

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

**UNIDAD IRAPUATO  
UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA**

Enfoque bioquímico-estructural para entender el reemplazo de la  
triosafosfato isomerasa de cloroplasto en plantas: el efecto de los  
agentes oxido-reductores en la actividad enzimática.

**Tesis que presenta:**

M.C. Eduardo Castro Torres

**para obtener el grado de:**

Doctor en Ciencias en Biología Integrativa

**Director de tesis:** Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Irapuato, Guanajuato.

Agosto de 2020

## Índice general

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas .....	4
Índice de figuras .....	5
Índice de tablas .....	6
Resumen .....	7
Abstract .....	8
Introducción.....	9
Marco teórico.....	11
Capítulo I.....	19
Introducción .....	19
Hipótesis .....	21
Objetivos.....	21
Objetivo general .....	21
Objetivo específico .....	21
Materiales y métodos.....	22
Resultados.....	29
SyTPI es resistente a agentes oxidantes y tiol-conjugantes .....	29
Estructura cristalográfica de SyTPI .....	35
Accesibilidad y reactividad de las cisteínas .....	39
Las mutaciones en SyTPI reducen la actividad catalítica .....	42
Identificación de tioles accesibles y reactivos .....	45
Discusión .....	49
Capítulo II.....	54
Introducción .....	54
Hipótesis .....	58
Objetivos.....	59
Objetivo general .....	59
Objetivos específicos .....	59
Materiales y métodos.....	60
Resultados.....	62
Reactividad de los residuos Cys13 y Cys218 .....	62
Incubación con GSSG propicia monómeros inactivos.....	66
Mutagénesis puede emular modificaciones redox.....	68
Fundamento estructural de la formación de monómeros inactivos ..	77
Las modificaciones en AtcTPI afectan la catálisis .....	80
Mecanismo doble de regulación redox en AtcTPI .....	83
Conclusión.....	89
Anexos .....	92
Bibliografía .....	93

## **Agradecimientos**

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca número 434534, otorgada para la realización de mis estudios de doctorado en ciencias en la especialidad de biología integrativa en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad de genómica avanzada. En el periodo comprendido entre marzo de 2016 y febrero de 2020.

Agradezco el financiamiento de este trabajo por el proyecto fronteras de la ciencia 11: “Proteínas con nuevos mecanismos de ensamblaje: Ingeniería de proteínas, métodos de selección, diseño de fármacos”

Agradezco a la I. A. Corina Elizabeth Díaz Quezada, auxiliar del laboratorio de bioquímica estructural, por su asistencia y apoyo durante el desarrollo de este proyecto de doctorado.

Agradezco al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro por haberme dado un voto de confianza y con ello brindarme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, así como la asesoría y apoyo brindados en mi formación académica.

Agradezco a mi comité evaluador por todo el trabajo que hicieron para apoyarme y guiarme en cada reunión tutorial.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por permitirme terminar un proyecto más en la vida y sobre todo por compartirlo con las personas a las que más amo.

Agradezco a Lucy mi compañera de vida y a nuestros nenes, Renatita y Eduardín por su paciencia y apoyo en cada una de las etapas de este proyecto.

Agradezco a mis papás y hermanas por todo el respaldo y empatía durante estos cuatros años.

Agradezco a mis compañeros de generación por darme la mano para no quedarme atrás.

Agradezco a mis compañeros del Lab. 4 de las diferentes generaciones y etapas, de todos aprendí muchas cosas tanto académicas como humanas.

## Abreviaturas

TPI	Triosafosfato isomerasa (Triosephosphate isomerase)
SyTPI	Triosafosfato isomerasa de <i>Synechocystis</i>
AtcTPI	Triosafosfato isomerasa de citosol de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtpdTPI	Triosafosfato isomerasa de cloroplasto de <i>Arabidopsis thaliana</i>
( $\beta$ - $\alpha$ ) <sub>8</sub>	8 láminas $\beta$ -plegadas y 8 $\alpha$ -hélices
DA	Diamida
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
GSSG	Glutación oxidado
MMS	Metil metanotiosulfonato
AtcTPI	Triosafosfato isomerasa de citosol de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtpdTPI	Triosafosfato isomerasa de cloroplasto de <i>Arabidopsis</i>
Cys	Cisteína
Met	Metionina
Ala	Alanina
Phe	Fenilalanina
Asp	Ácido aspártico
Lys	Lisina
Tyr	Tirosina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
G3P	Gliceraldehído 3 fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
Glu	Ácido glutámico
His	Histidina
Asn	Asparagina
2-PGA	Ácido 2-fosfoglicerico
NADH	Nicotinamidad adenina dinucleótido
NTCB	Ácido 2-nitro 5-tiocianato benzoico
SASA	Área superficial accesible a solvente, solvent accesible surface area

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Origen endosimbiótico del cloroplasto .....	11
<b>Figura 2.</b> Migración de material genético desde el protoplasto.....	12
<b>Figura 3.</b> Rutas de flujo genético huésped-endosimbionte .....	14
<b>Figura 4.</b> Reacción de isomerización del G3P y la DHAP .....	16
<b>Figura 5.</b> Complementación <i>in vivo</i> de TPI en levadura .....	16
<b>Figura 6.</b> Efecto de agentes oxidantes sobre la actividad catalítica .....	17
<b>Figura 7.</b> Alineamiento múltiple de secuencias de TPI.....	30
<b>Figura 8.</b> Gel SDS-page del proceso de purificación de SyTPI .....	31
<b>Figura 9.</b> Cinética en tiempo real de la actividad de SyTPI, AtcTPI y AtpdTPI .....	34
<b>Figura 10.</b> Cristales de SyTPI.....	35
<b>Figura 11.</b> Estructura cuaternaria de SyTPI.....	38
<b>Figura 12.</b> Estructura cristalográfica de SyTPI mostrando sus cisteínas.....	39
<b>Figura 13.</b> Complementación <i>in vivo</i> de SyTPI en <i>E. coli</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Identificación bioquímica de las cisteínas expuestas de SyTPI .....	47
<b>Figura 15.</b> Fundamento estructural de la resistencia a agentes redox de SyTPI..	52
<b>Figura 16.</b> Análisis estructural de AtcTPI y su inactivación por agentes redox.....	64
<b>Figura 17.</b> Mimetización de la oxidación de cisteínas .....	70
<b>Figura 18.</b> Perfiles de elusión de AtcTPI .....	76
<b>Figura 19.</b> Consecuencias estructurales de la oxidación de AtcTPI-cys13 .....	78
<b>Figura 20.</b> Consecuencias estructurales de la oxidación de AtcTPI-Cys218.....	84
<b>Figura 21.</b> El residuo AtcTPI-Cys218 es un blanco de regulación conservado ....	87
<b>Figura 22.</b> Modelo de regulación de AtcTPI mediado por la oxidación.....	88

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Reducción del genoma del cloroplasto .....	12
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de nucleótidos de los oligómeros de Q5 .....	25
<b>Tabla 3.</b> Parámetros catalíticos de SyTPI.....	32
<b>Tabla 4.</b> Área superficial expuesta al solvente.....	41
<b>Tabla 5.</b> Tioles accesibles en SyTPI Wt y mutantes, determinados por DTNB.....	42
<b>Tabla 6.</b> Parámetros termodinámicos de desplegamiento de SyTPI .....	45
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos para la mutagénesis de Cys13 y Cys218 .....	60
<b>Tabla 8.</b> Parámetros catalíticos de AtcTPI.....	67
<b>Tabla 9.</b> Temperaturas de fusión y constantes de disociación aparente .....	74
<b>Tabla A1.</b> Códigos de acceso de secuencias de TPI.....	92

## Resumen

En plantas, la triosafosfato isomerasa (TPI) ancestral de cianobacteria fue remplazada por una versión duplicada de la TPI citosólica. Esta isoforma adquirió una señal de exportación a cloroplasto en donde participa en el ciclo de Calvin-Benson. Para tener un mejor entendimiento acerca del reemplazo de este gen en plantas, se caracterizó la TPI de la bacteria fotosintética *Synechocystis* (SyTPI) como modelo más cercano a la TPI reemplazada, también se estudió la TPI de citosol de *Arabidopsis thaliana*, una TPI de plantas contemporánea de la cual surgió la duplicación. SyTPI presenta un perfil de cinética enzimática típico de las TPIs y un ensamblaje dímérico compuesto por dos subunidades acomodadas en un plegamiento  $(\beta-\alpha)_8$ . Se encontró que los agentes oxidantes como diamida (DA) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), así como los agentes tiol-conjugantes como el glutatión oxidado (GSSG) y el metil metanotiosulfonato (MMTS), no inhiben la actividad catalítica de SyTPI a las concentraciones que inhiben la actividad de las TPIs citosólica y cloroplastídica de *Arabidopsis thaliana* (AtcTPI y AtpdTPI). La estructura cristalográfica de SyTPI reveló que cada monómero contiene tres cisteínas, Cys47, Cys127 y Cys176; Sin embargo, solo el grupo tiol de Cys176 se encuentra expuesto a solvente. Mientras que, AtcTPI y AtpdTPI son redox-regulados por modificaciones químicas de sus cisteínas reactivas y expuestas, los resultados muestran que SyTPI-Cys176 no es sensible a modificaciones redox *in vitro*. Los datos obtenidos permiten postular que SyTPI fue reemplazada por una TPI eucarionte debido a que la versión duplicada contenía cisteínas redox-sensitivas que pueden ser objeto de modificaciones postraduccionales, requeridas para la modulación de la actividad enzimática de la TPI. Dicha hipótesis se refuerza con el estudio de AtcTPI la cual es blanco de regulación redox en dos de sus cisteínas, las cuales funcionan como interruptores. Una segunda etapa de este proyecto de doctorado consistió en investigar el papel de estos residuos, AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218, mediante su sustitución con ácido aspártico para emular la oxidación irreversible de las cisteínas (ácido sulfínico) y con aminoácidos que mimetizan las reacciones tiol-conjugantes. Los estudios cristalográficos mostraron que la mimetización de la oxidación del residuo AtcTPI-Cys13 propicia la formación de monómeros inactivos por la recolocación del residuo Phe75 de la subunidad vecina, generando una conformación que desestabiliza la interfaz del dímero. Las mutaciones del residuo AtcTPI-Cys218 a Asp, Lys, o Tyr generan variantes de la TPI con la actividad enzimática disminuida causadas por la modificación de dos lazos, el 7 y el 6, cuya integridad es necesaria para ensamblar el sitio activo. Las modificaciones a los residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218 modulan la actividad de AtcTPI induciendo la formación de monómeros inactivos y por la alteración del sitio activo de la enzima dímérica, respectivamente. Los resultados muestran los mecanismos estructurales por los cuales la S-glutationilación protege a AtcTPI de modificaciones irreversibles y reorientan el metabolismo del carbón hacia la ruta de las pentosas fosfato para disminuir el estrés oxidativo.

## Abstract

In plants, the ancestral cyanobacterial triosephosphate isomerase (TPI) was replaced by a duplicated version of the cytosolic TPI. This isoform acquired a transit peptide for chloroplast localization and functions in the Calvin-Benson cycle. To gain insight into the reasons for this gene replacement in plants, we characterized the TPI from the photosynthetic bacteria *Synechocystis* (SyTPI) as a most related model of the replaced TPI and the cytosolic TPI from *Arabidopsis thaliana* (AtcTPI), a contemporaneous TPI where duplication arose. SyTPI presents typical TPI enzyme kinetics profiles and assembles as a homodimer composed of two subunits that arrange in a  $(\beta\text{-}\alpha)_8$  fold. We found that oxidizing agents diamide (DA) and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as well as thiol-conjugating agents such as oxidized glutathione (GSSG) and methyl methanethiosulfonate (MMTS), do not inhibit the catalytic activity of SyTPI at concentrations required to inactivate plastidic and cytosolic TPIs from *Arabidopsis thaliana* (AtpdTPI and AtcTPI, respectively). The crystal structure of SyTPI revealed that each monomer contains three cysteines, C47, C127, and C176; however only the thiol group of C176 is solvent exposed. While AtcTPI and AtpdTPI are redox-regulated by chemical modifications of their accessible and reactive cysteines, we found that C176 of SyTPI is not sensitive to redox modification *in vitro*. Our data let us postulate that SyTPI was replaced by a eukaryotic TPI, because the latter contains redox-sensitive cysteines that may be subject to post-translational modifications required for modulating TPI's enzymatic activity. This theory is reinforced with the *Arabidopsis thaliana* cTPI (AtcTPI) study, which is subject of redox regulation at two reactive cysteines that function as thiol switches. Here, as a second part of the project, we investigate the role of these residues, AtcTPI-Cys13 and AtcTPI-Cys218, by substituting them with aspartic acid that mimics the irreversible oxidation of cysteine to sulfinic acid and with amino acids that mimic thiol conjugation. Crystallographic studies show that mimicking AtcTPI-Cys13 oxidation promotes the formation of inactive monomers by repositioning residue Phe75 of the neighboring subunit, into a conformation that destabilizes the dimer interface. Mutations in residue AtcTPI-Cys218 to Asp, Lys, or Tyr generate TPI variants with a decreased enzymatic activity by creating structural modifications in two loops (loop 7 and loop 6) whose integrity is necessary to assemble the active site. Modifications of residues AtcTPI-Cys13 and AtcTPI-Cys218 modulate AtcTPI activity by inducing the formation of inactive monomers and by altering the active site of the dimeric enzyme, respectively. Our data reveal the structural mechanisms by which S-glutathionylation protects AtcTPI from irreversible chemical modifications and re-routes carbon metabolism to the pentose phosphate pathway to decrease oxidative stress.

## Introducción

Hasta el proceso más sencillo del organismo más pequeño requiere de la participación de un sistema perfectamente sincronizado de reacciones químicas, como si se tratase de una maquinaria en la que cada uno de los engranes funcionan de manera coordinada. Los engranes de estas maquinarias biológicas son las enzimas, las responsables de que las células y por ende los organismos desde los más sencillos hasta los más complejos puedan llevar a cabo procesos que garanticen su sobrevivencia (respiración, movimiento, etc.). (Mäntsälä & Niemi, n.d.). Las plantas al ser organismos sésiles tuvieron que perfeccionar aún más estos procesos, desarrollando enzimas, rutas metabólicas, mecanismos de señalización (entre otros más) mucho más sensibles a los estímulos ambientales (van Loon, 2016).

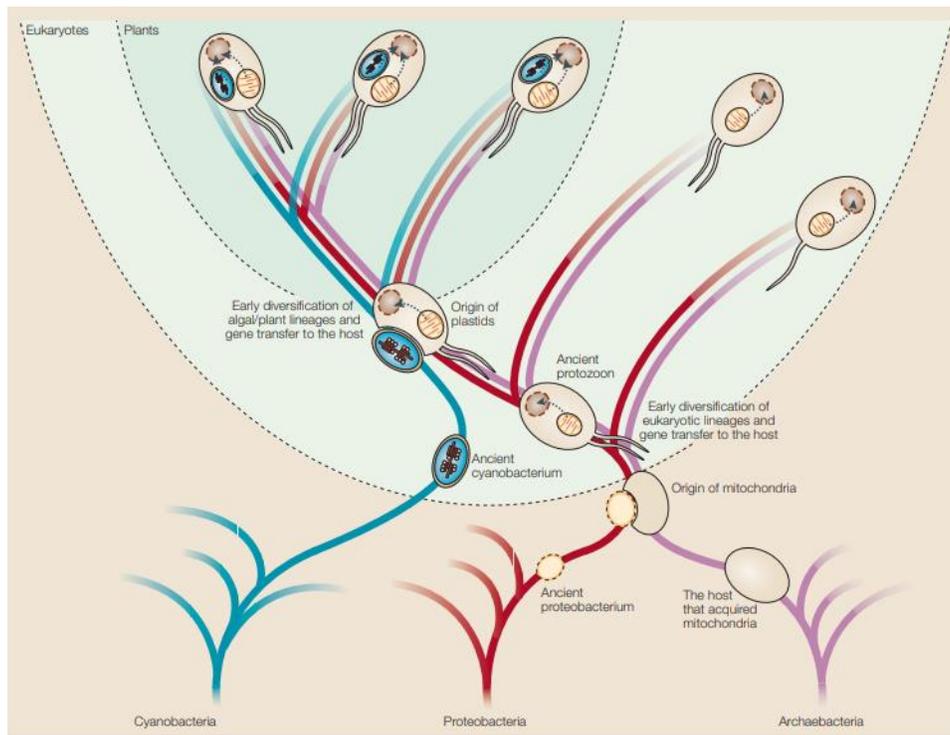
Los procesos metabólicos que se llevan a cabo en los seres vivos funcionan a modo de una serie de reacciones químicas entrelazadas en una intrincada red de codependencia, por lo que, si una de estas rutas falla, afectará el curso natural de las otras reacciones, situación de la cual la vida tomó ventaja para diversas aplicaciones, en un primer paso para utilizar la interrupción de los procesos como un mecanismo de sensado y en un segundo paso la modificación o reorientación de las rutas metabólicas para contrarrestar la presencia de agentes externos con potencial riesgo de daño, incluyéndolos en sus propios procesos a modo de intermediarios (N. M. Grüning, Lehrach, & Ralsler, 2010).

Además de su función nativa, diversas enzimas también realizan mecanismos de señalización o funcionan como interruptores metabólicos, esto

debido a que al estar en el medio celular son los elementos que tienen la primera interacción con los estímulos ambientales, por lo que representan mecanismos de señalización rápidos. Se ha visto que varias enzimas del metabolismo central funcionan también como mecanismos de sensado ante especies reactivas de oxígeno (EROs) disminuyendo su actividad catalítica para reorientar el flujo de carbono hacia rutas metabólicas que ayudan a contrarrestar la concentración de EROs disminuyendo el riesgo de daño celular (Bigelow & Squier, 2005; Grant, 2008; McLain, Szweda, & Szweda, 2011). Este riesgo de daño celular por EROS es más recurrente en células y compartimentos donde la concentración de EROs es mayor, debido a la función o localización, como en el cloroplasto, que al ser el nicho de la fotosíntesis la concentración de EROS es mucho mayor a la de otros departamentos celulares (Edreva, 2005). Por esta razón las enzimas del cloroplasto se vieron en la necesidad de adaptarse a estas características, contrario a lo que se esperaría, muchas de las enzimas ancestrales de la cianobacteria no se mantuvieron durante la transición a cloroplasto y un ejemplo de esto es la Triosafofato isomerasa (TPI), que en plantas terrestres la versión cloroplastidica proviene de un gen que surgió por duplicación de la TPI citosólica nuclear. En este trabajo de investigación proponemos que la TPI bacteriana ancestral fue reemplazada por una versión duplicada de la TPI citosólica, debido a que no contaba con los mecanismos suficientes (sensibilidad) para responder a la presencia de EROs y servir como mecanismo de señalización, a diferencia de la TPI eucarionte nuclear que cuenta con mecanismos perfectamente desarrollados.

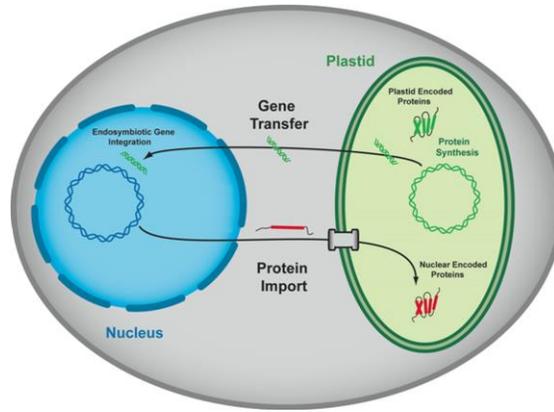
## Marco teórico

De acuerdo con la teoría sobre endosimbiosis de Lynn Margulis y Mereschkowsky, el cloroplasto es el remanente de una bacteria fotosintética que fue fagocitada por un organismo eucarionte hace más de 1000 millones de años. Debido a la contribución energética que estas bacterias proporcionaban al eucarionte (mucho mayor a la que representaban como alimento) ocurrió una transición de endosimbionte a organelo, dando así origen a los primeros organismos eucariontes fotosintéticos (Figura 1) (Margulis, 1970; Timmis, Ayliff, Huang, & Martin, 2004).



**Figura 1.** Origen endosimbiótico del cloroplasto. En un primer evento evolutivo, una arqueobacteria fagocitó a una proteobacteria dando origen a los primeros organismos protozoarios, en un evento posterior uno de estos protozoarios fagocitó a una cianobacteria, la cual al convertirse en organelo (cloroplasto) dio origen a los primeros organismos eucariontes fotosintéticos, Adaptado de Timmis et al., 2004.

El flujo de material genético desde el genoma de la bacteria fagocitada hasta el núcleo del hospedero eucarionte fue una pieza clave para esta transición, logrando en un primer paso una simbiosis obligada y en un segundo paso la integración como organelo (Figura 2) (Kobayashi et al., 2016; Timmis et al., 2004).



**Figura 2.** Migración de material genético desde la bacteria fagocitada (protoplasto) hacia el núcleo del hospedero. Los genes transferidos adquirieron señales de exportación a cloroplasto.

de *Synechocystis* cepa SPP. 6408, (organismo modelo de estudio de las cianobacterias) y los genomas cloroplastídicos de miembros de los diferentes clados del linaje de las plantas (Tabla 1), nos muestran como a lo largo de la historia

**Tabla 1.** Reducción del genoma cloroplastidico. Tanto el tamaño del genoma como la cantidad de genes que codifican a proteínas se ha visto reducido a través de la historia evolutiva de los organismos fotosintéticos.

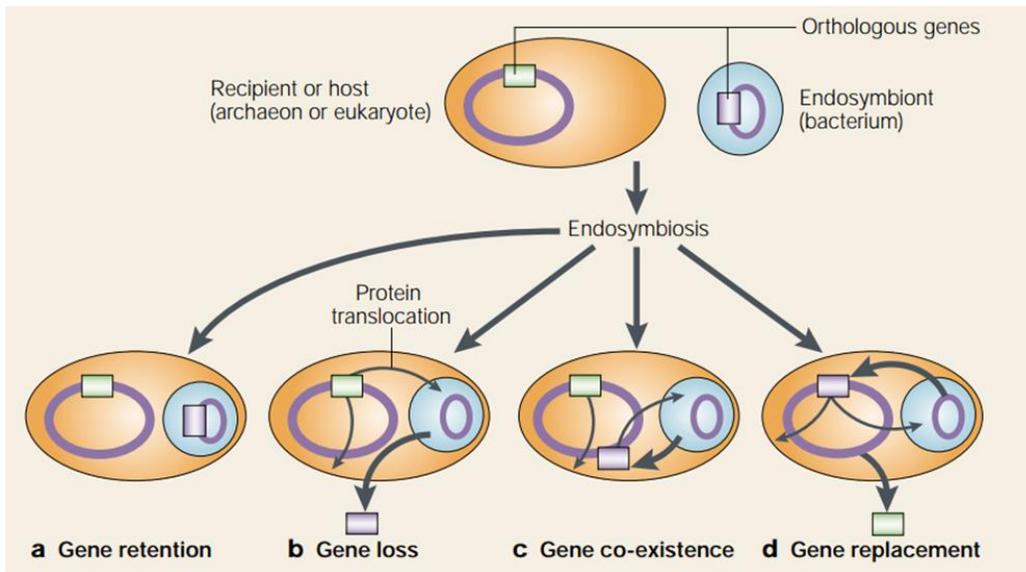
Organismo	Tamaño (kb)	Genes codificantes a proteína
<i>Synechocystis sp.</i> <sup>b</sup>	3,573	3168
<i>cp Porphyra purpurea</i>	191	200
<i>cp Cyanophora paradoxa</i>	135	136
<i>cp Odontella sinensis</i>	119	124
<i>cp Chlorella vulgaris</i>	150	78
<i>cp Chlamydomonas reinhardtii</i>	203	72
<i>cp Marchantia</i>	121	84
<i>cp Nicotiana</i>	155	76
<i>cp Zea</i>	140	76
<i>cp Arabidopsis</i> <sup>a</sup>	154	85

<sup>a</sup>Sato et al. 1999. <sup>b</sup> Kaneko et al. (1996) cp:cloroplasto

evolutiva de los organismos fotosintéticos se ha llevado a cabo esta reducción genómica (Kaneko, Matsubayashi, Sugita, & Sugiura, 1996; S. Sato, Nakamura, Kaneko, Asamizu, & Tabata, 1999; Uga et al., 2013) .

Diversas teorías se han postulado acerca de cómo el material genético migró desde la cianobacteria fagocitada hasta el núcleo del eucarionte. La primera de ellas es la retención (Figura 3, A) y hace referencia a aquellos genes cuyos productos (proteínas) resultaba difícil reimportar al cloroplasto a causa de

cuestiones físicas como el tamaño o la electronegatividad, polaridad, etc. Un ejemplo claro de esto es la subunidad mayor de la proteína RuBisCo la cual es codificada y traducida en el cloroplasto. Otra teoría hace referencia a los genes que desaparecieron (Figura 3, B) y cuya función fue remplazada por genes ortólogos nucleares que al adquirir etiquetas de localización pudieron ser exportados al cloroplasto, entre algunos ejemplos que respaldan a esta teoría tenemos a la fructosa 1-6 bifosfatasa y a la triosafosfato isomerasa (Reyes-Prieto & Bhattacharya, 2007). Una tercer teoría es la de la co-existencia de genes (Figura 3, C) en el cual tanto la versión eucarionte como la bacteriana co-existen en el genoma nuclear, ambas son codificadas en el núcleo, traducidas en el citosol y la versión bacteriana exportada al cloroplasto, este caso lo podemos ejemplificar con las polimerasas, para el caso de plantas como *Arabidopsis thaliana* en el núcleo coexisten los genes de la polimerasas responsables de la replicación del genoma nuclear, mitocondrial y cloroplastídico. La última de estas teorías es el reemplazo de genes (Figura 3, D), en este panorama, el gen eucarionte o nuclear es eliminado y su función es reemplazada por el gen ortólogo bacteriano, cuyos productos (proteínas codificadas) llevarán a cabo las funciones en el citosol y en el cloroplasto de forma independiente, la fosfoglicerato quinasa ejemplifica a la perfección esta teoría. De forma concreta se estima que alrededor de 1000 genes bacterianos fueron transferidos al núcleo de las plantas terrestres y sus proteínas son reimportadas al cloroplasto (Bock & Timmis, 2008; Gross, Meurer, & Bhattacharya, 2008; N. Sato, Ishikawa, Fujiwara, & Sonoike, 2005).



