones con SSB1 en *E. coli* (DE3+) pG-KJE8 fue menor que la reportada anteriormente usando MBP (García-Medel, 2016).

#### **6.2.4 Fusiones de EhICP1**

Todas las fusiones de EhICP1, fueron completamente solubles, a modo de ejemplo se muestra en la Figura 22 la purificación por IMAC de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub>, se observa claramente la aparición de una banda de 40 kDa (el tamaño aproximado de la fusión) en la fracción soluble (Flecha Carril 3), así mismo aparentemente toda la proteína se adsorbe a la columna IMAC (Carril 4), pues no se observa ninguna banda cercana a 40 kDa en la fracción no adsorbida a IMAC. Finalmente es muy evidente que la proteína que se eluyó (Flecha Carril 7) corresponde únicamente al tamaño esperado por la fusión (40 kDa), además se observa que la banda reduce su tamaño tras la proteólisis con PPS (Flecha Carril 8), el comportamiento respondería a la digestión de la HisTag.

Ahora bien, tras el tratamiento con PPS se observa la presencia de una banda de 40 kDa (Asterisco Carril 8), el tamaño correspondería aproximadamente tanto a la fusión con HisTag como a la PPS, debido a la baja concentración de PPS que se ocupó (relación 1/10) se incubó por más tiempo hasta que la banda de 40 kDa fue prácticamente despreciable, sugiriendo que correspondía en su mayoría a proteína de fusión no digerida.

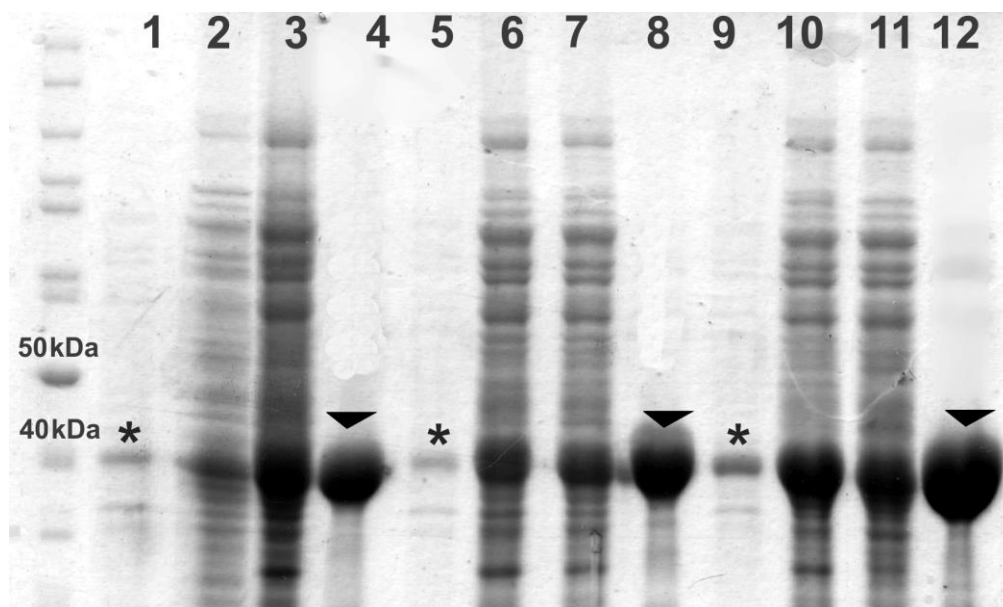


**Figura 22 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>wT</sub>**

Fracción Inducida (1), Fracción No Soluble (2), Fracción Soluble (3), Fracción no adsorbida a IMAC (4), Lavado con 20 mM Imidazol (5), Lavado con 40 mM Imidazol (6), Elución (500 mM Imidazol) (7), Elución dializada con PPS (8) MPM PageRulerPlus Prestained

En la Figura 23 se muestra la purificación por IMAC de todas las fusiones de EhICP1 en el andamio flexible, se observa que independientemente de la versión de EhICP1, el tamaño de las proteínas purificadas es cercano a 40 kDa (Flechas Carriles 4, 8 y 12) y presentan un barrido, probablemente por la cantidad de proteína cargada en el pozo. Se observa además la presencia de expresión basal (Asteriscos Carriles 1, 5 y 9), cabe destacar que, debido a la alta expresión, las columnas IMAC se saturaban y la fracción no adsorbida tenía que ser pasada a otra columna, para así recuperar mayor cantidad de proteína.





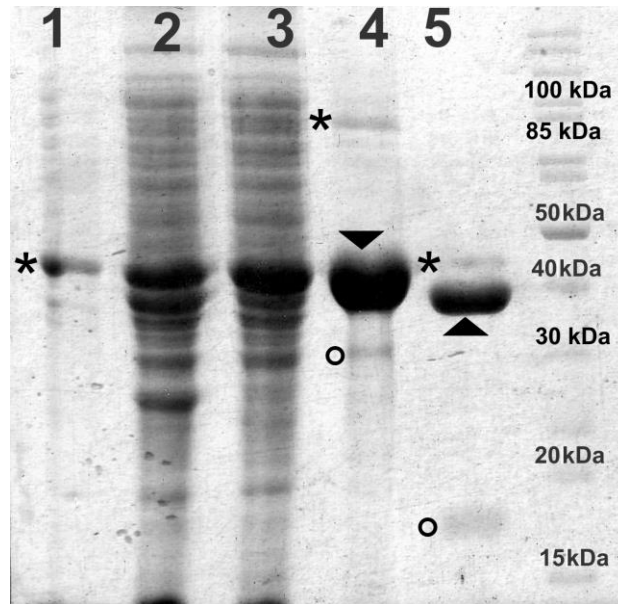
**Figura 23 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub>, TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxA</sub> y TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxS</sub>**

Fracción no Inducida WT (1), Fracción Inducida WT (2), Fracción Soluble WT (3), Elución WT (500 mM Imidazol), (4) Fracción no Inducida CxA (5), Fracción Inducida CxA (6), Fracción Soluble CxA (7), Elución CxA (500 mM Imidazol), (8) Fracción no Inducida CxS (9), Fracción Inducida CxS (10), Fracción Soluble CxA (11), Elución CxA (500 mM Imidazol) (12), MPM PageRuler.

En la Figura 24 se muestra la purificación de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>WT</sub>, se observa expresión basal de la proteína (Asterisco Carril 1), en la elución existe una alta recuperación de una proteína de 40 kDa (Flecha Carril 4) y la aparición de 2 bandas extras una cercana a 80 kDa (Asterisco Carril 4) que podría corresponder a un dímero de la fusión, esta conjetura basada en que una vez que la muestra es tratada con PPS dicha banda desaparece (Carril 5), de ser una contaminación, el tratamiento con PPS no debería afectar su aparición. En la elución también se observa una banda de aproximadamente 30 kDa (Círculo Carril 4), posiblemente es una proteína contaminante, sin embargo, tras la proteólisis dicha banda desaparece (Carril 5), esto hace pensar en la posibilidad de que la banda corresponda a la TvTIM con HisTag (Cfr. Tabla 2.) y que la proteína de fusión se escinda, sin embargo, no se observa alguna banda cercana a 11 kDa que correspondiera con EhICP1.

Tras la proteólisis con PPS se observa una banda mayoritaria, con un tamaño menor a 40 kDa (Flecha Carril 5) que correspondería a la fusión sin HisTag (Cfr. Tabla 2.), además se observa una tenue banda en 40 kDa (Asterisco Carril 5), basado en la experiencia previa con el andamio flexible, es posible que la banda corresponda a una

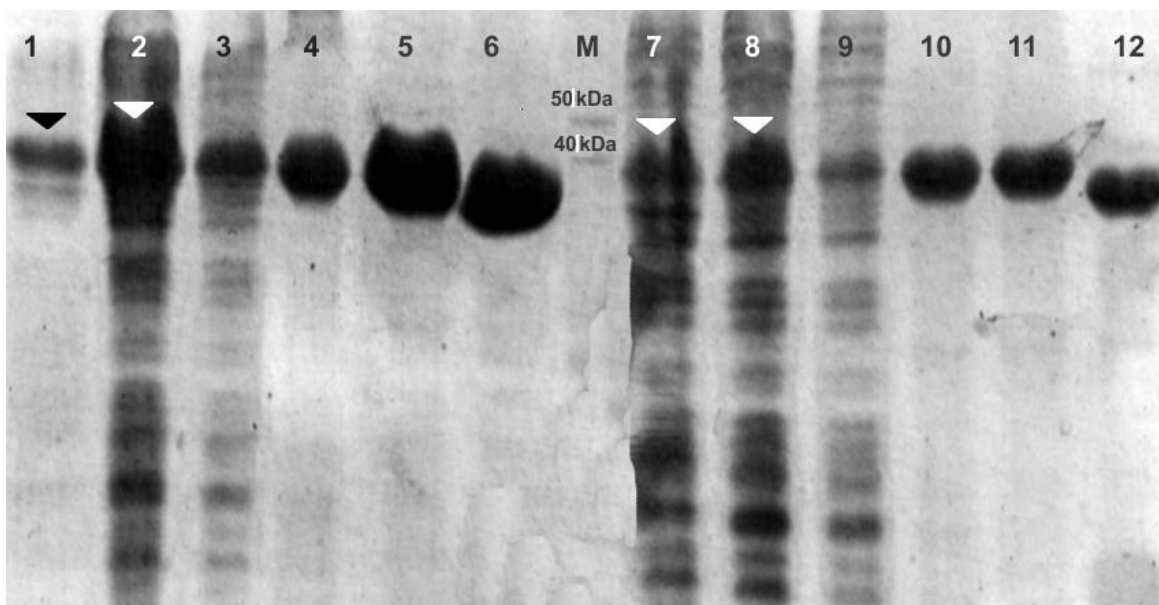
mezcla entre PPS y proteína de fusión con HisTag. Por último, la elución también presenta una banda cercana a 15 kDa (Círculo Carril 5), esta banda probablemente sea contaminación en la alícuota de PPS que se utilizó, puesto que no aparece ninguna banda de ese tamaño en la elución (Carril 4). De cualquier manera, el paso posterior de filtración en gel permite separar la banda cercana a 15 kDa.



**Figura 24 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>WT</sub>**

Fracción no Inducida (1), Fracción Inducida (2), Fracción Soluble (3), Elución (500 mM Imidazol) (4), Elución dializada con PPS (5) MPM PageRuler

Para el caso de las mutantes de EhICP1 en el andamio rígido (Figura 25), se observa que mantienen el mismo comportamiento que presentaron todas las fusiones de EhICP1. Expresión basal previa a la inducción (Flechas Carriles 1 y 7), sobreexpresión de proteína de 40 kDa (Flechas Carriles 2 y 8), las proteínas se expresan mayoritariamente de forma soluble (Carriles 3 y 9). Parte de la proteína no se adsorbió a la columna IMAC (Carriles 4 y 10) debido a que se satura la columna, por lo que fue necesario pasar las fracciones no adsorbidas en otras columnas IMAC para recuperar la mayor cantidad de proteína. Tras los lavados se obtuvo proteína de 40 kDa en alta pureza, sin contaminantes aparentes (Carriles 5 y 11), finalmente las proteínas pierden su HisTag tras la proteólisis con PPS (Carriles 6 y 12), generando una disminución en el tamaño.



