



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA
DEL DESPLEGAMIENTO DE LA
PROTEÍNA LAO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

ANA GUADALUPE RAMOS VELÁZQUEZ

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Miguel Antonio Costas Basín

VOCAL: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SECRETARIO: Profesor: Daniel Alejandro Fernández Velasco

1er. SUPLENTE: Profesor: Sandra Paola Sánchez Rodríguez

2° SUPLENTE: Profesor: Ismael Bustos Jaimes

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de proteínas, segundo piso, Torre de Investigación, Facultad de Medicina

Asesor del tema: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Sustentante: Ana Guadalupe Ramos Velázquez

Agradecimientos

Gracias Dios por ser esa fuerza no circunscrita y llenarme cada día de la paz y de la energía necesaria para continuar el camino y así poder llegar algún día a la plenitud y ver tu rostro.

Gracias papá y mamá por ser esa fuente de amor inagotable y apoyo incondicional sin el cual, todo esto no hubiera sido posible. Los admiro por su valentía al enfrentar día a día las dificultades de la vida y les puedo decir ahora: no ha sido en vano. Los amo con todo mi corazón.

Gracias brosititos por su apoyo, consejos y amor. Ya que desde niña, me han cuidado y protegido. Los amo. Gracias Bolita por endulzar y darle sonrisas a mi vida junto con Quín, los amo. Gracias a Angie y a Julio por los momentos gratos que hemos vivido juntos.

Gracias a mi tutor el Dr. Alejandro Fernández por su paciencia, consejos, asesorías y ayuda incondicional durante todo este tiempo. Gracias a Luis Téllez por haber sido mi mentor a mi llegada al laboratorio, a Luis Blancas, a Dani Silva, a Martín González, a Alejandro Sosa, a Alán por su apoyo y consejos. Agradezco la hospitalidad de todos los del laboratorio: Dr. Ismael Bustos, Laura, Isabel, Sandra, Vale, Lola, Fátima, Haiven, Ana, Mónica, Sergio, Laura.

A mis amigos de la Facultad de Química ya que sin ellos estos años no tendrían sabor: Oli, Oscar, Víctor, Grisell, Vero, Kenia, Rose, y los que me faltan por nombrar, gracias por su compañía durante este tiempo.

Índice

1.	Resumen	5
2.	Introducción.....	7
3.	Marco Teórico	9
3.1	Plegamiento de proteínas	9
3.2	Estudio de plegamiento de proteínas in vitro	11
3.3	Desnaturalización de las proteínas.....	12
3.4	Agentes desnaturalizantes	12
3.5	Curvas de desnaturalización	13
3.6	Urea como agente desnaturalizante	13
3.7	Técnicas para seguir los cambios estructurales en el desplegamiento de las proteínas	14
3.8	Fluorescencia	15
3.9	Fluorescencia intrínseca	16
3.10	Mediciones por fluorescencia- Estado estacionario.	17
3.11	Apagamiento en fluorescencia	17
3.12	Dicroísmo circular	18
3.13	Calorimetría de barrido diferencial	20
3.14	Transportadores ABC	22
3.15	Proteínas periplásmicas de unión (PPU)	23
3.16	Proteína LAO.....	24
4.	Objetivos	28
5.	Diseño experimental	29
5.1	Expresión y purificación de la proteína LAO silvestre y LAO W47F.	29
5.2	Determinación de la concentración de proteína	30
5.3	Ensayos por técnicas espectroscópicas	31
5.3.1	Preparación de muestras en condiciones de desnaturalización y renaturalización	31
5.3.2	Ensayos con la técnica espectroscópica de Fluorescencia	32
5.3.3	Ensayos con la técnica espectroscópica de Dicroísmo Circular (DC)	33
5.4	Análisis y procesamiento de datos	34
5.5	Ensayos por técnica calorimétrica	36
5.5.1	Preparación de muestra	36
5.5.2	Ensayos por calorimetría.	37

6.	Resultados	38
6.1	Purificación de LAO silvestre y W47F	38
6.2	LAO: Proteína silvestre	40
6.2.1	Fluorescencia y Dicroísmo Circular a 25°C	40
6.2.2	Ensayos a diferentes temperaturas con urea	42
6.2.3	Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia	47
6.2.4	Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular	50
6.2.5	Curva de estabilidad de LAO	53
6.2.6	Calorimetría	54
6.3	LAO W47F	59
6.3.1	Fluorescencia y Dicroísmo circular a 25°C y 37°C	59
6.3.2	Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia	63
6.3.3	Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular	64
6.3.4	Comparación de las curvas de desnaturalización térmica de LAO silvestre y LAO W47F seguidas por Fluorescencia y Dicroísmo Circular.	67
7.	Discusión.....	69
8.	Conclusiones.....	73
9.	Perspectivas	74
10.	Bibliografía	75
11.	Apéndices	79
11.1	Obtención de elipticidad en dicroísmo circular.	79
11.2	Estructuras cristalinas de LAO.	80
11.3	Ensayos con LAO silvestre	80
11.3.1	Espectros de fluorescencia de la curva de desnaturalización isotérmica	80
11.3.2	Ensayo de reversibilidad.	81
11.3.3	Tiempos de equilibrio.	82
11.3.4	Espectros de emisión a diferentes temperaturas	83
11.3.5	Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia. Ensayo de reversibilidad	83
11.3.6	Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular. Ensayo de reversibilidad.	84
11.4	Ensayos con LAO W47F	85
11.4.1	Espectros de fluorescencia de la curva de desnaturalización isotérmica	85

11.4.2	Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia. Ensayo de reversibilidad	86
11.4.3	Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular. Ensayo de reversibilidad	87
11.5	Porcentaje de variación de los datos calculados	88
11.6	Análisis de la curva de desnaturalización por temperatura	88
11.7	Desviación estándar de la ordenada al origen al obtener la ecuación de la recta.	89

Resumen

En este trabajo se realizó la caracterización termodinámica del mecanismo de desplegamiento de la proteína periplásmica de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina (LAO) de *Salmonella typhimurium*

Se partió de la premisa que el desplegamiento de la proteína LAO sigue un patrón de dos estados.

Al realizar perfiles de desnaturalización isotérmica utilizando urea como el agente perturbante y curvas de desnaturalización térmica siguiendo las señales del cambio conformacional con dos técnicas espectroscópicas: Fluorescencia y Dicroísmo Circular se observaron transiciones monofásicos, las cuales se ajustaron a un modelo de dos estados; no obstante, al colocar en un gráfico los datos adquiridos por las diferentes técnicas, los perfiles no fueron coincidentes sugiriendo que concentraciones de intermediarios están presentes al equilibrio; sin embargo los valores de energía libre calculados de los diferentes ensayos son similares.

La mejor evidencia encontrada para confirmar que el desplegamiento de LAO no puede adecuarse a un modelo de dos estados fue al comparar los valores de entalpía de desnaturalización estimados: ΔH_{cal} con el ΔH_m de van't Hoff, encontrando una variación de hasta el 23%. Por otra parte, el valor del ΔC_p de desnaturalización calculado mediante dos métodos fueron iguales: $2.8 \pm 0.06 \text{ kcal/molK}$.

Posteriormente se compararon parámetros termodinámicos de LAO estimados en este trabajo con los de HisJ, proteína análoga a LAO, en donde se observó que el ΔC_p de desnaturalización era de 2.8 ± 0.06 y 2.6 kcal/molK , respectivamente. Además el ΔH_{cal} de LAO es igual al ΔH_{cal} del lóbulo mayor de HisJ: $155 \pm 1.34 \text{ kcal/mol}$. Al realizar esta comparación y con toda la evidencia

presentada en este trabajo es posible pensar que el mecanismo de desplegamiento de LAO no difiera tanto del presentado por HisJ.

Por último, se realizaron experimentos análogos con la mutante W47F en donde se encontró que las curvas de desnaturalización isotérmica con urea y térmica seguidas por las técnicas de Fluorescencia y Dicroísmo Circular también se ajustan a un modelo de dos estados; sin embargo al comparar los gráficos de ambas técnicas, éstas no son coincidentes.

Se compararon las curvas de desnaturalización isotérmica y térmica de LAO silvestre y LAO W47F, en ellas se observa que la C_m y la T_m , respectivamente, disminuyen en la mutante; además el valor de la energía libre de Gibbs estimada es menor que la calculada para la proteína silvestre sugiriendo una menor estabilidad en LAO W47F.

Introducción

LAO forma parte de una familia de transportadores ABC, los cuales transportan una variedad de compuestos desde azúcares hasta vitaminas. LAO es el receptor soluble de estos sistemas de transporte. LAO se une al sustrato en el periplasma y lo lleva al complejo membranal para ser translocado. Una de las características de este tipo de receptores solubles, en este caso LAO, es la alta afinidad y especificidad con la que se une a sus ligandos (en el intervalo de los nanomolares), así como el cambio de conformación al unirse a ellos.

Por lo tanto, LAO resulta ser un excelente candidato como elemento de reconocimiento molecular para el desarrollo de nuevos biosensores debido a que los cambios conformacionales inducidos por sus ligandos, junto con un elemento transductor (un fluoróforo: triptofano) son la base del mecanismo de éstos.

El interés por estudiar a la proteína de unión a L-arginina, L-lisina y L-ornitina (LAO) en este trabajo es la caracterización termodinámica del mecanismo de desplegamiento seguido por LAO para llegar del estado nativo al estado desnaturalizado.

Para la caracterización termodinámica es indispensable que los procesos de plegamiento y desplegamiento sean reversibles; además que la reacción de desnaturalización haya alcanzado el equilibrio.

Estudios previos con His J, la cual es una proteína análoga a LAO (cuya secuencia es idéntica en el 70% de los aminoácidos) mostraron, con evidencias experimentales de calorimetría de barrido diferencial (DSC), que los dominios presentes en esta proteína se pliegan de manera independiente (con o sin ligando unido) y que cada uno sigue un modelo de dos estados (Kreimer *et al*, 2000). Estos antecedentes influyeron para plantearse si el mecanismo de plegamiento de LAO sería o no similar al de HisJ, es decir, si en el proceso existe o no un intermediario al equilibrio.