**Figura 3.** Rutas de flujo genético huésped-endosimbionte. El material desaparecido del genoma bacteriano tuvo diferentes destinos, para entender lo que sucedió con esta reducción de genoma se han elaborado distintas teorías. **A)** Retención de genes, **B)** Pérdida de genes, **C)** Co-existencia de genes y **D)** reemplazo de genes. Tomado de Brown 2003.

Las enzimas que fueron reemplazadas por versiones nucleares sufrieron cambios para copar con el ambiente químico del cloroplasto debido a que la fotosíntesis y el ciclo de Calvin-Benson llevados en el nuevo departamento celular (protoplasto) que permitieron a los nuevos organismos fijar carbono a partir del  $\text{CO}_2$  ambiental, también representaron una fuente de EROS dentro de la célula. La EROs pueden generar modificaciones estructurales en las enzimas, modificaciones que pueden llegar a generar la pérdida parcial o total de la función (Dalle-Donne et al., 2007). Los principales blancos de oxidación por EROs son los grupos tiol (-SH) de las cisteínas, debido a su abundancia electrónica (Davies, 2005), la formación de estos compuestos es irreversible.

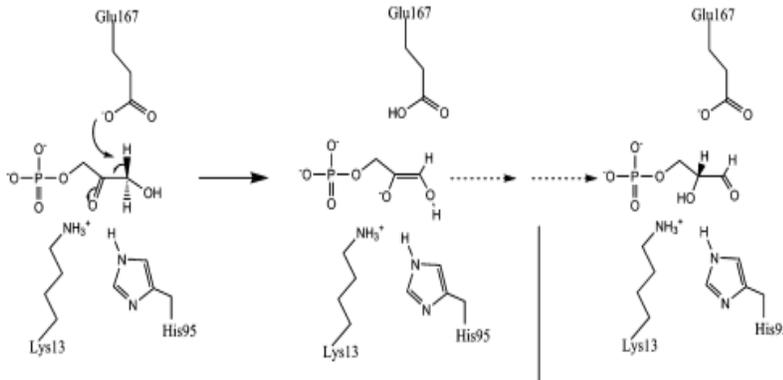
Debido a la naturaleza sésil de las plantas, fue necesario el desarrollo de sistemas complejos de sensado y señalización para sobrevivir a la diversidad de condiciones ambientales. Una situación aún más compleja para las proteínas

nucleares exportadas a cloroplasto, ya que además de tener que ser más resistentes a la oxidación en comparación a sus homólogos nucleares, se requiere tener una componente regulatoria y que además les permita servir como mecanismo de sensado, es decir, se requiere que estas enzimas sean resistentes al ambiente del nuevo compartimiento celular pero que también sean capaces de modular su actividad para servir como indicadores para reorientar la red metabólica.

La triosafosfato isomerasa TPI es un ejemplo claro de esta situación, en plantas terrestres como *Arabidopsis thaliana* existen en el genoma nuclear dos copias del gen que codifica para la TPI, ambas copias son codificadas en el núcleo y traducidas en el citosol. Sin embargo, una de ellas adquirió una señal de exportación a cloroplasto y al no estar sujeta a presión de selección sufrió modificaciones a lo largo de su estructura para funcionar de manera adecuada en el cloroplasto.

La TPI lleva a cabo la reacción de isomerización entre el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Figura 4) y se ha definido como una enzima perfecta, ya que su catálisis solo se ve limitada por la difusión del sustrato. Estructuralmente es un barril  $(\alpha\beta)_8$ , formado por ocho laminas beta y ocho hélices alfa unidas por 8 asas, una de las estructuras terciarias proteicas más estables presentes en la naturaleza. (Knowles & Alberly, 1977; Wierenga et al., 2010). Entre las TPI estudiadas en diferentes organismos, el sitio catalítico se encuentra conservado (Livesay & La, 2005) formado por 4 aminoácidos, (Figura 5, tomando como ejemplo a *Trypanosoma brucei*), el ácido glutámico 167 (Glu167),

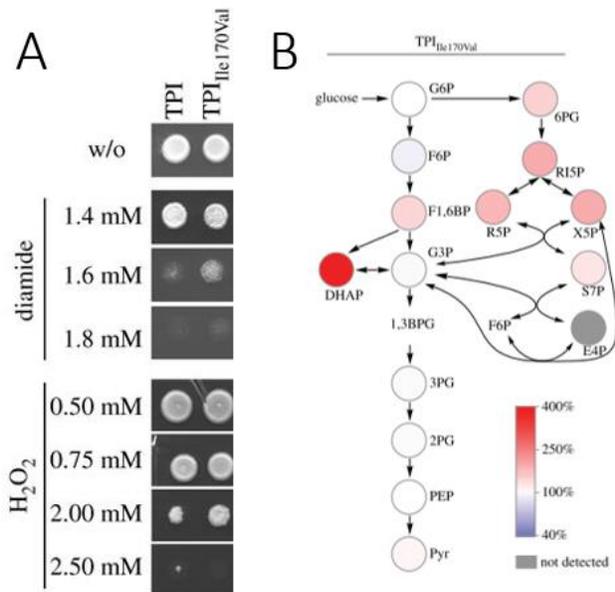
histidina95 (His95), lisina13 (Lys 13) y asparagina 11 (Asn 11) (Wierenga et al., 2010a)



**Figura 4.** Reacción de isomerización del G3P y la DHAP. En *T. brucei*, el residuo Glu167 funciona como base catalítica abstrayendo el protón, la His95 cede un protón a la molécula de sustrato actuando como ácido catalítico, y la Lys 13 polariza y sujeta al sustrato (Tomado de Wierenga et al. 2010).

Estudios como los de Ralser

(Ralser et al., 2007) en los que se transformó un set de variantes de TPI con diferente actividad catalítica en cepas de levadura con el gen de la TPI eliminado ( $\Delta$ TPI), junto a los realizados por Grüning (Grüning et al., 2014) en donde el sitio catalítico de la TPI de conejo es bloqueado (actividad catalítica disminuida) muestran que aquellas células de levadura con TPI de actividad catalítica disminuida, exhiben una resistencia mayor a altas concentraciones de agentes oxidantes, en comparación a aquellas

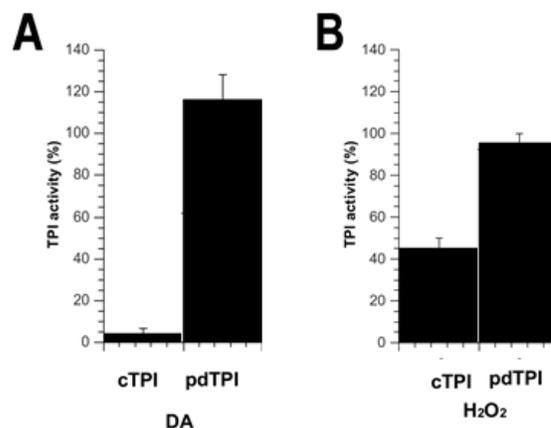


**Figura 5.** Complementación *in vivo* de TPI en levadura. A. La versión mutada de la TPI de humano Ile170Val posee una actividad catalítica en comparación a la silvestre disminuida, en concentraciones altas de agentes oxidantes la TPI con actividad disminuida presenta un crecimiento mejor en relación con la TPI wt. B la concentración de los metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato 6-fosfogluconato (6PG), Ribulosa 5-fosfato (R15P) Ribosa 5-fosfato (R5P), X5P (Xilulosa 5-fosfato) Eritrosa 4-fosfato (E4P) y Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se ve aumentada (Tomado de Ralser et al. 2007 y Grüning et al., 2014).

cepas con TPI completamente funcionales (Figura 5, A). En los estudios de metabolómica realizados por el grupo de Grüning, se observó que en células con TPI de actividad catalítica reducida los metabolitos involucrados en la ruta de las pentosas fosfato incrementaron (Figura 5, B). La regulación de la TPI tiene un gran impacto en la conservación de la célula, reorientando el flujo de carbono por la ruta de las pentosas fosfato en presencia de altas concentraciones de agentes oxidantes.

La ruta de las pentosas fosfato comienza con la oxidación de la glucosa 6 fosfato hasta convertirla en piruvato, durante el proceso se regeneran dos moléculas de NADPH por cada molécula de glucosa, este potencial reductor en forma de NADPH permitirá a la célula la regeneración de glutatión reducido, además de la disminución de la concentración de agentes oxidantes en la célula (Kruger & Von Schaewen, 2003).

López-Castillo y col. (López-Castillo et al., 2016b) determinaron que, AtpdTPI posee una capacidad regulatoria mayor en comparación a la versión citosólica, es decir, se requiere un concentración 15 veces mayor de glutatión para inhibir al 50% de su actividad a la AtpdTPI en comparación a AtcTPI (Figura 6). Algo similar ocurre con la resistencia ante agentes oxidantes como diamida (DA) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )



**Figura 6.** Efecto de agentes oxidantes sobre la actividad catalítica de TPI. **A)** A una concentración de 1 mM de DA, cTPI disminuye su actividad catalítica hasta un 5% mientras que pdTPI no muestra disminución en su actividad. **B)** Con 0.2  $\mu$ M de peróxido de hidrogeno, cTPI disminuye su actividad a un 45% en comparación a pdTPI donde no se observa un cambio significativo. Tomado de Lopez-Castillo et al. 2016.

donde la versión plastídica parece ser insensible a estos agentes en comparación a la versión citosólica que baja su actividad catalítica de forma significativa.

Con la evidencia antes planteada y el conocimiento que se tiene de las condiciones redox del cloroplasto y las características regulatorias de las enzimas localizadas en éste, en esta tesis se plantea mediante la utilización de herramientas bioquímicas y estructurales aplicadas al modelo de estudio SyTPI-AtcTPI obtener información sobre la pregunta de investigación ¿Qué ventajas biológicas se adquirieron con el remplazo de la TPI de cloroplasto en plantas?, partiendo de la hipótesis de que la regulación y/o resistencia a especies reactivas de oxígeno fue uno de los factores que favorecieron el remplazo, ya que la TPI bacteriana no poseía los mecanismos de regulación redox con los que contaba la TPI eucarionte AtcTPI.

## Capítulo I

### Fundamento estructural de la respuesta limitada a agentes oxidantes y tiol-conjugantes de la triosafosfato isomerasa de la bacteria fotosintética *Synechocystis*

#### Introducción

En el linaje de las plantas la TPI ancestral de origen bacteriano fue remplazado por una versión duplicada de la TPI citosólica, esta isoforma requirió adquirir una secuencia de exportación (péptido señal) que la exportara hacia el cloroplasto para participar en el ciclo de Calvin-Benson (Reyes-Prieto & Bhattacharya, 2007). Dado que la TPI nuclear que desarrolla su función en el citosol no era lo suficientemente resistente a estrés oxidativo y al no ser sujeta a la presión de selección esta nueva copia sufrió modificaciones para copar con los niveles mayores de EROs del cloroplasto.

Se ha hipotetizado que las cianobacterias son las células que dieron origen a los cloroplastos de las algas y plantas (Gould, Waller, & McFadden, 2008). *Synechocystis* sp. PCC 6803 es una cianobacteria contemporánea descendiente de las aquellas ancestrales que pudieron dar origen al cloroplasto, por lo que *Synechocystis* se ha empleado como un modelo de estudio tanto para cianobacterias contemporáneas como para aquellas ancestrales (Kaneko et al., 1996).

Mediante la utilización de la TPI de *Synechocystis* (SyTPI) y un set de versiones mutantes en las cuales se cambiaron las cisteínas por aminoácidos no reactivos, en un análisis bioquímico y estructural podremos entender las características

estructurales, así como la resistencia y susceptibilidad antes agentes tiol-conjugantes y oxidantes. Lo anterior sirve para darnos una idea de cómo pudo haber sido la TPI de aquella bacteria fotosintética fagocitada hace más de 1000 millones de años, y que dio origen al cloroplasto. Los resultados obtenidos nos ayudarán a entender porque la TPI bacteriana representaba una desventaja para este nuevo tipo de organismos y porque a lo largo de la historia evolutiva de las plantas, ésta fue reemplazada por una versión proveniente de la duplicación del gen nuclear.

## Hipótesis

Las diferencias en la susceptibilidad a los agentes redox entre las versiones de TPI ancestral y contemporánea del cloroplasto en plantas explican el remplazo del gen de TPI de cianobacteria por una versión eucarionte.

## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar la capacidad regulatoria de la triosafosfato isomerasa de *Synechocystis* PCC 6803 (SyTPI) desde un enfoque estructural y bioquímico con el objetivo de entender cómo era la TPI bacteriana que fue remplazada y su desventaja biológica ante la versión actual de origen eucarionte (AtpdTPI).

### Objetivos específicos

#### **Determinar la influencia de la relación función/estructura en la regulación.**

Obtener la estructura cristalográfica de SyTPI

Caracterización bioquímica de blancos de regulación

Determinar si SyTPI puede ser objeto de regulación por agentes oxidantes

#### **Identificar blancos de regulación de SyTPI**

Generación de mutantes sencillas

Ensayos de complementación *in vivo*

Determinación de parámetros catalíticos

Ensayos de S-glutathionilación

Derivatización con agentes oxidantes

Ensayos de complementación *in vivo*

## **Materiales y métodos**

### **Generación de mutantes puntuales**

Las mutaciones puntuales se realizaron en las cisteínas de SyTPI mediante mutagénesis sitio-dirigida Q5 con el procedimiento estándar. Uno o dos de los nucleótidos del codón que es traducido a cisteína son modificados mediante la amplificación del gen de SyTPI con oligonucleótidos que contienen la modificación del codón, estas modificaciones dependen del aminoácido por el cual se desea mutar a la cisteína. El resto del gen se amplificará sin modificaciones. La cisteína 42 se mutó a alanina (Cys42Ala), la cisteína 127 se mutó a alanina (Cys127Ala) y la cisteína 176 se mutó a serina (Cys176Ser), se generaron 3 mutantes sencillas, 3 mutantes dobles y una mutante triple.

### **Expresión de la triosa fosfato isomerasa de *Synechocystis sp* PCC 6803**

Los genes clonados en el sistema de expresión pet-19b se transformaron en células quimio-competentes de la cepa de *E. coli* BL21. De las colonias crecidas en caja se seleccionó una, la cual fue utilizada para inocular 50 mL de medio LB con antibiótico (Ampicilina a 100ug/mL), el cultivo se creció a 37°C y agitación a 250 rpm por un tiempo menor a 16 horas para posteriormente inocular 1L de LB con antibiótico (Ampicilina a 100ug/mL), este nuevo cultivo se creció a 37°C y agitación de 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.2 y 0.7, una vez alcanzado este parámetro al medio se le adicionó IPTG a una concentración de 0.5 mM la temperatura se disminuyó a 16°C y la agitación se mantuvo a 250 rpm durante 16 horas, pasado este tiempo el medio se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos para recuperar las células, las cuales se resuspendieron en 40 mL de una solución

amortiguadora de lisado (25 mM Tris-HCl pH 8.0 y 100 mM de NaCl).

### **Purificación mediante cromatografía por afinidad en columnas de níquel**

Las células resuspendidas se sometieron a 10 ciclos de sonicación de 30 segundos con periodos intermedios de 1 minuto entre cada ciclo, todo el proceso se llevó a cabo en incubación con hielo. La solución final se centrifugó a 10,000 g (13,000 rpm) durante 40 minutos, se recuperó el sobrenadante y se pasó por un filtro con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante se pasó por una columna de afinidad a níquel His-trap<sup>TM</sup> Chelating (GE Healthcare) equilibrada con solución amortiguadora de lisis adicionada con 5mM de imidazol, se hicieron 3 lavados, el primero de ellos con 30 volúmenes de una solución de lavado 1 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM de NaCl y 20 mM de Imidazol), el segundo con 30 volúmenes de solución de lavado 2 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM de NaCl y 30 mM de Imidazol) y lavado 3 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM de NaCl y 50 mM de Imidazol) por último la proteína aún adherida a la columna se eluyó con 3 mL de solución amortiguadora de elusión (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM de NaCl y 500 mM de Imidazol). El volumen final se dializó contra solución amortiguadora (igual que la solución de elusión, pero sin imidazol) mediante una membrana de celulosa con tamaño de poro de 12kDA (sigma-aldrich) para disminuir la concentración de imidazol.

## **Purificación de proteínas por cromatografía de líquidos**

Posterior al dializado, la proteína se purificó mediante cromatografía por exclusión de tamaño en fase móvil líquida (FPLC) en el equipo Äkta pure en una columna Superdex 75 10/300 GL, como fase móvil se utilizó una solución amortiguadora (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM de DTT y 0.5 mM de EDTA) con un flujo volumétrico de 0.5 mL/min y la proteína se recuperó en fracciones de 1 mL. Las fracciones recuperadas se monitorearon en geles de SDS-PAGE a condiciones desnaturizantes. La proteína purificada se concentró hasta un volumen de 1 mL.

## **Cristalización de la TPI de *Synechocystis sp.* PCC 68**

La proteína se cristalizó mediante la técnica de la gota colgante, la cual consiste en colocar una gota formada con solución concentrada de proteína (16 mg/mL) y solución de los kits de cristalización en un cubreobjetos, después es colocado de forma invertida para servir de sello a un pocillo que contiene 500  $\mu$ L de la misma solución colocada en la gota junto a la proteína. Las gotas se mezclaron con la solución de cristalización en una relación 2:1 y 1:1 (proteína/solución) con y sin sustrato (2 pga), en el sistema cerrado pocillo-cubreobjetos se forma un equilibrio de vapor con lo que el agua de la gota migra hacia la solución más concentrada en el pocillo, concentrando así la proteína de la gota, favoreciendo la formación de cristales proteicos. Los kits que se probaron fueron el crystal screen 1 y 2 de Hampton research® así como el wizard I y II de Rigaku®, viéndose favorecida la obtención de cristales en la condición 46 del kit cristal screen 1 de Hampton research (0.2 M de acetato de calcio, 0.1 M de cacodilato de sodio trihidratado, 18% w/v poli (etilen glicol) 8000).

## Ensayos de cinética enzimática

La concentración de la enzima se midió utilizando el coeficiente de extinción molar de  $23,950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad catalítica de la SyTPI y el set de mutantes fueron medidas espectrofotométricamente mediante el ensayo de enzima acoplada asistido por  $\alpha$ -glicerol fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) en la dirección de G3P a DHAP (Rozacky, Sawyer, Barton, & Gracy, 1971). Los ensayos fueron llevados a cabo en buffer 0.1 M TEA pH 7.4 and 10 mM EDTA además de 0.2 mM NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), 1  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -GDH, y 1 mM de D-L Gliceraldehido 3 fosfato. Las reacciones se iniciaron con la adición de SyTPI y la actividad enzimática fue calculada mediante el decaimiento de la absorbancia a 340 nm. La determinación de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $k_{cat}$ , se logró variando la concentración de G3P desde 0 hasta 5 mM.

## Mutagénesis sitio-dirigida

La mutagénesis sitio-dirigida o puntual se llevó a cabo mediante el uso del kit de mutagénesis Q5 (New England Biolabs) siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 2. Todas las mutantes fueron confirmadas mediante la secuenciación del sitio de clonación de los plásmidos.

**Tabla 2.** Secuencia de nucleótidos de los oligómeros utilizados en la mutagénesis sitio dirigida Q5.

Mutante		Secuencia de oligonucleotidos
SyTPI Cys42Ala	Up	GGTGGTGTGGgctGTTTCCTTTCACCGATTTGAGC
	Lower	TCACGACTTTCCGCCGCA
SyTPI Cys127Ala	Up	TCCCATTTCTGgctGTGGGGGAAAGTAAG
	Lower	ATTAAGCCCCGCCTTTTGG
SyTPI Cys176Ser	Up	AGGGGACACCtctGCGGCAACGG
	Lower	GTACCAATGGCCCAAATCGGC

## Resolución estructural de SyTPI

Los datos de difracción se recolectaron en un difractor a Micromax 002+ (Rigaku). El dataset fue resuelto mediante el software XDS y XSCALE. Las fases se resolvieron por remplazo molecular utilizando el programa PHASER (McCoy et al., 2007) y la estructura cristalina de la TPI de *Geobacillus stearothermophilus* (código PDB: 1BTM) como modelo de partida. El refinamiento del modelo se llevó a cabo usando COOT y PHENIX. Las coordenadas estructurales se depositaron en el PDB con el número de accesoión 6BVE.

## Desplazamiento térmico basado en fluorescencia (TSA)

El TSA se llevó a cabo en un equipo de PCR de tiempo real (Step One Instrument 48 wells, Applied Biosystems) (Huynh & Partch, 2015). Las proteínas purificadas fueron diluidas en buffer Tris 25 mM pH 8.0 y 100 mM NaCl hasta llevarlas a una concentración de 4  $\mu$ M. Nueve microlitros de proteína fueron mezclados con 1  $\mu$ L de Sypro Orange dye 20X para que la concentración final de Sypro Orange fuese de 2X y el volumen final de 10  $\mu$ L. Las mediciones fueron realizadas utilizando una fluorescencia de excitación de 490 nm y las lecturas se tomaron a 575 nm. La curva de fusión se fijó de 25 a 95  $^{\circ}$ C con incrementos de 1 $^{\circ}$ C cada 2 minutos. Los datos se obtuvieron substrayendo las intensidades experimentales y los datos fueron analizados utilizando el software del fabricante del equipo Applied Biosystems. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Escisión química de proteínas con ácido 2-nitro 5- tiocianato benzoico (NTCB)**

La escisión química mediante NTCB se llevó a cabo mediante los protocolos previamente descritos por (Jacobson, Schaffer, Stark, & Vanaman, 1973). Las proteínas purificadas fueron incubadas por 1 hora a 37°C en buffer reductor (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, y 5 mM DTT). Una vez reducidas, las muestras de proteína fueron dializadas en 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 100 mM de NaCl para remover el exceso de agente reductor (DTT). Las muestras se incubaron con NTCB en una relación molar 10:1 (NTCB/cisteínas) durante 2 horas a 25°C, pasado el tiempo de incubación las muestras fueron dializadas de nueva cuenta en el buffer original para eliminar el exceso de NTCB que no se conjugó con las cisteínas accesibles. Para el paso de desnaturalización las proteínas fueron incubadas en buffer 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, y 5 M de urea. Las muestras fueron analizadas mediante geles de SDS-PAGE.

### **Detección de S-glutationilación en SyTPI mediante Western Blot**

SyTPI silvestre y mutantes previamente reducidas fueron diluidas a una concentración de 6 µM e incubadas en 100 mM TEA pH 7.4, 10 mM EDTA y 1 mM de GSSG durante 48 h a 4°C. El exceso de GSSG fue removido mediante diálisis. Las muestras fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE no reductor, posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa y analizados mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-glutión (1:250, Virogen) y un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (1:5,000, Thermo scientific). Las señales fueron analizadas mediante quimioluminiscencia con películas CL-Xposure (Thermo Scientific, USA).

### **Cuantificación de tioles reactivos en SyTPI mediante el método de Ellman**

El número de tioles accesibles y reactivos en SyTPI fue determinado de manera espectrofotométrica mediante el ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB) (Ellman, 1959). Para ello, 90  $\mu\text{L}$  de proteína fueron agregados a una disolución de 200  $\mu\text{M}$  de DTNB (SIGMA, USA) en 100 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  pH 8.0. Se midió la absorbancia de las muestras a 412 nm posterior a 5 minutos de incubación a temperatura ambiente.

### **Efecto de agentes redox sobre la actividad catalítica de SyTPI**

Las muestras de proteína fueron diluidas hasta una concentración de 184 nM en 0.1 M TEA pH 7.4 y 10 mM EDTA y se preparó un set de muestras variando la concentración de forma creciente de GSSG (0–25 mM), MMTS (0–50  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0–500  $\mu\text{M}$ ), y diamida (DA) (0–1,000  $\mu\text{M}$ ). Las muestras fueron incubadas durante 4 horas a 25°C y después de la incubación fueron diluidas 1000 veces hasta una concentración de 0.184 nM (10 ng/mL) y la actividad catalítica fue medida mediante el ensayo de enzima acoplada descrito anteriormente.