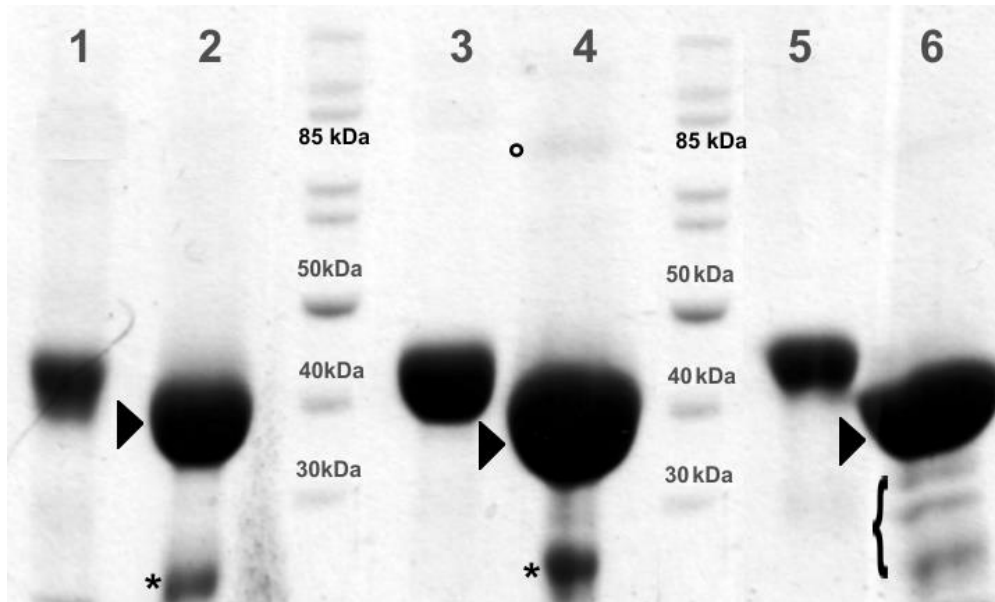
**Figura 25 Expresión y purificación por IMAC de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> y TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub>**

Fracción No Inducida de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> (1), Fracción Inducida de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> (2), Fracción Soluble de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> (3), Fracción no adsorbida a IMAC de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> (4), Elución de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> (500 mM Imidazol) (5), Elución dializada de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> con PPS (6), Fracción No Inducida de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub> (7), Fracción Inducida de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub> (8), Fracción Soluble de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub> (9), Fracción no adsorbida a IMAC de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub> (10), Elución de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub> (500 mM Imidazol) (11), Elución dializada de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CXS</sub> con PPS (12) MPM PageRuler

Una vez que las proteínas se purificaron por IMAC el siguiente paso consistía en digerir con PreScission™ Protease (PPS) la HisTag. La PreScission™ Protease, es la proteasa 3C de Rhinovirus14 fusionada a GST (Walker y col., 1994; GE Healthcare, 2012), generalmente se retira la HisTag porque puede llegar a alterar la solubilidad de la proteína a cristalizar, aumentar la agregación e impedir su posible cristalización (Carson y col., 2007).

En la Figura 26 se muestra la proteólisis de la HisTag con PPS en las fusiones de TvTIM-flexible y EhICP1, es de destacar la reducción de aproximadamente 3.7 kDa tras la escisión de HisTag (Flechas Carriles 2, 4 y 6). Otro dato destacable es la aparición de proteólisis debajo de 30 kDa después de la diálisis con PPS (Asteriscos y Llave en Carriles 2, 4 y 6), por último, se observa una banda de 80 kDa aproximadamente en la mutante CxA después de la proteólisis (Círculo Carril 3), es posible que la banda corresponda a algún contaminante acarreado en la alícuota de PPS, puesto que no aparece en la elución (Carril 3).

La proteólisis y la aparición de bandas extras tras el tratamiento con PPS se ha observado anteriormente en las fusiones con andamio flexible (Figura 24) y se ha relacionado con la posible separación de TvTIM de la fusión, sin embargo, no se corroboró la identidad de dichas bandas.



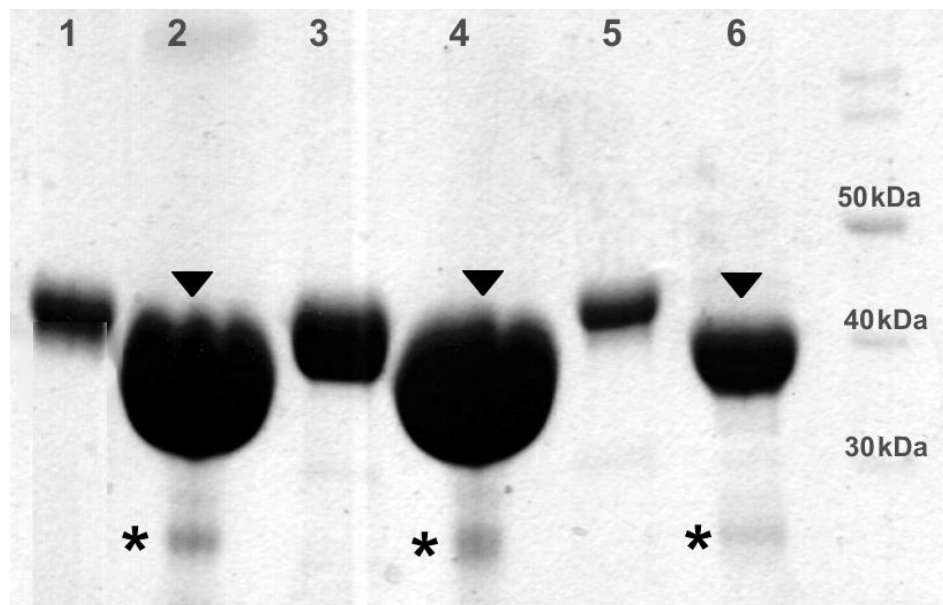
**Figura 26** Proteólisis con PPS para las construcciones de EhICP1 en el andamio TvTIM-flexible.

Elución WT (1), Elución WT digerida con PPS (2), Elución CxA (3), Elución CxA digerida con PPS (4), Elución CxS (5), Elución CxS digerida con PPS (6).

En la Figura 27 se muestra la proteólisis de HisTag de las fusiones de EhICP1 en el andamio rígido, se observa que en las fracciones tratadas con PPS, ocurre una disminución de tamaño correspondiente a la pérdida de la HisTag (Flechas Carriles 2, 4 y 6). Se observa que tras el tratamiento con PPS las bandas son más anchas e intensas, tal y como se observó en la Figura 26, lo más probable es que el tamaño de la PPS (~40 kDa) y el tamaño de las fusiones sin HisTag (39-40 kDa), generen el efecto de una banda más enriquecida, otra posibilidad es que se haya cargado más proteína debido al proceso de concentración previo al paso por filtración en gel y los volúmenes de carga no se ajustaron bien.

Se observa que al igual que las fusiones de la Figura 26, existen bandas menores a 30 kDa después de la proteólisis con PPS (Figura 27. Asteriscos en Carriles 2, 4 y 6), una explicación probable es contaminación por la alícuota de la PPS, dado que no se

presentaban esas bandas antes de la digestión con PPS y el tamaño es homogéneo en todas las muestras (Asteriscos en Carriles 2, 4 y 6). Otra explicación es que durante la diálisis ocurra una proteólisis inespecífica de la fusión o en algún paso anterior, pero no es visible la banda debido a la concentración de proteína en la elución (Carriles 1, 3 y 5); de esta forma las bandas que se observan (Asteriscos en Carriles 2, 4 y 6), corresponderían aproximadamente al tamaño de TvTIM (27 kDa), sin embargo debido a que el paso siguiente es filtración en gel y la diferencia de tamaño entre estas bandas desconocidas y las bandas de interés es muy grande, ya no se indagó más.



**Figura 27 Proteólisis con PPS para las construcciones de EhICP1 en el andamio TvTIM-rígido.**

Elución WT (1), Elución WT digerida con PPS (2), Elución CxA (3), Elución CxA digerida con PPS (4), Elución CxS (5), Elución CxS digerida con PPS (6).

Posterior a la proteólisis con PPS se separaron las proteínas de fusión de las HisTag por medio de filtración en gel, adicionando 5 mM de TCEP debido a que se ha observado la formación de multímeros de EhICP1 cuando se utilizan otros agentes reductores (Jímenez-Sandoval, 2016). En la Figura 28 se muestran los cromatogramas de las purificaciones por Superdex 200, la HisTag es eluída aproximadamente a los 30 mL, en todas las purificaciones se observan picos entre 5 y 15 mL aproximadamente, es importante resaltar que todos los cromatogramas sin excepción presentan un pico principal (entre 10 y 15 mL), con un pico de menor intensidad fusionado del lado izquierdo (entre 5 y 10 mL). Este comportamiento indica que no hay una correcta separación entre 2 muestras, pues lo ideal es tener picos independientes y separados entre sí.

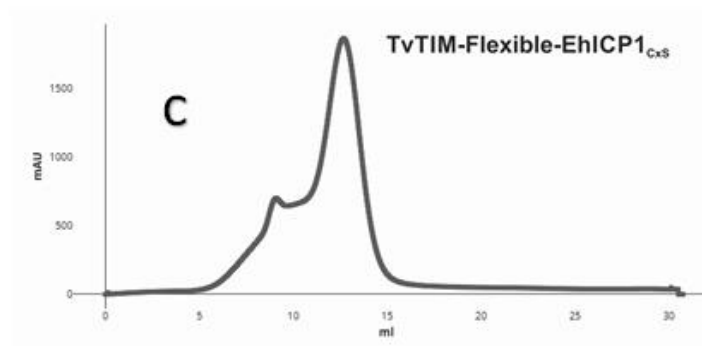
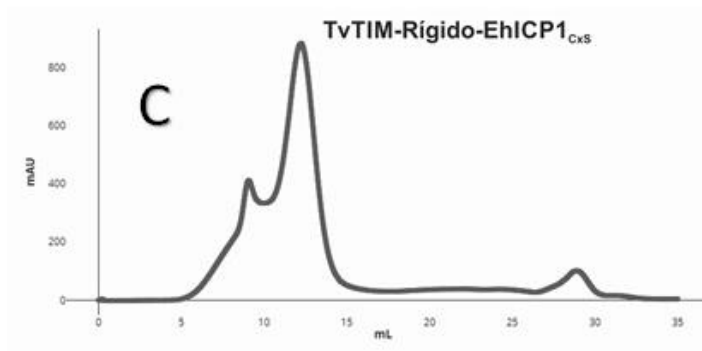
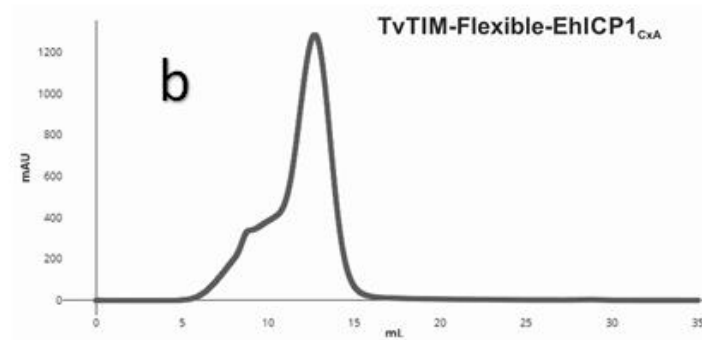
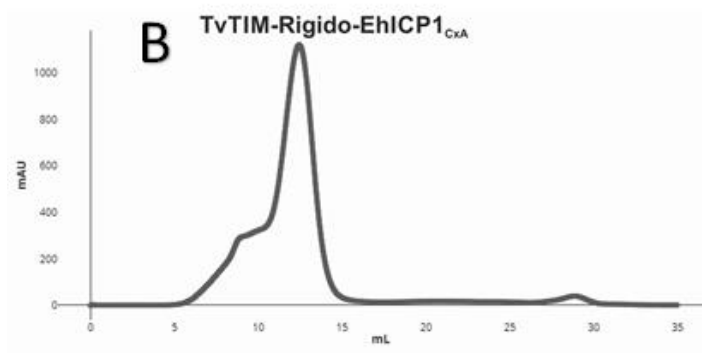
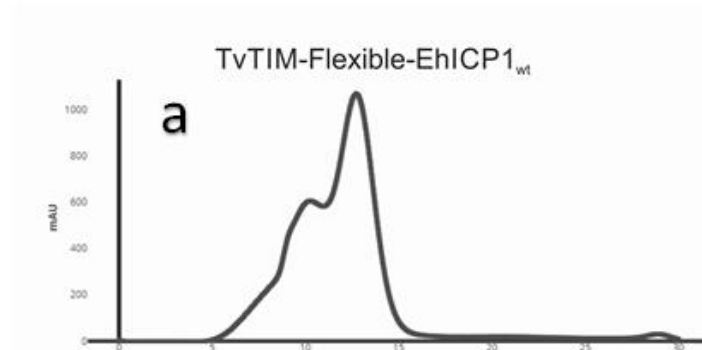
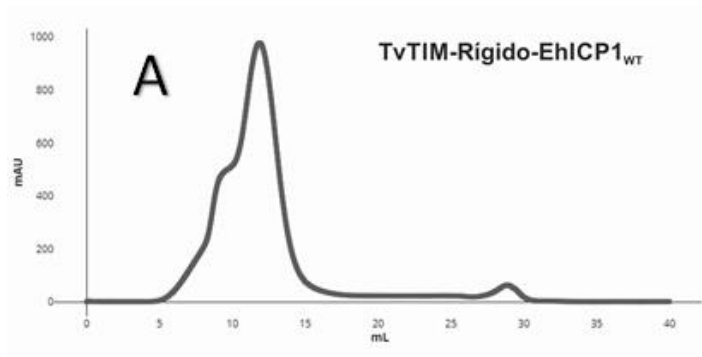
En ese momento las fracciones correspondientes a los picos entre 5 y 15 mL se analizaron por SDS-PAGE, se observó que aquellas fracciones entre 10 y 15 mL no presentaban las bandas de degradación observadas durante la proteólisis con PPS (Figuras 26 y 27), no se consideró entonces la posibilidad de que las fracciones cercanas a los 10 mL pudieran ser una mezcla entre fusiones con HisTag y PPS. Posteriormente en la tesis se discute como pudo haber afectado este dato al resultado final de la cristalización.