Para este estudio del plegamiento-desplegamiento de la proteína LAO se utilizaron dos agentes desnaturizantes: urea y temperatura; las transiciones fueron monitoreadas por medio de dos técnicas espectroscópicas: fluorescencia y dicroísmo circular (DC). Además, de una calorimétrica: calorimetría de barrido diferencial (DSC). La fluorescencia permitió observar cambios en la estructura terciaria de la proteína LAO, partiendo de la proteína nativa (N) hasta la proteína desplegada (D). La técnica de dicroísmo circular (DC), fue empleada para observar diferencias en la estructura secundaria de LAO. Por último, la técnica calorimétrica permitió caracterizar cambios energéticos que acompañan a la desnaturalización térmica.

Marco Teórico

Plegamiento de proteínas

La síntesis de proteínas se lleva a cabo en el proceso de traducción del RNA mensajero. La cadena polipeptídica recién sintetizada adquiere una estructura tridimensional y un arreglo espacial para llegar a un estado nativo y funcional, a este proceso se le conoce como plegamiento. En proteínas oligoméricas, la formación de una estructura cuaternaria definida se conoce como asociación. El plegamiento y la asociación deben estar coordinados ya que el ensamblaje de las subunidades requiere que las superficies de los monómeros se encuentren en una conformación correcta para que ocurra el reconocimiento específico (Jaenicke, 1987). En el plegamiento in vivo, existen factores auxiliares como chaperonas y catalizadores como la isomerasa de disulfuros y la peptidil prolil cis-trans isomerasa que asisten el proceso de plegamiento. Sin embargo, estos factores sólo facilitan el plegamiento productivo en el ambiente celular, pero no lo dirigen.

El mecanismo por el cual la proteína adquiere su estructura tridimensional nativa y funcional sigue siendo incierto, sin poderse explicar hoy en día. A partir de los resultados de la renaturalización por oxidación - reducción de la ribonucleasa (Anfinsen, 1973), se propuso que la estructura nativa está determinada por la secuencia de aminoácidos y las interacciones de ésta con el solvente.

El plegamiento de proteínas puede considerarse como una transición entre fases (desplegada, nativa e intermediarios), en donde cada una posee muchas conformaciones (Pande et al., 1998). Por lo que la proteína nativa es un sistema dinámico que fluctúa entre un número de conformaciones y no una estructura única (Jaenicke, 1987).

Si el proceso de plegamiento a partir del estado desplegado de una proteína se hiciera por la búsqueda al azar entre las diferentes conformaciones, el tiempo que se requeriría para obtener una proteína nativa sería demasiado largo, tan largo

como millones de años; sin embargo, las proteínas se pliegan en segundos. A esta observación se le conoce como paradoja de Levinthal (Levinthal, 1968)

De todas las conformaciones posibles de la cadena polipeptídica sólo algunas son importantes, aquellas cinéticamente accesibles en la escala de tiempo del plegamiento y se conocen como rutas preferenciales de plegamiento.

La caracterización de intermediarios podría determinar algunos factores que guíen el plegamiento de las proteínas a través de rutas productivas.

De acuerdo al modelo de plegamiento jerárquico (Mathews, 1991, 1993), durante los primeros milisegundos del plegamiento, la molécula se compacta y aparecen elementos de estructura secundaria. La siguiente etapa involucra la formación de puentes de hidrógeno estables y la exclusión de algunos aminoácidos hidrofóbicos del solvente. En esta etapa inicia la formación de la estructura terciaria, y pueden presentarse intermediarios con estructura muy semejante a la nativa. Los últimos eventos involucran la formación del resto de las interacciones no covalentes que mantienen la conformación nativa, siendo la etapa más lenta del proceso de plegamiento.

La propuesta de rutas de plegamiento es la visión considerada como clásica, e involucra una secuencia lineal de eventos; sin embargo existe otra visión basada en modelos de mecánica estadística donde se proponen diagramas de embudo. Los modelos mecánico- estadístico reconocen que los diferentes estados de plegamiento son en realidad ensambles de conformaciones. En el modelo de embudo, el plegamiento es un proceso de flujos paralelos de estas diferentes conformaciones. La idea de un embudo indica que las conformaciones adoptadas por la cadena poseen menor energía libre, reduciendo progresivamente su dimensionalidad en el espacio conformacional accesible. El embudo se va estrechando hasta llegar a la conformación nativa (Baldwin, 1995; Dill y Chan, 1997).

Estudio de plegamiento de proteínas in vitro

Los diferentes pasos del patrón de plegamiento que se han seguido son el análisis cinético y termodinámico de procesos de desplegamiento y replegamiento *in vitro*.

Es evidente que la reconstrucción *in vitro* difiere del plegamiento *in vivo* porque el replegamiento parte de una cadena completa de péptidos mientras que el plegamiento *in vivo* es un proceso que involucra el crecimiento de la cadena del amino al carboxilo terminal plegándose conforme se va sintetizando (Jaenicke, 1987). Para considerar la comparación del plegamiento *in vitro* e *in vivo* válida, se tiene que cumplir que el producto final de la renaturalización debe ser indistinguible del estado nativo inicial.

En términos termodinámicos, el plegamiento puede ser descrito como la transición reversible entre dos estados: N (Nativo) y D (Desnaturalizado). Para un conjunto de condiciones definidas (temperatura, presión y concentración de solutos) es posible determinar la relación de estas dos poblaciones en el equilibrio:

$$K_{eq} = [N] \times [D]^{-1} \dots\dots(ec. 1)$$

Por tanto, a partir de la constante de equilibrio (K_{eq}) es posible calcular la estabilidad de la conformación nativa, esto es, el trabajo necesario para la formación o ruptura de esta estructura, a partir de la diferencia en energía libre (ΔG^0) entre el estado nativo y el desnaturalizado (Fernández- Velasco, 1995).

La reversibilidad es un requisito indispensable para este tipo de análisis del proceso de plegamiento. Sin embargo, no todas las proteínas presentan un proceso de renaturalización reversible.

Desnaturalización de las proteínas

La estructura nativa de las proteínas se conserva bajo condiciones físicas apropiadas de pH, temperatura, presión, etc. El cambio en las propiedades del solvente puede originar la pérdida de la estructura nativa o desnaturalización. Se conoce como desnaturalización a efectos en las interacciones no covalentes que den como resultado un cambio en la conformación de una proteína sin afectar interacciones covalentes (a excepción de los puentes disulfuro). Cambios pequeños en las condiciones ambientales pueden no tener efecto sobre la estructura nativa de las proteínas; sin embargo, si el cambio en alguna variable sobrepasa un valor crítico, la proteína se desnaturaliza cooperativamente (Fernández- Velasco, 1995).

Agentes desnaturalizantes

Los desnaturalizantes utilizados para el desplegamiento de las proteínas globulares pueden ser físicos o químicos.

- Químicos: el cloruro de guanidinio (GdnHCl), urea, dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de litio, tiocianato de potasio, cloruro de calcio y tiocianato de guanidina.
- Físicos: aumento en la presión hidrostática, aumento o disminución en la temperatura (Tandford, 1970).

Los ensayos de desnaturalización se basan en seguir los cambios en la estructura conforme aumenta la condición desnaturalizante. Al graficar la proporción entre el número de moléculas de proteína que se encuentran en el estado nativo y el desnaturalizado, se obtiene una curva o perfil de desnaturalización.

Curvas de desnaturalización

Las curvas de desnaturalización están divididas en tres regiones:

- a. La región de la pre-transición, muestra como la variable dependiente, intensidad de fluorescencia por ejemplo, varía con el desnaturalizante reflejando el efecto del cambio en el solvente sobre las propiedades del estado nativo.
- b. La región de la transición, muestra como la variable dependiente varía al ocurrir el desplegamiento debido al cambio en la fracción de proteína nativa.
- c. La región de la pos- transición, muestra como la variable dependiente, intensidad de fluorescencia, varía con el desnaturalizante reflejando el efecto del cambio en el solvente sobre las propiedades del estado nativo.

Cada una de estas regiones es de gran importancia para el análisis. Se recomienda tener en la pre- y pos- transición cuatro puntos y 5 puntos en la región de la transición (Pace, 1989).

Urea como agente desnaturalizante

Tanto la urea como el cloruro de guanidinio son agentes caotrópicos utilizados para los ensayos de desnaturalización en condiciones de equilibrio y cinéticas. Estos agentes desnaturalizantes solubilizan todas las partes constitutivas de la proteína, desde la cadena polipeptídica hasta las cadenas hidrofóbicas laterales.

Se piensa que el mecanismo de unión del desnaturalizante es el causante de la desestabilización de la proteína nativa. En este mecanismo, los agentes estabilizadores, como el glicerol, tienen baja interacción con la superficie de la macromolécula haciendo a la proteína menos soluble. Sin embargo, los agentes caotrópicos como la urea y el cloruro de guanidinio interaccionan con la superficie de la proteína, especialmente con aquellas superficies no polares que tienden a estar dentro de la molécula (los valores de energía libre de transferencia de

cadena hidrofóbica del interior al exterior de la proteína son negativos) haciendo más soluble a la proteína. Ambos desnaturalizantes aumentan la solubilidad de moléculas polares y no polares disminuyendo la magnitud de las interacciones hidrofóbicas. De hecho, la interacción con las superficies polares y no polares es más favorable que su interacción con el agua, esto se ha cuantificado por la energía libre de transferencia de agua a una solución de desnaturalizante (Creighton, 1993).

Dentro del estudio realizado en este trabajo, se encuentra la desnaturalización por dos agentes: urea y temperatura. Por tanto, es importante saber que en varias proteínas como la ribonucleasa T₁ y la 6aJL2, por ejemplo, se ha comprobado que el ΔG obtenido utilizando diferentes agentes caotrópicos (temperatura y urea) muestra valores semejantes; esto es, los estados desnaturalizados producidos por diversos agentes desnaturalizantes son termodinámicamente equivalentes. Más claro, las diferencias en energía entre estos conformeros son despreciables en relación a la diferencia de energías entre el estado nativo y el desnaturalizado (Hu, 1992)

Técnicas para seguir los cambios estructurales en el desplegamiento de las proteínas

Al desnaturalizar es fundamental utilizar una señal sensible a los cambios en la conformación de la proteína nativa.