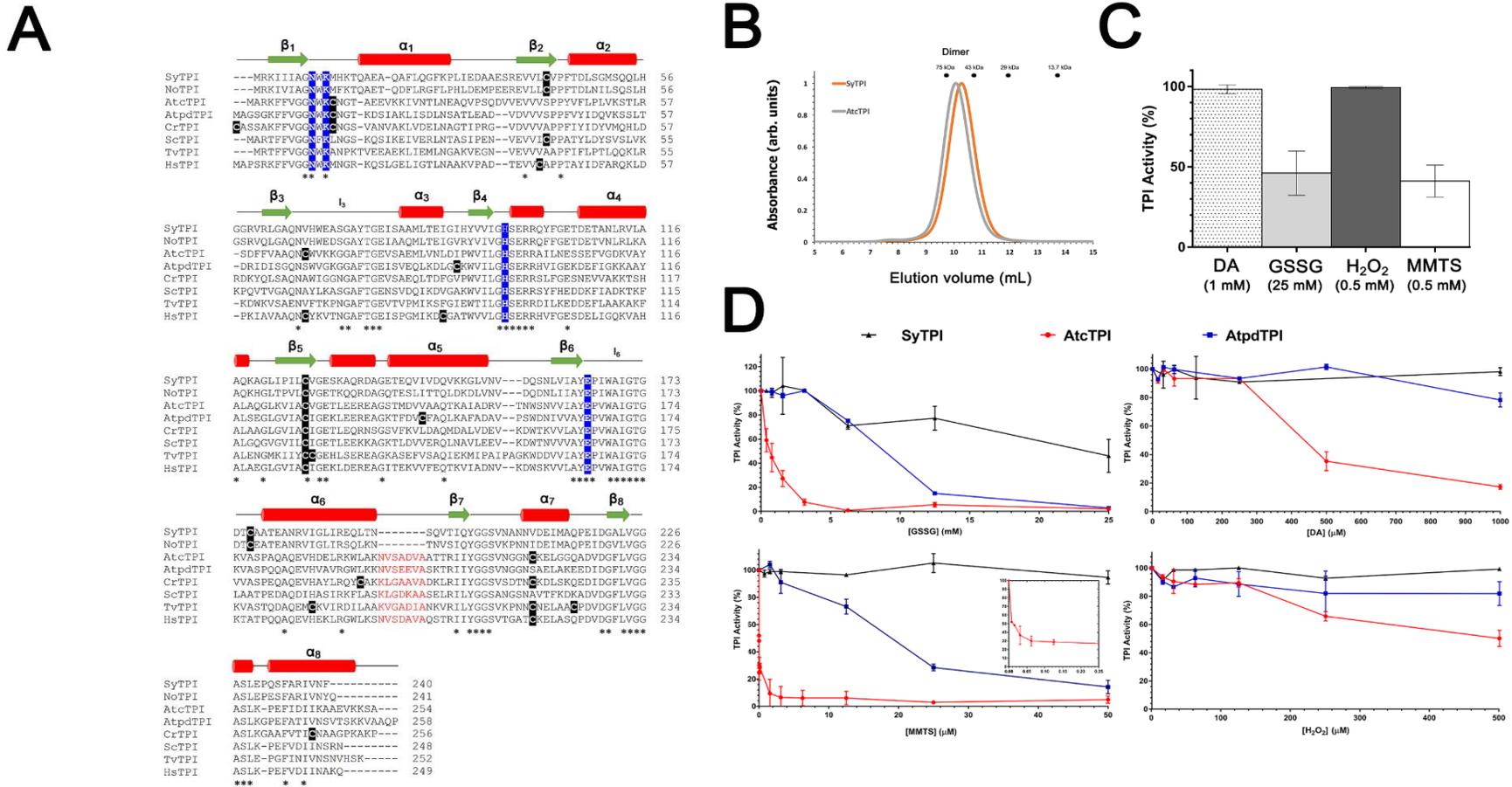
### **Análisis filogenéticos de TPIs de organismos fotosintéticos**

Una serie de secuencias de aminoácidos de TPIs representativas de organismos de diferentes clados del linaje de las plantas se utilizaron para ejecutar un alineamiento múltiple mediante el programa MUSCLE (Edgar, 2004)). El análisis filogenético se llevó a cabo con el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas, todo el análisis bioinformático fue realizado con el programa MEGA (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

## Resultados

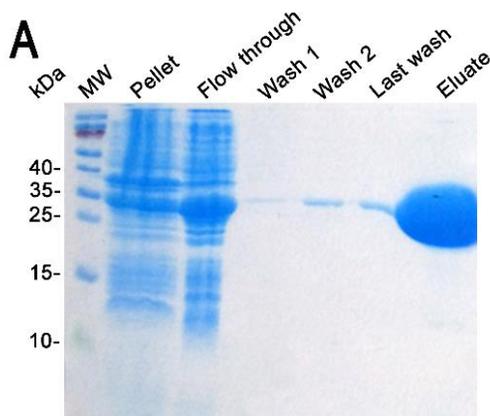
### **SyTPI es resistente a agentes oxidantes y tiol-conjugantes.**

El alineamiento de diferentes secuencias de aminoácidos entre SyTPI y TPIs de organismos modelo y organismos fotosintéticos ilustra que aquellos aminoácidos conservados son los que conforman el sitio activo y el lazo o asa 6 (lazo de unión a fosfatos (Figura 7). Este lazo posee una estructura flexible y realiza un movimiento tipo bisagra sobre el sitio activo posterior a la unión de sustrato con el sitio catalítico (Lolis et al., 1990; Wierenga, Noble, & Davenport, 1992). Del alineamiento también podemos observar que las secuencias de las cianobacterias presentan una delección de siete aminoácidos (residuos N195 a A201 en AtcTPI) en el lazo que conecta a la  $\alpha$ -hélice 6 con la  $\beta$ -plegada 7 (Figure 7, A). SyTPI posee tres cisteínas a lo largo de su estructura primaria en las posiciones 42, 127 y 176. La localización de estas cisteínas contrasta con los residuos de AtcTPI, C13, C218, y de AtpdTPI C15 los cuales se sabe que son blancos de S-glutathionilación y regulación *in vivo* (Figura 7,A) (López-Castillo et al., 2016b).



**Figura 7. (A)** Alineamiento múltiple de secuencias y elementos de la estructura secundaria de TPI de diferentes organismos: SyTPI (*Synechocystis* sp. PCC 6803), NoTPI, (*Nostoc* sp. PCC 7107), AtcTPI, (*Arabidopsis thaliana* cytosolic TPI), AtpdTPI (*Arabidopsis thaliana* chloroplatic TPI), CrTPI (*Chlamydomonas reinhardtii*), ScTPI (*Saccharomyces cerevisiae*), TvTPI (*Trichomonas vaginalis*), y HsTPI (*Homo sapiens*). Los residuos conservados están marcados con un asterisco (\*). Las cisteínas aparecen remarcadas en negro y los residuos catalíticos en azul (Asn 9, Lys 11, His96 and Glu 167). La delección de siete aminoácidos presente en SyTPI y NoTPI se muestra de color rojo. Los elementos secundarios están identificados de la siguiente manera: cilindros rojos para las  $\alpha$ -hélices y flechas verdes para las  $\beta$ -plegadas. **(B)** Cromatografía de exclusión molecular de SyTPI (línea naranja) en comparación a AtcTPI dimerica (línea gris), SyTPI and AtcTPI eluyen a 9.9 y 10.1 mL, respectivamente como dímeros, Los picos de SyTPI y AtcTPI fueron separados en una columna Superdex 75 10/300. Los perfiles de elución para los estándares de peso molecular: conalbumina (75 kDa), ovalbumina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), y ribonucleasa (13.7 kDa) se muestran como puntos. **(C)** Modulación de la actividad enzimática de SyTPI posterior al tratamiento por 4 horas a 25°C con 4 agentes redox, 1 mM de diamida (DA) (barra punteada), 25 mM de glutatión oxidado (GSSG) (barra gris), 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Barra gris oscuro), y 0.5 mM de MMTS (barra blanca). **(D)** Efecto diferencial de los agentes redox en SyTPI (línea negra), AtcTPI (línea roja), y AtpdTPI (línea azul). Los resultados están expresados como el porcentaje de la actividad con respecto a la actividad de la proteína sin tratamiento. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Para entender las características biofísicas y cinéticas de SyTPI, la versión silvestre y las mutantes puntuales fueron expresadas de forma recombinante en una cepa de *E. coli* BL21 DE3 carente de tpi endógena ( $\Delta$ tpi) (Sullivan, Durani, & Magliery, 2011). Posterior a dos etapas cromatográficas las SyTPIs recombinantes fueron purificadas con un rendimiento aproximado de 4 mg por litro de medio de cultivo con una pureza mayor al 95% (Figura 8).



**Figura 8.** Gel SDS-page del proceso de purificación de SyTPI por IMAC. Carriles: 1 Marcado de peso molecular. 2 pastilla. 3 flujo de la columna. 4,5 y 6 lavados. 7 elusión de proteína purificada.

El perfil de elusión de la SyTPI silvestre recombinante, en su paso por una columna de filtración en gel, mostró que la proteína se ensambla como un dímero con un peso molecular aproximado de 54 kDa (Figura 7, B). A diferencia de las TPIs de eucariontes y bacterias, los valores de constantes cinéticas de TPIs de cianobacterias son escasos en la literatura. Los resultados de cinéticas de estado estable de este trabajo arrojaron que SyTPI cataliza la reacción de isomerización en sentido de G3P a DHAP con una  $K_M$  de 0.8 mM y un número de recambio ( $k_{cat}$ ) de  $1,848 \text{ s}^{-1}$ . Estas constantes catalíticas corresponden a una eficiencia catalítica de  $2.31 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La cual es similar a las reportadas para TPIs de otros organismos fotosintéticos como *C. reinhardtii* y *A. thaliana* (Tabla 3) (López-Castillo et al., 2016b; Zaffagnini et al., 2014).

**Tabla 3.** Parámetros catalíticos para la interconversión de G3P y DHAP de SyTPI silvestre y sus mutantes.

<b>Enzima</b>	<b>Km(mM)</b>	<b>Kcat(s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Kcat/Km(M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>
SyTPI	0.80±0.02	1848±43	2.31x10 <sup>6</sup>
Cys42Ala	1.01±0.03	1776±42	1.76x10 <sup>6</sup>
Cys127Ala	1.04±0.08	1774±56	1.71x10 <sup>6</sup>
Cys176Ala	1.01±0.05	1811±17	1.79x10 <sup>6</sup>
Cys42Ala/Cys127Ala	1.10±0.03	1631±53	1.48x10 <sup>6</sup>
Cys42Ala/Cys176Ser	1.46±0.02	2126±62	1.46x10 <sup>6</sup>
Cys127Ala/Cys176Ser	1.19±0.08	683±6	5.73 x10 <sup>5</sup>
Cys42Ala/Cys127Ala/Cys176Ser	1.40±0.15	21.32±1.	1.52x10 <sup>4</sup>

Las actividades enzimáticas de las TPIs de *Arabidopsis* y *C. reinhardtii* muestran diferentes panoramas cuando se ven expuestas a la presencia de agentes oxidantes, por su lado AtcTPI es altamente susceptible a oxidación por diamida (DA) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mientras que AtpdTPI y CrTPI son resistente a estos mismos agentes (López-Castillo et al., 2016b; Zaffagnini et al., 2014). Se sabe que la incubación de AtcTPI con 1 mM de DA reducen su actividad a menos del 5% de la actividad de la enzima sin tratamiento y que contrastantemente la incubación con la misma concentración de este agente genera un efecto nulo en la actividad de AtpdTPI (López-Castillo et al., 2016b).

Se ha propuesto que la oxidación de las cisteínas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DA promueven la formación de ácido sulfínico y/o sulfónico (Kosower & Kosower, 1995; Poole, 2015). Tomando en cuenta las diferencias en la susceptibilidad ante agentes oxidantes entre diversas TPIs, se optó por cuantificar el efecto que genera la exposición a estos agentes sobre la actividad enzimática de la SyTPI. Los resultados nos mostraron que la actividad catalítica de SyTPI no se ve afectada por

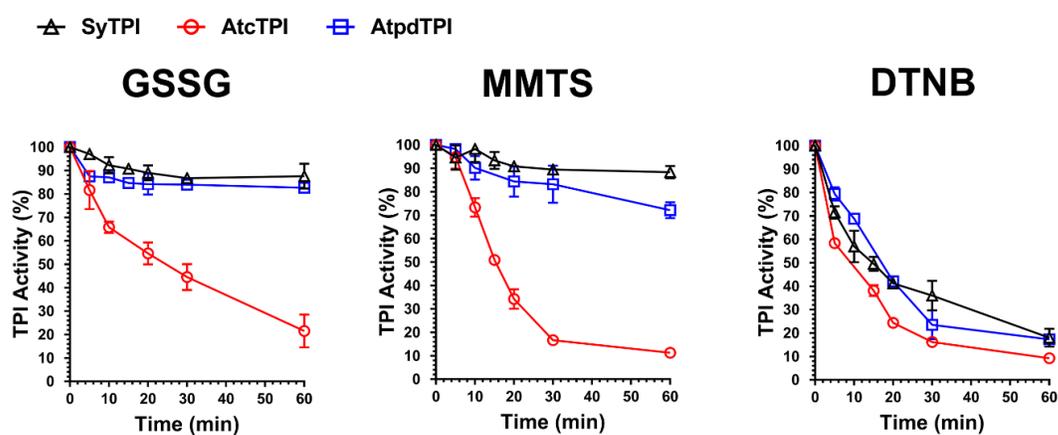
la adición de 1 mM de DA o 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin embargo, la actividad si decrece a un 50% 25 mM de glutatión oxidado (GSSG) y 0.5 mM MMTS (Figura 7, C).

Con la intención de comparar el comportamiento de SyTPI con respecto con el de las TPIs de plantas en la presencia de agentes tiol-conjugantes, se llevaron a cabo ensayos cinéticos utilizando diferentes concentraciones de estos agentes. Los resultados mostraron que SyTPI es menos susceptible a agentes tiol conjugantes como GSSG, MMTS y DA en comparación con AtcTPI y AtpdTPI (figura 7, D). La actividad enzimática de SyTPI decrece a un 50% (de la actividad de la enzima sin tratamiento) después de la incubación con 25 mM de GSSG, en comparación a las actividades de AtcTPI y AtpdTPI, las cuales son completamente inhibidas a esa misma concentración de GSSG. La incubación con MMTS genera efectos inhibitorios en la actividad enzimática de SyTPI a concentraciones menores a 50  $\mu$ M. Por su lado AtcTPI y AtpdTPI disminuyen su actividad al 50% de su actividad original a una concentración de 0.005 y 18  $\mu$ M de MMTS respectivamente.

Esto indica que un exceso molar de 27 veces de MMTS inhibe el 50% de la actividad enzimática de AtcTPI, sin embargo, un exceso molar mucho más grande de aproximadamente 272, 000 veces de este mismo agente no afecta la actividad catalítica de SyTPI. De igual modo se observó que la DA a concentraciones por arriba de 1,000  $\mu$ M no afecta la actividad enzimática de SyTPI, pero la actividad enzimática de AtcTPI y AtpdTPI disminuyen a un 20 y 80% respectivamente a la misma concentración de DA. Para el caso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad enzimática de SyTPI no se ve afectada con la incubación, la actividad de AtpdTPI se reduce hasta un

20% con 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , la actividad de AtcTPI decrece igual a un 20% pero a una concentración de 180  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 7, D).

Para entender si la actividad de SyTPI es modulada por la conjugación de agentes redox por medio su conjugación con alguna de las cisteínas, se llevaron a cabo ensayos cinéticos en tiempo real utilizando las enzimas SyTPI, AtpdTPI y AtcTPI. Los resultados revelaron que SyTPI y AtpdTPI no muestran una inhibición de la actividad después de 60 minutos de incubación con GSSG, por el contrario, AtcTPI es inhibida hasta el 50% de su actividad a los 30 min del ensayo. La misma tendencia se observa para el agente MMTS, donde AtcTPI presenta un 50% de su actividad inicial después 15 min de incubación. Para el caso de DTNB todas las enzimas se inhibieron de forma similar (Figura 9).

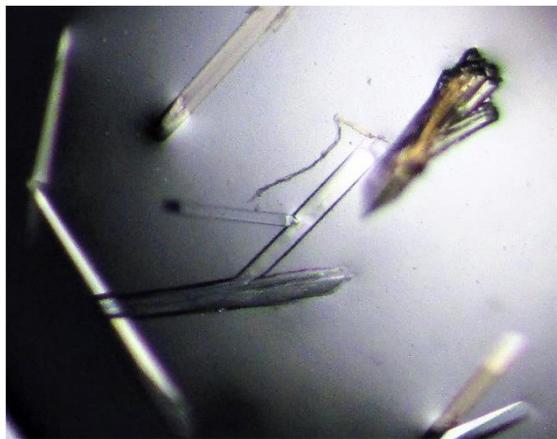


**Figura 9.** Cinética en tiempo real mostrando el efecto de GSSG, MMTS, y DTNB en la actividad enzimática de las enzimas wt SyTPI, AtcTPI y AtpdTPI. **(Izquierda)** la incubación con GSSG no produce un efecto inhibitorio en la actividad de SyTPI (triángulos negros) y AtpdTPI (cuadros azules), sin embargo, la actividad de AtcTPI (círculos rojos) disminuye al 50% a los 20 min. del ensayo. **(Centro)** La incubación con MMTS no afecta la actividad de SyTPI, a los 60 minutos del ensayo la actividad de AtpdTPI disminuye a un 80% y a este mismo tiempo la actividad de AtcTPI decrece hasta un 10%. **(Derecha)** El efecto de DTNB sobre la actividad catalítica de las tres enzimas es similar, a los 15 minutos las actividades catalíticas disminuyen a un intervalo de entre 45 y 55% mientras que, a los 60 minutos las actividades decrecen hasta un 10 a 20%.

El diferencial de inactivación entre los tres agentes tiol-conjugantes indican que AtcTPI contiene cisteínas accesibles cuyo ambiente químico propicia la conjugación o enlace con GSSG y MMTS, y que por su parte AtpdTPI y SyTPI contienen cisteínas accesibles pero que su ambiente no es propicio para reaccionar con GSSG o MMTS. La inhibición total de la actividad con DTNB y mínima ante GSSG es un comportamiento que se ha visto con anterioridad en CrTPI (Zaffagnini et al., 2014). DTNB es un compuesto cargado negativamente mientras que MMTS es neutral, y GSSG promueve la formación de un enlace disulfuro con mayor afinidad a grupos tiolatos más que con tioles (Poole, 2015).

### Estructura cristalográfica de SyTPI

Para comprender la insensibilidad de SyTPI ante la presencia de agentes tiol-



**Figura 10.** Cristales de SyTPI con forma de laminas con una dimensión máxima de 700 x 70 x 70  $\mu\text{m}$  después de una semana.

conjugantes desde una perspectiva estructural, se crecieron cristales proteicos de SyTPI en complejo con 2-fosfoglicolato (2-PGA), estos cristales se lograron difractar a una resolución de 1.6 Å (Figura 10). La estructura resuelta reveló que SyTPI se ensambla como un homodímero y que cada monómero se ensambla de forma canónica  $(\beta\text{-}\alpha)_8$  o barril TIM cuyo arreglo

consta de 8  $\alpha$ -hélices y 8 láminas  $\beta$ -plegadas (Figura 11, A).

Respecto al barril TIM, los lazos ubicados al final de cada  $\beta$ -plegada se ensamblan al frente del barril y algunos de estos están involucrados en el

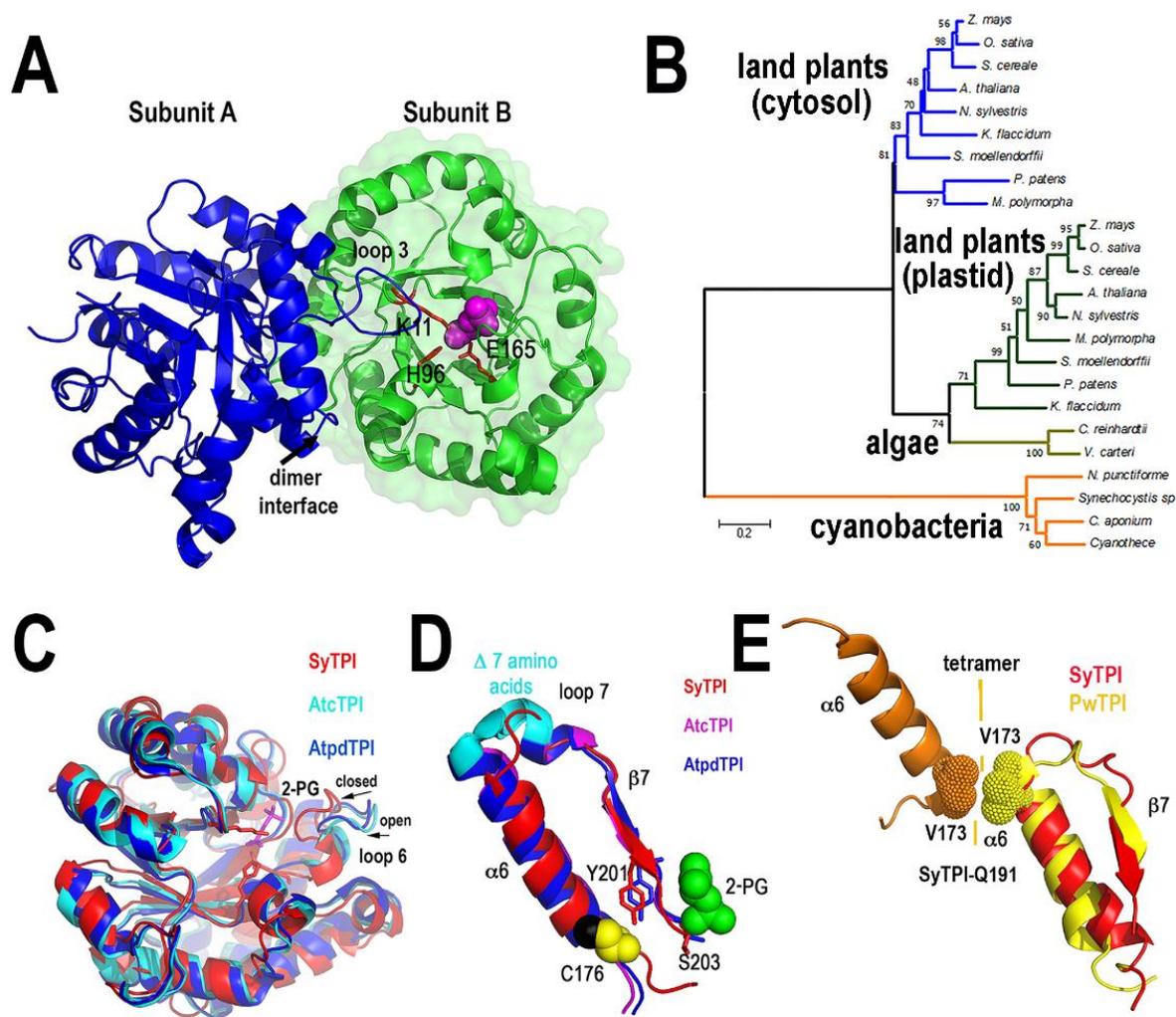
ensamblaje del dímero (lazos 1, 2, 3 y 4) y en la actividad catalítica (lazos 6, 7 y 8) (Katebi & Jernigan, 2014). Los lazos que acompañan a cada  $\alpha$ -hélice ensamblan la parte trasera del barril y su rol es meramente estructural. El sitio activo de SyTPI muestra la interacción y contacto de los residuos catalíticos Lys 11, His96, y Glu165 con el inhibidor 2-PGA (Figura 11, A). La superficie total de la interfase del dímero posee un área de 10,390 Å<sup>2</sup>.

Para tener una perspectiva evolutiva sobre las TPIs de organismos fotosintéticos, se construyó un árbol filogenético utilizando la secuencia de TPI de plantas terrestres, algas y cianobacterias (Tabla anexa 1). La topología del árbol muestra que las TPI de cianobacterias no están filogenéticamente relacionadas con las TPIs de plantas y algas, lo anterior se encuentra de acuerdo a los datos publicados con antelación por Reyes-Prieto y colaboradores (Reyes-Prieto & Bhattacharya, 2007). De igual modo la topología del árbol también nos sugiere que las TPIs de algas verdes como *C. reinhardtii*, han seguido distintas trayectorias evolutivas en comparación a las TPI de cloroplasto de plantas terrestres. (Figura 11, B).

Un alineamiento de la estructura de SyTPI con TPIs cristalizadas en ausencia de ligando (AtcTPI and AtpdTPI) (Figura 11, C) muestran que SyTPI posee una conformación cerrada del lazo 6 (Lopez-Zavala et al., 2016; Mande et al., 1994). Esta superposición o alineamiento estructural también nos indica que los elementos estructurales secundarios de SyTPI son virtualmente idénticos a los de las otras TPIs de organismos fotosintéticos. Como se comentó en secciones anteriores, SyTPI posee una delección de 7 aminoácidos en el lazo que conecta a la  $\alpha$ -hélice 6

con la  $\beta$ -plegada 7. En AtcTPI y AtpdTPI esta región se ensambla como una pequeña  $\alpha$ -hélice, en SyTPI esta región se ensambla como un loop que conecta a la  $\alpha$ -hélice 6 y a la  $\beta$ -plegada 7 (Figure 11, D), esta  $\alpha$ -hélice corta se comparte con las TPIs de arqueas como *Pyrococcus woesei* (Walden et al., 2001).

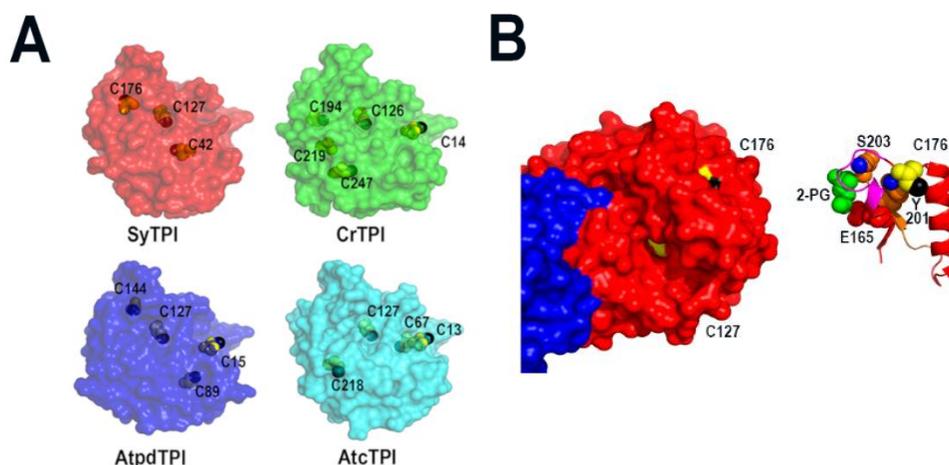
En TPIs de arqueas, una valina conservada en la  $\alpha$ -hélice 6 (Val173 en *P. woesei*) forma parte de una interfaz que al coordinarse con residuos de la  $\alpha$ -hélice 4 y 5 ensamblan el oligómero tetramérico (Figura 11, E). A pesar de que SyTPI no posee esta  $\alpha$ -hélice corta que conecta a la  $\alpha$ -hélice 6 y a la  $\beta$ -plegada 7, los residuos y los cambios estructurales necesarios para el ensamblaje del oligómero tetramérico no se presenta. La localización opuesta a la cavidad catalítica de SyTPI de la conexión entre  $\alpha$ -hélice 6 y la  $\beta$ -plegada 7 sugiere que la delección en esta  $\alpha$ -hélice no tiene un rol en la catálisis.



**Figura 11.** Estructura cuaternaria de SyTPI. (A) Representación de caricatura del homodímero de SyTPI. La interfaz del dímero está formada por la interconexión del loop 3, la subunidad A está coloreada en azul y la subunidad B en color verde. El 2-PGA está coloreado en rosa en una representación de esferas solidas y los residuos catalíticos Lys11, His96, y Glu165 están representados de forma de barras y esferas. (B) Árbol filogenético de TPIs de organismos fotosintéticos. El árbol está formado a partir de secuencias de aminoácidos representativos de TPIs de plantas terrestres, algas verdes y cianobacterias. Los valores de Bootstrap se reportan como nodos. La escala de distancia está indicada entre 0 y 1, donde 0.2 indica 20% de diferencia entre dos secuencias. (C) Superposición de las estructuras de SyTPI, AtcTPI y AtpdTPI. SyTPI presenta una conformación cerrada del loop 6. (D) Acercamiento y representación de listones de la  $\alpha 6$  y  $\beta 7$  de SyTPI, AtcTPI y AtpdTPI. AtcTPI y AtpdTPI conectan a la  $\alpha 6$  y  $\beta 7$  mediante una pequeña  $\alpha$ -hélice, mientras que SyTPI presenta una delección de siete aminoácidos y conecta estos elementos estructurales mediante un lazo corto. (E) Comparativa estructural entre la TPI tetramérica de *Pyrococcus woesei* (PDB: 1HG3) y SyTPI en la región que comprende la  $\alpha 6$  y  $\beta 7$ . En PwTPI el residuo V173 de la  $\alpha 6$  está involucrado en el ensamblaje del tetramero. SyTPI posee una glutamina (Q191) en la posición equivalente.