Las fracciones de filtración en gel eluidas entre 10 y 15 mL se concentraron con concentradores de proteína tipo Pierce de 10K MWCO (ThermoFisherScientific). En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de las proteínas que se utilizaron para los ensayos de cristalización con los kits Crystal Screen de Hampton. Las concentraciones fueron calculadas por Nanodrop, utilizando el coeficiente de extinción teórico dado por ProtParam (Gasteiger y col., 2003).

**Tabla 3 Concentración de las proteínas de fusión para ensayos de cristalización**

<b>Andamio</b>	<b>Proteína</b>	<b>Concentración [mg/mL]</b>
TvTIM- Rígido	EhICP1 <sub>WT</sub>	30
	EhICP1 <sub>CxA</sub>	10
	EhICP1 <sub>CxS</sub>	9.86
TvTIM-flexible	EhICP1 <sub>WT</sub>	12.11
	EhICP1 <sub>CxA</sub>	33.5
	EhICP1 <sub>CxS</sub>	16.8

La capacidad que tiene una proteína fusionada cristalizar en un andamio está generalmente determinada por la capacidad del andamio a formar redes tal que puedan dar espacio para acomodar a la proteína de interés, sin embargo, la proteína de interés no contribuye necesariamente a la formación de la red, además la proteína de interés no debe perturbar la red formada por el andamio sino contribuir a su estabilidad (Stura y col., 2002). En general las proteínas de bajo peso molecular que tienen dominios sencillos y son oligoméricas, cristalizan más fácil que aquellas de alto peso molecular, con múltiples dominios o monoméricas (Abdalla, 2015). Se eligieron las fusiones de EhICP1 para probar a cristalizar, en lugar de las fusiones de las otras proteínas debido a que las EhICP1 eran las proteínas más pequeñas con las que se trabajaron, esto aumentaba la posibilidad de obtener cristales de las fusiones.



**Figura 28 Cromatogramas de la purificación de las fusiones de TvTIM con EhICP1, por Superdex 200.**

En letras mayúsculas se muestran los cromatogramas de las fusiones en el andamio Rígido, en minúscula se muestran las fusiones en el andamio Flexible. TvTIM-rígido-EhICP1<sub>WT</sub> (A), TvTIM-rígido-EhICP1<sub>C<sub>XA</sub></sub> (B), TvTIM-rígido-EhICP1<sub>C<sub>XS</sub></sub> (C), TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub> (a), TvTIM-flexible-EhICP1<sub>C<sub>XA</sub></sub> (b), TvTIM-rígido-EhICP1<sub>C<sub>XS</sub></sub> (c)

## 6.3 Cristalización


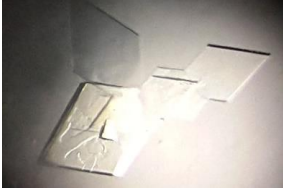


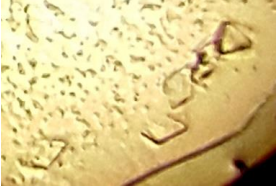

Los ensayos de cristalización se realizaron por el método de Gota Colgante, se probaron 96 condiciones del kit Crystal Screen (Condiciones 1-48 de Crystal Screen 1 y Crystal Screen 2 completo), se tomaron imágenes del crecimiento de los cristales. En la Tabla 4, se muestran los cristales obtenidos durante el escrutinio de condiciones de cristalización, las condiciones presentadas fueron aquellas que generaron cristales de 10-35 $\mu$ M, la relación de proteína: condición fue de 1:1. En comparación a lo referido por Salgado-Lugo los cristales tardaron 10 días en aparecer y 28 días en alcanzar el tamaño esperado. Eso generó complicaciones al recuperar los cristales para difractarlos, pues los cristales estaban secos y las gotas presentaban nata.

Asimismo, hubo condiciones que presentaron microcristales (Tabla 5), tras 28 días sin presentar crecimiento de los cristales, se volvieron a purificar las proteínas y se procedió a optimizar las condiciones de cristalización, partiendo de una solución de proteína igual a la concentración del escrutinio (Tabla 3), se modificaron las composiciones de las soluciones de cristalización variando el pH y la concentración de precipitantes. Finalmente se probaron distintas relaciones de proteína: condición (1:1, 2:1, 3:1,1:2), de todas las condiciones la única proteína que formó cristales más grandes fue TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> en las modificaciones de Buffer Crystal Screen 1 #46 (Tabla 6)

Existen muchos factores que provocan que la cristalización fracase, del comportamiento de la proteína varía mucho en el dependiendo del ambiente donde se encuentre, *in vivo* las proteínas se encuentran en su estado nativo, asociadas a otras proteínas o integrando grandes complejos, en las condiciones de cristalización se promueve un estado de sobresaturación que puede llegar a generar precipitación. Incluso en algunos casos, las proteínas ni siquiera son solubles en su estado nativo, situación que se mantiene tras su aislamiento (Abdalla, 2015). Aunque las fusiones de EhICP1 con TvTIM mostraron alta solubilidad cuando fueron expresadas en *E. coli*, fue quizá esta alta solubilidad (se lograron rendimientos de hasta 98 mg/mL para TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxA</sub>) la que no propició condiciones óptimas nucleación para posterior cristalización. Es notable mencionar que la mayoría de los cristales fueron obtenidos en el andamio flexible.






**Tabla 4 Relación de cristales obtenidos durante el escrutinio de condiciones de cristalización.**

Andamio	Proteína	Condición Hampton	Composición	Imagen
		Crystal Screen 1 #10	0.2 M Acetato de amonio 0.1 M acetato de sodio trihidratado pH 4.6, 30% w/v Polietilén glicol 4,000	
	EhICP1 <sub>CxA</sub>	Crystal Screen 1 #46	0.2 M Acetato de calcio hidratado, 0.1 M cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 18% w/v Polietilén glicol 8,000	
		Crystal Screen 2 #26	26. 0.2 M Sulfato de Amonio, 0.1 M MES monohidratado pH 6.5, 30% w/v polietilén glicol monometil éter 5,000	
TvTIM-Flexible		Crystal Screen 1 #10	0.2 M Acetato de amonio 0.1 M acetato de sodio trihidratado pH 4.6, 30% w/v Polietilén glicol 4,000	
	EhICP1 <sub>CxS</sub>	Crystal Screen 1 #15	15. 0.2 M Sulfato de amonio, 0.1 M Cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 30% w/v Polietilén glicol 8,000	
TvTIM-Rígido	EhICP1 <sub>CxA</sub>	Crystal Screen 1 #36	36. 0.1 M TRIS-HCl pH 8.5, 8% w/v Polietilén glycol 8,000	

**Tabla 5 Condiciones de cristalización que generaron microcristales**

Andamio	Proteína	Condición Hampton	Composición
TvTIM-Flexible	EhICP1 <sub>CxA</sub>	Crystal Screen 1 #41	0.1 M HEPES pH 7.5, 10% v/v 2-Propanol, 20% w/v Poetilén glicol 4,000
	EhICP1 <sub>CxS</sub>	Crystal Screen 1 #41	0.1 M HEPES pH 7.5, 10% v/v 2-Propanol, 20% w/v Poetilén glicol 4,000
		Crystal Screen 2 #39	0.2 M MgCl <sub>2</sub> hexahidratado, 0.1 M Tris pH 8.5, 3.4 M 1,6-Hexanediol
	EhICP1 <sub>WT</sub>	Crystal Screen 1 #10	0.2 M Acetato de amonio 0.1 M acetato de sodio trihidratado pH 4.6, 30% w/v Poetilén glicol 4,000
Crystal Screen 2 #39		0.2 M MgCl <sub>2</sub> hexahidratado, 0.1 M Tris pH 8.5, 3.4 M 1,6-Hexanediol	
TvTIM-Rígido	EhICP1 <sub>CxS</sub>	Crystal Screen 1 #28	0.2 M Acetato de sodio trihidratado, 0.1 M cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 30% w/v polietilén glicol 8,000
	EhICP1 <sub>CxA</sub>	Crystal Screen 1 #46	0.2 M acetato de calcio hidratado, 0.1 M cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 18% w/v polietilén glicol 8,000

**Tabla 6 Condiciones optimizadas de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub> en Buffer Crystal Screen 1 #46**

Andamio	Proteína	Condición Hampton	Composición	Imagen
TvTIM-Rígido	EhICP1 <sub>CxA</sub>	Crystal Screen 1 #46 (modificado) 1:1	0.2 M acetato de calcio hidratado, 0.1 M cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 19% w/v polietilén glicol 8,000	
		Crystal Screen 1 #46 (modificado) 2:1	0.2 M acetato de calcio hidratado, 0.1 M cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 20% w/v polietilén glicol 8,000	
		Crystal Screen 1 #46 (modificado) 2:1	0.2 M acetato de calcio hidratado, 0.1 M cacodilato de sodio trihidratado pH 6.3, 18% w/v polietilén glicol 8,000	

La concentración de la proteína no parece ser un factor tan determinante, puesto que recuperaron 30 mg/mL de TvTIM-rígido-EhICP1<sub>WT</sub>, sin embargo, no se consiguieron cristales de la fusión en ninguna condición. De las condiciones de cristalización obtenidas, las condiciones de Crystal Screen 1 #41 y #46 fueron reportadas anteriormente como condiciones de cristalización para TvTIM (Salgado Lugo, 2011), no así las condiciones de Crystal Screen 1 #10, #28 y Crystal Screen 2 #39. El conseguir cristales en estas condiciones sugería que la proteína cristalizada era la fusión de TvTIM con EhICP1.

## 6.4 Difracción de rayos X y resolución de estructuras

Como se explica en la metodología, los cristales colectados fueron criopreservados en nitrógeno líquido, hasta ser difractados en el *Advanced Photon Source* en Chicago. Se llevaron 12 cristales a difractar de las condiciones mostradas en las tablas 6 y 4, de todos los cristales únicamente se consiguieron difracciones para 3 fusiones TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxS</sub>, TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub> y TvTIM-rígido-EhICP1<sub>CxA</sub>, los otros cristales de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxA</sub>, estaban en malas condiciones o generaron patrones de difracción que no se podían analizar. Los datos se analizaron en el Langebio, según se explica en la metodología. Los resultados de las difracciones se muestran en la Tabla 7.