Algunas de las técnicas usadas para medir cambios estructurales durante el desplegamiento son: la espectroscopía diferencial de UV, la fluorescencia, el dicroísmo circular (DC), la dispersión óptica rotatoria (DOR), la resonancia magnética nuclear (RMN), la viscosidad y el intercambio deuterio- hidrógeno (Pace *et al.*, 1989; Dobson *et al.*, 1994).

La espectroscopía puede dar información sobre los cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína en solución. Además, se requieren

cantidades pequeñas de proteína para realizar estas mediciones en comparación con la técnica calorimétrica.

Fluorescencia

Con la técnica de fluorescencia es posible obtener información termodinámica y cinética de las transiciones de macromoléculas, como los procesos de plegamiento- desplegamiento de proteínas (Eftink, 1994).

La sensibilidad de la técnica permite que los ensayos puedan ser llevados a cabo en concentraciones micromolares (o menores), lo cual minimiza los problemas asociados con la agregación y baja solubilidad. Además, las señales de fluorescencia son muy sensibles a los estados conformacionales de las macromoléculas (Eftink, 1994).

La fluorescencia ocurre cuando un fotón es absorbido por un compuesto, por tanto el electrón pasa a un estado excitado y decae por re-emisión del fotón (el tiempo de vida de un estado excitado es de 10 ns) al estado basal. Esta emisión ocurre a mayores longitudes de onda (con respecto al espectro de absorción) debido a que una parte de la energía se pierde en procesos como las transiciones vibracionales (Fersht, 1999).

En estudios con proteínas, los fluoróforos pueden ser intrínsecos: aminoácidos aromáticos, flavinas, vitamina A, clorofila y el NADH, o extrínsecos: cloruro de dansilo, pireína, fluoresceína y el 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS). Los fluoróforos extrínsecos pueden unirse covalente o no covalentemente a la molécula de interés (Eftink, 1994).

La señal de fluorescencia es extremadamente sensible al microambiente del fluoróforo por tanto es confiable para monitorear transiciones conformacionales de la proteína. Entre los parámetros que se pueden obtener debido a los cambios en las señales se encuentran: la intensidad de fluorescencia (IF), longitudes de

onda de emisión λ_{em} y excitación λ_{ex} , rendimiento cuántico, entre otras (Eftink, 1994).

Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe a la presencia de los fluoróforos naturales: fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptofano (W), estos tres aminoácidos son escasos en las proteínas. El W, el cual es el fluoróforo dominante, está presente en 1% mol en proteínas. En un medio hidrofóbico como el interior de una proteína plegada, la emisión de los W se lleva a cabo a longitudes de onda menores que la que ocurre cuando estos residuos se exponen al solvente, por lo que es posible seguir los cambios en la intensidad de la fluorescencia y el cambio de la longitud de onda de máxima emisión, al aumentar una condición desnaturalizante en la que se exponen los residuos W al solvente. (Lakowics, 1999)

La fluorescencia de los W se ha usado para seguir la movilidad interna en el ambiente de regiones particulares de la proteína; sin embargo, existen dificultades para interpretar las señales de fluorescencia de las proteínas que tienen más de un W. Para dichas proteínas es difícil resolver la contribución de cada uno de los fluoróforos limitando la interpretación de las características dinámicas de las cadenas laterales durante los estudios de desplegamiento de las proteínas (Royer *et al.*, 1993). La sustitución de cadenas laterales fluorescentes como el W por otro residuo (preferentemente aromático pero menos fluorescente) por mutagénesis dirigida es una solución a este problema para posteriormente seguir la fluorescencia remanente. Este tipo de estrategia ha permitido obtener datos de asignación de la contribución de fluorescencia de un W en particular o bien elucidar algunos aspectos sobre la estructura y función de alguna proteína (Mogi *et al.*, 1989)

Mediciones por fluorescencia- Estado estacionario.

Las mediciones por fluorescencia pueden ser clasificadas en dos tipos: Estado estacionario y resueltas en tiempo. Las mediciones realizadas en este trabajo fueron mediciones en estado estacionario. Éstas son las más comunes y se realizan con iluminación y observación constantes. La muestra es radiada con luz constante y el espectro de intensidad o de emisión se registra. Muchas mediciones se hacen en estado estacionario debido a la escala de tiempo en nanosegundos de fluorescencia. Cuando la muestra se expone a la luz, el estado estacionario se alcanza de manera inmediata.

Apagamiento en fluorescencia

La intensidad de fluorescencia puede ser disminuida por una variedad de procesos. Dicho decremento en la intensidad se llama apagamiento. El apagamiento puede ocurrir por mecanismos diferentes. El apagamiento por colisión ocurre cuando el estado excitado del fluoróforo es desactivado por contacto con otra molécula en solución, la cual recibe el nombre de apagador. Las moléculas no se alteran químicamente en el proceso. Una variedad de moléculas pueden actuar como apagadores por colisión, algunas son el oxígeno, halógenos, aminas y moléculas deficientes de electrones como la acrilamida. El mecanismo de apagamiento varía con el par fluoróforo- apagador. Por ejemplo el apagamiento del indol por acrilamida se da por la transferencia de electrones del indol a la acrilamida, el cual no ocurre en el estado excitado. El apagamiento por halógenos y átomos pesados ocurre debido al acoplamiento spin- orbita. Además de apagamiento por colisiones, el fluoróforo puede formar complejos no fluorescentes con los apagadores, este proceso se denomina apagamiento estático ya que este ocurre en el estado basal (Lakowicz, 2006).

Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una propiedad presentada por moléculas ópticamente activas. Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha (R) y el otro a la izquierda (L). Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. Además, los coeficientes de extinción molar para los vectores circularmente polarizables, derecha (ϵ_D) e izquierda (ϵ_I) son diferentes. Se puede utilizar DC en proteínas ya que la cadena polipeptídica es ópticamente activa en el UV lejano (el enlace peptídico absorbe en la región de 170- 230nm); además, diferentes estructuras secundarias muestran un espectro característico. El triptofano y la tirosina pueden dar señales en DC pero en el UV cercano (270- 300nm).

El coeficiente de extinción molar se define como:

$$\epsilon = \frac{A}{cl} \dots\dots\dots (\text{ec. 2})$$

El D.C. es la diferencia en el coeficiente de extinción molar, $\Delta\epsilon$, entre la luz polarizada de la izquierda y la derecha.

$$\Delta\epsilon = \epsilon_I - \epsilon_D \dots\dots\dots (\text{ec. 3})$$

O,

$$\Delta\epsilon = \frac{(A_I - A_D)}{cl} \dots\dots\dots (\text{ec. 4})$$

Donde A_I es la absorbancia de la luz polarizada a la izquierda y A_D de la luz polarizada a la derecha. Esta diferencia aparece por lo regular en un intervalo de

0.005 a 0.1% de A_I o A_D . $\Delta\epsilon$ tiene unidades de $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Muchos instrumentos de dicróismo circular dan el valor en elipticidad, θ , medida en grados, donde

$$\theta = 33 \times (A_I - A_D) \dots\dots\dots (\text{ec. 5}) \text{ (Apéndice 1)}$$

θ es convertida en elipticidad molar $[\Theta]$:

$$[\Theta] = \frac{100\theta}{d} \text{ o } [\Theta] = 3300 \times \Delta\epsilon \dots\dots\dots (\text{ec. 6})$$

Por tanto las unidades de $[\Theta]$ son $^\circ\text{Ccm}^2\text{dmol}^{-1}$ (d=deci).

Las principales longitudes de onda a las cuales el enlace peptídico absorbe luz están alrededor de 222nm, 208-210nm y 191-193nm. Los tipos principales de estructuras secundarias tienen características especiales. La hélice α se caracteriza por una señal grande y negativa en 222 y 208nm y una positiva en 192nm. Las hebras β proporcionan señales débiles en longitudes cercanas a las de la hélice α (Fersht, 1999).

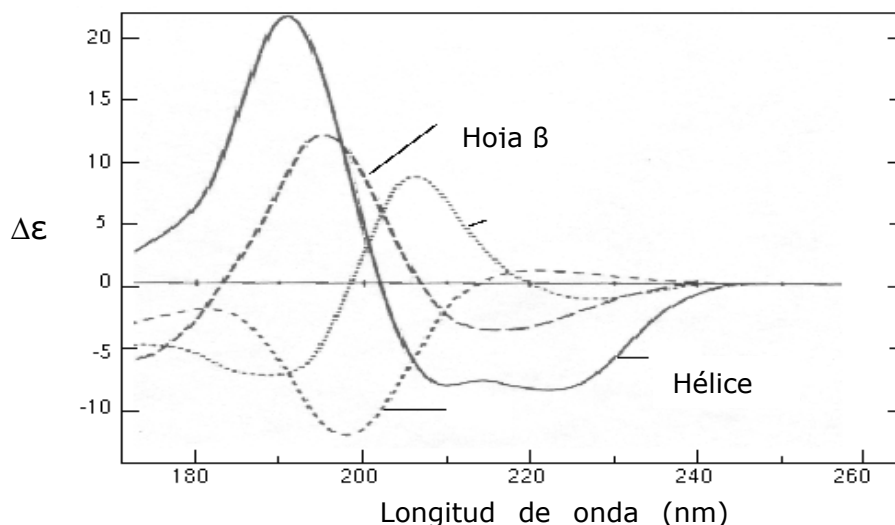


Figura 1. Espectro de D.C. Se muestran las hélices α y las hebras β (Brahms, 1980)

Calorimetría de barrido diferencial

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) consiste en calentar una muestra (S) y un compuesto de referencia (R) de tal manera que la temperatura es en todo

momento igual en R y en S. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y ajustando las potencias de calentamiento. Se aplican velocidades de calentamiento (en grados/s) uniformes a la muestra y a la referencia para realizar el barrido de temperaturas. La representación de la potencia de calentamiento frente a la temperatura es lo que se denomina diagrama DSC o, dado que se realiza frente a la temperatura, termograma. DSC detecta transiciones que implican intercambio de energía, sea almacenamiento de calor (procesos endotérmicos) o liberación de calor (procesos exotérmicos). Ejemplos de estos procesos son las transiciones de fase (sólido- sólido o sólido-líquido), procesos de cristalización, oxidaciones irreversibles, deshidrataciones, etc. (Chowdhry, 1997). Para muestras biológicas, esta técnica está considerada hoy en día como la más adecuada para estudiar la energética de las transiciones plegamiento-desplegamiento de las proteínas. Permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas (Chowdhry, 1997).