## Accesibilidad y reactividad de las cisteínas de SyTPI

Para entender de una forma más clara el proceso de regulación redox de las TPIs, diversos grupos de investigación han enfocado su trabajo en un aminoácido en particular, las cisteínas, dado que se ha visto que pueden fungir como elementos de regulación (Dumont, Bykova, Pelletier, Dorion, & Rivoal, 2016b; López-Castillo et al., 2016b; Zaffagnini et al., 2014). SyTPI contiene 3 cisteínas por monómero (Figure 12, A). en todas las TPIs de los organismos conocidos a la fecha, se encuentra una cisteína conservada, la cual en SyTPI corresponde a la posición 127 (SyTPI-C127) (Olivares-Illana et al., 2017). En las TPIs de organismos fotosintéticos y en las TPIs cristalizadas hasta la fecha, el grupo tiol de esta cisteína se encuentra completamente cubierto dentro de la coraza hidrofóbica (Figura 12, A) (Olivares-Illana et al., 2017).



**Figura 12.** Estructura cristalina de SyTPI mostrando las cisteínas. (A) Comparativa estructural de la localización de las cisteínas de (SyTPI, *Synechocystis sp. PCC 6803* TPI; CrTPI, *C. reinhardtii* TPI; AtcTPI citosólica de *A. thaliana* TPI; AtpdTPI de *A. thaliana* TPI). (B) Localización estructural del residuo SyTPI-Cys176. (Izquierda) Las subunidades A y B de SyTPI están coloreadas en Azul y rojo. Todas las cisteínas están de color Amarillo y los grupos tioles en color negro. El grupo tiol del residuo Cys127 está orientado hacia la coraza hidrofóbica, por el contrario, el grupo tiol del residuo Cys176 se encuentra expuesto al solvente. (Derecha) Representación de listones enfocada en el residuo Cys176. La cadena lateral del residuo Cys176 interactúa con el residuo Tyr201. El grupo hidroxilo de Tyr201 (coloreado en azul) y la cadena principal de S203 establecen interacciones de Van der Waals con Cys176. Tyr201 y Ser203 forman parte del lazo de unión a fosfatos (lazo 6).

La localización de las cisteínas en SyTPI difiere con la de otros organismos fotosintéticos (Cys14 en CrTPI, Cys15 en AtpdTPI15 y Cys13 en AtcTPI)(López-Castillo et al., 2016b; Zaffagnini et al., 2014), además de la ausencia de otra cisteína con potencial de S-glutationilación (Cys218 en AtcTPI y Cys219 en CrTPI) (Figura 12, A) (Dumont, Bykova, Pelletier, Dorion, & Rivoal, 2016a; López-Castillo et al., 2016b; Zaffagnini et al., 2014). Los residuos SyTPI-Cys42 y SyTPI-Cys176 no están conservados en CrTPI, AtcTPI y AtpdTPI (Figure 12, A). El residuo SyTPI-Cys42 se encuentra cubierto e inaccesible al solvente mientras que los residuos SyTPI-Cys127 y SyTPI-Cys176 si están expuestos y presentan áreas superficiales accesibles al solvente (SASAs por sus siglas en inglés) de 2.4 y 1.7 Å<sup>2</sup>, respectivamente (Tabla 4).

Como se mencionó anteriormente, el grupo tiol del residuo SyTPI-Cys127 está completamente embebido, mientras que el grupo tiol del residuo SyTPI-Cys176 contiene el único grupo tiol accesible a solvente en esta proteína (Figura 12, B). Un acercamiento y representación de listones del residuo SyTPI-Cys176 nos muestra que este aminoácido interactúa directamente con los residuos Tyr201 y Ser203 del lazo 6 (lazo de unión a fosfatos). El cambio conformacional que ocurre en este lazo es indispensable para la catálisis, por lo que las modificaciones o mutaciones hechas en esta zona, (por ejemplo en los residuos equivalentes a SyTPI-201 y SyTPI-S203 en la TPI de levadura) afectan severamente a la catálisis (Zhai, Amyes, & Richard, 2015). Así pues, los cambios estructurales en SyTPI-Cys176, originados por modificaciones químicas a causa de agentes redox o por mutaciones puntuales del aminoácido podrían tener un efecto importante en la catálisis.

**Tabla 4.** Área superficial accesible a solvente (SASA por sus siglas en inglés) de las cisteínas presentes en SyTPI calculadas en ANCHOR (Meireles et al., 2010).

<b>Residuo</b>	<b>SASA (Å<sup>2</sup>) de la subunidad dimerica A</b>	<b>SASA (Å<sup>2</sup>) de la subunidad dimerica B</b>
Cys42	0	0
Cys127	2.4	2.5
Cys176	1.7	1.7

Con el fin de corroborar la accesibilidad predicha de las cisteínas de SyTPI, se midieron el número de tioles accesibles mediante la técnica espectrofotométrica de Ellman (DTNB) tanto para la enzima silvestre de SyTPI como para el set de las mutantes puntuales (Tabla 5). Como se mencionó en secciones anteriores, se diseñaron un set de mutantes para neutralizar la posible participación de las cisteínas en la regulación o insensibilidad de SyTPI ante agentes REDOX. Los residuos SyTPI-Cys47 y SyTPI-Cys127 se mutaron a alanina debido a que sus grupos tioles se encuentran cubiertos dentro de la coraza hidrofóbica. El residuo SyTPI-Cys176 se cambió a serina dado que el grupo tiol se encuentra expuesto a solvente.

La sustitución del residuo Cys127 a serina en TPIs ortólogas desestabiliza la naturaleza dimerica de la estructura cuaternaria, mucho más de lo que haría una mutación a alanina (González-Mondragón et al., 2004; Hernández-Santoyo et al., 2012). Esto debe estar relacionado con el carácter hidrofóbico de las cisteínas y su incapacidad de establecer puentes de hidrógeno con el agua (Nagano, Ota, & Nishikawa, 1999). El análisis de DTNB reveló que SyTPI silvestre contiene 1.37 tioles accesibles por monómero. La mutante SyTPI-Cys127Ala disminuyó el número

de tioles accesibles a uno, SyTPI-Cys42Ala a 0.88 y SyTPI-Cys176S a 0.55. El descenso más marcado en el número de tioles accesibles por monómero lo presenta la mutante SyTPI-Cys176Ser, este dato nos indica que el residuo SyTPI-Cys176 es el que contiene el tiol accesible. Por otro lado, las mutantes de los residuos SyTPI-Cys42 y SyTPI-Cys176 muestran un mínimo descenso en el número de tioles expuestos o accesibles. (Tabla 5). En resumen, la determinación de la accesibilidad de los tioles de las cisteínas por DTNB nos indica que el residuo SyTPI-Cys176 posee un tiol accesible y que los grupos tiol tanto SyTPI-Cys42 como SyTPI-Cys127 se encuentran parcialmente accesibles.

**Tabla 5.** Tioles accesibles en SyTPI silvestre y mutantes determinados por DTNB.

Enzima	Tioles accesibles por monómero
SyTPI	1.37±0.08
Cys42Ala	0.88±0.02
Cys127Ala	1.01±0.07
Cys176Ser	0.55±0.05

### **Las mutaciones de las cisteínas de SyTPI reducen la actividad catalítica y la estabilidad**

Para entender el efecto que modificar a las cisteínas de SyTPI por medio de mutaciones puntuales tiene sobre la actividad catalítica, se midieron las actividades de SyTPI Wt y de todo el set de mutantes, 3 sencillas, 3 dobles y una triple (Tabla 3). Los resultados mostraron que la actividad de las mutantes sencillas SyTPI-Cys42Ala, SyTPI-Cys127Ala y SyTPI-Cys176Ser disminuye a un 76 a 77% de la actividad de la enzima sin modificación. Por su lado la actividad de las dobles mutantes Cys42Ala/Cys127Ala y Cys42Ala/Cys176Ser se redujo a un 63% de la

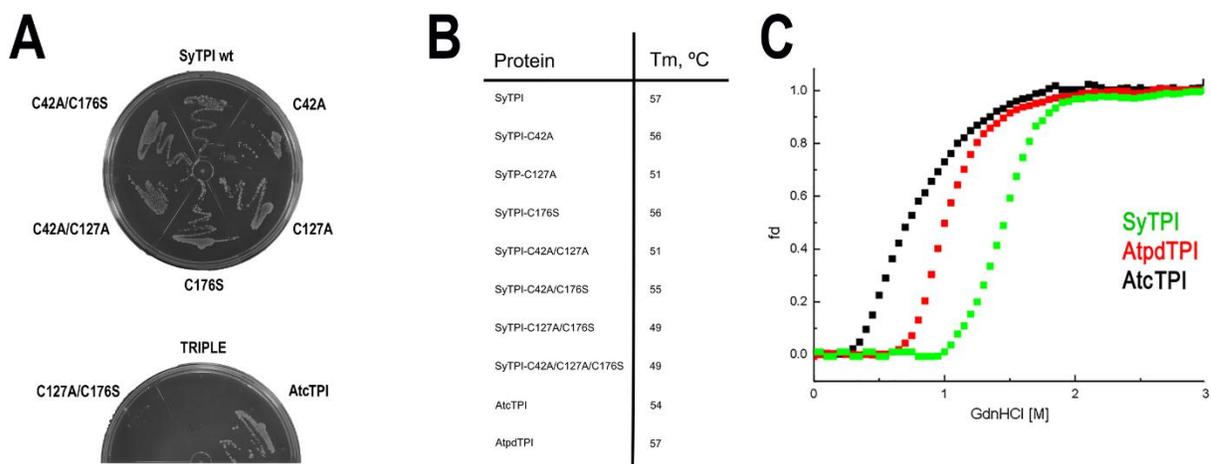
actividad de la enzima silvestre, para el caso de la mutante doble y triple la disminución de la actividad fue drástica, presentando la doble mutante Cys42Ala/Cys176Ser una disminución equivalente al 24.8% y la triple mutante Cys42Ala/Cys127Ala/Cys176Ser de 0.68% de la actividad de SyTPI silvestre (Tabla 3).

Los parámetros cinéticos observados para las mutantes de SyTPI se correlacionan con la capacidad de complementar en una cepa *E. coli*  $\Delta$ TPI (Sullivan et al., 2011), esta cepa al tener mutado de forma insercional el gen de TPI la única manera en que puede crecer en un medio mínimo es mediante la complementación con versiones de TPI funcionales. Los resultados de la complementación mostraron que las tres mutantes sencillas y las dobles mutantes Cys42Ala/Cys127Ala y Cys42Ala/Cys176Ser son capaces de complementar *in vivo*, mientras que para la doble mutante Cys127Ala/Cys176Ser se logran observar algunas cuantas colonias y no se logra observar complementación para la triple mutante Cys42Ala/Cys127Ala/Cys176Ser (Figura 13, A). Dado que ninguna cisteína de SyTPI se encuentra cerca del sitio activo es probable que el decremento observado en la actividad de la doble mutante SyTPI-Cys127Ala/Cys176Ser y la triple mutante se asocie con la disminución de la estabilidad debido a la acumulación de mutaciones (Bloom & Arnold, 2009).

Con el fin de investigar si la introducción de mutantes puntuales en las cisteínas de SyTPI está realmente asociado a la disminución de la estabilidad, se realizó a las mutantes sencillas dobles y triple un ensayo de estabilidad térmica basado en fluorescencia para tener un panorama comparativo de la estabilidad de

las mutantes respecto a la versión Wt (Huynh & Partch, 2015; Lo et al., 2004). La enzima SyTPI silvestre mostró un punto de fusión ( $T_m$ ) de 57°C, la  $T_m$  de las mutantes Cys176Ser y Cys42Ala solo se redujo 1°C, mientras que para la mutante Cys127A la disminución fue de entre 6–8°C. La doble Cys127Ala/Cys176Ser y la triple Cys42Ala/Cys127Ala/Cys176Ser de nueva cuenta presentan los cambios más abruptos, correlacionando los datos con la falta de complementación *in vivo* que también nos da evidencia sobre la estabilidad y actividad de la enzima (Figura 13, B) así como con la reducción en la actividad catalítica también mostrada por estas mutantes (Tabla 6). Debido a que una mutación doble convierte a SyTPI inactiva, surge la interrogante sobre el comportamiento de la estabilidad de SyTPI en comparación con la estabilidad de las TPIs de plantas terrestres. Para dar respuesta a esta interrogante, se determinó la estabilidad de SyTPI, AtcTPI, y AtpdTPI mediante un ensayo de desnaturalización química tomando en cuenta la energía libre de Gibbs del plegado proteico (Figura 13, C).

Todas las TPIs exhiben un proceso de desplegamiento de dos fases sin la presencia de intermediarios. Esta observación sugiere que las interacciones cuaternarias son necesarias para la estabilización o para el plegado del estado monomérico (Tabla 6). Este análisis indica que la proteína más estable es SyTPI, seguido de AtpdTPI, mientras que AtcTPI es la proteína menos estable. La energía libre de Gibbs para SyTPI implica que esta proteína es más resistente al desplegamiento en comparación a las TPIs de plantas AtcTPI o AtpdTPI.



**Figura 13.** (A) Placas de agar M63 (medio mínimo) mostrando la complementación *in vivo* en células de *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ TPI de los plásmidos que expresan las versiones de SyTPI wt y mutantes, se utilizó el plásmido de AtcTPI wt como control positivo. (B) Perfiles de desnaturalización térmica de SyTPI wt y mutantes, se utilizó como marco comparativo y como controles positivos a las TPIs de plantas. (C) Curvas de desnaturalización con Gdn-HCl de SyTPI, AtcTPI y AtpdTPI. El eje “y” representa el porcentaje de desplegamiento de la proteína (fd) y el eje “x” la concentración de Gdn-HCl.

**Tabla 6.** Parámetros termodinámicos del desplegamiento de SyTPI, AtcTPI y AtpdTPI. \*Concentración de GdnHCl necesaria para alcanzar el punto medio de la desnaturalización.

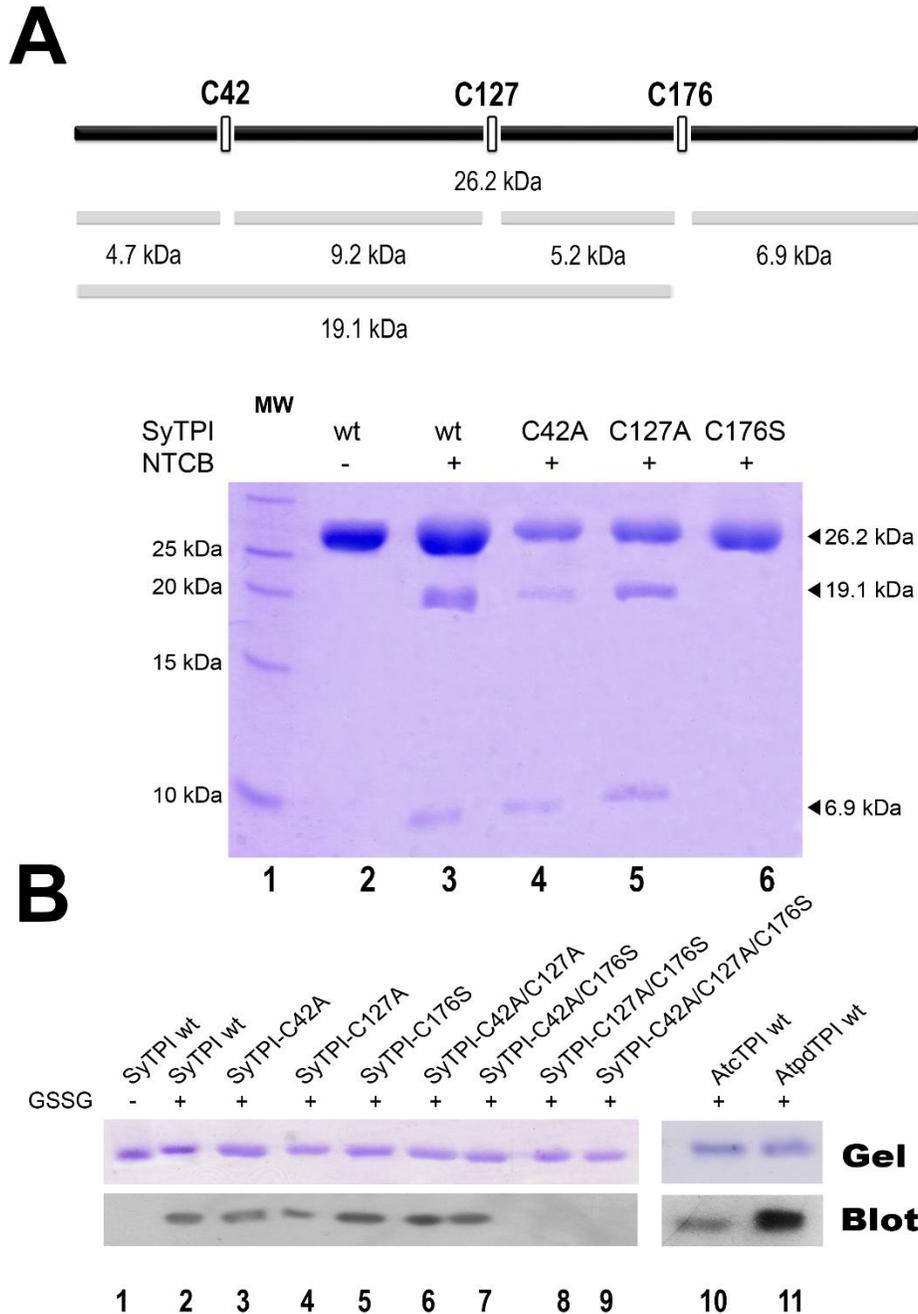
Enzima	$\Delta G_D^{H_2O}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	*[GdnHCl] 50% (M)
SyTPI	64.8 ± 2.5	23.8 ± 1.0	1.4 ± 0.1
AtpdTPI	50.5 ± 2.1	19.5 ± 1.5	1.0 ± 0.1
AtcTPI	41.2 ± 1.5	14.0 ± 1.0	0.72 ± 0.1

### Identificación de tioles accesibles y reactivos mediante escisión química con (NTCB).

El análisis de la estructura cristal de SyTPI indicó que el residuo SyTPI-Cys176 contiene el único grupo tiol que se encuentra expuesto al solvente. Por otro lado, la cuantificación por DNTB mostró que SyTPI contiene más de un grupo tiol accesible por monómero (Tabla 5), por lo que resulta posible que SyTPI-Cys176

sea un sitio de regulación mediado por la unión a glutatión. Para probar esta hipótesis, se determinó la accesibilidad y reactividad de SyTPI silvestre y de las mutantes sencillas con ayuda de (NTCB) bajo condiciones nativas. El peso molecular predictivo esperado de los productos de escisión considerando que todas las cisteínas de SyTPI están expuestas al solvente corresponderían a fragmentos de 4.7, 9.2, 5.2, y 6.9 kDa (Figura 14, A).

Los resultados del experimento mostraron que la reacción de escisión de NTCB en SyTPI genera dos fragmentos proteolíticos de aproximadamente 20 y 7 kDa. Estos fragmentos corresponden a los pesos moleculares de los fragmentos predichos para la proteólisis del residuo Cys176, indicando que este residuo contiene el único grupo tiol en SyTPI que se encuentra expuesto al solvente. El patrón de escisión en las mutantes sencillas Cys42Ala y Cys127Ala muestran un patrón de corte idéntico al de SyTPI silvestre, lo cual refuerza la idea de que NTCB solo reacciona con Cys176. Esta observación se corrobora con la ausencia de proteólisis en la mutante Cys176 (Figura 14, A).



**Figura 14.** Identificación bioquímica de las cisteínas expuestas de SyTPI. **(A)** Fragmentos de corte por NTCB. Las barras de la parte superior representan los posibles sitios de corte en SyTPI así como el tamaño esperado de los fragmentos proteolíticos. Las muestras fueron digeridas con NTCB y analizadas por SDS-page. Los fragmentos de corte por NTCB de 19.1 y 6.9 kDa corresponden a los residuos del corte de la cisteína 176 de SyTPI silvestre. **(B)** Identificación de S-glutathionilación en SyTPI mediante Western blot. Las enzimas purificadas wt y mutantes fueron incubadas en la presencia de glutatión oxidado (GSSG). Las proteínas en el gel SDS-Page fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para su análisis por Western blot, las TPI de plantas AtcTPI y AtpdTPI fueron utilizadas como control positivo. Se detectó S-glutathionilación en SyTPI silvestre, en las mutantes sencillas y en las mutantes dobles Cys42Ala/Cys127Ala y Cys42Ala/Cys176Ser (carriles 2–7) y en los controles positivos (carriles 10–11), sin embargo, no se detectó señal en la doble mutante Cys127Ala/Cys176Ser ni en la triple mutante Cys42Ala/Cys127Ala/Cys176Ser (carriles 8 y 9).

La S-glutationilación es una modificación postraducciona que protege de la oxidación a los grupos tiol de las cisteínas, es una modificación redox que puede modular la actividad catalítica de la enzima. Se sabe que las TPIs de diferentes especies son blancos de s-glutationilación y para identificar si SyTPI también es blanco de S-glutationilación, se probó si la versión SyTPI silvestre y mutantes pueden ser glutacionadas. Un anticuerpo biotinilado específico para glutatión (BioGSSG) que interactúa con proteínas glutacionadas detectó S-glutationilación en residuos de SyTPI y en los controles positivos AtcTPI y AtpdTPI cuando se llevó a cabo un análisis por medio de un ensayo de Western blot (Figura 14, B, carriles 1, 9, y 10). La S-glutationilación fue detectada en las mutantes sencillas Cys42Ala, Cys127Ala y Cys176Ser indicando que por lo menos dos de las cisteínas de SyTPI pueden reaccionar con el glutatión (Figura 14, B, carriles 2, 3, 4). También se detectó señal en las dobles mutantes Cys42Ala/Cys127Ala, Cys42Ala/Cys176Ser, pero no en la Cys127Ala/Cys176Ser ni tampoco para la triple Cys42Ala/Cys127Ala/Cys176Ser (Figura 14, B, carriles 5, 6, 7, 8). Lo que estos resultados indican es que tanto el residuo Cys127 como el Cys176 son blancos de S-glutationilación *in vitro*.

## Discusión

Los mecanismos de señalización basados en oxido-reducción, como la S-glutathionilación y la S-nitrosilación, juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad enzimática bajo condiciones de estrés. Estos mecanismos dependen de la reactividad de las cisteínas expuestas. En este trabajo se encontró que la actividad enzimática de SyTPI no se ve afectada por la interacción con agentes tío-conjugantes a concentraciones a las cuales la TPI citosólica y cloroplastidica de plantas (*A. thaliana*) se encuentran totalmente inhibidas (Figura 7, D). SyTPI está involucrada en procesos oxidativos y reductores del metabolismo del carbono, lo que significa que es participe de la glucólisis y el ciclo de Calvin-Benson, por lo que la integridad de esta enzima es crítica en *Synechocystis*. Así que es plausible predecir que la TPI de cianobacteria evolucionó para evitar la oxidación irreversible de sus cisteínas en ácido sulfínico o sulfónico (Zaffagnini, Bedhomme, Lemaire, & Trost, 2012).

Una comparativa entre las cisteínas accesibles en TPIs de organismos fotosintéticos (Figuras 7A y 11A) muestran que la única cisteína conservada es la equivalente a SyTPI-Cys127. Los resultados del Western blot mostraron que los residuos SyTPI-Cys176 y SyTPI-Cys127 son glutathionados *in vitro* (Figura 14, B), estos datos contrastan con los patrones de corte de NTCB y con la localización estructural del grupo tío SyTPI-Cys127 (Figura 14, A). La S-glutathionilación de residuos análogos al de SyTPI-Cys127 se ha observado en estudios proteómicos de la TPI de humano, levadura, plantas y en otras cianobacterias (Dumont et al.,

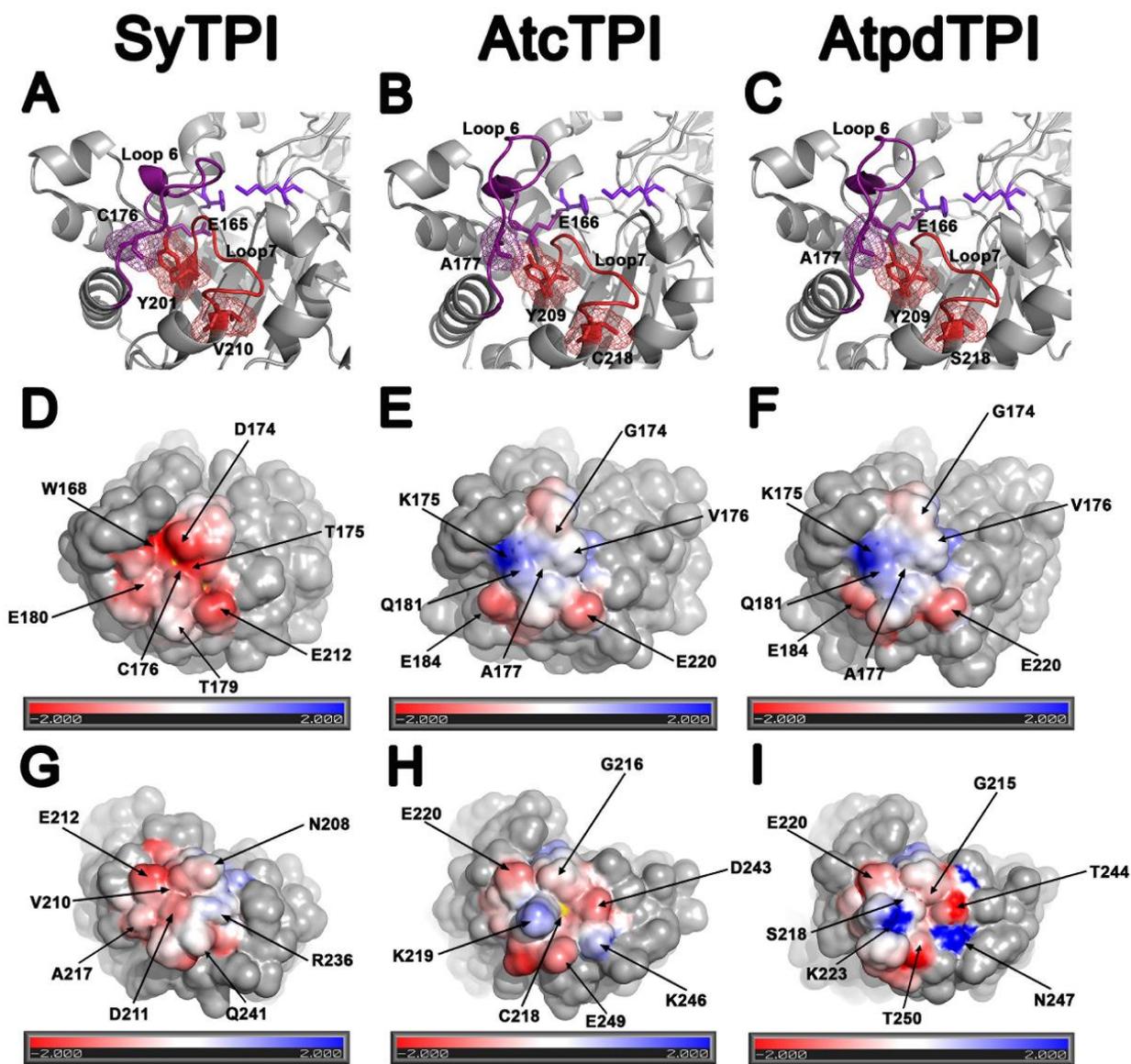
2016a; McDonagh, Ogueta, Lasarte, Padilla, & Bárcena, 2009). El residuo Cys127 está involucrado en la estabilización del dímero (González-Mondragón et al., 2004; Hernández-Santoyo et al., 2012; McDonagh et al., 2009; Samanta, Banerjee, Murthy, Balaram, & Balaram, 2011). En este trabajo se plantea que la S-glutathionilación del residuo conservado Cys127 en TPIs puede ser producto de una exposición transitoria de este grupo por lo que no se considera un blanco relevante de S-glutathionilación.