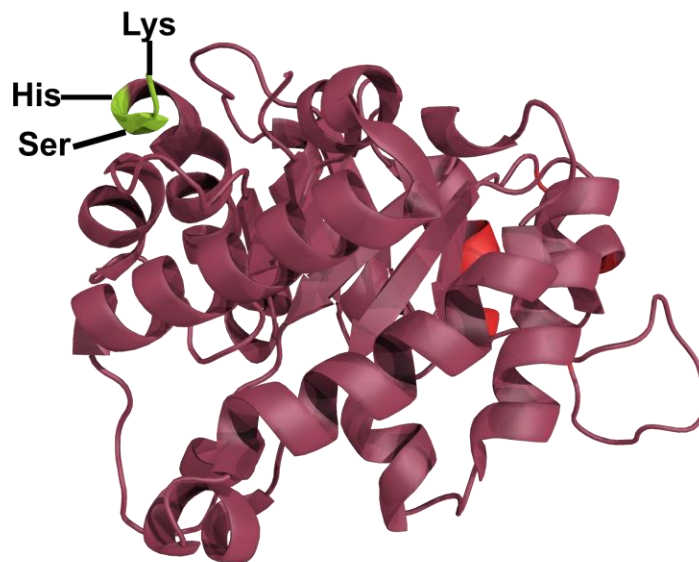
**Tabla 7 Características de la colección de datos de los cristales**

Parámetros	TvTIM-Flexible-EhICP1 <sub>CxS</sub>	TvTIM-Flexible-EhICP1 <sub>WT</sub>	TvTIM-Rígido-EhICP1 <sub>CxA</sub>
<b>Grupo Espacial</b>	P 1,2,1	P 2 2 2	P 2 2 2
<b>Longitud de Celda Unitaria a, b, c (Å)</b>	46.9, 106.89, 56.42	47.66, 56.85, 107.26	47.12, 56.61, 108.32
<b>Ángulos de celda unitaria <math>\alpha=\beta=\gamma</math> (°)</b>	90,90,90	90,90,90	90,90,90
<b>Rango de Resolución (Å)</b>	1.179-49.9	(1.713-53.64)	(1.109-36.22)
<b>Reflexiones</b>	799924	178221	1410407

Al comparar la longitud de la celda unitaria de los cristales difractados (Tabla 7), con la longitud de la celda unitaria de los cristales de TvTIM1 (Anexo 8.3), es evidente que el tamaño es idéntico. Éste resultado sugiere que los cristales únicamente correspondían a TvTIM, puesto que en caso de que existiera co-cristalización de TvTIM con EhICP1, la celda unitaria debería haber aumentado de tamaño, tal como ocurre en el

caso de las fusiones con MBP (Waugh, 2016), o en su defecto se esperaría que el grupo espacial fuera distinto. Por lo tanto, una vez realizado el reemplazo molecular se observó que no existía densidad electrónica para EhICP1, toda la densidad electrónica correspondía únicamente a TvTIM, concordando con lo observado en los datos de los cristales.

Los modelos mostraron a la TvTIM truncada hasta los residuos: histidina, serina y lisina (HSK). HSK son los últimos residuos de la TvTIM (Figura 6 y Anexo 8.1.2), en la Figura 29 se ejemplifica el caso de la TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub>, se muestra en rojo el residuo de isoleucina 45 y en verde los residuos de HSK. Es interesante notar que incluso aquellos cristales obtenidos en condiciones distintas a las reportadas para TvTIM, también correspondían a TvTIM, tal es el caso de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub>.



**Figura 29 Modelo de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>WT</sub> por reemplazo molecular.**

En verde se resaltan los últimos 3 residuos de TvTIM (Histidina, Serina, Lisina) en rojo se resalta el residuo de I45.

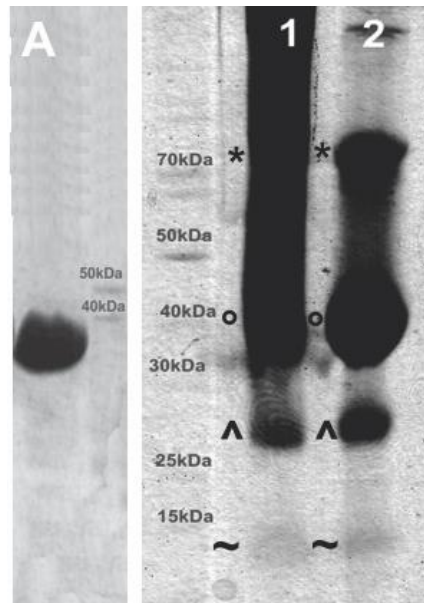
Ahora bien, durante el proceso de purificación de las proteínas, se observó constantemente proteólisis después del tratamiento con PPS, en la Figura 30 se muestra el estado de TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxA</sub> en el momento justo de la purificación (Carril A, tomado de la Figura 25.), en cristal (Carril 1) y en conservación en tubo (Carril 2). En el Carril 1 se muestra la proteína utilizada para poner las gotas, pero que se conservó a 4°C,

por su parte el Carril 2 muestra la proteína que estuvo en la gota incubándose a 21°C, cabe recalcar que el tiempo de ambas proteínas fue el mismo, pues es exactamente el mismo lote. Se observa que en el Carril 1 hay una gran cantidad de proteólisis, es de notar que tanto en gota como en tubo la proteólisis generó 4 bandas, una cercana a 70 kDa (Asteriscos Carril 1 y 2) que correspondería con el dímero de la fusión (80 kDa), otra cercana a 40 kDa (Círculos Carril 1 y 2) que corresponde con el tamaño de la fusión, una tercera banda cercana a 25 kDa (Cuñas Carril 1 y 2) que correspondería con el tamaño de la TvTIM (27 kDa) y una última banda muy difuminada debajo de 15 kDa (Tildes Carril 1 y 2) que correspondería con la EhICP1 (13 kDa), por lo tanto, en gota a 21°C como preservada a 4°C la proteína se está digiriendo.

Esto propone varios escenarios posibles: Un escenario es que durante la purificación se estuviera acarreado una proteasa de *E. coli*, si bien las cepas BL21 son reducidas en proteasas, eso no implica que pueda existir alguna proteasa capaz de separar a TvTIM del *linker* y la proteína fusionada. Aunque no se alcanza a ver en los geles alguna proteína extra después de la filtración en gel, es importante recordar que las proteasas en general son muy activas y una ínfima cantidad sería capaz de digerir las fusiones, generando la cristalización accidental de únicamente la proteína de andamio (Waugh, 2011; Niedzialkowska y col., 2016). Esta situación explicaría por qué tardaron tanto en cristalizar las proteínas, es posible que los contactos necesarios para formar un cristal no fueran posibles, hasta que alguna proteasa escindiera a TvTIM de la fusión permitiendo que las moléculas de TvTIM cristalizaran entre sí, dejando trazas de la EhICP1. Por tal razón el tamaño de la celda y el grupo espacial de los cristales eran los mismos que la TvTIM, es posible que la red formada por el andamio no fuera lo suficientemente amplia como para permitir el acomodo de EhICP1 o que a su vez EhICP1 no contribuyera a la estabilidad de las redes y por eso no cristalizaran como fusión.

Ahora en el caso de que se esté acarreado una proteasa, es posible que estas proteasas reconozcan y corten la secuencia del *linker* flexible, ya que la mayoría de los cristales fueron de fusiones en el *linker* flexible. Sin embargo, se observa en la Figura 30 un barrido, por lo tanto, es más probable que las proteasas sean inespecíficas y simplemente degraden toda la proteína de fusión. Es necesario entonces realizar pruebas de purificación con inhibidores de proteasas para observar si disminuye o no el grado de

proteólisis durante la purificación, dichas pruebas no se realizaron por disposición de tiempo y recursos materiales.



**Figura 30** Proteólisis de la fusión TvTIM-flexible-EhICP1<sub>CxA</sub> al purificar, en gota y en tubo. Proteína purificada por IMAC y digerida con PPS (A), Proteína reservada en tubo a 4°C (1), Proteína en gota con Crystal Screen 1 #46 (2).

Otro escenario que explica el comportamiento de la Figura 30 es que las fusiones sean inestables, o que en algún paso de la purificación se contaminara la muestra con proteasas, una remota posibilidad es que la PPS realice una proteólisis inespecífica a la fusión de TvTIM, sin embargo esto es poco posible dado que la secuencia de reconocimiento de PPS (Leucina-Fenilalanina-Glutamina/Glicina-Prolina) es muy específica, por esa misma razón se ocupa PPS, además no existen reportes de que la PPS corte de forma inespecífica (GE Healthcare, 2012; Waugh, 2011). En el remoto caso que la PPS cortara de forma inespecífica es posible que los hombros que se observan de 5 a 10 mL en la Figura 28, fueran una fracción de la proteína de fusión unida a PPS y debido a que los tamaños son muy similares, fuera imposible determinar su identidad por SDS-PAGE, un análisis por espectrometría de masas revelaría si esta hipótesis es cierta. Bajo la misma línea de pensamiento, las condiciones de los buffers de cristalización podrían propiciar actividad inespecífica de la PPS y por eso como se propuso anteriormente, una vez que la PPS escinda TvTIM de la fusión, es que se pueden conseguir cristales. El uso de AG7088, un inhibidor de PPS (Patick y col., 1999), podría

aclarar si en realidad es efecto de la PPS. Otra posibilidad es que durante el segundo paso de purificación por Superdex 200, la columna tuviera contaminación de alguna proteasa y esto generará la proteólisis observada, sin embargo, durante el periodo de trabajo, ningún miembro de laboratorio reportó proteólisis de su proteína tras usar la columna, pues es de esperarse que la limpieza de la columna con 200 mM de NaOH sea suficiente para eliminar y desactivar cualquier proteasa potencial.

## 7 Conclusiones y Perspectivas

### 7.1 Conclusiones

Se determinaron condiciones de expresión y purificación de proteínas de fusión entre TvTIM con EhICP1 usando 2 linkers, los resultados indican que las proteínas de fusión, purificadas con el protocolo descrito de IMAC y Filtración en Gel, sufren degradación con el paso del tiempo.

No fue posible determinar la causa de la degradación, ni la factibilidad de TvTIM como andamio de cristalización con los linkers propuestos en el proyecto, es necesario la realización de más experimentos.

### 7.2 Perspectivas

- Realizar Western Blot de las fusiones de SSB1, para corroborar la identidad de las fusiones. Posteriormente optimizar el protocolo de purificación e intentar cristalizar las fusiones.
- Adaptar el protocolo de purificación utilizado agregando inhibidores de proteasas, para disminuir la degradación.
- Agregar un paso de purificación por afinidad a GST, para retirar la PPS después de la proteólisis, así observar si disminuye la degradación o se obtienen cristales de las fusiones completas.
- Intentar cristalizar las fusiones sin escindir la HisTag, aunque no es común existen casos de éxito (Carson y col., 2007).
- Realizar prueba de concepto fusionando GFP con TvTIM para conocer la viabilidad de TvTIM como andamio de cristalización y el límite de espacio de empaquetamiento para cristalizar (Stura y col., 2002).

### 7.3 Productos

Como parte de los productos de este proyecto, se presentaron los resultados de esta tesis durante el **6° Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño**



de Proteínas en Durango, México. Se fue asistente al **XXI Congreso Nacional de Bioquímica** en Aguascalientes, México.



Además, se incorporó a la **Sociedad Mexicana de Bioquímica**, como miembro estudiante. Se realizaron actividades de Divulgación Científica durante el **Taller Ciencia Viva 2016** y **Taller Ciencia Viva 2017**.



## La Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

Atendiendo al mérito de *Marcel Gustavo Alamán Zarate*  
y a los servicios que ha prestado a la ciencia, tuvo a bien admitirlo en su seno como

Miembro *Estudiante*

El día 19 de Mayo de 2017 y para constancia le extiende el presente diploma.

Ciudad de México

Dr. Miguel Lara Flores  
Presidente

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo  
Secretaria



El Centro de Investigación y Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional otorga el presente:

# DIPLOMA

a: I.Bt. Marcel Gustavo Alamán

Por su valiosa participación como Instructor en el  
Taller Ciencia Viva 2017 para jóvenes de  
licenciatura y bachillerato en las instalaciones del  
Cinvestav Unidad Irapuato del 9 al 22 de Julio del  
2017.

M.C. Africa Ibas Robles  
Coord. Taller Ciencia Viva

Dra. Gabriela Olmedo Alvarez  
Directora Cinvestav Unidad Irapuato





Se entrega la presente constancia a:

**MARCEL GUSTAVO ALAMÁN ZÁRATE**

Por su participación como instructor en el **Taller Ciencia Viva** para alumnos de licenciatura que se llevó a cabo del 25 al 28 de julio de 2016 en las instalaciones del Cinvestav Unidad Irapuato.

Irapuato, Guanajuato, México a 28 de julio de 2016.