La desnaturalización térmica de proteínas se mide en el calorímetro de barrido diferencial, el cual mide el calor absorbido por la proteína, cuando ésta se calienta lentamente, la concentración de proteína debe estar cercana a 1mg/mL; esta muestra junto con el buffer de referencia se calientan mediante resistencias eléctricas. La corriente adicional requerida para calentar la solución de proteína es registrada. Cuando la proteína empieza a desnaturalizarse, hay un gran consumo de energía porque el proceso es muy endotérmico. La temperatura en el máximo del pico es la T_m (temperatura de fusión). El área bajo la curva, después de la resta de la línea base, es la entalpía de desnaturalización, ΔH_{D-N} . A este valor entálpico se representa como $\Delta H_{D-N(cal)}$. En la T_m , ΔG_{D-N} es cero porque la concentración de D y N son iguales ya que,

$$\Delta G_{D-N} = -RT \times \ln \frac{[D]}{[N]} \dots\dots (ec. 7)$$

Además,

$$\Delta H_{D-N(T_m)} = T_m \times \Delta S_{D-N(T_m)} \dots\dots (ec. 8)$$

Ahora bien, el valor de la T_m para una clase en particular de proteínas no es necesariamente una medición de su estabilidad, sino simplemente es la razón entre la entalpía y entropía de desnaturalización.

Por otro lado, es difícil medir el ΔC_p de un solo termograma, por lo que un procedimiento alternativo es calcular $\Delta H_{D-N(cal)}$ en soluciones donde se incremente la acidez. Las proteínas se desestabilizan paulatinamente al disminuir el pH y la T_m incrementa. La disminución en la estabilidad es debido a la protonación de los grupos carboxilos ya que se conoce que éstos tienen baja entalpía de ionización. Numerosos experimentos han mostrado que $\Delta H_{D-N(cal)}$ disminuye al bajar el pH, y al graficar $\Delta H_{D-N(cal)}$ contra la T_m calculada a diferentes valores de pH obtenemos una recta y la pendiente es el ΔC_p (Fersht, 1999). Ya que:

$$\Delta C_p = \frac{\partial H}{\partial T} \dots\dots\dots (ec. 9)$$

La mayoría de la información generada sobre plegamiento ha sido obtenida al estudiar proteínas monoméricas pequeñas (100 a.a.) por ejemplo la ribonucleasa (Anfinsen, 1973) ya que en ellas la transición de la conformación nativa a la desnaturalizada es reversible (Fernández- Velasco, 1995).

En contraste, el conocimiento adquirido sobre proteínas de mayor peso molecular es limitado debido a que generalmente presentan fenómenos de agregación irreversible. La proteína de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina (LAO) utilizada para este estudio es relativamente grande (238 a.a.). Estudios preliminares muestran que su desplegamiento en presencia de urea y temperatura es reversible, lo cual la hacen un sistema idóneo para la caracterización termodinámica.

LAO forma parte de los transportadores ABC, de los cuales mencionaré sus principales características a continuación.

Transportadores ABC

La superfamilia de transportadores ABC transporta una variedad de compuestos como son azúcares, iones, aminoácidos, metales, oligopéptidos, vitaminas a través de las membranas de procariotas y eucariotas (Ames, 1986).

Los transportadores ABC comparten una extensa homología en su secuencia; y están compuestos por cuatro elementos estructurales: dos proteínas integrales de membrana y dos dominios hidrofílicos que contienen motivos conservados de unión a nucleótidos.

En los procariotes, los dominios están separados por polipéptidos y forman un complejo membranal de unión. Entre estos sistemas, el más estudiado es el de las bacterias Gram (-) que además de tener este complejo, poseen un receptor soluble (proteína periplásmica de unión: PPU) el cual se une al sustrato en el periplasma y lo lleva al complejo membranal para ser translocado (Cheng *et al.*, 1998)

El modelo de transporte periplásmico inicia con la unión del sustrato con la PPU, se postula que el complejo ligando-proteína interactúa con el complejo membranal, el cual debido a esta interacción sufre cambios conformacionales permitiendo la formación de un poro a través del cual el sustrato difunde, la energía necesaria para realizar este proceso es proporcionada por la hidrólisis del ATP (Speiser y Ames, 1990).

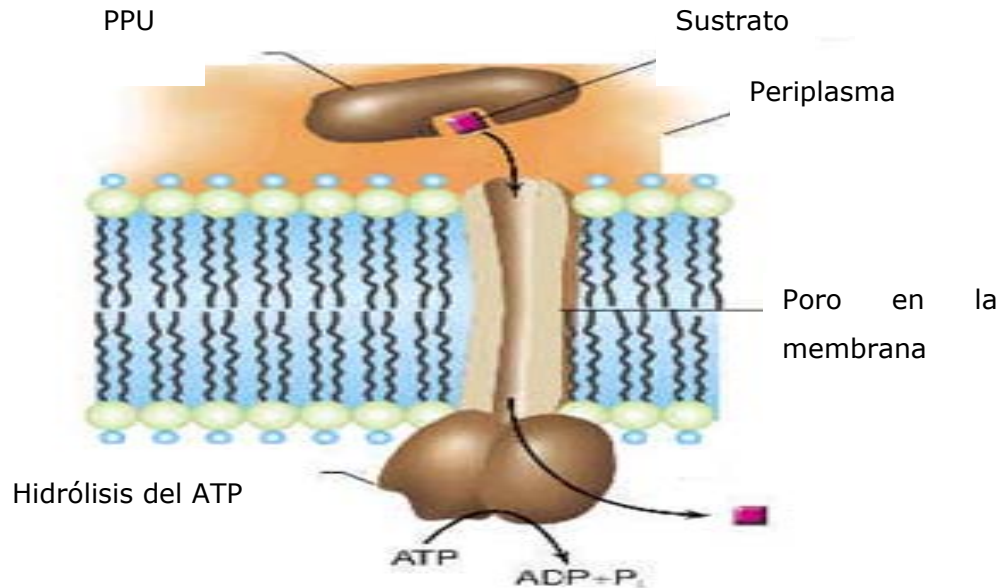


Figura 2. Mecanismo de acción del transportador ABC.

Proteínas periplásmicas de unión (PPU)

Las PPU son componentes esenciales para el transporte, los cuales funcionan como receptores para la quimiotaxis y el transporte activo en los sistemas bacterianos.

Una de las características de estas proteínas es la alta afinidad y especificidad con la que se unen a sus ligandos, esto es, en el intervalo de micromolar a nanomolar. (de Lorimier *et al.*, 2002). Las PPU tienen un motivo estructural común que consiste en dos dominios unidos por una bisagra y un sitio de unión entre los lóbulos de la misma. Un aspecto importante asociado a esta superfamilia es el cambio conformacional que presenta al unir sus ligandos: de una forma abierta –libre de ligando- a una forma cerrada- unida a ligando. Estas proteínas se han clasificado en dos subclases denominadas clase I (eg. Proteína de unión a arabinosa) y clase II (eg. Proteína de unión a maltosa, de unión a fosfato, proteína LAO), que difieren en la topología con que la cadena polipeptídica se distribuye entre los dos dominios de acuerdo con la clasificación SCOP.