AtcTPI, CrTPI, y AtpdTPI poseen una cisteína conservada (AtcTPI-Cys13, CrTPI-Cys14, and AtpdTPI-Cys15) localizada entre  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  (Figuras 15, A). Esta cisteína presenta un diferencial en la accesibilidad en las TPI de *T. cruzi* y *T. brucei* y se sabe que es un blanco de S-glutathionilación en AtcTPI and AtpdTPI (López-Castillo et al., 2016b). AtcTPI también presenta una cisteína en la posición 218 (AtcTPI-Cys218) la cual esta remplazada por una serina en AtpdTPI. Se ha postulado que AtcTPI-Cys218 es el principal blanco de modificaciones redox en AtcTPI (López-Castillo et al., 2016b).

El hecho de que SyTPI no sea susceptible a agentes redox puede explicarse por la ausencia de una cisteína en la posición equivalente a AtcTPI-Cys218. SyTPI presenta un solo residuo expuesto SyTPI-Cys176 (Figura 15, A), que interactúa directamente con el residuo Tyr201 y Ser203 del asa o lazo 6. El cambio conformacional de este lazo es indispensable para la catálisis y se sabe que las mutaciones a este residuo en la TPI de levadura interfieren a la catálisis (Zhai et al., 2015). Así pues, la principal pregunta en todo esto es como la actividad catalítica SyTPI no se ve afectada por la modificación del residuo SyTPI-Cys176. Para

entender esta interrogante se realizó un análisis electroestático en la periferia del residuo SyTPI-Cys176 (Figura 15, D), como podemos ver, este residuo está rodeado por aminoácidos que poseen un potencial electroestático negativo (Asp174, Glu212, Glu180) limitando el potencial de SyTPI-Cys176 de interactuar con GSSG o  $H_2O_2$ , por su lado AtpdTPI y AtcTPI contienen una alanina en la posición equivalente a SyTPI-Cys176 (Figuras 15, D-F).

Aunque SyTPI contiene un tiol accesible, el ambiente estructural de éste dificulta su interacción con GSSG o  $H_2O_2$ . La inactivación de SyTPI por DTNB, pero no por GSSG y MMTS (Figura 9) podría deberse a la alta reactividad de DTNB. Un fenómeno similar se ha observado en la conjugación de CrTPI con DTNB pero no con GSSG, en donde las muestras incubadas de CrTPI con DTNB inhiben la actividad enzimática, pero al realizar el mismo experimento con GSSG la catálisis no se ve afectada. La idea de que el residuo SyTPI-Cys176 no es un blanco de S-glutathionilación *in vivo* se ha corroborado en otros trabajos mediante análisis proteómicos (Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., Lemaire, S. D., & Decottignies, 2015).



**Figure 15.** Fundamento estructural de la resistencia ante agentes redox de. (A–C) acercamiento a la  $\alpha$ -hélice 7 mostrando los residuos SyTPI-Val210 (A), AtcTPI-Cys218 (B) y AtpdTPI-Ser218 (C) En color rojo como representación de barras, los tres residuos están localizados cerca de una tirosina (SyTPI-Tyr201, AtcTPI-Tyr209, y AtpdTPI-Tyr209) del motivo YGGGS, que hace contacto con los residuos localizados inmediatamente después (SyTPI-Cys176, AtcTPI-Ala177, and AtpdTPI-Ala177) del residuo catalítico (SyTPI-Glu165, AtcTPI-Glu166, y AtpdTPI-Glu166). Los potenciales electrostáticos cerca de los residuos SyTPI-Cys176, AtcTPI-Ala177, y AtpdTPI-Ala177 (D–F), y SyTPI-Ala217, AtcTPI-Cys218, y AtpdTPI-Ser218 (G–I). Los aminoácidos cargados negativamente se muestran de color rojo y los cargados positivamente de color azul. El grupo tiol de SyTPI-Cys176 y de AtcTPI-Cys218 están coloreados de color amarillo.

La S-glutationilación del residuo AtcTPI-Cys218 no puede modificar el contexto estructural del lazo 7 el cual está muy cercano al aminoácido Glu166 (López-Castillo et al., 2016b). Un acercamiento de los aminoácidos cercanos al residuo AtcTPI-Cys218 muestran que esta región mayoritariamente presenta una carga electronegativa (Figure 15, H). En SyTPI y AtpdTPI, esta región no contiene cisteínas, su lugar lo ocupa una alanina o serina, respectivamente, las cuales no son blanco de oxidación (Figura 15, I).

Tomando como base el análisis función-estructura de este trabajo, se puede postular que SyTPI en el cloroplasto de plantas fue remplazado por una copia duplicada de la TPI citosólica, todo esto debido en gran parte a la incapacidad de ser regulada por S-glutationilación o por compuestos redox. El residuo SyTPI-Cys176 es resistente a ser modificado por S-glutationilación o por agentes redox debido a la carga negativa de su ambiente estructural. Por lo tanto, podemos especular que el camino evolutivo que la naturaleza tomó fue la alta susceptibilidad ante agentes redox de la enzima AtcTPI además de la capacidad de poder ser regulada por S-glutationilación, para evolucionar en una AtpdTPI resistente a agentes redox pero capaz de ser regulada, posiblemente en el residuo AtpdTPI-Cys14. Descartando a la TPI bacteriana (SyTPI en nuestro modelo de estudio) por su alta resistencia a ser modificada de forma postraducciona.

## Capítulo II

### **Mimetización de modificaciones REDOX mediante mutaciones puntuales de las cisteínas de AtcTPI como fundamento estructural de la regulación de la actividad catalítica.**

#### **Introducción**

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROS) y la S-glutacionilación modulan la actividad de la triosafosfato isomerase citosólica de plantas (cTPI). Y la TPI citosólica de *Arabidopsis thaliana* (AtcTPI) no es la excepción, su actividad está sujeta a regulación redox por medio de dos cisteínas reactivas, las cuales funcionan como elemento de control o interruptores. En este trabajo se investigó el papel de los residuos, AtcTPI-Cys13 y At-Cys218, mediante su sustitución por mutagénesis sitio-dirigida, los aminoácidos por los cuales la cisteína fue intercambiada mimetizan los aductos producidos de la conjugación del grupo tiol, así como los ácidos sulfínico y sulfónico, productos de la oxidación irreversible de la cisteína. Los estudios cristalográficos muestran que la modificación del residuo AtcTPI-Cys13 propicia la formación de monómeros inactivos debido al reacomodo del residuo Phe75 de la subunidad vecina, lo que desestabiliza la interfaz del dímero. Por su lado, las modificaciones realizadas al residuo AtcTPI-Cys218 generan diferentes versiones estructurales de la TPI con una variedad de decrementos de la actividad catalítica debido a la modificación estructural de las asas 6 y 7, cuya integridad estructural es necesaria para el ensamblaje del sitio activo. A diferencia de las mutaciones en el residuo AtcTPI-Cys13, las mutaciones en AtcTPI-Cys218 no alteran la naturaleza

dimérica de AtcTPI. Así pues, las modificaciones a los residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218 modifican la actividad catalítica de AtcTPI debido a la inducción y formación de monómeros inactivos, así como la estructura del sitio activo de la enzima dimérica, respectivamente. La identidad del residuo AtcTPI-Cys218 se encuentra conservada en la mayoría de las TPIs citosólicas de plantas, esta conservación y la exposición a solvente, lo hace el blanco más probable de regulación ante daño oxidativo a causa de EROs. Los datos presentados en este trabajo revelan los mecanismos estructurales por los cuales la S-glutacionilación además de proteger a AtcTPI de modificaciones químicas irreversibles, promueve el reordenamiento de las rutas del metabolismo del carbón a la ruta de las pentosas fosfato para disminuir el estrés oxidativo, colocando a AtcTPI como un elemento de regulación.

La formación de dímeros de proteínas ocurre mediante una gran variedad de interacciones proteína-proteína, entre las que podemos mencionar la interacción entre el asa 1 de una subunidad con el asa 3 de la subunidad vecina, (Lara-Gonzalez et al., 2015; Wierenga, Kapetaniou, & Venkatesan, 2010b). Las modificaciones estructurales en cualquiera de estas dos asas resultan en la afectación de la dimerización, afectando la actividad catalítica de aquellas enzimas cuya función depende de la estructura cuaternaria como es el caso de la TPI. Debido al rol de la TPI en las rutas del metabolismo central originaron que esta enzima se encuentre conservada en todos los organismos, desde bacterias hasta plantas y animales. El genoma nuclear de plantas con flores codifica dos TPI completamente funcionales, una versión citosólica y otra con señalización de exportación a

cloroplasto (Chen & Thelen, 2010; Dumont et al., 2016b; López-Castillo et al., 2016a). Como se mencionó en apartados anteriores, la TPI cloroplastidica (pdTPI) deriva de una duplicación génica proveniente de la TPI citosólica (cTPI), esta duplicación reemplazo a la TPI de origen cianobacteriano (Reyes-Prieto & Bhattacharya, 2007). La actividad de la TPI citosólica y cloroplastidica en plantas terrestres está sujeta a diferentes mecanismos regulatorios. Por ejemplo, la actividad de cTPI incrementa durante el crecimiento para proveer de acetil coenzima A para el ciclo del ácido cítrico y disminuye hasta inhibirse con la S-glutathionilación (Ito et al., 2003; Dorion et al., 2005; Flugel et al., 2017).

Otros casos como la levadura y la papa (*Solanum tuberosum*) cuentan con variantes de TPI las cuales presentan un diferencial en la actividad catalítica, cuestión que les permite reorientar el flujo de carbono hacia la ruta de las pentosas fosfato (PPP) (Ralser et al., 2007; Dorion et al., 2012; Valancin et al., 2013). En plantas, las EROs son subproductos del metabolismo, a pesar de que también son una respuesta ante estrés abiótico (Kim et al., 2011), una gran variedad de enzimas también son sus blancos (Dixon et al., 2005; Zaffagnini et al., 2012b, 2013). Las cisteínas de estas enzimas juegan un papel predominante en esta interacción como los blancos directos de modificación por redox. El grupo tiolato es reactivo con peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ), y con el anión superóxido ( $O_2\bullet$ ).

Por lo que, el estrés oxidativo puede inducir modificaciones postraduccionales progresivas (PTM) del grupo tiol, convirtiéndolo en ácido sulfénico (-SOH), sulfínico (-SO<sub>2</sub>H), y sulfónico (-SO<sub>3</sub>H) (Ito et al., 2003), estos das

últimas reacciones son irreversibles (Jacob et al., 2004; Murray et al., 2012). Las cisteínas también pueden ser modificadas de forma reversible por medio de la S-glutationilación, la S-nitrosilación y por la formación puentes disulfuro (Zaffagnini et al., 2012a, 2012b).

Diversos estudios han mostrado que las TPI provenientes de organismos fotosintéticos son blanco de S-glutationilación y nitrosilación (Ito et al., 2003; Dixon et al., 2005; Zaffagnini et al., 2014; Dumont et al., 2016; Lopez-Castillo et al., 2016). Sin embargo, el efecto de la S-glutationilación en la TPI difiere entre las especies. Por ejemplo, la S-glutationilación en la TPI citoplásmica de *A. thaliana* produce una pérdida concomitante de la actividad catalítica, la cual puede ser revertida por la adición de glutatión reducido (GSH) o por DTT (Ito et al., 2003), así mismo la S-glutationilación solo induce una ligera reducción en la actividad de la TPI cloroplastidica de *Arabidopsis* y *Chlamydomonas* (CrTPI) (Zaffagnini et al., 2014; Lopez-Castillo et al., 2016) y como se observó en el capítulo 1 de este trabajo, la S-glutationilación genera un efecto despreciable en la actividad catalítica de la TPI de la bacteria fotosintética *Synechocystis* (SyTPI) (Zaffagnini et al., 2014; Lopez-Castillo et al., 2016).

Con base en la estructura cristalográfica de cTPI de *A. thaliana* (AtcTPI) se ha hipotetizado que la S-glutationilación y las modificaciones químicas de los residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218 podrían ocasionar la inactivación enzimática por la promoción de la formación de especies monoméricas inactivas o por la modificación del sitio activo de la enzima (Lopez-Castillo et al., 2016). Para entender como la S-glutationilación y las modificaciones mediadas por EROs en los

residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218 afectan la actividad enzimática de AtcTPI, se creó un set de mutantes puntuales en ambos residuos. Estas mutaciones puntuales mimetizan el efecto de la oxidación de las cisteínas (ácido aspártico) (Miyata et al., 2012), la unión con agentes tiol-conjugantes (tirosina y lisina) y a aminoácidos que anulan la existencia de la cisteína con el mínimo efecto estructural (alanina y serina). Los resultados mostraron que la mutación de AtcTPI-Cys13 a ácido aspártico promueve la formación de monómeros y que, por el contrario, las mutaciones al residuo AtcTPI-Cys218 a tirosina, ácido aspártico y lisina dieron como resultado versiones de la enzima con una actividad catalítica disminuida, lo anterior a causa de cambios conformacionales ocurridos cerca al sitio activo.

En resumen, los datos mostrados en este trabajo indican que las modificaciones químicas de los residuos AtcTPI-Cys218 y AtcTPI-Cys13 originan enzimas inactivas por dos diferentes mecanismos.

## **Hipótesis**

En este trabajo se propone que la S-glutationilación de cAtTPI es un mecanismo de protección enzimático contra la oxidación irreversible de las cisteínas, así como para disminuir la actividad enzimática de forma reversible para reorientar el metabolismo del carbono hacia la ruta de PPP para disminuir el estrés oxidativo mediante la modificación del estado oligómero y el sitio activo de la TPI. (Dumont et al., 2016; Lopez-Castillo et al., 2016).

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar el efecto que tiene la modificación de los residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218 sobre la actividad catalítica y su papel en el mecanismo de regulación de AtcTPI.

### **Objetivos específicos**

Determinar la influencia del residuo AtcTPI-Cys13 en el papel regulatorio de AtcTPI.

- Caracterización bioquímica de blancos de regulación

- Generación de mutantes sencillas

- Ensayos de complementación *in vivo*

- Determinación de parámetros catalíticos

- Derivatización con agentes oxidantes

- Ensayos de dilución

Determinar la influencia del residuo AtcTPI-Cys218 en el papel regulatorio de AtcTPI.

- Caracterización bioquímica de blancos de regulación

- Generación de mutantes sencillas

- Ensayos de complementación *in vivo*

- Determinación de parámetros catalíticos

- Derivatización con agentes oxidantes

## Materiales y métodos

### Diseño de los genes sintéticos para expresión y mutagénesis sitio dirigida.

El marco de lectura de AtcTPI fue optimizado de los codones para su expresión recombinante en *E. coli*, el gen se sub-clonó dentro los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* de un vector pET19 modificado con el sitio de corte de la enzima precisión proteasa. La mutagénesis sitio-dirigida para el residuo AtcTPI-Cys13 se realizó utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el residuo AtcTPI-Cys218 las mutantes se construyeron utilizando el protocolo de Quick-change (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida se muestran en la tabla 8. La expresión y purificación de las AtcTPIS se llevó a cabo en células de *E. coli* tanto para estudios cristalográficos como para los ensayos bioquímicos (Sullivan et al., 2011). La purificación de las proteínas se hizo siguiendo el mismo protocolo que se presentó en el capítulo 1.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida de los residuos AtcTPI-C13 y AtcTPI-C218.

Mutante	Secuencia
Cys13Ala (GCC)	5'GACGACAAGCATATGGCTCGTAAATTCTTCGTTGGTGGTAACTGGAAAAGCCAACGGTACCGCTGAAGAAG3'
Cys13Ser(AGC)	5'GACGACAAGCATATGGCTCGTAAATTCTTCGTTGGTGGTAACTGGAAAAGCAACGGTACCGCTGAAGAAG3'
Cys13Met(ATG)	5'GACGACAAGCATATGGCTCGTAAATTCTTCGTTGGTGGTAACTGGAAAATGAACGGTACCGCTGAAGAAG3'
Cys13Asp(GAC)	5'GACGACAAGCATATGGCTCGTAAATTCTTCGTTGGTGGTAACTGGAAAGACAACGGTACCGCTGAAGAAG3'
C-Terminal_ Cys13LP	5'TTAGCAGCCGGATCCTCAAGCAGATTTTTTAAC3'
Cys218AlaUpper	GCCTGACCACCCAGTTCTTTGGCGTTACCACCGTTAACAGAA
Cys218AlaLower	TTCTGTTAACGGTGGTAAACGCCAAAGAAGTGGGTGGTCAGGC
Cys218SerUpper	GCCTGACCACCCAGTTCTTTGCTGTTACCACCGTTAACAGAA
Cys218SerLower	TTCTGTTAACGGTGGTAAACAGCAAAGAAGTGGGTGGTCAGGC

Para la cristalización de las proteínas de AtcTPI, las mutantes fueron concentradas a 14 mg/mL<sup>1</sup> en una solución amortiguadora conteniendo 20 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl y 2 mM DTT. Al igual que en el capítulo 1, los cristales se obtuvieron mediante la técnica de la gota colgante.

Los sets de datos de cada mutante se recolectaron en el Advanced Photon Source utilizando un cristal de proteína único. Los datos fueron procesados con MOSFLM (Battye et al., 2011) y escalados con AIMLESS, mediante el uso del programa CCP4 Software Suite (McNicholas et al., 2011). Las estructuras cristalográficas de las mutantes de AtcTPI fueron resueltas con remplazo molecular. Los ensayos de complementación *in vivo* y la determinación de los parámetros catalíticos se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el capítulo 1

### **Experimentos de dilución para la determinación de la constante aparente de disociación.**

La constante aparente de disociación ( $appK_{diss}$ ) del dímero de AtcTPI Wt y mutantes fue estimada a partir de experimentos de dilución y medición posterior de la actividad catalítica. Las proteínas fueron incubadas por 24 h a 25°C a diferentes concentraciones (de 1000 ng/mL a 50 ng/mL) en una solución amortiguadora conteniendo TEA 100 mM, 10 mM EDTA y 1 mM DTT a pH 8.0. Posterior a la incubación la actividad se determina como se explica en el capítulo 1. Los datos fueron normalizados con el valor de actividad más alto obtenido.

## **Resultados**

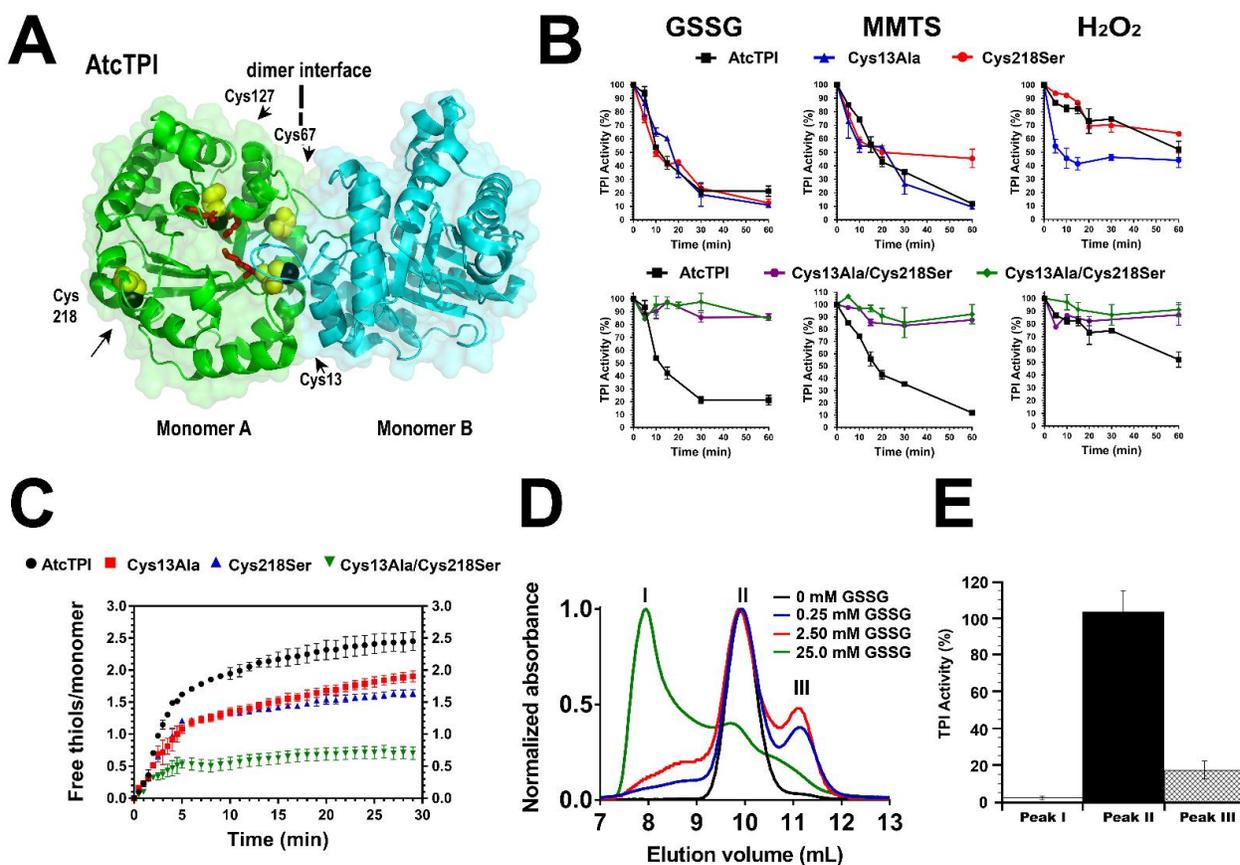
### **Reactividad de los residuos Cys13 y Cys218**

AtcTPI posee cuatro cisteínas en las posiciones 13, 67, 127, y 218. De estos residuos, se sabe que Cys13, Cys127, y Cys218 se pueden S-glutacionar *in vitro* (Dumont et al., 2016; Lopez-Castillo et al., 2016). La estructura cristalina de AtcTPI muestra que los grupos tioles de los residuos Cys13 y Cys218 están expuestos al solvente, mientras que los grupos tiol de los residuos Cys67 y Cys127 están completamente embebidos (Figura 16, A) (Lopez-Castillo et al., 2016). La identidad del residuo 127 corresponde a la cisteína conservada en todas las TPIs conocidas hasta hoy en día (Olivares-Illana et al., 2017) y su S-glutacionilación es aún incierta, dado que el grupo tiol de este residuo siempre se encuentra oculto. Se sabe de otros trabajos y por lo que se observó en el capítulo 1 que las mutaciones a la cisteína 127 disminuyen la estabilidad térmica y la asociación dimérica, por lo que este residuo es crítico para la estabilización de la interfaz del dímero (Gonzalez-Mondragon et al., 2004; Samanta et al., 2011). La inaccesibilidad del grupo tiol del residuo Cys127 y su tendencia para ser blanco de regulación resulta paradójico.

La mayoría de las TPIs incluyendo la de *Zea mays* TPI (ZmTPI), se disocian en monómeros desplegados, sugiriendo que la posible glutacionilación del residuo Cys127 puede ocurrir en el estado desplegado (Tellez et al., 2008; Romero-Romero et al., 2018) o también puede evidenciar la exposición transitoria del grupo tiol a la superficie, como se sugirió en el capítulo 1 para SyTPI. El residuo AtcTPI-Cys13 está localizado en la mitad del asa 1 y forma parte de la interfaz del dímero mediante la interacción con residuos del asa 3 de la subunidad vecina (Figura 16, A). El residuo AtcTPI-Cys13 posee una superficie accesible a solvente (SASA) de 2.7 Å<sup>2</sup>

en la estructura dimérica, mientras que para la estructura monomérica corresponde a  $129.3 \text{ \AA}^2$  (Lopez-Castillo et al., 2016).