**Dra. Gabriela Olmedo Álvarez**  
Directora Unidad Irapuato



## Bibliografía

1. Abdalla, M; Eltayb, W; Elshareef, SHM; Dafaalla, T (2016): Important Factors Influencing Protein Crystallization. En: *Glob. J Biotechnol Biomater Sci* 2 (1), pág. 25–28.
2. Abdalla, Mohnad (2015): Important Factors Influencing Protein Crystallization. En: *Glob J Biotechnol Biomater Sci* 2 (1), pág. 25–28. DOI: 10.17352/gjbbs.000008.
3. Adams, Paul D.; Afonine, Pavel V.; Bunkóczi, Gábor; Chen, Vincent B.; Davis, Ian W.; Echols, Nathaniel y col. (2010): PHENIX. A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66 (Pt 2), pág. 213–221. DOI: 10.1107/S0907444909052925.
4. Alber, T.; Hartman, F. C.; Johnson, R. M.; Petsko, G. A.; Tsernoglou, D. (1981): Crystallization of yeast triose phosphate isomerase from polyethylene glycol. Protein crystal formation following phase separation. En: *The Journal of biological chemistry* 256 (3), pág. 1356–1361.
5. Bachmann, Laura H.; Hobbs, Marcia M.; Seña, Arlene C.; Sobel, Jack D.; Schwebke, Jane R.; Krieger, John N. y col. (2011): *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. En: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 53 Suppl 3, S160-72. DOI: 10.1093/cid/cir705.
6. Bellini, Dom; Fordham-Skelton, Anthony P.; Papiz, Miroslav Z. (2011): STRU-cloning. A fast, inexpensive and efficient cloning procedure applicable to both small scale and structural genomics size cloning. En: *Molecular biotechnology* 48 (1), pág. 30–37. DOI: 10.1007/s12033-010-9345-7.
7. Berlec, Aleš; Strukelj, Borut (2013): Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. En: *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 40 (3-4), pág. 257–274. DOI:

10.1007/s10295-013-1235-0.

8. Biomatters (2009): Geneious Pro: Biomatters. Disponible en línea en [www.geneious.com](http://www.geneious.com).

9. Blaber, Michael, Dr. (1997): Lecture 25 Prokaryotic Expression Vectors. BCH5425 Molecular Biology and Biotechnology. Florida State University. Department of Chemistry, 1997. Disponible en línea en <http://www.mikeblaber.org/oldwine/bch5425/bch5425.htm>, Última comprobación el 12/12/2014.

10. Cantrell, Sally A. (2003): Vectors for the expression of recombinant proteins in *E. coli*. En: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 235, pág. 257–275. DOI: 10.1385/1-59259-409-3:257.

11. Carson, Mike; Johnson, David H.; McDonald, Heather; Brouillette, Christie; Delucas, Lawrence J. (2007): His-tag impact on structure. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 63 (Pt 3), pág. 295–301. DOI: 10.1107/S0907444906052024.

12. Casados-Vázquez, Luz E.; Lara-González, Samuel; Brieba, Luis G. (2011): Crystal structure of the cysteine protease inhibitor 2 from *Entamoeba histolytica*. Functional convergence of a common protein fold. En: *Gene* 471 (1-2), pág. 45–52. DOI: 10.1016/j.gene.2010.10.006.

13. Casali, Nicola (2003): *Escherichia coli* host strains. En: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 235, pág. 27–48. DOI: 10.1385/1-59259-409-3:27.

14. Causey, Jamie (2003): The pET Expression System. Davidson College. Disponible en línea en <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Causey/pET.html>, Última comprobación el 12/12/2014.

15. Chayen, Naomi E.; Saridakis, Emmanuel (2008): Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. En: *Nature methods* 5 (2), pág. 147–153. DOI: 10.1038/nmeth.f.203.

16. Chen, Xiaoying; Zaro, Jennica L.; Shen, Wei-Chiang (2013): Fusion protein linkers. Property, design and functionality. En: *Advanced drug delivery reviews* 65 (10), pág. 1357–1369. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039.
17. Coligan, John E. (1996): Current protocols in protein science. New York: John Wiley and Sons.
18. Copley, R. R.; Bork, P. (2000): Homology among (betaalpha)(8) barrels: implications for the evolution of metabolic pathways. En: *Journal of Molecular Biology* 303 (4), pág. 627–641. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4152.
19. Cudney, R.; Patel, S.; Weisgraber, K.; Newhouse, Y.; McPherson, A. (1994): Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 50 (Pt 4), pág. 414–423. DOI: 10.1107/S09074444994002660.
20. Del Sal, G.; Manfioletti, G.; Schneider, C. (1988): A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. En: *Nucleic acids research* 16 (20), pág. 9878.
21. Edmondson, Andrew C.; Song, Daqing; Alvarez, Luis A.; Wall, Melisa K.; Almond, David; McClellan, David A. y col. (2005): Characterization of a mitochondrially targeted single-stranded DNA-binding protein in *Arabidopsis thaliana*. En: *Molecular genetics and genomics : MGG* 273 (2), pág. 115–122. DOI: 10.1007/s00438-004-1106-5.
22. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. (2010): Features and development of Coot. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66 (Pt 4), pág. 486–501. DOI: 10.1107/S09074444910007493.
23. Estrella Hernández, Priscila (2015): Estudio de las Triosafosfato Isomerasas de *Trichomonas vaginalis* (TvTIMs): El papel de las interacciones intermonoméricas en la estabilidad y función del dímero. Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Gto. Unidad Irapuato.
24. Evans, Philip; McCoy, Airlie (2008): An introduction to molecular replacement. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 64 (Pt 1), pág. 1–10. DOI:

10.1107/S0907444907051554.

25. Farber, Gregory K. (1993): An  $\alpha/\beta$ -barrel full of evolutionary trouble. En: *Current Opinion in Structural Biology* 3 (3), pág. 409–412. DOI: 10.1016/S0959-440X(05)80114-9.
26. Figueroa-Angulo, Elisa E.; Estrella-Hernandez, Priscila; Salgado-Lugo, Holjes; Ochoa-Leyva, Adrian; Gomez Puyou, Armando; Campos, Silvia S. y col. (2012a): Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*. En: *Parasitology* 139 (13), pág. 1729–1738. DOI: 10.1017/S003118201200114X.
27. Figueroa-Angulo, Elisa E.; Rendón-Gandarilla, Francisco J.; Puente-Rivera, Jonathan; Calla-Choque, Jaeson S.; Cárdenas-Guerra, Rosa E.; Ortega-López, Jaime y col. (2012b): The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. En: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14 (15), pág. 1411–1427. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.09.004.
28. Fuentes-Pascacio, Alma Yazmin (2015): EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS ENOLASAS DE *Arabidopsis thaliana*. Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Gto. Unidad Irapuato-Langebio.
29. García-Medel, Paola-Libertad (2016): Clonación, expresión y purificación de OSB1, OSB2, SSB1 y SSB2, 30/09/2016. Comunicado Personal.
30. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Bairoch, A.; Duvaud, S; Wilkins, M.R.; Appel, R.D (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;. En: John M. Walker (ed.): *The proteomics protocols handbook*. Totowa N.J.: Humana Press, pág. 571–607. Disponible en línea en [https://web.expasy.org/docs/expasy\\_tools05.pdf](https://web.expasy.org/docs/expasy_tools05.pdf).
31. Gasteiger, Elisabeth; Gattiker, Alexandre; Hoogland, Christine; Ivanyi, Ivan; Appel, Ron D.; Bairoch, Amos (2003): ExPASy. The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. En: *Nucleic acids research* 31 (13), pág. 3784–3788.
32. GE Healthcare (2012): PreScission Protease. Certificate of Analysis.

33. GenScript: pUC57. Disponible en línea en <https://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/pUC57.pdf>, Última comprobación el Octubre, 2017.
34. Gopal, Gopal Jee; Kumar, Awanish (2013): Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. En: *The protein journal* 32 (6), pág. 419–425. DOI: 10.1007/s10930-013-9502-5.
35. Gräslund, Susanne; Nordlund, Pär; Weigelt, Johan; Hallberg, B. Martin; Bray, James; Gileadi, Opher y col. (2008): Protein production and purification. En: *Nature methods* 5 (2), pág. 135–146. DOI: 10.1038/NMETH.F.202.
36. Harp, Djana F.; Chowdhury, Indrajit (2011): Trichomoniasis: evaluation to execution. En: *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 157 (1), pág. 3–9. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.02.024.
37. Jana, S.; Deb, J. K. (2005): Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. En: *Applied microbiology and biotechnology* 67 (3), pág. 289–298. DOI: 10.1007/s00253-004-1814-0.
38. Jancarik, J.; Kim, S.-H. (1991): Sparse matrix sampling. A screening method for crystallization of proteins. En: *J Appl Cryst* 24 (4), pág. 409–411. DOI: 10.1107/S0021889891004430.
39. Jiménez-Sandoval, Pedro (2016): Clonación, expresión y purificación de EhICP1 wt y sus mutantes CxS y CxA, 30/09/2016. Comunicado Personal.
40. Jonasson, Per; Liljeqvist, Sissela; Nygren, Per-Åke; Ståhl, Stefan (2002): Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. En: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35 (2), pág. 91. DOI: 10.1042/BA20010099.
41. Kapust, R. B.; Waugh, D. S. (1999): *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. En: *Protein science : a publication of the Protein Society* 8 (8), pág. 1668–1674. DOI: 10.1110/ps.8.8.1668.



42. Kelley, Lawrence A.; Mezulis, Stefans; Yates, Christopher M.; Wass, Mark N.; Sternberg, Michael J. E. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. En: *Nature protocols* 10 (6), pág. 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
43. Kobe, Bostjan; Ve, Thomas; Williams, Simon J. (2015): Fusion-protein-assisted protein crystallization. En: *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* 71 (Pt 7), pág. 861–869. DOI: 10.1107/S2053230X15011061.
44. Köster, Tino; Maronedze, Claudius; Meyer, Katja; Staiger, Dorothee (2017): RNA-Binding Proteins Revisited - The Emerging Arabidopsis mRNA Interactome. En: *Trends in plant science* 22 (6), pág. 512–526. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.03.009.
45. Kursula, Inari (2003): Crystallographic studies on the structure-function relationships in triosephosphate isomerase. Oulu: Oulun Yliopisto (Acta Universitatis Ouluensis A, Scientiae rerum naturalium, 400).
46. Lara-Gonzalez, Samuel; Estrella-Hernandez, Priscila; Ochoa-Leyva, Adrian; Del Carmen Portillo-Tellez, Maria; Caro-Gomez, Luis A.; Figueroa-Angulo, Elisa E. y col. (2014): Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication. En: *Proteins* 82 (1), pág. 22–33. DOI: 10.1002/prot.24333.
47. Lattman, Eaton; Loll, Patrick (2008): Protein crystallography. A concise guide. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
48. LaVallie, E. R. (2001): Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. En: *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 5, Unit5.1. DOI: 10.1002/0471140864.ps0501s00.
49. Leibly, David J.; Arbing, Mark A.; Pashkov, Inna; DeVore, Natasha; Waldo, Geoffrey S.; Terwilliger, Thomas C.; Yeates, Todd O. (2015): A Suite of Engineered GFP Molecules for Oligomeric Scaffolding. En: *Structure* 23 (9), pág. 1754–1768. DOI: 10.1016/j.str.2015.07.008.
50. Lewis, David A. (2010): Trichomoniasis. En: *Medicine* 38 (6), pág. 291–293. DOI: 10.1016/j.mpmed.2010.03.007.

51. Madden, T. L.; Tatusov, R. L.; Zhang, J. (1996): Applications of network BLAST server. En: *Methods in enzymology* 266, pág. 131–141.
52. McMurry, John; Begley, Tadhg P. (2005): The organic chemistry of biological pathways. Englewood Colo.: Roberts and Co. Publishers.
53. Medécigo Micete, Agustina Consuelo; Arrieta Pérez, Raúl Tomás; Cabrera Martínez, Laura Elena; Machorro Morales, José Antonio; Rios Castillo, Brendha; Valádez Toscano, Francisco Javier; Trejo Solórzano, Oscar (2009): Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y Tratamiento de la Vaginitis Infecciosa en Mujeres en Edad Reproductiva, en el Primer Nivel de Atención. Evidencias y Recomendaciones. Catalogo Maestro de Guías de Práctica Clínica IMSS-081-08. Disponible en línea en [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/081\\_GPC\\_Vaginitisin fec1NA/Vaginitis\\_ER\\_CENETEC.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/081_GPC_Vaginitisin fec1NA/Vaginitis_ER_CENETEC.pdf), Última comprobación el 13/11/2013.
54. Miranda-Ozuna, Jesus F. T.; Hernandez-Garcia, Mar S.; Briebe, Luis G.; Benitez-Cardoza, Claudia G.; Ortega-Lopez, Jaime; Gonzalez-Robles, Arturo; Arroyo, Rossana (2016): The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose that Functions as a Laminin- and Fibronectin-Binding Protein. En: *Infection and immunity*. DOI: 10.1128/IAI.00538-16.
55. Moon, Andrea F.; Mueller, Geoffrey A.; Zhong, Xuejun; Pedersen, Lars C. (2010): A synergistic approach to protein crystallization: combination of a fixed-arm carrier with surface entropy reduction. En: *Protein science : a publication of the Protein Society* 19 (5), pág. 901–913. DOI: 10.1002/pro.368.
56. Nagano, Nozomi; Orengo, Christine A.; Thornton, Janet M. (2002): One Fold with Many Functions. The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on their Sequences, Structures and Functions. En: *Journal of Molecular Biology* 321 (5), pág. 741–765. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00649-6.
57. New England BioLabs (2013): Optimizing Restriction Endonucleasa Reactions. New England BioLabs. Disponible en línea en <https://www.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease->

reactions.