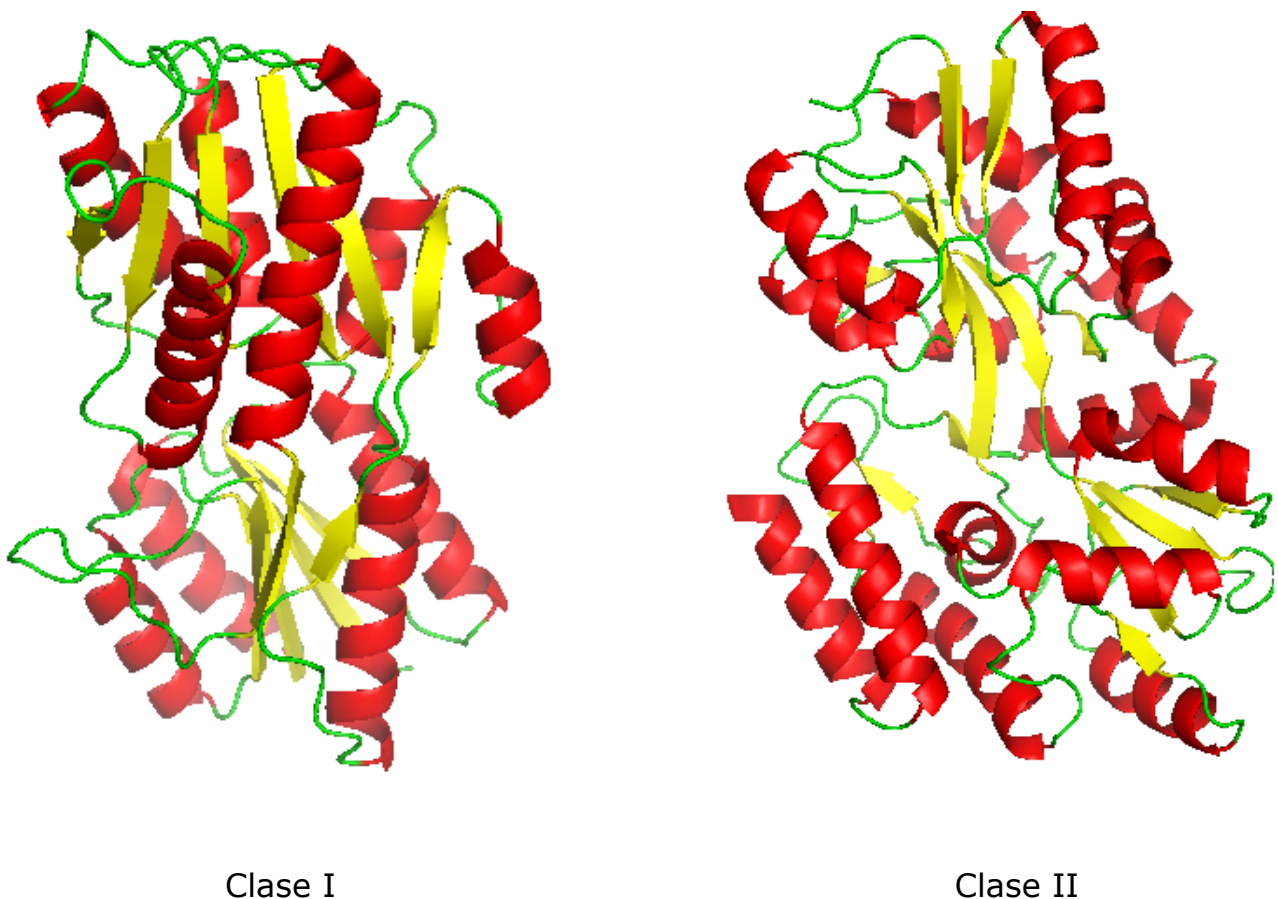


Figura 3. Estructuras representativas de las dos clases de PPBs. Clase I, con seis hebras β representada por la proteína de unión a arabinosa (IBAP.pdb); clase II, con cinco hebras β representada por la proteína de unión a maltosa (IPEB.pdb) (Telmer y Shilton, 2003).

Proteína LAO

El sistema de transporte de aminoácidos de *S. typhimurium* es uno de los más estudiados. Los genes *argT*, *hisJ*, *hisQ* e *hisP* codifican a la proteína periplásmica de unión a L-lisina, L-arginina y L-Ornitina (proteína LAO), la proteína periplásmica de unión a L-histidina (proteína J), una proteína de localización denominada proteína Q y una proteína intermembranal llamada proteína P, respectivamente.

HisJ y su homólogo LAO presentan un 70% en similitud en su secuencia. Estas proteínas se encuentran en bacterias Gram (-) tales como *E. coli* y *S. typhimurium*.

LAO está constituida por 238 aminoácidos y tiene un peso molecular de 26 KDa (Higgins y Ames, 1981) Su estructura terciaria está conformada por dos lóbulos unidos por dos segmentos cortos (residuos: 89-92 y del 186-194), donde un lóbulo está formado por los residuos 1-88, 195-238 (dominio mayor) y el otro lóbulo está compuesto por los residuos 93-135 (dominio menor). Ambos lóbulos exhiben un patrón de plegamiento semejante que consiste en un núcleo central de hebras β y alrededor de éstas se encuentran hélices. (Kang *et al.*, 1993)



Figura 4. Topología y estructura terciaria de LAO. La imagen de la derecha muestra la topología de LAO: 4 hélices α y 5 hebras β , una de las cuales es antiparalela a las otras cuatro para cada dominio. A la izquierda se muestra la estructura terciaria de LAO la cual es bilobular unida por cadenas cortas de péptidos (2LAO.pdb).

Las constantes de disociación, K_d , de los ligandos L-arginina, L-lisina, L-ornitina y L-histidina de LAO es de 14, 15, 29 y 500nM respectivamente. (Nikaido y Ames, 1992) Las estructuras cristalográficas de la proteína LAO se encuentran disponibles, tanto para la forma apo (abierta sin ligando) como para los complejos con cada uno de sus ligandos (Oh Pandit *et al.*, 1993; Ames *et al.*, 1994) (Apéndice 2). Los residuos que se localizan en el sitio de unión son: Aps-

11, Tyr-14, Asp-30, Phe-52, Ser-69, Ser-70, Ser-72, Arg-77, Leu-117, Thr-121 y Asp-161. (Oh, 1993).

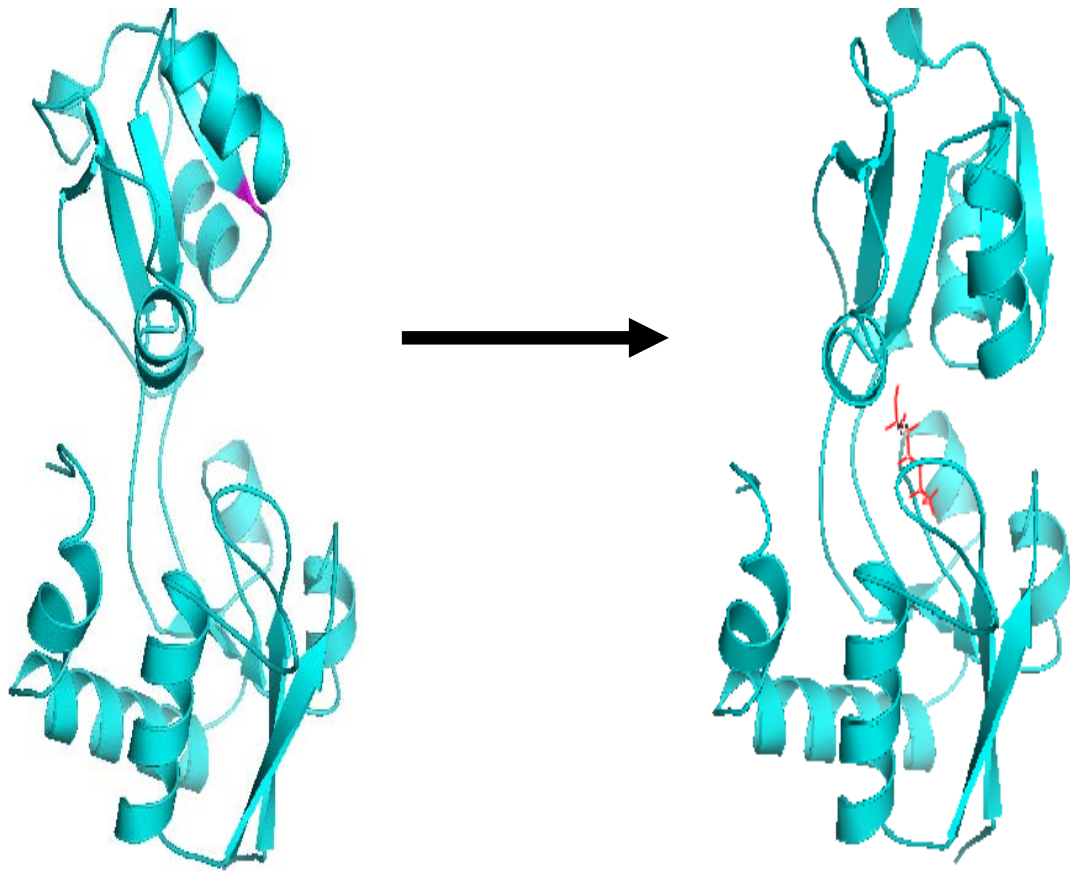


Figura 5. Proteína periplásmica de unión de L-lisina, L-arginina y L-ornitina. A la izquierda se muestra la proteína LAO sin ligando (forma abierta, 2LAO.pdb) y a la derecha la proteína LAO con ligando: L-lisina (forma cerrada, 1LST.pdb).

LAO posee en su estructura dos triptofanos: W47 y W130. Gracias a estos residuos es posible seguir el proceso de desplegamiento por medio de fluorescencia; además cerca del W47 se encuentra un puente disulfuro (posición: 38 y 45), el cual se cree es un apagador del W47.

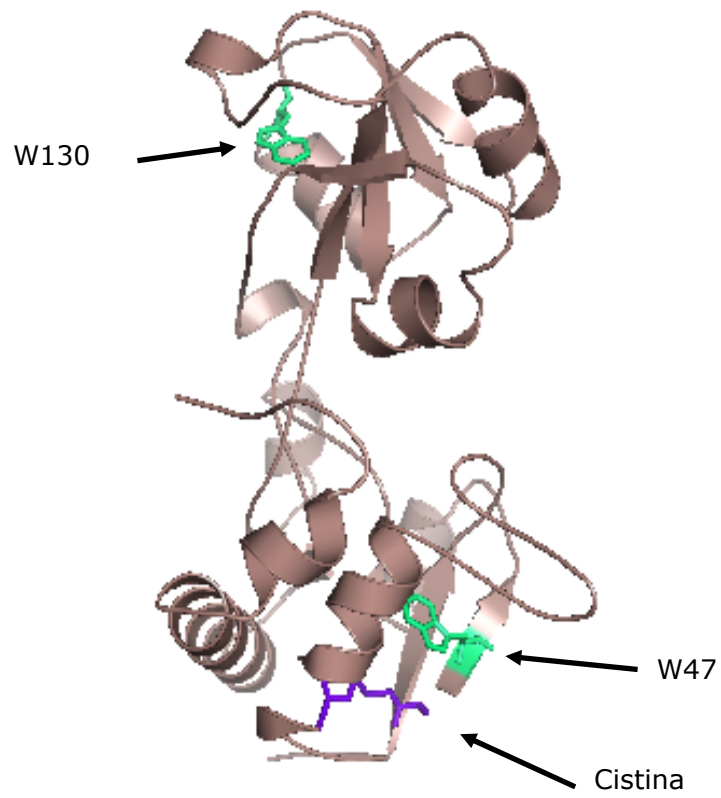


Figura 6. Proteína de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina. Se muestra las posiciones de los fluoróforos en cada dominio y el puente disulfuro cerca del triptofano 47.

Objetivos

General

- Caracterizar el patrón de desplegamiento al equilibrio de la proteína de unión a L-lisina, L-arginina y L-Ornitina (LAO) de *Salmonella typhimurium*.

Particulares

- Obtener los parámetros termodinámicos del desplegamiento inducido por urea y temperatura por medio de técnicas espectroscópicas: Fluorescencia y Dicroísmo circular; y de una técnica calorimétrica: Calorimetría de barrido diferencial.
- De acuerdo con la información experimental obtenida, determinar el mecanismo de desplegamiento de LAO al equilibrio.
- Conocer la estabilidad de la mutante W47F con respecto a la silvestre por medio de parámetros obtenidos de las curvas de desnaturalización isotérmica y térmica.