El residuo AtcTPI-Cys218 está localizado en el extremo N-terminal de la  $\alpha$ -hélice 7, cerca del asa de unión a fosfatos, este residuo en la forma monomérica posee una SASA de  $6.7 \text{ \AA}^2$  (Lopez-Castillo et al., 2016) (Figura 16, A). La accesibilidad a solvente de los residuos AtcTPI-C13 and AtcTPI-Cys218 los vuelve blancos mucho más probables para las oxidorreductasas de las familias de la tiorredoxinas y glutaredoxinas y por tanto también objeto de estudio en este trabajo. Para entender si los residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218 son los principales blancos de S-glutacionilación y oxidación, se construyó un set de mutantes con la intención de remplazar el grupo tiol con las mínimas consecuencias estructurales posibles. Se diseñó una versión recombinante de AtcTPI silvestre conteniendo únicamente tres aminoácidos extra antes de la metionina inicial (Dumont et al., 2016; Lopez-Castillo et al., 2016). Partiendo de esta versión recombinante, se mutó el residuo AtcTPI-C13 por metionina, serina, alanina y ácido aspártico. Es de esperarse que la mutación a serina tenga efectos mínimos en las interacciones de van der Waals con lo que se espera que las perturbaciones estructurales sean menores. La decisión de mutar el residuo AtcTPI-Cys13 a alanina parte de la hidrofobicidad característica de los residuos que rodean a AtcTPI-Cys13 con lo cual se logra emular la naturaleza hidrofóbica de la cisteína (Nagano et al., 1999).



**Figura 16.** Análisis estructural de AtcTPI y su inactivación por agentes tiol-conjugantes. **(A)** Representación de listones de estructura cristalográfica de AtcTPI mostrando la localización de sus cuatro cisteínas en el monómero A y su interfaz dimerica. Los aminoácidos catalíticos conservados están representados en esferas y barras de color rojo. **(B)** Experimentos en tiempo real mostrando la inactivación de AtcTPI por agentes tiol-derivatizantes. AtcTPI en una concentración de 0.184 nM fue incubada con una concentración en exceso de 200 veces de MMTS, GSSG y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (36.8 nM). Las gráficas representan el porcentaje de AtcTPI con respecto a la muestra sin tratamiento a través del tiempo. **(C)** Determinación del contenido de tioles de AtcTPI wt y mutantes mediante análisis de DTNB. La gráfica muestra el número total de tioles reactivos por monómero durante 30 min de incubación con DTNB. El experimento fue llevado a cabo con triplicados y el resultado mostrado es el promedio de los tres experimentos. **(D)** Efecto de la incubación con glutatión en el estado oligomérico de AtcTPI. AtcTPI fue incubada con tres diferentes concentraciones de GSSG de 0.25 a 25 mM. El estado oligomérico de AtcTPI fue evaluado mediante una corrida de las muestras en una columna de filtración en gel. La AtcTPI sin tratamiento eluye como dímero con un peso molecular estimado de 50 kDa (pico II). Las incubaciones con 0.25 y 2.5 mM de GSSG dieron como resultado la aparición de un pico de proteína con un peso molecular que corresponde al del monómero de 25 kDa (pico III), mientras que la incubación con 25 mM GSSG dio como resultado la aparición de un pico desplazado hacia volúmenes de elusión bajos, lo que corresponde a agregados de proteínas (pico I). **(E)** Actividad enzimática de TPIs recuperada de los picos I y II. AtcTPI recuperada de los picos I y II mostraron menos del 20% y 4% de la actividad enzimática, respectivamente. Las muestras recuperadas del pico II mostraron una actividad enzimática equivalente a la de la enzima sin tratamiento. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Inicialmente se mutó AtcTPI-Cys218 a serina dadas las similitudes estructurales entre estos dos aminoácidos. El análisis cinético mostró que AtcTPI-Cys13Ala y AtcTPI-Cys218Ser disminuyen su actividad catalítica en un rango de 4.3 y 2.5-veces, respectivamente. En contraparte, AtcTPI-Cys13Ser mostró un decremento de 30-veces la eficiencia catalítica (Tabla 8). Estos datos sugieren que la introducción de la alanina en la posición 13 y de la serina en la posición 218 son tolerables para AtcTPI. Para determinar si la modificación de los residuos AtcTPI-Cys13 y Cys218 afectan la actividad enzimática de la TPI, se midió la susceptibilidad de las mutantes AtcTPI-Cys13Ala y AtcTPI-Cys218Ser a la reacción con glutatión oxidado (GSSG), (MMTS), y  $H_2O_2$  en un experimento de una cinética de una hora (Lopez-Castillo et al., 2016).

Las mutantes individuales de AtcTPI mostraron susceptibilidades similares a la versión silvestre ante los agentes tiol-conjugantes, mientras que la mutante AtcTPI-Cys13Ala resultó ser la más susceptible a  $H_2O_2$  (Figura 16, A y B). Estos datos sugieren que tanto AtcTPI-Cys13 como AtcTPI-Cys218 reaccionan con la misma eficacia ante agentes oxidantes y tiol reductores, sugiriendo que ambos residuos son blancos de modificaciones mediadas por EROs. Para determinar si solo estos dos residuos son los responsables de la inhibición de actividad por la conjugación y/o oxidación con agentes redox, se midió la actividad enzimática de las dobles mutantes carentes de cisteínas expuestas AtcTPI-Cys13Ala/Cys218Ser y AtcTPI-Cys13Ser/Cys218Ser posterior a la incubación con agentes tiol-conjugantes (Figura 16, B). La doble mutante AtcTPI-Cys13Ser/AtcTPI-Cys218-Ser disminuyó su actividad en una razón de 43.5 veces, mientras que la doble mutante AtcTPI-

Cys13Ala/AtcTPI-Cys218Ser solo disminuyó la actividad 5.3-veces (Tabla 9). Los dos mutantes dobles no son susceptibles a la derivatización por agentes redox como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reforzando el papel de que ambos residuos AtcTPI-Cys13 and AtcTPI-Cys218 son los únicos blancos de regulación redox en AtcTPI (Lopez-Castillo et al., 2016) (Figura 16, B).

Para reforzar estos resultados, se midió la accesibilidad de los grupos tiol de las cisteínas de la enzima silvestre y de algunas mutantes de AtcTPI mediante el ensayo de DTNB. En concordancia con los datos reportados anteriormente, AtcTPI silvestre contiene aproximadamente dos tioles accesibles por monómero, mientras que AtcTPI-Cys13Ala y AtcTPI-Cys218Ser cuentan con aproximadamente un tiol por cada monómero (Figura 16, C). La doble mutante AtcTPI-Cys13Ala/Cys218Ser mostró una reactividad limitada con DTNB, lo que nos confirma que únicos tioles expuestos son los de los aminoácidos Cys13 y Cys218. Todos estos datos concuerdan con los análisis de Western blot que han identificado a los residuos Cys13 y Cys218 como los principales blancos de S-glutacionilación (Dumont et al., 2016; Lopez-Castillo et al., 2016).

### **La incubación con GSSG propicia la formación de monómeros inactivos**

Sabiendo que la incubación con GSSG promueve la formación de monómeros inactivos de AtcTPI, se hipotetizó que el decremento en la actividad de AtcTPI ante la presencia de agentes oxidantes y tiol-conjugantes se debe a la formación de monómeros inactivos (Lopez-Castillo et al., 2016).

La característica de reversibilidad de la S-glutacionilación hace de esta modificación postraducciona un mecanismo de regulación de la actividad enzimática mediada por la conjugación entre glutatión y el grupo tiol de las cisteínas. Los resultados de una primera corrida de exclusión molecular de la AtcTPI incubada con GSSG (datos no mostrados) dieron como resultado un perfil de elusión con un peso molecular aparentemente menor al de un monómero de TPI (aproximadamente 27 kDa). La migración aberrante de la AtcTPI en la columna de filtración en gel debido a la interacción con glutatión es poco intuitiva, así que, debido a lo atípico de este dato se decidió probar el efecto de la S-glutacionilación en AtcTPI utilizando tiempos de incubación cortos en tres diferentes concentraciones de GSSG (Figura 16, D).

**Tabla 8.** Parámetros catalíticos de AtcTPI silvestre y mutantes sencillas y dobles

Enzima	Km(mM)	Kcat(s <sup>-1</sup> )	Kcat/Km(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Relación de disminución
AtcTPI wt	0.47±0.08	1140±46.7	2.40x10 <sup>6</sup>	-
Cys13M	0.52±0.03	353±16.7	6.87x10 <sup>5</sup>	3.49
Cys13A	0.37±0.04	209±8.1	5.54x10 <sup>5</sup>	4.32
Cys13S	0.51±0.07	41.6±3.1	8.00x10 <sup>4</sup>	30.0
Cys13D	0.63±0.09	32.1±2.4	5.09x10 <sup>4</sup>	47.1
Cys218M	0.82±0.09	468±19.2	5.68x10 <sup>5</sup>	4.22
Cys218V	1.03±0.18	642±42.2	6.25x10 <sup>5</sup>	3.84
Cys218S	0.49±0.09	465±26.9	9.44x10 <sup>5</sup>	2.54
Cys218K	0.53±0.02	165±14.2	3.11x10 <sup>5</sup>	7.71
Cys218Y	0.88±0.07	455±37.1	5.11x10 <sup>5</sup>	4.69
Cys218D	0.50±0.12	115±6.67	2.27x10 <sup>5</sup>	10.5
Cys13Ala/Cys218Ser	1.75±0.21	789±138	4.51x10 <sup>5</sup>	5.37
Cys13Ser/Cys218Ser	3.76±0.45	209±35.9	5.57x10 <sup>4</sup>	43.5

Como se esperaba, la AtcTPI no derivatizada eluyó como un pico sencillo en un volumen de elución que corresponde al del dímero de AtcTPI ~54 kDa (Figura 16, D, pico II). La incubación de AtcTPI con 25 mM de GSSG indujo la formación de

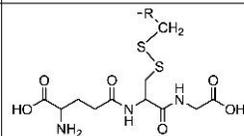
agregados de gran peso molecular (Figure 16, D, pico I), estos agregados son la consecuencia de la disociación y desplegamiento del dímero, tal como se ha reportado con anterioridad para otras TPIs (Chávez-Cárdenas et al., 2002; Maithal, Ravindra, Balaram, & Balaram, 2002). La AtcTPI incubada con 2.5 o 0.25 mM GSSG dieron como resultado la aparición de un pico de proteína con un volumen de elución equivalente al monómero de AtcTPI ~27 kDa (Figura 16, E, pico III). La proteína de esta fracción monomérica mostró menos del 20% de la actividad catalítica en comparación a la fracción dimérica que exhibe la misma actividad que la proteína sin tratamiento. (Figura 16, E). Estos datos sugieren que la S-glutacionilación altera el estado oligómero de AtcTPI, dando como resultado enzimas con actividad reducida debido a la monomerización o en los casos más severos, la pérdida total de actividad debido a la agregación.

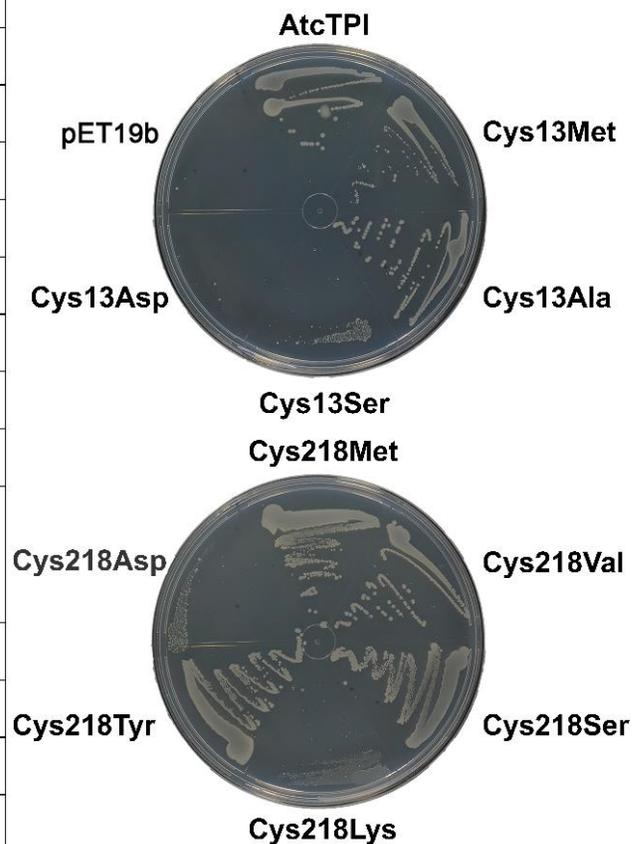
### **Las modificaciones Redox se pueden emular mediante mutagénesis**

Las modificaciones redox pueden ser mimetizadas por mutagénesis sitio dirigida para entender el comportamiento de AtcTPI ante la oxidación y conjugación de los residuos Cys13 y Cys218. En este trabajo se utilizó mutagénesis para emular las modificaciones redox de las cisteínas de AtcTPI (Figura 17, A). Se mutó AtcTPI-Cys13 a ácido aspártico para emular la modificación química irreversible de la cisteína a ácido sulfínico y a metionina para anular la participación de la cisteína, comprometiendo en lo mínimo la integridad catalítica de la proteína, lo anterior considerando que en la TPI de humano y de levadura poseen una metionina en la posición equivalente a AtcTPI-Cys13 (Lolis et al., 1990; Mande et al., 1994; Permyakov et al., 2012). Para el caso de AtcTPI-Cys218 las mutaciones se hicieron

a metionina, valina y lisina para imitar la oxidación mediada por EROs, agentes tiol-conjugantes y aductos lineales como MMTS o S-glutationilación, a tirosina para imitar la conjugación química con agentes voluminosos o aromáticos (por ejemplo DTNB), y finalmente la cisteína también se mutó por ácido aspártico para mimetizar la oxidación a ácido sulfínico. (Lara-Gonzalez et al., 2015; Olivares-Illana et al., 2017) (Figure 17, A).

**A**

Chemical specie/amino acid	Structure
Cysteine	-R-CH <sub>2</sub> -SH
Methionine	-R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
Alanine	-R-CH <sub>3</sub>
Valine	-R-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Serine	-R-CH <sub>2</sub> -OH
Lysine	-R-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>
Tyrosine	-R-CH <sub>2</sub> - 
Aspartic acid	-R-CH <sub>2</sub> -C(=O)O <sup>-</sup>
Cysteine-GSH	
Cysteine-DTNB	-R-CH <sub>2</sub> -S-S- 
Cysteine-MMTS	-R-CH <sub>2</sub> -S-S-CH <sub>3</sub>
Sulfenic acid	-R-CH <sub>2</sub> -S-O <sup>-</sup>
Sulfinic acid	-R-CH <sub>2</sub> -S(=O)O <sup>-</sup>
Sulfonic acid	-R-CH <sub>2</sub> -S(=O) <sub>2</sub> O <sup>-</sup>

**B**

**Figura 17.** Mimetización de cisteínas oxidadas y tiol-conjugadas mediante mutagénesis. **(A)** Estructura química de los aminoácidos utilizados para la mutagénesis sitio dirigida y su contraparte a la que mimetizan, producto de las reacciones mediadas por EROs con el grupo tiol. Como se observa, el ácido aspártico mimetiza la oxidación de la cisteína a ácido sulfónico, la lisina a la conjugación con MMTS y la tirosina la conjugación con DTNB. **(B)** Complementación bacteriana de AtcTPI wt y mutantes en la cepa de *E. coli*  $\Delta$ TPI BL21- DE3. Las bacterias transformadas con los plásmidos que contenían las construcciones de AtcTPI se crecieron en medio mínimo durante 48 horas a 30°C.

Para evaluar el efecto de las mutaciones en la función de AtcTPI de forma *in vivo* se llevaron a cabo ensayos de complementación con *E. coli*. El primer paso para evaluar el efecto de las modificaciones de los residuos Cys13 y Cys218, fue una complementación *in vivo* de una cepa de *E. coli*  $\Delta$ TPI BL21- DE3, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 1. (Lara-Gonzalez et al., 2015)(Figura 17, B). AtcTPI wt, AtcTPI-Cys13Ala y AtcTPI-Cys13Met complementaron de forma eficiente a las cepas transformadas. Por el contrario, la construcción AtcTPI-Cys13Asp no procedió a complementar la cepa deficiente en el gen *tpi* y la mutante AtcTPI-Cys13Ser exhibió una disminución en el número de colonias (Figura 17, B, arriba). Las células bacterianas que contenían los plásmidos de las mutantes AtcTPI-Cys218Asp y AtcTPI-Cys218Lys mostraron defectos en la complementación, mientras que aquellas que contenían a las construcciones AtcTPI-Cys218Val, AtcTPI-Cys218Tyr, AtcTPI-Cys218Ser y AtcTPI-Cys218Met mostraron una complementación similar a la exhibida por la construcción AtcTPI silvestre (Figura 17, B, abajo).

El análisis de la cinética enzimática mostró que AtcTPI-Cys13Asp y AtcTPI-Cys13Ser presentan una reducción de la actividad catalítica de 47 y 30-veces, mientras que la mutante a alanina y metionina mostraron una reducción menor a 5 veces (tomando en comparación la actividad de AtcTPI silvestre) (Tabla 9). Por lo tanto, la poca complementación que presentaron las construcciones AtcTPI-Cys13Asp y AtcTPI-Cys13Ser se correlaciona con la disminución de su eficiencia catalítica. AtcTPI-Cys218Asp y AtcTPI-Cys218Lys mostraron una reducción de 10.5 y 7.7-veces en sus actividades, sin embargo, AtcTPI-Cys218Val y AtcTPI-

Cys218Tyr mostraron actividades muy cercanas a la que presenta AtcTPI silvestre (Tabla 9). Con lo anterior, nos damos cuenta que la dificultad observada de las mutantes Asp and Lys en el residuo AtcTPI-Cys218 para complementar la cepa  $\Delta tpi$  se correlacionan a la perfección con la disminución de su eficiencia catalítica. Para evaluar si las mutantes en los residuos Cys13 y Cys218 comprometen la estabilidad estructural de AtcTPI, se midió la estabilidad térmica del set de mutantes tomando como base la estabilidad de AtcTPI silvestre (Tabla 9).

Las mutantes del residuo Cys13 disminuyeron su temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre 4.5 y 3 °C en comparación a la silvestre, las mutantes de Cys218 disminuyeron su temperatura de fusión en un rango de 2 a 10°C y las mutantes que presentaron la mayor disminución de la actividad catalítica, AtcTPI-Cys13Ser y AtcTPI-Cys13Asp, presentaron una pequeña disminución en la  $T_m$ . Contrastantemente, los mutantes de la cisteína Cys218 exhiben una mayor disminución en los valores de la  $T_m$ , pero una disminución moderada de entre 7.7 y 10.6 veces de la actividad catalítica. Estos datos sugieren que la modificación del residuo Cys13 no representa un cambio considerable en la estructura y que las mutaciones al residuo Cys218 propician modificaciones estructurales que afectan la integridad estructural de la proteína, pero con un cambio en la actividad catalítica menor.

Como ya se ha descrito, las modificaciones por mutagénesis del residuo AtcTPI-Cys13 promueve la formación de monómeros no catalíticos, por lo que, para investigar si la pérdida de la actividad enzimática en las mutantes de AtcTPI-Cys13 se debe a la alteración de la naturaleza dimérica de AtcTPI, se evaluó el estado oligómero de las versiones mutantes de AtcTPI mediante exclusión molecular en

una columna cromatográfica, a dos diferentes concentraciones de proteína: 1 mg/mL y 0.1 mg/mL (Figura 18, A). A la concentración de 1 mg/mL, AtcTPI silvestre y el set de mutantes, tanto del residuo AtcTPI-Cys13 como del residuo AtcTPI-Cys218, eluyeron en un pico sencillo a un volumen de elución correspondiente a un peso molecular aproximado de 54 kDa. Por el contrario, a concentraciones de 0.1 mg/mL, AtcTPI-Cys13Asp, AtcTPI-Cys13Ser, and AtcTPI-Cys13Met presentaron un desplazamiento en su perfil de elución, migrando el pico de proteína a un volumen de elución con un peso molecular equivalente al de un monómero (aproximadamente 25 kDa). La única mutante de AtcTPI-Cys13 que eluyó como dímero fue AtcTPI-Cys13Ala (Figura 18, A). Por su parte, todas las mutantes del residuo AtcTPI-Cys218 eluyeron en un volumen correspondiente a un dímero para ambas concentraciones.

En todas las TPI estudiadas hasta la fecha, esta enzima funciona como un dímero obligado, esto significa que los monómeros de TPI son catalíticamente incompetentes (Jimenez-Sandoval et al., 2017; Zárate-Pérez, Chánez-Cárdenas, Arreola, Torres-Larios, & Vázquez-Contreras, 2009). Así pues, para determinar el rol de la monomerización en la catálisis, se midieron las actividades específicas de AtcTPI silvestre y el set de mutantes ante la dilución, las enzimas se incubaron por 24 h a 25°C en concentraciones de proteína desde los 50 hasta los 1000 ng/mL (Tabla 10).

**Tabla 9.** Temperaturas de fusión y constantes de disociación aparente.

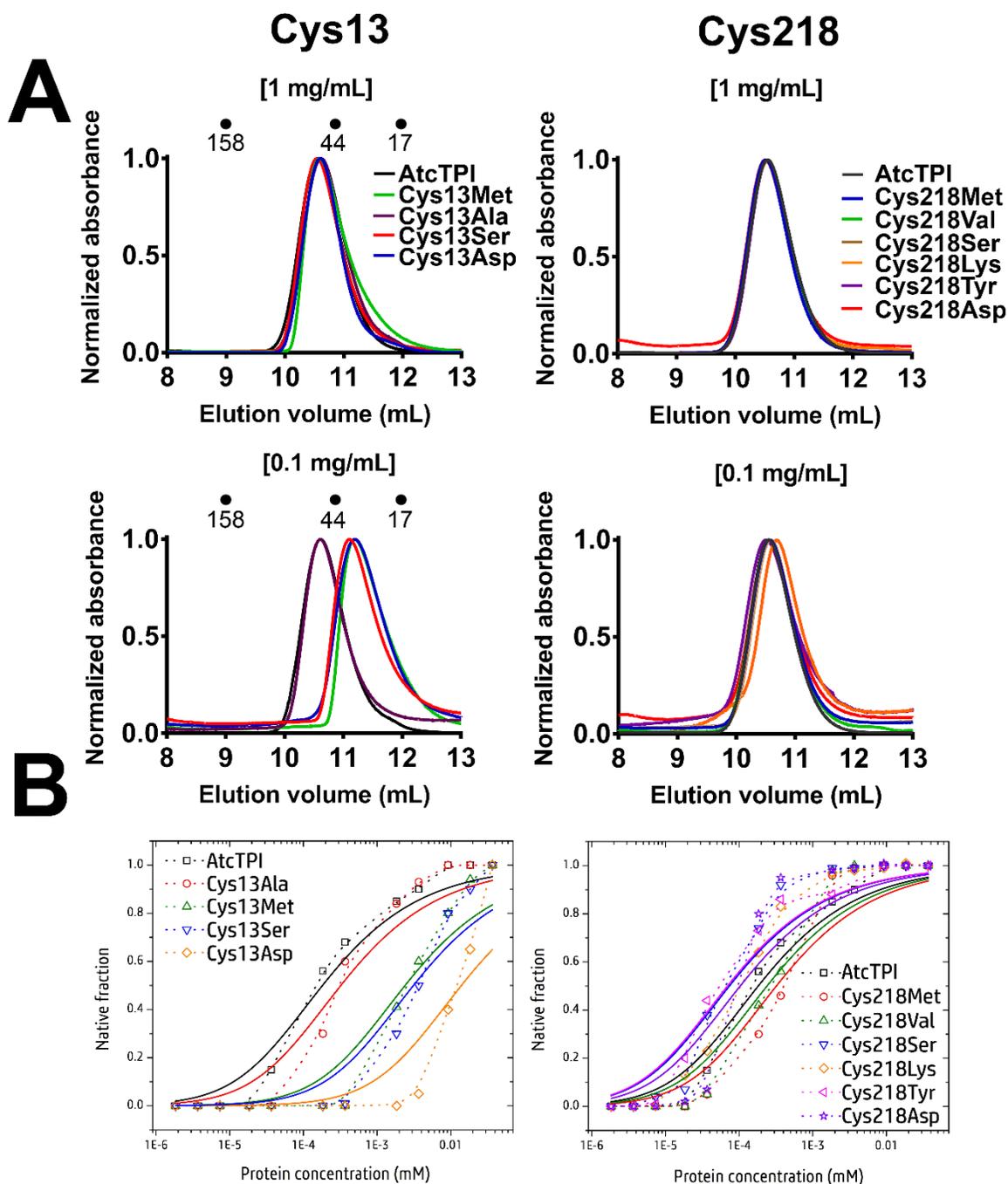
<b>Enzima</b>	<b>T<sub>m</sub>, °C</b>	<b><sup>app</sup>K<sub>diss</sub> (M)</b>
AtcTPI	52.0 ± 0.0	1.45E-07 ± 2.10E-08
Cys13Met	49.0 ± 0.0	2.40E-07 ± 2.83E-07
Cys13Aal	48.0 ± 0.0	3.22E-07 ± 3.57E-08
Cys13Ser	48.0 ± 0.0	3.12E-06 ± 3.57E-07
Cys13Asp	47.5 ± 0.5	1.40E-05 ± 1.77E-07
Cys218Met	48.0 ± 0.0	3.20E-07 ± 4.09E-08
Cys218Val	50.0 ± 0.0	2.39E-07 ± 3.02E-08
Cys218Ser	50.0 ± 0.0	0.96E-07 ± 3.53E-08
Cys218Lys	42.0 ± 1.0	1.03E-07 ± 2.83E-08
Cys218Tyr	47.0 ± 0.0	1.06E-07 ± 1.71E-08
Cys218Asp	42.5 ± 0.5	1.03E-07 ± 4.97E-08

Se sabe que la dilución promueve la disociación de la TPI activa en monómeros, con la concomitante pérdida de actividad específica (Figura 18, B) (Mainfroid et al., 1996; Reyes-Vivas et al., 2002). Los resultados de los ensayos de dilución mostraron que la AtcTPI silvestre presentó una constante de disociación aparente ( $appK_{diss}$ ) de 1.57 M, la cual es similar a la observada para otras TPIs (Reyes-Vivas et al., 2002). Las mutantes puntuales AtcTPI-Cys13Ala, AtcTPI-Cys13Met, y AtcTPI-Cys13Ser disminuyeron su afinidad de enlace del dímero en una relación de 2, 16, y 21 veces, respectivamente. Por su lado, las mutantes AtcTPI-Cys13Asp disminuyeron la estabilidad del dímero en más de 100 veces, indicando que esta mutación emula a la oxidación de la cisteína 13 dando como resultado la formación de enzimas monoméricas. (Figura 18, B).