58. New England BioLabs (2014): Molecular Cloning. Technical Guide. Disponible en línea en [https://www.neb.com/~media/NebUs/Files/Brochures/Cloning\\_Guide\\_1113.pdf](https://www.neb.com/~media/NebUs/Files/Brochures/Cloning_Guide_1113.pdf).

59. Nicholl, Desmond S. T (2008): An introduction to genetic engineering. 3rd ed. Cambridge, New York: Cambridge University Press.

60. Niedzialkowska, Ewa; Gasiórowska, Olga; Handing, Katarzyna B.; Majorek, Karolina A.; Porebski, Przemyslaw J.; Shabalin, Ivan G. y col. (2016): Protein purification and crystallization artifacts. The tale usually not told. En: *Protein science : a publication of the Protein Society* 25 (3), pág. 720–733. DOI: 10.1002/pro.2861.

61. Nievas, Yesica R.; Coceres, Veronica M.; Midlej, Victor; Souza, Wanderley de; Benchimol, Marlene; Pereira-Neves, Antonio y col. (2017): Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*. Characterization and their association with cell interaction. En: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. DOI: 10.1007/s00018-017-2726-3.

62. Novagen (N/A): pET System. Mirror (partial) of Novagen, Inc. web page. The entire page was obtained at <http://www.novagen.com/petfram.html>. California State University Northridge. Disponible en línea en <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec4a/petsys.html#table>, Última comprobación el 14/12/2014.

63. Novagen: pET-28a-c(+) Vectors. TB074 12/98. Disponible en línea en <http://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET28.pdf>, Última comprobación el Octubre, 2017.

64. Novagen (1998a): pET19b. TB049 12/98. Disponible en línea en [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-19b\\_map.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-19b_map.pdf).

65. Novagen (1998b): pET-28a-c(+) Vectors. TB074 12/98. Disponible en línea en <http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-28-map.pdf>.

66. Novagen (2011): pET System Manual. User Protocol TB055 Rev. C 0611JN. 11 ed. Merck Biosciences.

67. Patick, A. K.; Binford, S. L.; Brothers, M. A.; Jackson, R. L.; Ford, C. E.; Diem, M. D. y col. (1999): In vitro antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease. En: *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 43 (10), pág. 2444–2450.
68. Qing, Guoliang; Ma, Li-Chung; Khorchid, Ahmad; Swapna, G V T; Mal, Tapas K.; Takayama, Masanori Mita y col. (2004): Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. En: *Nat Biotechnol* 22 (7), pág. 877–882. DOI: 10.1038/nbt984.
69. Quan, Juan-Hua; Kang, Byung-Hun; Cha, Guang-Ho; Zhou, Wei; Koh, Young-Bok; Yang, Jung-Bo y col. (2014): *Trichomonas vaginalis* Metalloproteinase Induces Apoptosis of SiHa Cells through Disrupting the Mcl-1/Bim and Bcl-xL/Bim Complexes. En: *PLoS one* 9 (10), e110659. DOI: 10.1371/journal.pone.0110659.
70. Read, R.J. (2010): Protein Crystallography Course. The phase problem: introduction to phasing methods. University of Cambridge. Disponible en línea en [http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic\\_phasing/Phasing.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic_phasing/Phasing.html), Última actualización el 22/02/2010, Última comprobación el 15/12/2017.
71. Rédei, George P. (ed.) (2008): Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics. Dordrecht: Springer Netherlands.
72. Riekenberg, S.; Witjes, B.; Šarić, M.; Bruchhaus, I.; Scholze, H. (2005): Identification of EhICP1, a chagasin-like cysteine protease inhibitor of *Entamoeba histolytica*. En: *FEBS Letters* 579. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.067.
73. Rupp, Bernhard (2010): Biomolecular crystallography. Principles, practice, and application to structural biology. New York: Garland Science.
74. Salgado Lugo, Holjes (2011): *Trichomonas vaginalis* CONTIENE DOS MARCOS DE LECTURA ABIERTOS FUNCIONALES PARA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA: UN ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL. Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Gto. Unidad Irapuato.
75. Sambrook, Joseph; Russell, David W. (2001): Molecular cloning. A laboratory

manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

76. Sato, Dan; Nakada-Tsukui, Kumiko; Okada, Mami; Nozaki, Tomoyoshi (2006): Two cysteine protease inhibitors, EhICP1 and 2, localized in distinct compartments, negatively regulate secretion in *Entamoeba histolytica*. En: *FEBS Letters* 580 (22), pág. 5306–5312. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.08.081.

77. Schrödinger, L. L.C. (2015): The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.

78. Shilova, Anastasiia (2016): Development of serial protein crystallography with synchrotron radiation. Tesis. Université Grenoble Alpes, Francia. Disponible en línea en <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01499403/document>.

79. Sørensen, Hans Peter; Mortensen, Kim Kusk (2005): Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. En: *Journal of biotechnology* 115 (2), pág. 113–128. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

80. Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. En: *Journal of Molecular Biology* 189 (1), pág. 113–130.

81. Stura, Enrico A.; Taussig, Michael J.; Sutton, Brian J.; Duquerroy, Stéphane; Bressanelli, Stéphane; Minson, Anthony C.; Rey, Felix A. (2002): Scaffolds for protein crystallisation. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 58 (10), pág. 1715–1721. DOI: 10.1107/S0907444902012829.

82. Takara: Chaperone Plasmid Set. Cat. # 3340. Takara Bio Inc. Disponible en línea en [http://www.ibt.unam.mx/computo/cepas/manual\\_Chaperone\\_plasmid\\_set.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/cepas/manual_Chaperone_plasmid_set.pdf).

83. ThermoScientific (2014): GeneJET Plasmid Miniprep Kit. #K0502, #K0503. Disponible en línea en <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0503>, Última comprobación el Noviembre, 2017.

84. Vázquez-Contreras, Edgar (2003): Cristalografía de rayos X. Instituto de Química, UNAM. Disponible en línea en <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/cristalografia%20de%20rayos%20x.html>,

Última actualización el 20/09/2003, Última comprobación el 15/12/2017.

85. Walker, Philip A.; Leong, Louis E.-C.; Ng, Patrick W. P.; Tan, Shyh Han; Waller, Sarah; Murphy, David; Porter, Alan G. (1994): Efficient and Rapid Affinity Purification of Proteins Using Recombinant Fusion Proteases. En: *Nature biotechnology* 12 (6), pág. 601–605. DOI: 10.1038/nbt0694-601.
86. Waugh, David S. (2011): An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. En: *Protein expression and purification* 80 (2), pág. 283–293. DOI: 10.1016/j.pep.2011.08.005.
87. Waugh, David S. (2016): Crystal structures of MBP fusion proteins. En: *Protein science : a publication of the Protein Society* 25 (3), pág. 559–571. DOI: 10.1002/pro.2863.
88. Whitford, David (2005): Proteins. Structure and function. Hoboken NJ: J. Wiley & Sons.
89. Wierenga, R. K.; Kapetaniou, E. G.; Venkatesan, R. (2010): Triosephosphate isomerase. A highly evolved biocatalyst. En: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (23), pág. 3961–3982. DOI: 10.1007/s00018-010-0473-9.
90. Winn, Martyn D.; Ballard, Charles C.; Cowtan, Kevin D.; Dodson, Eleanor J.; Emsley, Paul; Evans, Phil R. y col. (2011): Overview of the CCP4 suite and current developments. En: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67 (Pt 4), pág. 235–242. DOI: 10.1107/S0907444910045749.
91. Wlodawer, Alexander; Minor, Wladek; Dauter, Zbigniew; Jaskolski, Mariusz (2008): Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. En: *The FEBS journal* 275 (1), pág. 1–21. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x.
92. Yeates, Todd O.; Kent, Stephen B. H. (2012): Racemic protein crystallography. En: *Annual review of biophysics* 41, pág. 41–61. DOI: 10.1146/annurev-biophys-050511-102333.

93. Zaegel, Vincent; Guermann, Benoît; Le Ret, Monique; Andrés, Charles; Meyer, Denise; Erhardt, Mathieu y col. (2006): The plant-specific ssDNA binding protein OSB1 is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in Arabidopsis. En: *The Plant cell* 18 (12), pág. 3548–3563. DOI: 10.1105/tpc.106.042028.
94. Zhang, Z.; Sugio, S.; Komives, E. A.; Liu, K. D.; Knowles, J. R.; Petsko, G. A.; Ringe, D. (1994): Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution. En: *Biochemistry* 33 (10), pág. 2830–2837. DOI: 10.2210/pdb1tph/pdb.
95. Zolotoyabko, Emil (2014): Basic Concepts of X-Ray Diffraction: Wiley-VCH.





## 8.1.2 Secuencia proteica de los andamios

### TvTIM1\_andamio\_flexible

**MGHHHHHHHHHH**SSGHI DDDDKHTS **LEVLFQGP**HMRTFFVGGNWKANPKT  
VEEAEKLIEMLN GAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQQKLRKDWK VSAENVF  
TKPNGAFTGEVTVPMIKSFGIEWTILGHSERRDILKEDDEF LAAKAKFAL  
ENGMKIIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQIEKMI PAIPAGKWDDVVIAYE  
PIWAIGTGKVASTQDAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVRILYGGSVKPN  
NCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHSGSAGSAAGSGGSHM  
**EFELRRQACGRGSTRAPPPPPLRSGC**

HisTag

PreScission Site

Residuo PPS

Linker

MultipleCloningSite

TvTIM(Ile45)

### TvTIM1\_andamio\_rigido

**MGHHHHHHHHHH**SSGHI DDDDKHTS **LEVLFQGP**HMRTFFVGGNWKANPKT  
VEEAEKLIEMLN GAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQQKLRKDWK VSAENVF  
TKPNGAFTGEVTVPMIKSFGIEWTILGHSERRDILKEDDEF LAAKAKFAL  
ENGMKIIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQIEKMI PAIPAGKWDDVVIAYE  
PIWAIGTGKVASTQDAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVRILYGGSVKPN  
NCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHSGTVDAALAAAQTNAH  
**MEFELRRQACGRGSTRAPPPPPLRSGC**

## 8.1.3 Secuencia proteica de fusiones

### 8.1.3.1 Inhibidor de Cisteína Proteinasa 1 (*EhICP1*)

#### TvTIM1\_andamio\_flexible-EhICP1wt

**MGHHHHHHHHHH**SSGHIDDDDKHTS**LEVLFOGP**HMRTFFVGGNWKANPKTVEEAEKLIEM  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQQLRKDWKVS AENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEF LAAKAKFALENGMKIIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGK VASTQDAQEMCKVIRDILA AKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNE LAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVH SK**GSAGSAAGSGGSHM**  
**SLTEDNNNTTITIAKGENKEIILHGNPTTGYSWVVDSC**EGLSNTVEYVADQHAPGIC**CGC**  
**GKYHIKITGTQTGEGKIVLVYRRPWAPNANDRTFTLKVNVQ**

HisTag  
PreScission Site  
Residuo PPS  
Linker  
EhICP1wt  
TvTIM(Ile45)  
Cisteinas mutadas

#### TvTIM1\_andamio\_rigido-EhICP1wt

**MGHHHHHHHHHH**SSGHIDDDDKHTS**LEVLFOGP**HMRTFFVGGNWKANPKTVEEAEKLIEM  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQQLRKDWKVS AENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEF LAAKAKFALENGMKIIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGK VASTQDAQEMCKVIRDILA AKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNE LAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVH SKTVDAALAAAQTNAH  
**MSLTEDNNNTTITIAKGENKEIILHGNPTTGYSWVVDSC**EGLSNTVEYVADQHAPGIC**CGC**  
**GKYHIKITGTQTGEGKIVLVYRRPWAPNANDRTFTLKVNVQ**