Diseño experimental

Expresión y purificación de la proteína LAO silvestre y LAO W47F.

La proteína LAO y su mutante (W37F) se obtuvieron a través de sobreexpresión utilizando células quimiocompetentes de la cepa BL21AI de *Escherichia coli*. Por medio de choque térmico a 42°C, a las células se les introdujo un plásmido (pET12b) que contiene la secuencia que codifica para la proteína LAO "silvestre" de *Salmonella typhimurium* o LAO W37F, un promotor de arabinosa y una secuencia de resistencia al antibiótico ampicilina (amp). Estas células se incubaron a 37°C en agitación constante a 250 rpm durante 1 hora en medio líquido Luria- Bertani (LB). Posteriormente el contenido se vertió en tubos con 10 mL de LB con amp (100µg/mL) y se dejaron en agitación hasta el día siguiente.

Después de la incubación, todo el medio líquido se vertió en un precultivo de 250 mL (medio LB + amp), en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Dos horas después, el precultivo se transvasó en un matraz con 1 L de medio líquido LB + amp y se continuó incubando bajo las mismas condiciones. A partir de este momento, se observó a diferentes tiempos la densidad óptica (D.O.) del medio ($\lambda=550$ nm) hasta llegar a un valor de entre 0.8 y 1. Al llegar a esta D.O. se agregó arabinosa al medio con una concentración de 2 % (m/v) para comenzar la inducción y se incubó durante 4 h (tiempo máximo). Al término del tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió en una solución con Tris 50 mM pH 7.5 y se centrifugó por 10 min a 4500 rpm. De nuevo, el sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido en una solución con Sacarosa 20 % y EDTA 1 mM en acetato de potasio (KAc) 10 mM pH 5.1, dejando reposar durante 10 min. Al término del reposo, se centrifugó por 10 min a 4500 rpm. El paquete celular se resuspendió de nuevo en 50mL de KAc 10 mM pH 5.1. Por último, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min para obtener el

sobrenadante, el cual contienen la proteína de interés. (Ames y Lever 1972; Lever 1972).

Para caracterizar el mecanismo de desplegamiento de LAO, nos interesa la proteína sin ligando, pero debido a la alta afinidad de LAO, una gran porción de la proteína purificada tiene ligando unido.

Para separar a LAO de su ligando, se colocó el sobrenadante en tubos para filtración Amicon® Ultra (estos tubos se utilizan para cambiar el solvente a la proteína ya que la diálisis contamina la muestra debido a una impureza desconocida) y se agregó cloruro de guanidinio 2 M en Hepes 10 mM pH 8 para desnaturalizar a la proteína y así eliminar el ligando centrifugando durante 2 periodos de 25 min a 10,000 rpm. Se renaturalizó la proteína con un cambio en el solvente utilizando un amortiguador de Bis-tris propano 5 mM pH 8.5 centrifugando a la misma velocidad y con un volumen de buffer de 50 mL.

LAO fue purificada usando una columna de intercambio aniónico (Source Q, Amersham Biosciences) equilibrada con solución amortiguadora de Bis-tris propano 5 mM pH 8.5. Las fracciones colectadas se colocaron en un tubo para filtración Amicon® Ultra para cambiar el solvente al buffer de trabajo: Hepes 10 mM pH 8 utilizando un volumen de amortiguador de 50 mL.

El método de desnaturalizar-renaturalizar para obtener LAO sin ligando es válido, ya que se obtiene gran cantidad de proteína sin ligando; además la proteína renaturalizada y la proteína que nunca pasó por este proceso de renaturalización no varían en sus propiedades.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de la proteína LAO silvestre y la mutante (W37F) se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985).

Ensayos por técnicas espectroscópicas

Preparación de muestras en condiciones de desnaturalización y renaturalización.

Para el estudio del mecanismo de plegamiento de la proteína LAO, se emplearon como agentes desnaturalizantes urea y temperatura.

Desnaturalizante urea. Se preparó una solución stock de urea concentrada (~7 M) con Hepes 10 mM (pH 8). Se obtuvieron los índices de refracción (IR) de la solución amortiguadora (blanco) y del stock de urea+Hepes, en un refractómetro. Con estos valores, se estimó la concentración exacta de urea (ec. 1) (Warren y Gordon, 1966).

$$[\text{Urea}] = 117.66 (\text{IR}_{\text{muestra}} - \text{IR}_{\text{buffer}}) + 29.753 (\text{IR}_{\text{muestra}} - \text{IR}_{\text{buffer}})^2 + 185.56 (\text{IR}_{\text{muestra}} - \text{IR}_{\text{buffer}})^3 \dots\dots\dots (\text{ec. 10})$$

Para los experimentos de desnaturalización se prepararon tubos en donde se colocaron diversas concentraciones de urea (de 0 a 6 M) y a cada tubo se le agregó un volumen calculado para tener una concentración final de proteína de 50 µg/mL en cada uno (volumen final de cada tubo 400 µL). Las muestras fueron incubadas en tiempos de hasta 24 h (tiempo máximo de incubación). El experimento se llevó a cabo a diferentes temperaturas entre 5 y 40°C.

Para los experimentos de renaturalización se colocó, en primer lugar, un volumen de proteína muy concentrada en 6 M de urea durante toda la noche. La proteína desnaturalizada se diluyó en diferentes concentraciones de urea (de 0.15 hasta 6 M), manteniendo en cada tubo la misma concentración de proteína (50 µg/mL) agregando sólo la cantidad de urea y solución amortiguadora restante en cada tubo. Esto se realizó a 25°C y en tres tiempos de incubación (6, 12 y 24 h).

Para DC sólo se realizaron experimentos de desnaturalización a 25°C.

Desnaturalizante temperatura. Se preparó una solución con proteína y Hepes 10 mM pH 8, a una concentración de 100 µg/mL para el experimento en el espectrofluorómetro y una solución Hepes 10 mM pH 8 con 200 µg/mL de LAO para dicróismo circular.

Ensayos con la técnica espectroscópica de Fluorescencia

La fluorescencia en estado estacionario se determinó en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS Inc., Champine, IL, USA), acoplado a un controlador de temperatura (Quantum Northwest). Las rejillas de paso de luz utilizadas para la excitación y la emisión fueron de 1 mm para ambos casos.

Desnaturalizante urea. Con las muestras incubadas, ya sea para experimentos de desnaturalización o renaturalización, se midieron los cambios en la señal de fluorescencia de la proteína en diversas concentraciones de urea (de 0 M a 6 M) y a diversas temperaturas: se realizó la desnaturalización a 9 temperaturas diferentes en un intervalo de 5°C a 40°C.

Estas mediciones de fluorescencia intrínseca se realizaron aprovechando los cambios de emisión de los triptofanos situados en ambos dominios de la proteína. Se vertieron 400 µL de cada muestra en una celda de cuarzo, la cual se colocó en la cámara del espectrofluorómetro a temperatura constante. Se excitó con luz UV a 295 nm y se observó el espectro de emisión en un intervalo de longitud de onda de 310 nm a 410 nm. Para cada muestra se tomaron 3 lecturas y el programa de cómputo (Vinci® v1.6) registró la señal promedio de las lecturas. Se tomaron también los espectros de fluorescencia de muestras de urea sin proteína, para determinar la señal del blanco en cada una de las concentraciones de desnaturalizante empleadas.

Con la mutante sólo se realizaron experimentos de desnaturalización a dos temperaturas: 25°C y 37°C por duplicado y triplicado respectivamente empleando la misma concentración de proteína que en la silvestre (/mL).

Desnaturalizante: temperatura. Utilizando el controlador de temperatura Quantum Northwest, se creó un programa en donde se establecieron las condiciones del experimento. La temperatura inicial fue de 20°C y la final 75°C, la velocidad asignada para el aumento de temperatura se estableció en 0.5°C por minuto. Se excitó a una longitud de onda de 295 nm y se obtuvo el espectro de emisión de 310 nm a 410 nm cada dos minutos. El volumen que se vertió en la celda de cuarzo fue de 1 mL. Este experimento también se realizó con la mutante bajo las mismas condiciones de concentración y temperatura.

Ensayos con la técnica espectroscópica de Dicroísmo Circular (DC)

Los cambios de elipticidad en la proteína se midieron con el equipo Jasco J-715®.

Desnaturalizante urea. Se realizó un espectro con la proteína sin urea a 25°C en un intervalo de 250 a 210 nm (UV lejano) para observar un máximo a una longitud de onda dada, la cual se utilizó para realizar los experimentos a las diferentes concentraciones de urea.

Con las muestras incubadas, para experimentos de desnaturalización, se midieron los cambios de elipticidad en la proteína a 25°C. Se vertieron 400 µL de cada muestra en una celda de cuarzo de 0.1 mm de paso de luz, la cual se colocó en la cámara del espectropolarímetro a temperatura constante. Las lecturas se hicieron en una longitud de onda de 222 nm durante 3 min para cada una de las concentraciones de urea, adquiriéndose un total de 10 mediciones por muestra. En la concentración de 6 M (máxima concentración de urea) se obtuvo un espectro para compararlo con el espectro inicial sin urea. Los datos de cada espectro de DC registrados por el programa se ocuparon posteriormente para

análisis y ajuste matemático. Se tomaron también lecturas de DC de 4 muestras de urea sin proteína para determinar la señal del blanco en cada una de las concentraciones de desnaturizante empleadas.

Este experimento se hizo por duplicado con LAO silvestre y una vez con la mutante.

Desnaturizante: temperatura. Se recabó un espectro a la temperatura inicial 20°C (250 a 210 nm); otro al finalizar el barrido por temperatura (75°C) y por último uno cuando la muestra regresó a la temperatura inicial.

Se realizaron dos velocidades de barrido, una fue de 60°C/h y la segunda de 30°C/h, recabando una lectura por cada 0.5°C.

Este experimento se realizó con ambas velocidades de barrido utilizando la proteína silvestre y la mutante.