En comparación a la tendencia de AtcTPI-Cys13 de promover la aparición de especies monoméricas, las modificaciones al residuo AtcTPI-Cys218 no alteran la actividad específica a partir de la dilución, dando soporte a la idea de que las

mutaciones a este residuo no afectan la naturaleza dimérica de AtcTPI (Figura 18 A, B y tabla 10). El cambio en el equilibrio dímero-monómero de AtcTPI-Cys13Ser y AtcTPI-Cys13Asp se correlaciona con la disminución de 30 y 47 veces de la actividad catalítica.

Resulta interesante el dato de que, la mutante AtcTPI-Cys13Met es solo 3.5-veces menos activa que la versión AtcTPI silvestre. Por lo que, la diferencia observada en la actividad enzimática entre las mutantes monoméricas AtcTPI-Cys13Ser, AtcTPI-Cys13Asp, y AtcTPI-Cys13Met puede estar relacionada con la formación de dímeros asistida por la unión a sustrato, tal como ocurre en la TPI de *Trichomonas vaginalis* (Lara-Gonzalez et al., 2015) esto significa que la formación de dímeros a partir de monómeros disociados es favorable en las mutantes AtcTPI-Cys13Met pero no en AtcTPI-Cys13Ser ni AtcTPI-Cys13Asp.

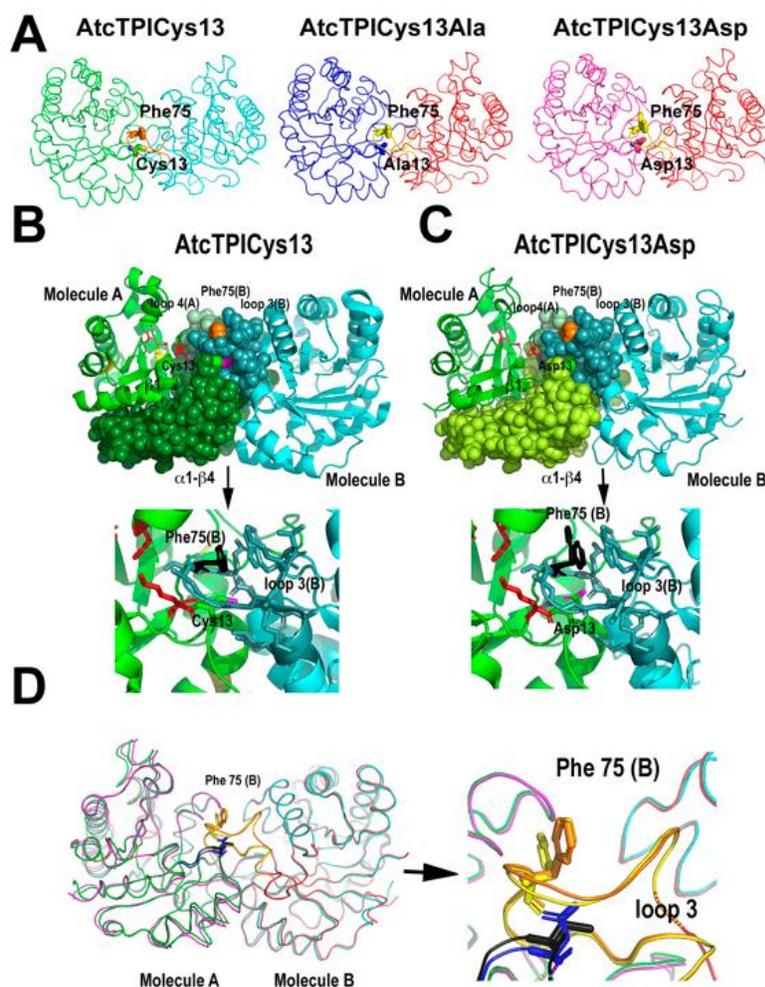


**Figura 18.** Perfiles de elución de las AtcTPIs ante la mimetización de la oxidación por mutagénesis de sitio dirigida. **(A)** Perfiles de elución de filtración en gel para las versiones de AtcTPI wt y mutantes de los residuos Cys13 y Cys218 de dos concentraciones de proteína, 1 y 0.1 mg/mL. El perfil de elución para las mutantes C13 corresponde a un perfil de especies monoméricas con un peso molecular correspondiente de 25 kDa. **(B)** Determinación de la  $K_{diss}$  aparente de AtcTPI wt y mutantes. La gráfica representa la actividad enzimática relativa después de diluir de forma serial a la proteína. Los datos reportados son el promedio de tres experimentos independientes.

## **Fundamento estructural de la formación de monómeros no catalíticos por la modificación del residuo AtcTPI-Cys13**

Para probar como la mimetización de la oxidación de tioles en el residuo AtcTPI-Cys13 induce la formación de monómeros no catalíticos, se resolvieron las estructuras cristalográficas de las mutantes AtcTPI-Cys13Asp y AtcTPI-Cys13Ala (Figura 19, A). En comparación con la cisteína Cys13, la mutación a alanina decrece el volumen de van der Waals a  $19 \text{ \AA}^3$  mientras que la mutación a ácido aspártico incrementa el volumen en  $10 \text{ \AA}^3$ . Las estructuras cristalográficas de AtcTPI-Cys13Ala y AtcTPI-Cys13Asp revelan que estas mutantes no alteran significativamente la estructura de AtcTPI, estas estructuras presentan una desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) de  $0.1350$  y  $0.1750 \text{ \AA}$ , respectivamente con relación a AtcTPI. La estructura de AtcTPI-Cys13Ala solo presenta una pequeña variación en los aminoácidos del asa 3, el cual se encuentra desplazado  $0.6 \text{ \AA}$ , presumiblemente para compensar la cadena lateral más pequeña de la alanina (Figura 19A). Los cambios mínimos en la estructura de AtcTPI-Cys13Ala con relación a la enzima silvestre, concuerdan con las eficiencias catalíticas inalteradas, así como la naturaleza dimérica de esta mutante, la cual además también es resistente a la dilución. La estructura también mostró que los aminoácidos aromáticos de la subunidad vecina que rodean a la posición 13 se organizaron de una manera similar cuando la cisteína fue remplazada por una alanina (Figura 19A). Tanto AtcTPI-Cys13Ala como AtcTPI-Cys13Asp no producen cambios severos en la estructura que pudiesen alterar su dinámica. La estructura de AtcTPI-Cys13Asp muestra que la sustitución a ácido aspártico mimetiza la

oxidación de la cisteína, esto en virtud de su carga negativa, lo que coloca a la cadena del grupo carboxílico en una posición similar a la del grupo tiol de la cisteína. Sin embargo, la ubicación del carboxilato produce cambios conformacionales súbitos en el asa 1 y en el asa 3 de la subunidad contigua.



**Figura 19.** Consecuencias estructurales de la mimetización de la oxidación del residuo AtcTPICys13. **(A)** comparación estructural de las mutantes de AtcTPI que contienen alanina y ácido aspártico en la posición 13. **(B, C)** Representación de la interfaz del dímero. Los grupos carboxilos del residuo 13 en AtcTPI wt y de las mutantes están coloreadas en magenta y los residuos del loop 3 de la subunidad continua están coloreados en cyan. El residuo Phe75 esta coloreado en magenta. Los residuos correspondientes a la primera mitad del barril TIM ( $\alpha 1$  a  $\beta 4$ ) presentan un sustancioso desplazamiento (coloreado en verde para la wt y en magenta para la mutante AtcTPICys13Asp). Un acercamiento (a la parte inferior) a la estructura de la enzima wt y mutante AtcTPICys13Asp ilustran el cambio en la conformación del residuo Phe75 (negro) debido al grupo carboxilo que ocupa lugar del grupo tiol del residuo 13 **(D)** Representación de listones de la superposición de las estructuras de la versión wt y AtcTPICys13Asp en el loop 3 de la interfaz del dímero. La estructura de AtcTPICys13Asp ilustra que la mimetización de la oxidación del residuo 13 induce la reorientación del residuo Phe75 de la subunidad contigua.

La consecuencia más dramática la produce la mutante AtcTPI-Cys13Asp provocando un cambio conformacional al residuo AtcTPI-Phe75. El residuo AtcTPI-Cys13 lleva a cabo interacciones intra-subunidad con los residuos del loop3 de la subunidad contigua, Gly72, Gly73, Ala74, Phe75, Thr76, Glu78, Ser80, and Met83. Estos residuos forman parte del motivo conservado GGAFTG (Figura 19, B). La interacción entre el asa 1 de una subunidad con el asa 3 de la otra es crítico para la formación del dímero. La derivatización del residuo AtcTPI-Cys13 con agentes alquilantes genera TPIs monoméricas en los organismos *P. falciparum* y *E. histolytica*, pero solo agregación de proteína en las TPIs de *T. cruzi* and *T. brucei* (Garza-Ramos et al., 1998; Maithal et al., 2002; Rodriguez-Romero, 2002) La presencia del grupo carboxílico en AtcTPI-Cys13Asp desplaza la cadena lateral del residuo AtcTPI-Phe75 de la subunidad contigua, por tanto este residuo adopta una doble conformación. Como una consecuencia de esta conformación alternativa, la mitad del barril TIM ( $\alpha 1$  a  $\beta 4$ ) cambia su orientación (Figura 19, B y C). La doble conformación del residuo AtcTPI-Phe75 de la subunidad vecina desplaza el loop 3, para acomodar la cadena lateral del carboxilato (Figura 19, D). Los cambios estructurales observados en la mutante AtcTPI-Cys13Asp se correlacionan con el hecho de que las otras mutantes Ser, Met, y Asp sean monoméricas a una concentración de 0.1 mg/mL. Como AtcTPI-Cys13Asp emula la oxidación de Cys13, los datos obtenidos sugieren que la monomerización de AtcTPI es un mecanismo que reduce la actividad catalítica de forma rápida en respuesta al estrés oxidativo. Este mecanismo de modulación de la actividad de la TPI se ha observado en levadura, en donde expresando variantes deficientes de la TPI humana pero con ensamblaje dimerico, vuelve más resistentes a las células a estrés oxidativo,

presumiblemente para reorientar el flujo de carbono (Ralsler et al., 2006). Otro ejemplo de modulación de la actividad de la TPI lo observamos en el arroz, en donde la TPI interactúa con un receptor transmembranal tipo quinasa. Con este mecanismo putativo alostérico de modulación de la TPI, la planta resiste infecciones bacterianas mediante una interacción fortalecida entre el receptor transmembranal y la TPI, esta alta interacción estimula a la TPI con un incremento concomitante de producción de EROs, lo cual le permite a la planta resistir la infección bacteriana (Liu et al., 2018).

### **Las modificaciones en AtcTPI Cys218 afectan la catálisis**

De los resultados obtenidos sabemos que las modificaciones en el residuo AtcTPI-Cys218 disminuyen la actividad catalítica de la TPI. Así como que dos estudios independientes han mostrado que el residuo AtcTPI-Cys218 es un blanco de regulación por S-glutacionilación (Dumont et al., 2016a; López-Castillo et al., 2016b). Y que los análisis cinéticos indicaron que la mutante que posee un ácido aspártico decrece su actividad catalítica hasta 10 veces mientras que los remplazos con aminoácidos de cadenas laterales voluminosas disminuyen su actividad entre 8 y 10 veces (Tabla 8). Estas mutantes presentan una estabilidad dimérica similar a la versión silvestre, descartando la posibilidad de que una alteración en este residuo afecte el equilibrio dimero-monómero y por ende sea responsable de la disminución de la actividad catalítica. Sin embargo, es incierto como las modificaciones en el residuo AtcTPI-Cys218 afectan la catálisis. Las modificaciones al residuo AtcTPI-Cys218 conducen un rearrreglo estructural en el asa 6 y 7. Para entender los mecanismos por los cuales las modificaciones en el residuo AtcTPI-

Cys218 afectan la actividad catalítica de AtcTPI, se resolvieron las estructuras de las mutantes del residuo AtcTPI-Cys218 que mimetizan la conjugación de la cisteína con grupos voluminosos o aromáticos. Una comparación estructural entre AtcTPI silvestre y de las mutantes del residuo Cys218 muestran que las mutaciones no inducen cambios estructurales mayores, tomando como referencia a la AtcTPI silvestre (Figura 20, A). Sin embargo, al realizar un análisis más de cerca, se puede observar que en la estructura de las mutantes que presentan una conformación alterna en el asa 6 (residuos 166–176) y el asa 7 (residuos 210–218) (Figura 20, B y C). Estos cambios estructurales están localizados solamente en esta región y no se observan alteraciones en otras regiones como el sitio activo o la interfaz del dinero. El asa 6 también conocida como el asa de unión a fosfatos realiza un movimiento de bisagra de abierto a cerrado por efecto de la unión del sitio activo con el sustrato (Wierenga, 2001; Wierenga et al., 1992; Wierenga, Noble, Vriend, Nauche, & Hol, 1991) lo que lo vuelve un elemento estructural altamente flexible. El asa 6 en la mutante AtcTPI-Cys218Ser se encuentra ligeramente desplazado, mientras que en AtcTPI-Cys218Lys y AtcTPI-Cys218Tyr sufre un desplazamiento de 2.5 Å (Figura 20, B). Las mutaciones puntuales al residuo AtcTPI-Cys218 también incrementaron la movilidad térmica del asa 6, lo que sugiere que estas mutantes alteran la dinámica del asa de unión a fosfatos (Figura 20, C y D). Por su lado, y opuesto a la movilidad que presenta el asa 6, el asa 7 se encuentra en la misma posición en todas la TPI analizadas a la fecha. El asa 7 posee el motivo YGGG (residuos 209–212) cuya integridad estructural es indispensable para la actividad catalítica, por lo que las modificaciones hechas a este motivo reducen la actividad catalítica más allá de 1000-veces (Sampson & Knowles, 1992b, 1992a). En el

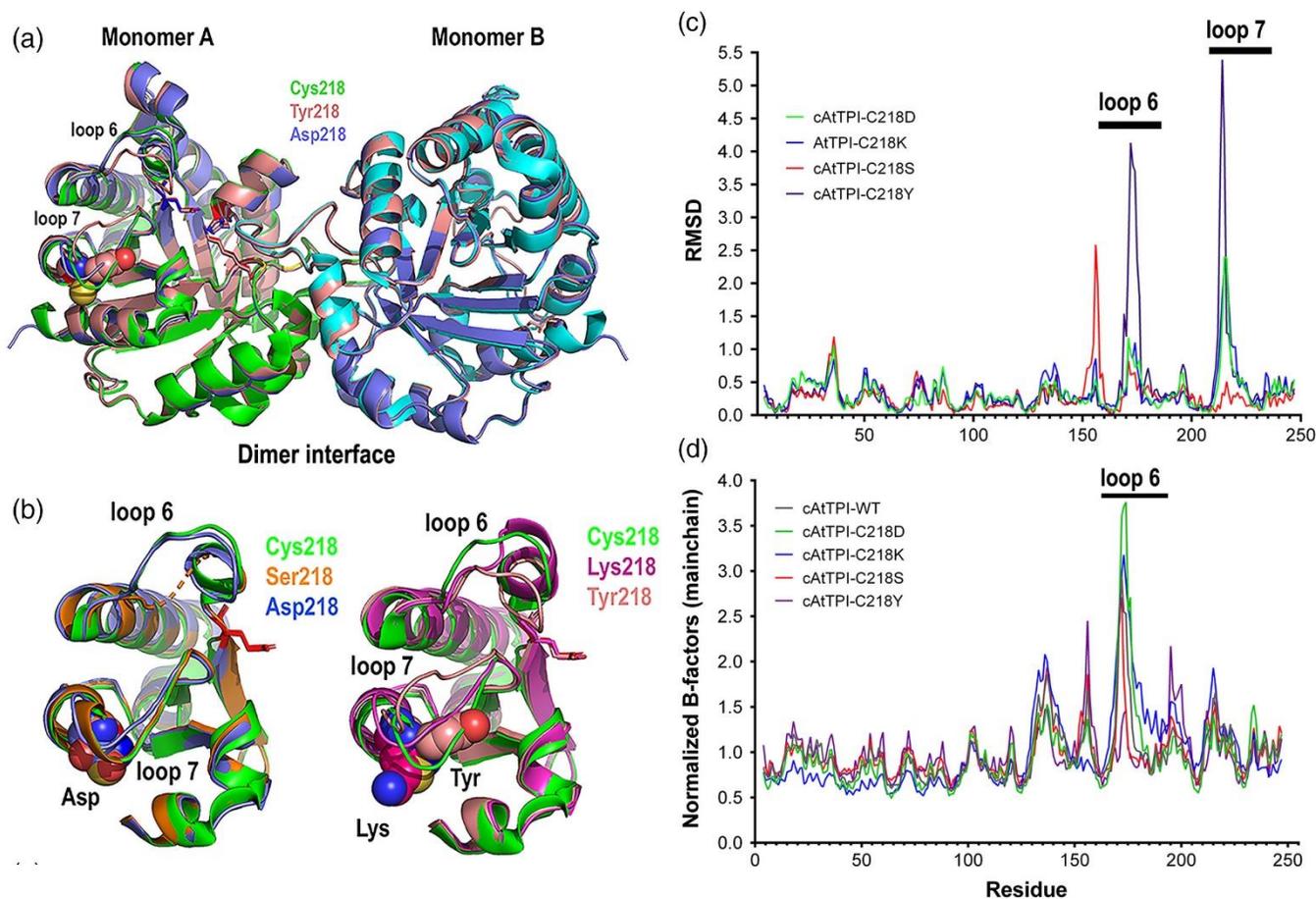
análisis de este trabajo se observó que, las mutantes puntuales, Asp, Lys y Tyr, además de lo anteriormente mencionado también alteran la orientación del asa 7 (Figure 20, B y C). El residuo AtcTPI-Cys218 interactúa con el residuo AtcTPI-Gly211 del motivo YGGG, por lo que es de esperarse que las modificaciones estructurales del residuo AtcTPI-Cys218 afecten esta interacción. La mutante AtcTPI-Cys218Ser no altera la orientación del asa 7 (Figura 20, B), por el contrario, las mutantes Asp, Lys, y Tyr inducen cambios conformacionales en el C $\alpha$  de los residuos Val213 y Asn217, los cuales están localizados inmediatamente después del motivo YGGG (Figura 20, B y C). Por su parte, los cambios provocados por AtcTPI-Cys218Asp y AtcTPI-Cys218Lys son sutiles. En la estructura de estas mutantes, un segmento del loop 7 desde el residuo Val213 hasta la Asn217 se mueven entre 2 y 2.3 Å. Por su lado, la mutante AtcTPI-Cys218Tyr da provoca una abrupta reorientación de 6.3 Å en el asa 7 (Figure 20, B). Las cadenas laterales del residuo 218 de las mutantes Asp, Lis y Ser se encuentran en una posición equivalente a la cadena lateral de la cisteína. Sin embargo, la cadena lateral de AtcTPI-Cys218Tyr ocupa el espacio del aminoácido Val213 localizada inmediatamente después del motivo YGGG (Figura 20, B). Las mutaciones en el residuo análogo a AtcTPI-Cys218 en la TPI de *G. lambia* (GITPI) también exhiben un decremento en la actividad catalítica (Hernández-Alcántara et al., 2013) de la misma forma los estudios cristalográficos de las mutantes de GITPI-Cys222Asp también presentan variaciones estructurales en los loops 6 y 7 que se correlacionan con la pérdida de la actividad enzimática (Hernández-Alcántara et al., 2013). La mutante AtcTPI-Cys218Asp decrece su actividad catalítica aproximadamente 11 veces, pero AtcTPI-Cys218Tyr y Lys la disminuyen en 4-7 y 7.7 veces

respectivamente. En comparación con la pérdida severa de actividad observada en la mutante de ácido aspártico en el residuo C13, la mutación por este mismo aminoácido en el residuo AtcTPI-Cys218 disminuye su actividad aproximadamente 11 veces. Aunque esta disminución de la actividad parezca pequeña, la disminución de la actividad en una proporción de 4-veces producto de la mutación Ile170Val en la TPI de humano, induce hiper-resistencia contra estrés oxidativo en levadura (Ralser, Heeren, Breitenbach, Lehrach, & Krobitsch, 2006). Esto sugiere que los pequeños cambios en la actividad enzimática de la TPI, enzima clave de la glucólisis, son suficiente para alterar y reorientar las rutas del metabolismo central (Ralser et al., 2006, 2007).

### **Un mecanismo doble basado en la regulación redox en las TPIs citosólicas de plantas.**

La identidad del residuo Cys13 y Cys218 se encuentra conservado en la mayoría de las TPIs de algas verdes y en la mayoría de las TPIs citosólicas de plantas (López-Castillo et al., 2016b; Zaffagnini et al., 2014) (Figura 21, A). Sin embargo, la identidad del residuo Cys218 en todas las TPIs cloroplastídicas de plantas y de bacterias fotosintéticas es una serina o un aminoácido hidrofóbico, dando una idea de que este sistema de modulación basado en cisteínas esta únicamente presente en plantas terrestres y algas verdes. (López-Castillo et al., 2016b). En diferentes trabajos de Zaffagnini y colaboradores se puede observar que la cisteína Cys219 de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrTPI) es un análogo estructural de AtcTPI-Cys218 (Zaffagnini et al., 2014). Si comparamos su estructura con AtcTPI podemos observar que, para ambas estructuras el grupo tiol expuesto está localizado en el polo N-

terminal de la  $\alpha$ -hélice y, en ambos casos, dos lisinas están próximamente cercanas a los grupos tiol.

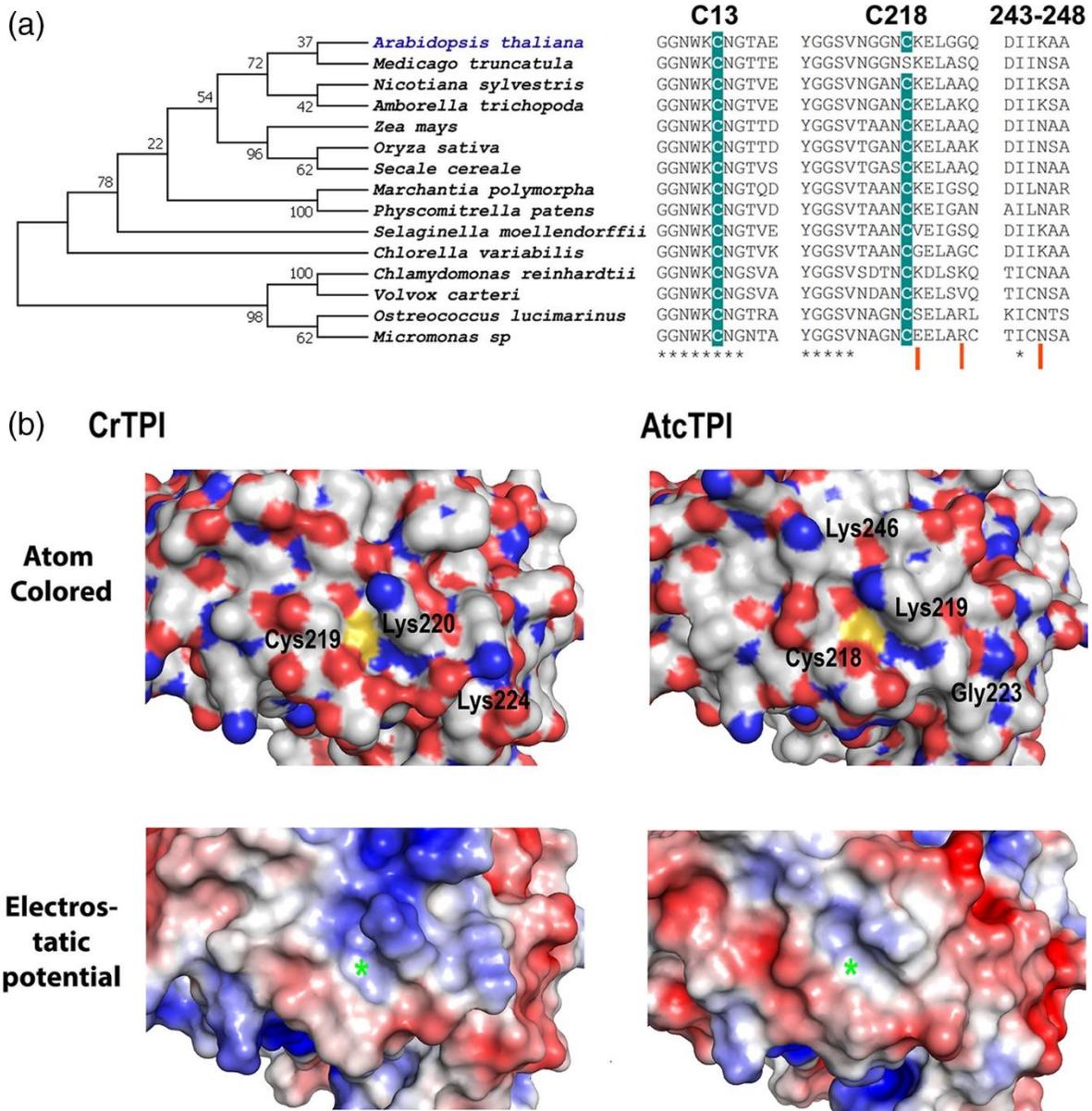


**Figura 20.** Consecuencias estructurales de la mimetización de la oxidación y conjugación-tiol del residuo AtcTPI Cys218. **(A)** Alineamiento estructural de AtcTPI wt y mutantes Cys218Asp y Cys218Tyr. **(B y C)**, Acercamiento de la región correspondiente a los loops 6 y 7 para las mutantes Serina y ácido aspártico (b) Lisina y tirosina, **(C)** Comparación estructural entre AtcTPI wt y mutantes. La grafica de RMSD por residuo (Roberts et al., 2006) muestra las diferencias estructurales entre las mutantes de AtcTPI-Cys218. **(D)** Comparativa estructural de AtcTPI wt y mutantes, donde se muestran los factores-B normalizados.