### 8.1.3.2 Proteína Mitocondrial de Unión a Cadena Sencilla (SSB1)

#### TvTIM\_andamio\_flexible\_SSB1

**MGHHHHHHHHH**SSGHIDDDDKHTS**LEVLFGQP**HMRTFFVGGNWKANPKTVEEAekliem  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFI FLPTLQQLRKDWKvsaENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEFLAAKAKFALENGMKIIYCCGEHLsEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGKvASTQDAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHsk**GSAGSAAGSGGSHM**  
**KSWFSTGPIDEGVEEDFEENVTERPELQPHGVDPRKGWGRGVHRAICGKVGQAPLQKI**  
**LRNGRTVTIFTVGTGGMFDQRLVGATNQPQPAQWHRIAVHNEVLGSYAVQKLAKNSSVYV**  
**EGDIETRVYNDSSISSEVKSIPeICVRRDGKIRMIKYGESISKISFDELKEGLIGSTRAPP**  
**PPLRSGC**

HisTag  
PreScission Site  
**Residuo PPS**  
Linker  
SSB1  
TvTIM(Ile45)

#### TvTIM\_andamio\_rigido\_SSB1

**MGHHHHHHHHH**SSGHIDDDDKHTS**LEVLFGQP**HMRTFFVGGNWKANPKTVEEAekliem  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFI FLPTLQQLRKDWKvsaENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEFLAAKAKFALENGMKIIYCCGEHLsEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGKvASTQDAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHsk**TVDAALAAAQTNAH**  
**MKSWFSTGPIDEGVEEDFEENVTERPELQPHGVDPRKGWGRGVHRAICGKVGQAPLQK**  
**ILRNGRTVTIFTVGTGGMFDQRLVGATNQPQPAQWHRIAVHNEVLGSYAVQKLAKNSSVY**  
**VEGDIETRVYNDSSISSEVKSIPeICVRRDGKIRMIKYGESISKISFDELKEGLIGSTRAP**  
**PPPPLRSGC**

### 8.1.3.3 Proteína Organelar de Unión a Cadena Sencilla (OSB1)

#### TvTIM\_andamio\_flexible\_OS1

MGHHHHHHHHHSSGHI DDDDKHTS **LEVL FQGP** HMRTFFVGGNWKANPKTV EEAekliEM  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFI FLPTLQQLRKDWK VSAENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEFLAAKAKFALENGMKII YCCGEHLSEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGK VASTQDAQEMCKVIRDILA AKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHSK **GSAGSAAGSGGSHM**  
**YHHARLFKKPLSTKLKFNLVNSVSLMGFVDRSIQVMNTGPDRFGVFTILRVKDPLNPNRS**  
**FRISLRMWDAMARTCIAHLKLNHDHILVSGRLESYSKSSSDVYSGLNLDYQVKVAEVNYVA**  
**APP SHVLD SQISKNP KTKTEDDIEESKDEIYLWQVFFSNPYDWDNRNKKKNPKQPDFK**  
**HKDTGEALWLCSDLPDWITRRLELFDQKNRFYDEEKTRRDRLSDYIGSTRAPPPPLRSGC**

HisTag  
PreScission Site  
Residuo PPS  
Linker  
OS1  
TvTIM(Ile45)

#### TvTIM\_andamio\_rigido\_OS1

MGHHHHHHHHHSSGHI DDDDKHTS **LEVL FQGP** HMRTFFVGGNWKANPKTV EEAekliEM  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFI FLPTLQQLRKDWK VSAENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEFLAAKAKFALENGMKII YCCGEHLSEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIGTGK VASTQDAQEMCKVIRDILA AKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHSK **TVDAALAAQ TNAH**  
**MYHHARLFKKPLSTKLKFNLVNSVSLMGFVDRSIQVMNTGPDRFGVFTILRVKDPLNPNR**  
**SFRISLRMWDAMARTCIAHLKLNHDHILVSGRLESYSKSSSDVYSGLNLDYQVKVAEVNYV**  
**AAPP SHVLD SQISKNP KTKTEDDIEESKDEIYLWQVFFSNPYDWDNRNKKKNPKQPDF**  
**KHKDTGEALWLCSDLPDWITRRLELFDQKNRFYDEEKTRRDRLSDYIGSTRAPPPPLRS**  
**GC**

### 8.1.3.4 Enolasa 1 (Eno1)

#### TvTIM\_andamio\_flexible\_Eno1

**MGHHHHHHHHHH**SSGHIDDDDKHTS**LEVLFGQP**HMRTFFVGGNWKANPKTVEEAEKLIEM  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQOKLRKDWKVAENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEFLLAAKAKFALENGMKIIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIIGTGKVA STQDAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHSK**GSAGSAAGSGGSHM**  
**ALTTPHHLQRSFLSPSRVSGERYLESAPSCLRFRRSGVQCSVVAKECRVKGVKARQIID**  
**SRGNPTVEVDLITDDLYRSVPSGASTGIYEALERDGDKSVYGGKGVLOAIKNINELVA**  
**PKLIGVDVRNQADVDALMLELDGTPNKSCLGANAILGVSLSVCRAGAGAKGVPLYKHIQE**  
**TSGTKELVMPVPAFNVIINGGSHAGNSLAMQEFMILPVGATSFSEAFQMGSEVYHTLKGII**  
**KTKYGQDACNVGDEGGFAPNVQDNREGLVLLIDAIEKAGYTGKIKIGMDVAASEFFMKDG**  
**RYDLNFKKQPNDBGAHVLSAESLADLYREFIKDFPIVSIEDPFDQDDWSSWASLQSSVDIQ**  
**LVGDDLLVTNPKRIAEAIKKQSCNALLLKVNQIGTVTESIQAAALDSKAAGWGMVSHRSG**  
**ETEDNFIADLSVGLASGQIKTGAPCRSERLSKYNQLLRIEEELGNVRYAGEAFRSPGSTR**  
**APPPPLRSGC**

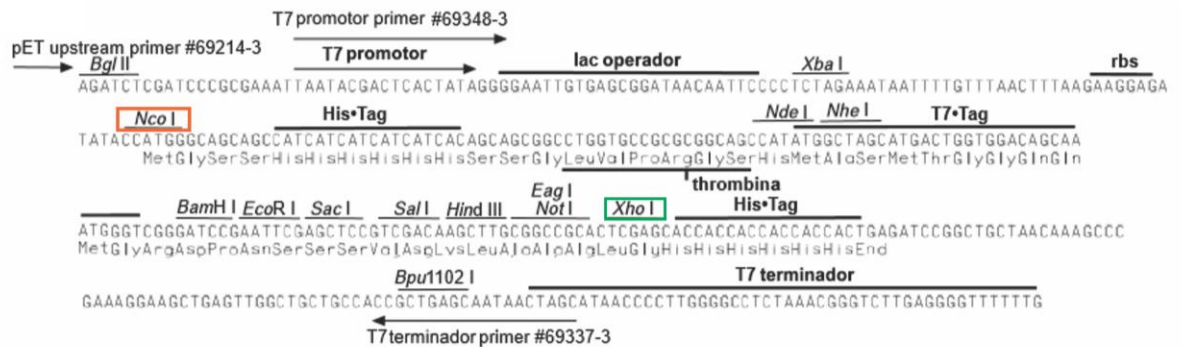
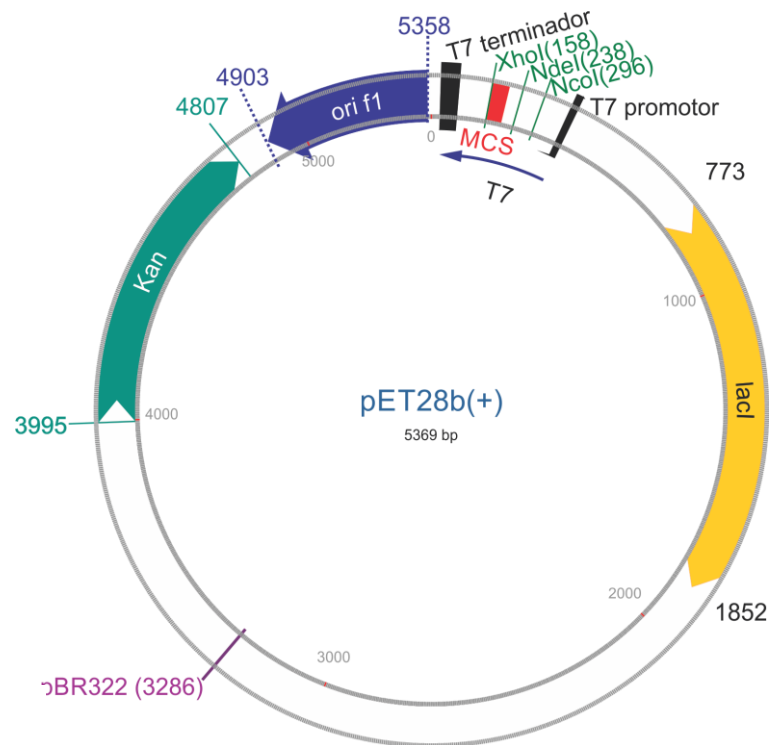
HisTag  
PreScission Site  
Residuo PPS  
Linker  
Eno1  
TvTIM(Ile45)

#### TvTIM\_andamio\_rigido\_Eno1

**MGHHHHHHHHHH**SSGHIDDDDKHTS**LEVLFGQP**HMRTFFVGGNWKANPKTVEEAEKLIEM  
LNGAKVEGNVEVVVAAPFIFLPTLQOKLRKDWKVAENVFTKPNGAFTGEVTVPMIKSFG  
IEWTILGHSERRDILKEDDEFLLAAKAKFALENGMKIIYCCGEHLSEREAGKASEFVSAQI  
EKMI PAIPAGKWDDVVIAYEPIWAIIGTGKVA STQDAQEMCKVIRDILAAKVGADIANKVR  
ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLVGGASLEPGFINIVNSNVHSK**TVDAALAAAQTNAH**  
**MALTTKPHHLQRSFLSPSRVSGERYLESAPSCLRFRRSGVQCSVVAKECRVKGVKARQII**  
**DSRGNPTVEVDLITDDLYRSVPSGASTGIYEALERDGDKSVYGGKGVLOAIKNINELV**  
**APKLIIGVDVRNQADVDALMLELDGTPNKSCLGANAILGVSLSVCRAGAGAKGVPLYKHIQ**  
**ETSGTKELVMPVPAFNVIINGGSHAGNSLAMQEFMILPVGATSFSEAFQMGSEVYHTLKGII**  
**IKTKYGQDACNVGDEGGFAPNVQDNREGLVLLIDAIEKAGYTGKIKIGMDVAASEFFMKD**  
**GRYDLNFKKQPNDBGAHVLSAESLADLYREFIKDFPIVSIEDPFDQDDWSSWASLQSSVDI**  
**QLVGDDLLVTNPKRIAEAIKKQSCNALLLKVNQIGTVTESIQAAALDSKAAGWGMVSHRS**  
**GETEDNFIADLSVGLASGQIKTGAPCRSERLSKYNQLLRIEEELGNVRYAGEAFRSPGST**  
**RAPPPPLRSGC**