Análisis y procesamiento de datos

De los espectros obtenidos por fluorescencia se observó la longitud de onda (λ) en donde se tuvo el máximo de emisión de la muestra de proteína incubada sin urea y se emplearon todos los datos registrados en dicha λ correspondientes a cada concentración de desnaturizante. Con los datos anteriores se construyeron gráficos de intensidad de fluorescencia (IF) en función de la concentración de [urea] y de elipticidad (θ) en función de [urea]. Los datos crudos fueron normalizados y convertidos a fracción desnaturizada (Fd) basándose en un modelo de dos estados, empleando los valores de la señal registrada (S), la señal del estado nativo (S_n) y la señal del estado desnaturizado (S_d) (ec. 11) y graficados en función de [urea].

$$Fd = \frac{S - S_n}{S_d - S_n} \dots\dots\dots(ec. 11)$$

Se calcularon también los centros de masa espectral (CME), con los datos de intensidad de fluorescencia (IF) y las longitudes de onda (λ) (ec. 12) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CME = \frac{\sum_{\lambda=310}^{410} IF \cdot \lambda}{\sum_{\lambda=310}^{410} IF} \dots\dots\dots(ec. 12)$$

Con los gráficos de IF y de elipticidad (θ) en función de la concentración de urea y temperatura normalizados y convertidos a fracción desnaturalizada (Fd) se realizó un ajuste no lineal con un modelo de dos estados (Santoro y D. Bolen, 1988) (ec. 13) para obtener parámetros como la energía libre de Gibbs (ΔG) y la pendiente (m).

$$F_{obs} = \frac{(S_n + S_d) \times e^{-\frac{(\Delta G_{H_2O} + m[urea])}{RT}}}{1 + e^{-\frac{(\Delta G_{H_2O} + m[urea])}{RT}}} \dots\dots\dots(ec. 13)$$

Donde F_{obs} es la señal observada; S_n y S_d son las señales de los estados nativos y desnaturalizados, respectivamente; ΔG_{H_2O} es la energía libre de Gibbs de desnaturalización en ausencia del desnaturalizante; y nos referiremos a él como la estabilidad conformacional de la proteína; $[urea]$ es la concentración de urea; y m es $\delta\Delta G/\delta [urea]$. La pendiente permite correlacionar el cambio de área accesible al solvente, interacción proteína-desnaturalizante, conservación de estructura ordenada y que tan cooperativa es la transición. Con estos parámetros es posible calcular la concentración media de desnaturalizante (C_m) (ec. 14) que es el valor en donde las concentraciones de los dos estados son iguales. Todos estos valores calculados a través del ajuste se presentan en la tabla 1.

$$C_m = \frac{\Delta G_{H_2O}}{m} \dots\dots\dots(ec. 14)$$

Por último, al graficar la energía libre de Gibbs a diferentes temperaturas (experimentos de fluorescencia) se realiza una curva de estabilidad, la cual al

ajustar con una forma de la ecuación de Gibbs- Helmontz se obtiene el $\Delta H_{\text{Van't Hoff}}$ y el C_p (ec 15).

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \times \left(1 - \left(\frac{T}{T_m}\right)\right) - \Delta C_p \times \left((T_m - T) + \left(T \times \ln \left(\frac{T}{T_m}\right)\right) \right) \dots\dots\dots \text{(ec. 15)}$$

Ensayos por técnica calorimétrica

Preparación de muestra

Se utilizó proteína nativa a una concentración de 1 mg/mL (0.03845 mM) en tres valores diferentes de pH. En la siguiente tabla se muestran los amortiguadores utilizados en cada caso.

pH	Amortiguador
6.5	10 mM de Fosfatos (monobásico)
7.5	10 mM de Hepes
8.0	10 mM de Hepes

Tabla 1. Muestra los amortiguadores con sus respectivos pH utilizados en los ensayos de DSC.

A los amortiguadores se les ajustó el pH en un Beckman pH meter. Para cambiar el pH en cada muestra de proteína se siguió el siguiente procedimiento:

Se tomaron 3 mg de proteína disuelta en Hepes 10 mM pH 8 (pH inicial), los cuales se vertieron en tubos para filtración Amicon® Ultra. Se llenó hasta el límite con el amortiguador al pH de trabajo (6.5 o 7.5 o 8.5), se centrifugó durante 10 min y se realizó de nuevo el llenado, esto se repitió por 5 veces. Por último, se cuantificó la proteína con el método del ácido bicinconínico.

Ensayos por calorimetría.

Se utilizó un calorímetro de barrido diferencial: Microcalorimeter Control Unit VP-DSC MicroCal™. Se realizaron barridos a partir de una temperatura de 20°C hasta 75°C con una velocidad de 90°C/h y un tiempo de pre-equilibrado de 60 min. Se corrieron líneas base con el buffer a un pH determinado un día antes de cargar la muestra en la celda. Después de correr la muestra se enjugaron ambas celdas (referencia y muestra) y se lavaron con 0.5 L de agua desionizada.

Para el análisis de los termogramas se utilizó el software Origin Microcal LLC, DSC©, el cual incluye la resta de la línea base así como los ajustes para modelos de dos o más estados.

Resultados

Purificación de LAO silvestre y W47F

LAO es una proteína periplásmica, cuenta con un péptido señal mediante el cual se exporta al espacio periplásmico de la bacteria. Esto permitió realizar un choque osmótico donde se purifica de forma casi exclusiva.

La purificación de la proteína LAO tanto silvestre como mutante (W47F) se realizó en tres etapas: la primera comprendió un choque osmótico, seguida por una desnaturalización en 2 M de cloruro de guanidinio, y por último una cromatografía de intercambio aniónico.

Para caracterizar el mecanismo de desplegamiento de LAO nos interesó trabajar con la proteína sin ligando, pero debido a la alta afinidad de LAO, la mayor proporción de la proteína purificada tiene ligando unido. Ya que no es posible remover al ligando por diálisis, el ligando se removió de la proteína desnaturalizando con cloruro de guanidinio 2 M en Hepes 10 mM pH 8; y se renaturalizó con un cambio de disolvente: Bis-tris propano 5 mM pH 8.5 obteniendo así, una mayor cantidad de proteína sin ligando.

Posteriormente, se separó la forma abierta (LAO sin ligando) de la pequeña fracción remanente en la forma cerrada (LAO con ligando) utilizando una columna de intercambio aniónico (columna Source Q) a un pH de 8.5, en un gradiente lineal de 0-500 mM de NaCl en 60 min. (Figura 7). Las fracciones correspondientes a la proteína con ligando y sin ligando eluyeron en 17.16 y 41.47 mM de NaCl respectivamente.

La purificación de la proteína LAO silvestre y mutante seguida por este protocolo es eficiente consiguiendo al final proteínas lo suficientemente puras para realizar los ensayos de desnaturalización como se observa en el SDS-PAGE (Figura 8). El rendimiento obtenido fue de 26 mg y 9 mg de proteína pura por dos litros de cultivo de la proteína silvestre y W47F, respectivamente.

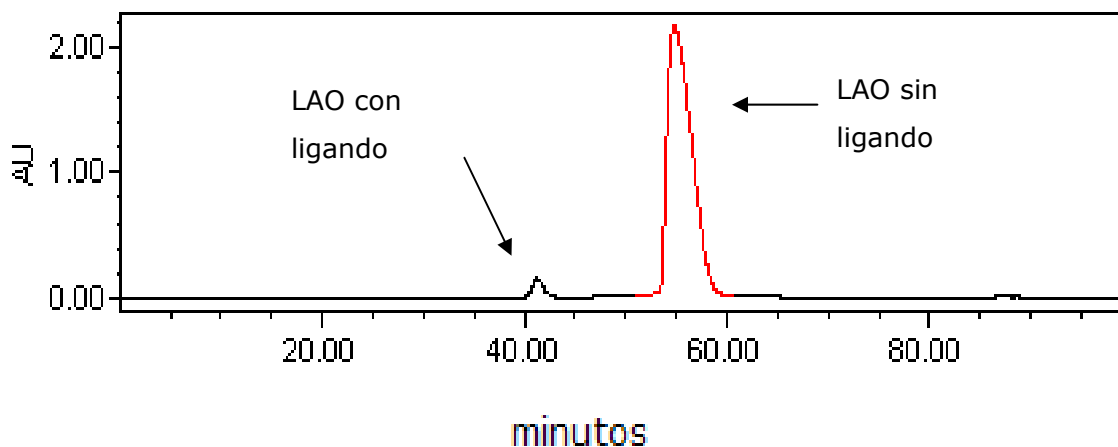


Figura 7. Cromatograma de las fracciones correspondientes de la purificación de la proteína LAO en una columna Source Q. Condiciones experimentales: fase móvil de Bis-tris propano 5 mM pH 8.5; gradiente lineal de NaCl en la misma fase móvil de 0 a 500 mM en 60 min; velocidad de flujo de 1mL/min; detección a 280 nm. Las fracciones que corresponden a la proteína LAO eluyeron en 17.16 y 41.47 mM de NaCl para la proteína con ligando y sin ligando respectivamente. Tanto la silvestre como la mutante presentaron el mismo cromatograma.

1 2 3 4 5 6 7 8

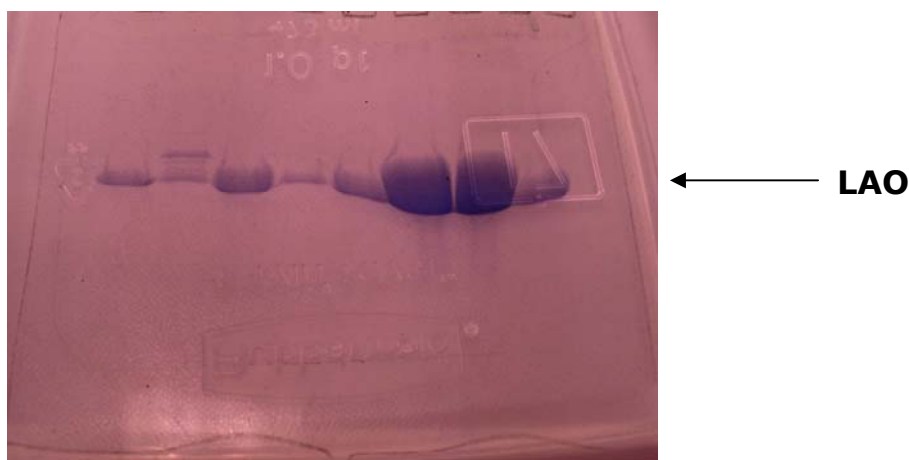


Figura 8. Resolución electroforética de las fracciones después de la purificación de la proteína LAO silvestre y mutante. Carril 1: Control proteína LAO silvestre; Carril 2,4,5: LAO silvestre sin renaturalizar; Carril 3: LAO mutante- W37F; Carril 6 y 7: LAO silvestre renaturalizada; Carril 8: LAO silvestre con ligando.