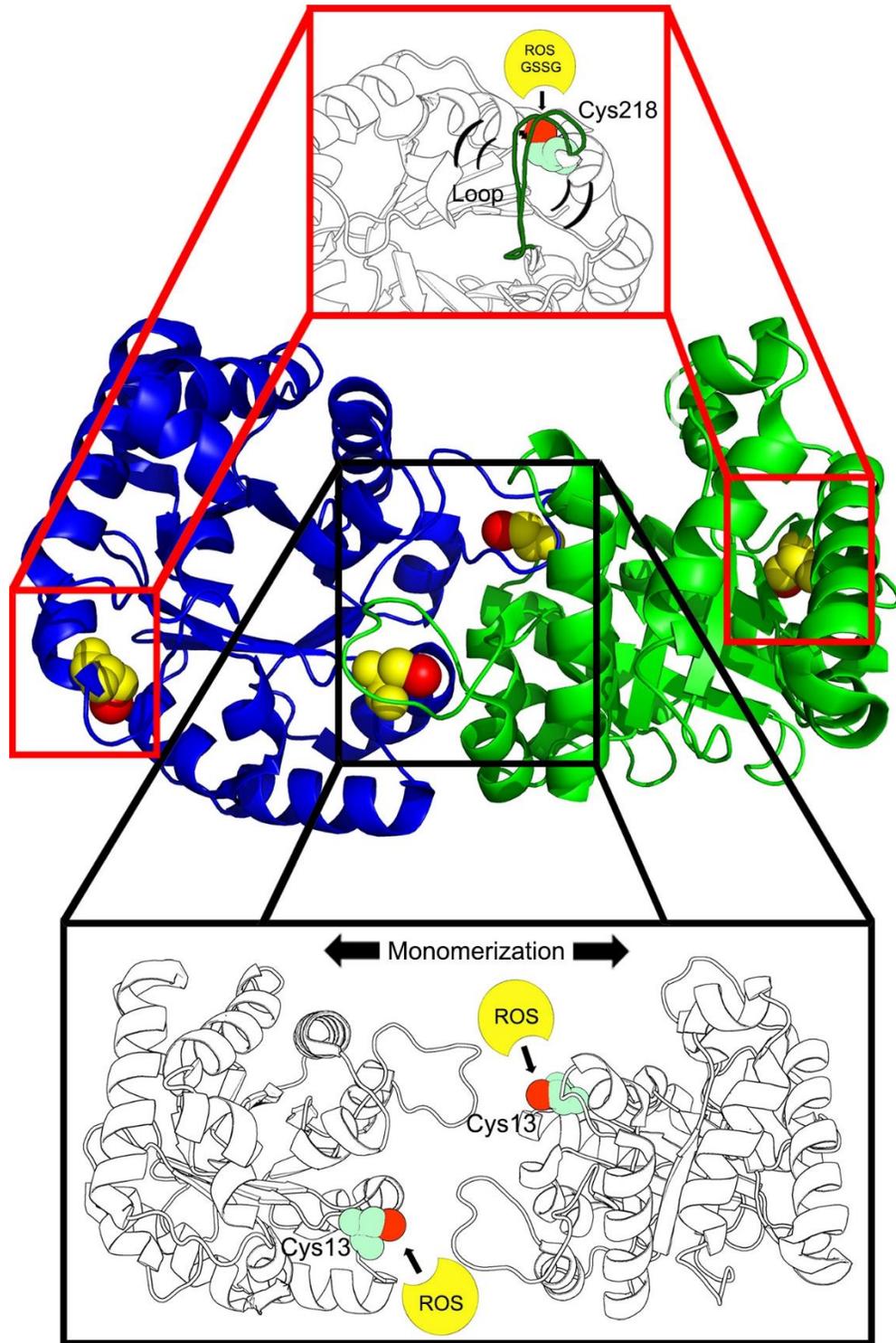
Este carácter químico genera un cambio en el ambiente estructural positivo, el cual desencadena, como una consecuencia, una disminución en el pKa de ambas cisteínas, las cuales estabilizan la formación de la forma desprotonada de cisteínas (tiolato) el cual es propenso a reaccionar con GSSG. A pesar de que, los aminoácidos que rodean a CrTPI-Cys219 y AtcTPI-Cys218 no están conservados, el ambiente químico que rodea a estos residuos cargado por aminoácidos positivos y negativos si esta conservado (Figura 21, B). Así pues, la estructura tridimensional muestra que la predisposición química del residuo AtcTPI-Cys218 a ser blanco de S-glutationilación esta conservada desde las algas verdes hasta las plantas terrestres. La ausencia de un grupo tiol en el residuo equivalente a AtcCys218 en las TPI cloroplastídicas de las plantas terrestres puede ser explicado desde el punto de vista de que las TPI de cloroplasto necesitan coexistir con una concentración de agentes oxidativos mucho mayor (López-Castillo et al., 2016b)

En resumen, en este trabajo se logró elucidar el mecanismo por el cual la AtcTPI de plantas terrestres modula su actividad catalítica mediante la modificando de sus dos cisteínas: AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218. Las modificaciones basadas en redox de estos residuos dan como resultado una disminución de la actividad catalítica. Esta reducción en la actividad se asocia con una reducción en la producción de EROs mediante la reorientación del metabolismo central (Ralser et al., 2006, 2007). Una estructura cristalográfica que mimetiza la oxidación del residuo C13 induce inactivación enzimática debido a la monomerización, así pues, la mimetización del residuo AtcATP-Cys218 a ácido sulfónico o S-tiolación induce cambios conformacionales en la enzima, con la concomitante disminución de la

actividad catalítica. Con todos estos datos, se propuso un modelo de regulación de dos pasos, en el cual, el residuo expuesto al solvente AtcTPI-Cys218 es el blanco primario de EROs y S-glutationilación (Figure 21). La localización del residuo C218 lo hace un probable blanco de las oxido-reductasas y glutaredoxinas de plantas, las cuales podrían modular la actividad de la TPI. Además, este ambiente químico está conservado en la TPI de algas verdes y TPIs citosólicas, sugiriendo la posibilidad de un mecanismo de control de la glucolisis en plantas evolutivamente conservado. La S-glutationilación del residuo Cys218 además de proteger al grupo tiol de la oxidación no reversible, también previene la disminución de la actividad catalítica. La localización del residuo Cys13 en la interfaz del dímero disminuye la probabilidad de este residuo para ser blanco de S-glutationilación, sin embargo, en las condiciones en las que se presenta una alta concentración de EROs, la oxidación de AtcTPI se vuelve factible. La oxidación de este aminoácido, y en consecuencia, la pérdida del ensamblaje dimérico, generan una severa caída en la catálisis a modo de respuesta rápida a estrés oxidativo, reorientando la ruta del carbono hacia la ruta de las pentosas fosfato (Ralser et al., 2006, 2007) (Figura 21). En este trabajo se logró describir como la S-glutationilación y la oxidación de los grupos tiol en AtcTPI forman parte de un mecanismo perfeccionado de la glucolisis de plantas basado en el estado redox (Holtgreffe et al., 2008; Scheibe, Backhausen, Emmerlich, & Holtgreffe, 2005).



**Figura 21.** El residuo AtcTPI-Cys218 es un blanco de modulación por S-glutacionilación conservado para regular la glucólisis en plantas terrestres y algas verdes. **(A)** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos algunas plantas y algas verdes. Se muestra la identidad del residuo análogo a AtcTPI-Cys218 y las lisinas que contribuyen a crear una región cargada positivamente en la región cercana a CrTPI-Cys219 y AtcTPI-Cys218. **(B)** Representación de superficie y potencial electroestático de la región de los residuos CrTPI-Cys219 y AtcTPI-Cys218. El grupo tiol está coloreado en Amarillo, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y los carbonos en blanco. La figura de abajo muestra el ambiente químico de los residuos CrTPI-Cys219 y AtcTPI-Cys218. Las regiones cargadas positivamente están coloreadas de azul y las cargadas negativamente en rojo. El grupo tiol de las cisteínas se señala con un asterisco.



**Figura 22.** Modelo de regulación enzimática de la TPI mediada por la oxidación o S-glutathionilación de los residuos AtcTPI-Cys13 y AtcTPI-Cys218. **(Arriba)** La oxidación o S-glutathionilación del residuo Cys218 altera la estructura de los lazos 6 y 7. Estos cambios estructurales disminuyen la actividad enzimática de AtcTPI. La reversibilidad de la S-glutathionilación vuelve a AtcTPI-Cys218 un potencial interruptor redox para hacer frente al estrés oxidativo en plantas. **(Abajo)** La oxidación irreversible del residuo AtcTPI-Cys13 en la interfaz del dímero de AtcTPI induce cambios en el loop 3 de la subunidad vecina, propiciando la disociación del dímero con una concomitante pérdida de la actividad catalítica.

## Conclusión

El origen eucarionte de la TPI de cloroplasto en plantas resulta interesante desde diferentes puntos de vista, el más intrigante de estos es el evolutivo. Como en cualquier evento evolutivo, existe una basta variedad de rutas que la naturaleza pudo haber tomado, algunas mediadas por la presión de selección como respuesta a estímulos geográficos, ambientales, etc. o también por cuestiones meramente azarosas.

En esta intrigante historia tenemos tres protagonistas, una TPI de origen bacteriano que por algún periodo de tiempo formó parte del cloroplasto de los recién creados organismos fotosintéticos y que, por cuestiones inciertas fue remplazada por nuestro segundo protagonista, una TPI nuclear con señalización de exportación a cloroplasto, generara a partir de la duplicación de nuestro tercer protagonista la TPI eucarionte nuclear citosólica. Como se mencionó anteriormente, es incierto saber el camino que la naturaleza tomó, ya que, viéndolo de una forma filosófica, solo los involucrados en este proceso “saben” lo que realmente sucedió.

Si bien no sabemos lo ruta que tomó la naturaleza, conocemos a la perfección el destino al que llego, las TPI de citosol y cloroplasto de las plantas terrestres, y de cierto modo, también el origen. Dado que hoy en día en la tierra aún están presentes los descendientes de las cianobacterias ancestrales que dieron origen al cloroplasto, que si bien, también han evolucionado en estos más de mil millones de años, son un modelo de estudio valido ya que nos brindan la información más cercada a estos organismos.

La implementación del modelo *Arabidopsis thaliana/Synechocystis* nos permitió unir la historia de estos tres protagonistas en un proyecto integrado. El capítulo I nos permitió entender que SyTPI es una enzima altamente resistente a EROs y agentes tiol-conjugantes debido a la falta de elementos de regulación, cisteínas reactivas con la capacidad de modificar de forma negativa la actividad catalítica. Para un organismo de forma libre como las cianobacterias estas características son perfectas para contrarrestar los estímulos ambientales, permitiéndoles llevar a cabo sus procesos metabólicos esenciales aún en condiciones adversas. Sin embargo, para el nuevo organelo (el cloroplasto) esta TPI tan resistente e insensible no era del todo funcional. Si bien, la función del cloroplasto (fotosíntesis) conlleva una presencia constante de EROs y por ende el requerimiento de enzimas resistentes a EROs, se requiere también que estas enzimas sean sensibles a mecanismos de protección reversibles como la S-glutathionilación cuando la concentración de EROs sobrepasa la concentración homeostática, reorientando las rutas metabólicas para disminuir la concentración de estos agentes que ponen en riesgo la integridad del organelo y hasta de la célula.

Por análisis filogenéticos sabemos que la TPI de cloroplasto de las plantas contemporáneas surgió a partir de la duplicación de TPI de citosol, la cual en el capítulo II pudimos observar que cuenta con mecanismos muy sofisticados para de modulación de la actividad catalítica, detonados por la reacción de dos de sus cisteínas (C13 y C218) con glutatión y EROs, mediante una serie de cambios conformacionales logra disminuir la actividad catalítica de la enzima en dos etapas, la primera no tan drástica cuando la concentración de EROs es baja y una segunda

etapa con una caída de la actividad mayor cuando la concentración de estos agentes es mucho mayor, la inactivación de la TPI funge como un interruptor que permite la reorientación del flujo de carbono.

Esta enzima duplicada, al no ser blanco de la presión de selección como la AtcTPI, sufrió modificaciones a lo largo del tiempo, conservando su habilidad de regulación, pero agregando un cierto nivel de insensibilidad o resistencia a EROs. El estudio estructural para elucidar el mecanismo por el cual AtpdTPI es resistente a una concentración mayor de EROs en comparación a AtcTPI y que al mismo tiempo puede regular su actividad forma parte de las perspectivas de este trabajo,

## Anexos

**Table A1.** Códigos de acceso de las secuencias de TPI utilizadas para construir el árbol filogenético.

<b>Organismo</b>	<b>Código de identificación</b>
<i>Synechocystis</i> sp PCC 6803	Q59994*
<i>Nostoc punctiforme</i>	B2JA20*
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	K9Z135*
<i>Cyanothece</i> sp PCC 7822	E0U717*
<i>Volvox carteri</i>	Vocar.0001s0851.1 <sup>+</sup>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Q5S7Y5*
<i>Chlorella variabilis</i> cytosolic	E1ZKB3*
<i>Chlorella variabilis</i> plastid	E1ZJ95*
<i>Oryza sativa</i> cytosolic	P48494*
<i>Oryza sativa</i> plastid	LOC_Os09g36450.1 <sup>+</sup>
<i>Zea mays</i> cytosolic	P12863*
<i>Zea mays</i> plastid	PWZ12483.1*
<i>Secale cereale</i> cytosolic	P46226*
<i>Secale cereale</i> plastid	P46225*
<i>Nicotiana glauca</i> cytosolic	A0A1U7WBV5*
<i>Nicotiana glauca</i> plastid	A0A1U7XMB3*
<i>Arabidopsis thaliana</i> cytosolic	P48491*
<i>Arabidopsis thaliana</i> plastid	Q9SKP6*
<i>Sellaginella moellendorffii</i> cytosolic	XP_002960386-
<i>Sellaginella moellendorffii</i> plastid	D8SSS6*
<i>Marchantia polymorpha</i> cytosolic	Mapoly0042s0045 <sup>+</sup>
<i>Marchantia polymorpha</i> plastid	A0A176WT02*
<i>Physcomitrella patens</i> cytosolic	XP_024402314.1 <sup>-</sup>
<i>Physcomitrella patens</i> plastid	XP_024398301.1 <sup>-</sup>
<i>Klebsormidium flaccidum</i> cytosolic	GAQ81916.1 <sup>-</sup>
<i>Klebsormidium flaccidum</i> plastid	A0A1Y1HSX2*

\*Número de acceso Uniprot

<sup>+</sup>Identificado de gen de Phytozome 12

<sup>-</sup>Número de acceso NCBI

## Bibliografía

- Bigelow, D. J., & Squier, T. C. (2005). Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703(2), 121–134.
- Bloom, J. D., & Arnold, F. H. (2009). In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement 1), 9995–10000.
- Bock, R., & Timmis, J. N. (2008). Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays*, 30(6), 556–566.
- Chávez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G., & Pérez-Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(2), 117–129. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2749>
- Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., Lemaire, S. D., & Decottignies, P. (2015). First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *Journal of Proteome Research*, 14, 59-71.
- Chen, M., & Thelen, J. J. (2010). The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22(1), 77–90. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071837>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., & Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 883–898. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014>
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1703(2), 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>
- Dumont, S., Bykova, N. V., Pelletier, G., Dorion, S., & Rivoal, J. (2016a). Cytosolic triosephosphate isomerase from *Arabidopsis thaliana* is reversibly modified by glutathione on cysteines 127 and 218. *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01942>
- Dumont, S., Bykova, N. V., Pelletier, G., Dorion, S., & Rivoal, J. (2016b). Cytosolic triosephosphate isomerase from *Arabidopsis thaliana* is reversibly modified by glutathione on cysteines 127 and 218. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1942.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in

chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106(2-3 SPEC. ISS.), 119–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.022>

- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77.
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena De Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., & Gómez-Puyou, A. (1998). Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *European Journal of Biochemistry*, 253(3), 684–691. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530684.x>
- González-Mondragón, E., Zubillaga, R. A., Saavedra, E., Chánez-Cárdenas, M. E., Pérez-Montfort, R., & Hernández-Arana, A. (2004). Conserved cysteine 126 in triosephosphate isomerase is required not for enzymatic activity but for proper folding and stability. *Biochemistry*, 43(11), 3255–3263.
- Gould, S. B., Waller, R. F., & McFadden, G. I. (2008). Plastid Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 491–517.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915>
- Grant, C. M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of Biology*, 7(1), 6–9. <https://doi.org/10.1186/jbiol63>
- Gross, J., Meurer, J., & Bhattacharya, D. (2008). Evidence of a chimeric genome in the cyanobacterial ancestor of plastids. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 117.
- Grüning, N.-M., Du, D., Keller, M. A., Luisi, B. F., & Ralser, M. (2014). Inhibition of triosephosphate isomerase by phosphoenolpyruvate in the feedback-regulation of glycolysis. *Open Biology*, 4, 130232.  
<https://doi.org/10.1098/rsob.130232>
- Grüning, N. M., Lehrach, H., & Ralser, M. (2010). Regulatory crosstalk of the metabolic network. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4), 220–227.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.12.001>
- Hernández-Alcántara, G., Torres-Larios, A., Enríquez-Flores, S., García-Torres, I., Castillo-Villanueva, A., Méndez, S. T., ... Oria-Hernández, J. (2013). Structural and Functional Perturbation of *Giardia lamblia* Triosephosphate Isomerase by Modification of a Non-Catalytic, Non-Conserved Region. *PLoS ONE*, 8(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069031>
- Hernández-Santoyo, A., Domínguez-Ramírez, L., Reyes-López, C. A., González-Mondragón, E., Hernández-Arana, A., & Rodríguez-Romero, A. (2012). Effects of a buried cysteine-to-serine mutation on yeast triosephosphate isomerase structure and stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10010–10021.
- Holtgreffe, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., ...

- Scheibe, R. (2008). Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiologia Plantarum*, *133*(2), 211–228. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01066.x>
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Current Protocols in Protein Science*, *79*(1), 28–29.
- Jacobson, G. R., Schaffer, M. H., Stark, G. R., & Vanaman, T. C. (1973). Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(19), 6583–6591.
- Jimenez-Sandoval, P., Vique-Sanchez, J. L., Hidalgo, M. L., Velazquez-Juarez, G., Diaz-Quezada, C., Arroyo-Navarro, L. F., ... Brieba, L. G. (2017). A competent catalytic active site is necessary for substrate induced dimer assembly in triosephosphate isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1865*(11), 1423–1432. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.014>
- Kaneko, T., Matsubayashi, T., Sugita, M., & Sugiura, M. (1996). Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 genome. *Plant Molecular Biology*, *31*(1), 193–201.
- Katebi, A. R., & Jernigan, R. L. (2014). The critical role of the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics, and functionality. *Protein Science*, *23*(2), 213–228.
- Knowles, J. R., & Albery, W. J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.*, *10*(4), 105–111. <https://doi.org/10.1021/ar50112a001>
- Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., ... Nishimura, Y. (2016). Eukaryotic Components Remodeled Chloroplast Nucleoid Organization during the Green Plant Evolution. *Genome Biology and Evolution*, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv233>
- Kosower, N. S., & Kosower, E. M. (1995). [11] Diamide: An oxidant probe for thiols. *Methods in Enzymology*, *251*, 123–133.
- Kruger, N. J., & Von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(3), 236–246. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00039-6)
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874.
- Lara-Gonzalez, S., Estrella, P., Portillo, C., Cruces, M. E., Jimenez-Sandoval, P., Fattori, J., ... Brieba, L. G. (2015). Substrate-induced dimerization of engineered monomeric variants of triosephosphate isomerase from *trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE*, *10*(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141747>

- Livesay, D. R., & La, D. (2005). The evolutionary origins and catalytic importance of conserved electrostatic networks within TIM-barrel proteins. *Protein Sci.*, *14*(5), 1158–1170. <https://doi.org/10.1110/ps.041221105>
- Lo, M.-C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., & Ellestad, G. (2004). Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry*, *332*(1), 153–159.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., & Petsko, G. A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, *29*(28), 6609–6618.
- López-Castillo, L. M., Jiménez-Sandoval, P., Baruch-Torres, N., Trasviña-Arenas, C. H., Díaz-Quezada, C., Lara-González, S., ... Briebe, L. G. (2016a). Structural basis for redox regulation of cytoplasmic and chloroplastic triosephosphate isomerases from *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1817.
- López-Castillo, L. M., Jiménez-Sandoval, P., Baruch-Torres, N., Trasviña-Arenas, C. H., Díaz-Quezada, C., Lara-González, S., ... Briebe, L. G. (2016b). Structural Basis for Redox Regulation of Cytoplasmic and Chloroplastic Triosephosphate Isomerases from *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *7*(December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01817>
- Lopez-Zavala, A. A., Carrasco-Miranda, J. S., Ramirez-Aguirre, C. D., López-Hidalgo, M., Benitez-Cardoza, C. G., Ochoa-Leyva, A., ... Sotelo-Mundo, R. R. (2016). Structural insights from a novel invertebrate triosephosphate isomerase from *Litopenaeus vannamei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1864*(12), 1696–1706.
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., ... Goraj, K. (1996). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *Journal of Molecular Biology*, *257*(2), 441–456. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0174>
- Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., & Balaram, P. (2002). Inhibition of *Plasmodium falciparum* triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine: Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(28), 25106–25114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202419200>
- Mande, S. C., Hol, W. G. J., Mainfroid, V., Goraj, K., Martial, J. A., & Kalk, K. H. (1994). Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Science*, *3*(5), 810–821.
- Mäntsälä, P., & Niemi, J. (n.d.). SA NE M SC PL O E – C EO AP LS TE S PL O E – , //.

- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth*. Yale University Press.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, *40*(4), 658–674.
- McDonagh, B., Ogueta, S., Lasarte, G., Padilla, C. A., & Bárcena, J. A. (2009). Shotgun redox proteomics identifies specifically modified cysteines in key metabolic enzymes under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteomics*, *72*(4), 677–689.
- McLain, A. L., Szweda, P. A., & Szweda, L. I. (2011).  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. *Free Radical Research*, *45*(1), 29–36. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.534163>
- Nagano, N., Ota, M., & Nishikawa, K. (1999). Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins. *FEBS Letters*, *458*(1), 69–71.
- Olivares-Illana, V., Riveros-Rosas, H., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., & Gómez-Puyou, A. (2017). A guide to the effects of a large portion of the residues of triosephosphate isomerase on catalysis, stability, druggability, and human disease. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *85*(7), 1190–1211.
- Permyakov, S. E., Zernii, E. Y., Knyazeva, E. L., Denesyuk, A. I., Nazipova, A. A., Kolpakova, T. V., ... Senin, I. I. (2012). Oxidation mimicking substitution of conservative cysteine in recoverin suppresses its membrane association. *Amino Acids*, *42*(4), 1435–1442. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0843-0>
- Poole, L. B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, *80*, 148–157.
- Ralser, M., Heeren, G., Breitenbach, M., Lehrach, H., & Krobitsch, S. (2006). Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization—not catalytic inactivity—of the mutant enzymes. *PLoS One*, *1*(1).
- Ralser, M., Wamelink, M. M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E. A., ... Krobitsch, S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, *6*(4), 10. <https://doi.org/10.1186/jbiol61>
- Reyes-Prieto, A., & Bhattacharya, D. (2007). Phylogeny of Calvin cycle enzymes supports Plantae monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *45*(1), 384–391.
- Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Mendoza-Hernández, G., López-Velázquez, G., Pérez-Montfort, R., Tuena De Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (2002). Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact

and a nicked monomer. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 48(3), 580–590. <https://doi.org/10.1002/prot.10179>

- Rodriguez-Romero. (2002). STRUCTURE AND INACTIVATION OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM ENTAMOEBE HISTOLYTICA, 58, 2002.
- Rozacky, E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A., & Gracy, R. W. (1971). Studies on human triosephosphate isomerase: I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 146(1), 312–320.
- Samanta, M., Banerjee, M., Murthy, M. R. N., Balaram, H., & Balaram, P. (2011). Probing the role of the fully conserved Cys126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis—distal effects on dimer stability. *The FEBS Journal*, 278(11), 1932–1943.
- Sampson, N. S., & Knowles, J. R. (1992a). Segmental motion in catalysis: investigation of a hydrogen bond critical for loop closure in the reaction of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 31(36), 8488–8494.
- Sampson, N. S., & Knowles, J. R. (1992b). Segmental movement: definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 31(36), 8482–8487.
- Sato, N., Ishikawa, M., Fujiwara, M., & Sonoike, K. (2005). Mass identification of chloroplast proteins of endosymbiont origin by phylogenetic profiling based on organism-optimized homologous protein groups. *Genome Informatics*, 16(2), 56–68.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., & Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 6(5), 283–290.
- Scheibe, R., Backhausen, J. E., Emmerlich, V., & Holtgreffe, S. (2005). Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1481–1489. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri181>
- Sullivan, B. J., Durani, V., & Magliery, T. J. (2011). Triosephosphate isomerase by consensus design: dramatic differences in physical properties and activity of related variants. *Journal of Molecular Biology*, 413(1), 195–208.
- Timmis, J. N., Ayliff, M. A., Huang, C. Y., & Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics*, 5(2), 123–135. <https://doi.org/10.1038/nrg1271>
- Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., ... Yano, M. (2013). Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, 45(9), 1097–1102. <https://doi.org/10.1038/ng.2725>
- van Loon, L. C. (2016). The intelligent behavior of plants. *Trends in Plant Science*,

21(4), 286–294.

- Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., & Taylor, G. L. (2001). Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology*, 306(4), 745–757.
- Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*, 492(3), 193–198.
- Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G., & Venkatesan, R. (2010a). Triosephosphate isomerase: A highly evolved biocatalyst. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(23), 3961–3982. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0473-9>
- Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G., & Venkatesan, R. (2010b). Triosephosphate isomerase: A highly evolved biocatalyst. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(23), 3961–3982. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0473-9>
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., & Davenport, R. C. (1992). Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology*, 224(4), 1115–1126.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., & Hol, W. G. J. (1991). Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate: a comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *Journal of Molecular Biology*, 220(4), 995–1015.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Lemaire, S. D., & Trost, P. (2012). The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Science*, 185, 86–96.
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Sciabolini, C., Giacinto, N. Di, Morisse, S., Marchand, C. H., ... Lemaire, S. D. (2014). High-resolution crystal structure and redox properties of chloroplastic triosephosphate isomerase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Plant*, 7(1), 101–120. <https://doi.org/10.1093/mp/sst139>
- Zárate-Pérez, F., Cháñez-Cárdenas, M. E., Arreola, R., Torres-Larios, A., & Vázquez-Contreras, E. (2009). Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(3), 626–630. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.085>
- Zhai, X., Amyes, T. L., & Richard, J. P. (2015). Role of loop-clamping side chains in catalysis by triosephosphate isomerase. *Journal of the American Chemical Society*, 137(48), 15185–15197.