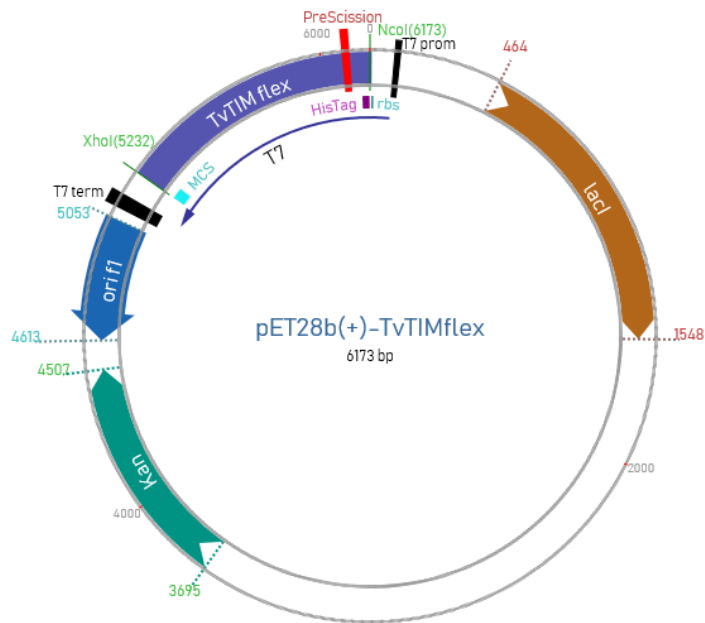
## 8.2 Plásmidos utilizados

### 8.2.1 Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pET28b(+)

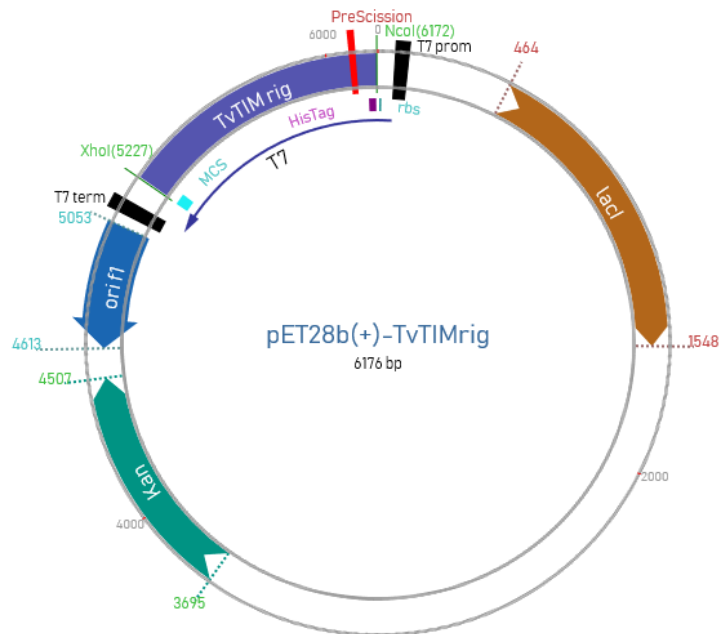


pET-28b(+) region expresión/clonación

## 8.2.2 Mapa del vector pET28b (+)-TvTIMflexible

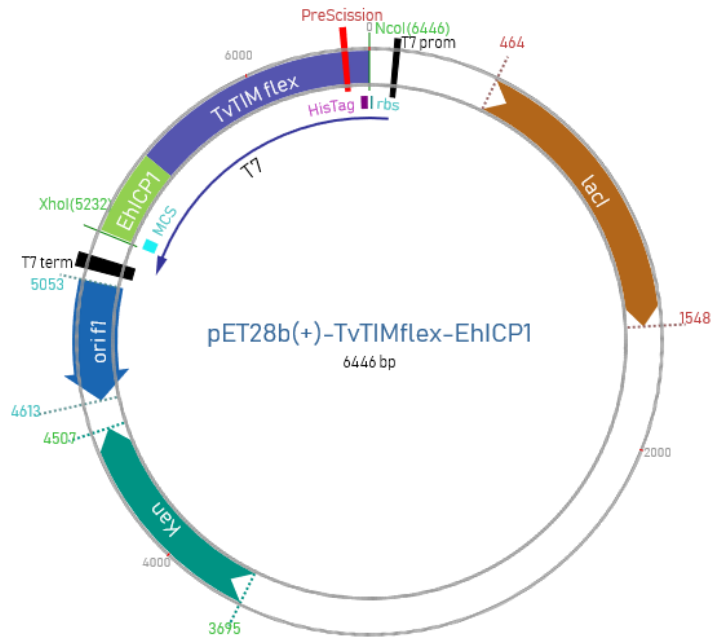


## 8.2.3 Mapa del vector pET28b (+)-TvTIMrigido

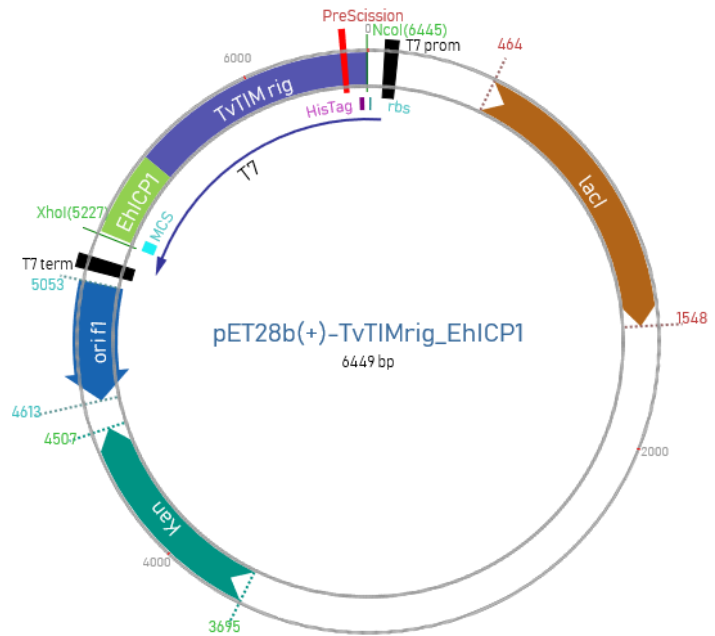




### 8.2.4 Mapa de plásmido pET28b (+)-TvTIMflexible-EhICP1

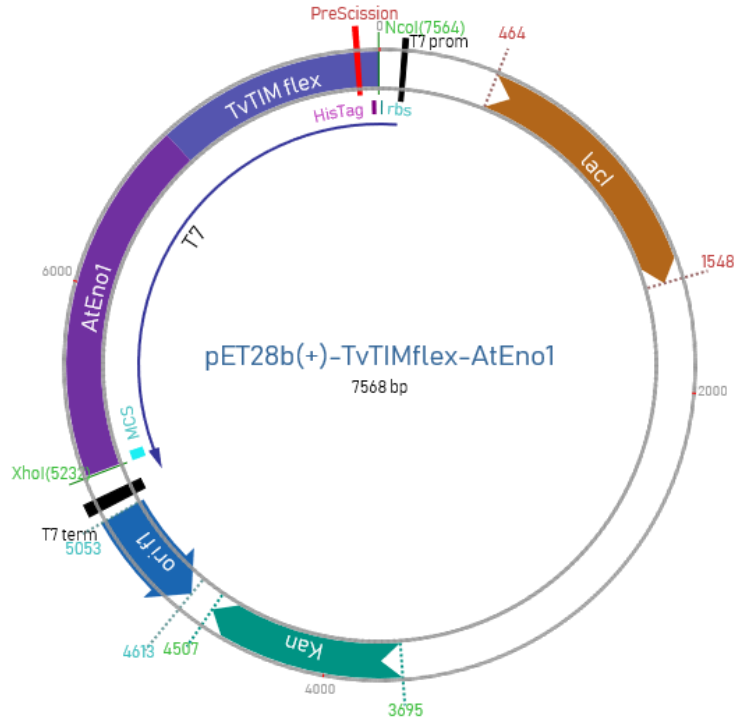


### 8.2.5 Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-EhICP1

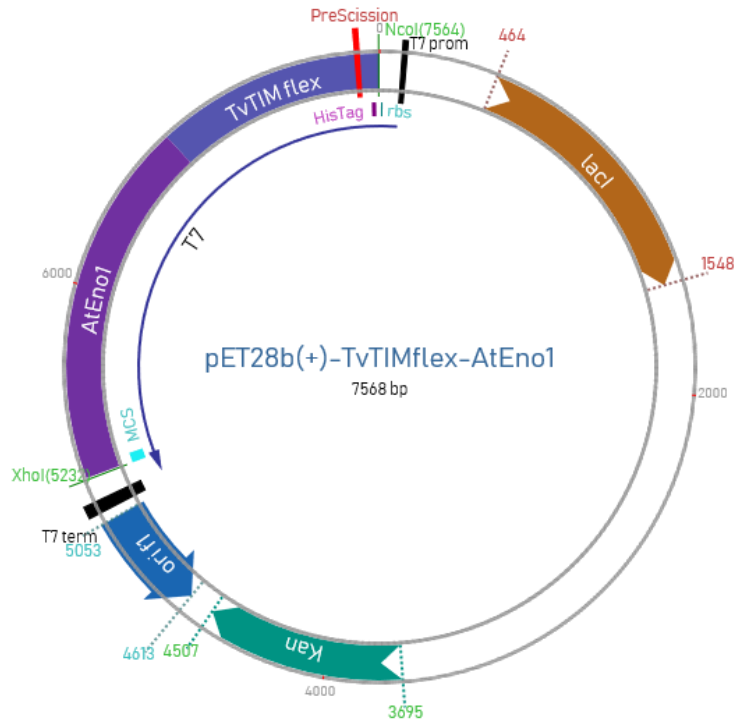




### 8.2.6 Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMflex-AtEno1

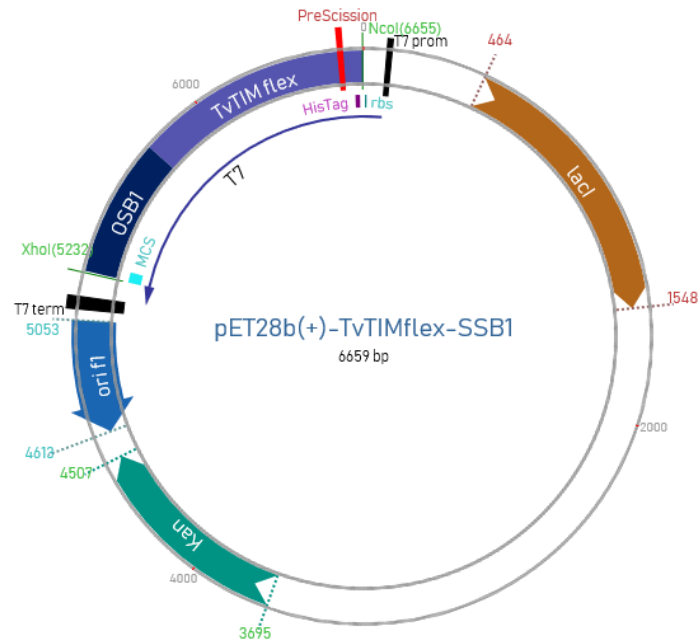


### 8.2.7 Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-AtEno1

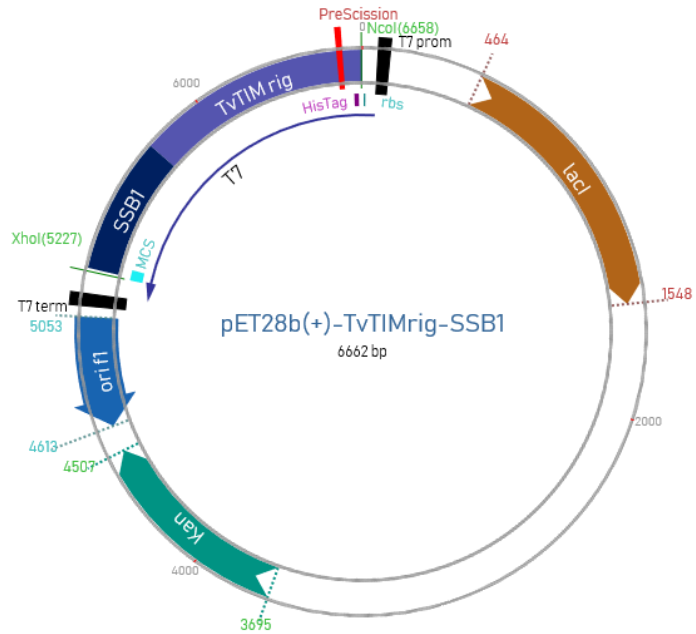




### 8.2.10 Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMflexible-SSB1



### 8.2.11 Mapa del plásmido pET28b (+)-TvTIMrigido-SSB1



### 8.3 Datos de difracción de TvTIM (Salgado Lugo, 2011)

Parámetros	TvTIM1
Fuente Rayos-X	Langebjo
Temperatura de colección (°K)	100
Rango de resolución (Å)	38.03-2.15
Grupo espacial	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Longitud celda unitaria a, b, c (Å)	46.8, 55.77, 104.0
Ángulos celda unitaria $\alpha=\beta=\gamma$ (°)	90, 90, 90

Parámetros	TvTIM2
Fuente Rayos-X	Langebjo
Temperatura de colección (°K)	100
Rango de resolución (Å)	24.8-1.75
Grupo espacial	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Longitud celda unitaria a, b, c (Å)	46.8, 56.2, 105.4
Ángulos celda unitaria $\alpha=\beta=\gamma$ (°)	90, 90, 90