LAO: Proteína silvestre

Fluorescencia y Dicroísmo Circular a 25°C

Tanto la desnaturalización por urea como la promovida por temperatura son reversibles, esto es, los espectros de F y CD obtenidos para las muestras nativas y renaturalizadas son equivalentes (Apéndice: 3.2, 3.5, 3.6, 4.2 y 4.3)

Se realizaron perfiles de desnaturalización isotérmica con urea siguiendo las señales de los cambios en la estructura por medio de dos técnicas espectroscópicas: Fluorescencia (F) y Dicroísmo Circular (DC). Los espectros de emisión de F y de DC de la proteína LAO silvestre se obtuvieron a diferentes concentraciones de urea en un intervalo de emisión de 310-410 nm y de 250-210 nm, respectivamente (Figura 27 y 30 del Apéndice). Por ambas técnicas, el gráfico de la curva de desnaturalización muestra una sola transición ajustándose a un modelo de dos estados. (Figura 9)

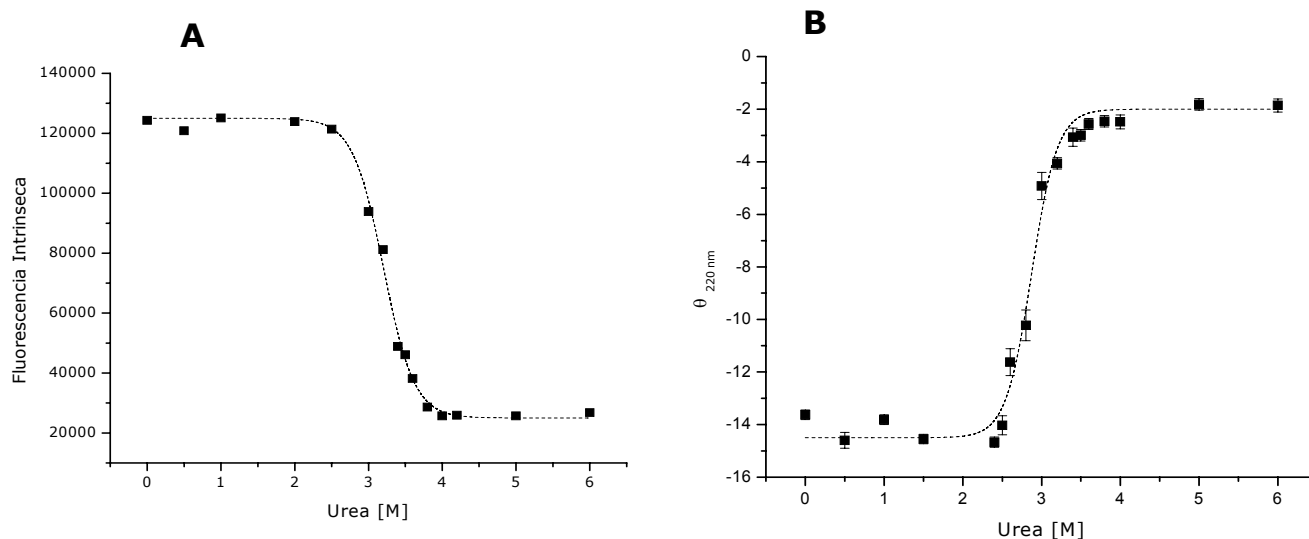


Figura 9. Curvas de desnaturalización de LAO silvestre a 25°C. A. Fluorescencia intrínseca en función de la concentración de urea (datos sin normalizar). λ_{ex} : 295, λ_{em} : 310-410. B. Elipticidad (220 nm) en función de la concentración de urea (datos sin normalizar).

Para determinar si la desnaturalización de LAO es un proceso de dos estados, se compararon las señales normalizadas de F y CD, los resultados muestran (Figura 10) que aunque ambas curvas son monofásicas, no son perfectamente coincidentes, lo cual podría indicar que el proceso no es de dos estados. Sin

embargo, los valores de ΔG_{H_2O} y pendiente (m) estimados para ambas técnicas son muy similares (Tabla 2).

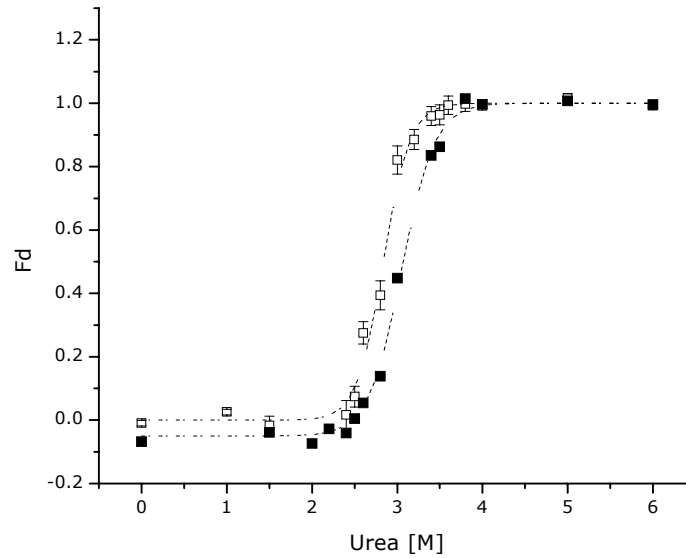


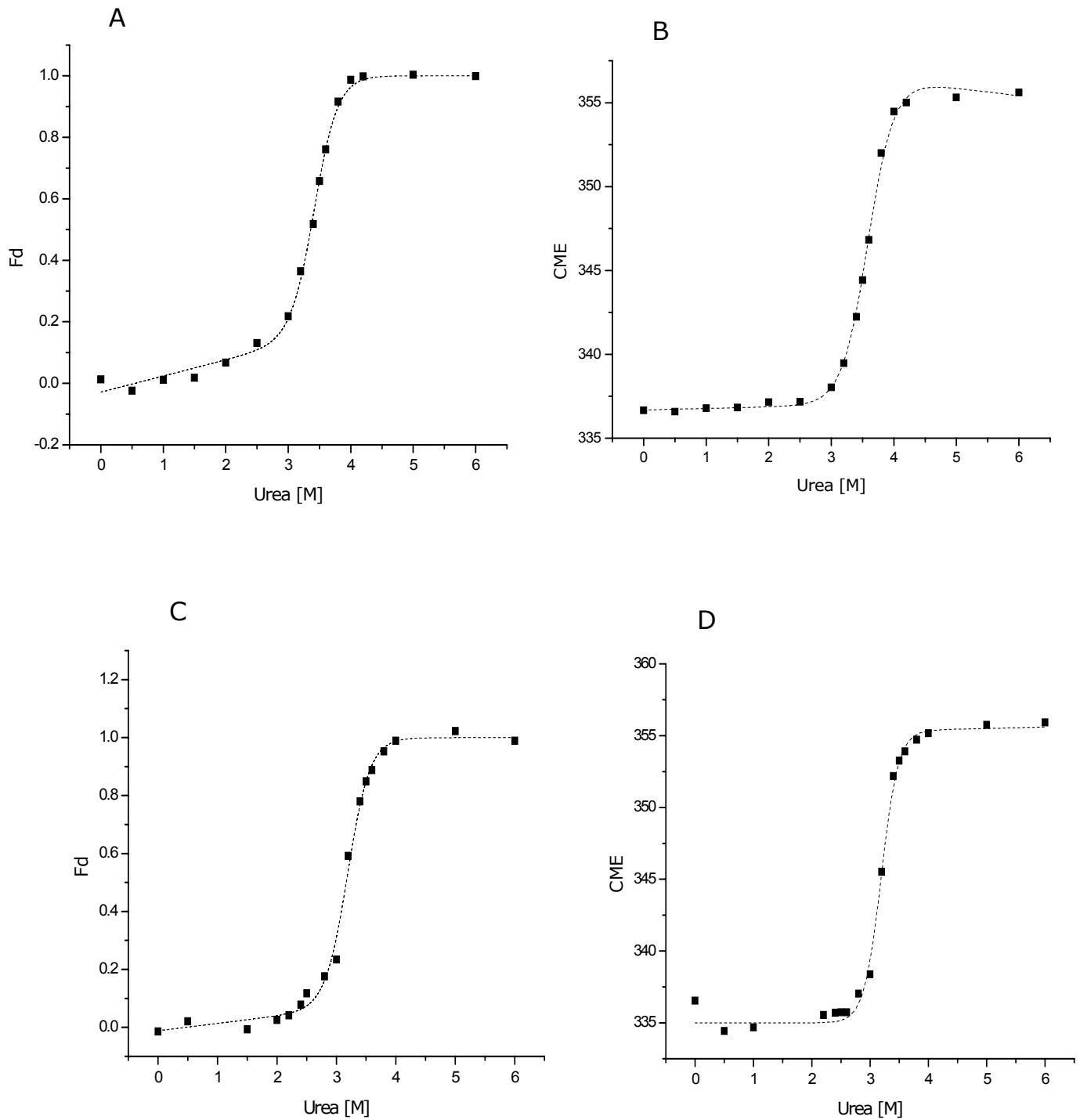
Figura. 10. Curvas normalizadas de desnaturalización de LAO silvestre. Línea punteada muestra el ajuste simultáneo. (■) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, técnica: F, $\lambda_{\text{max}} = 223 \text{ nm}$. (□) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, técnica DC, $\lambda = 220 \text{ nm}$. Condiciones experimentales: 6 h de incubación a 25°C.

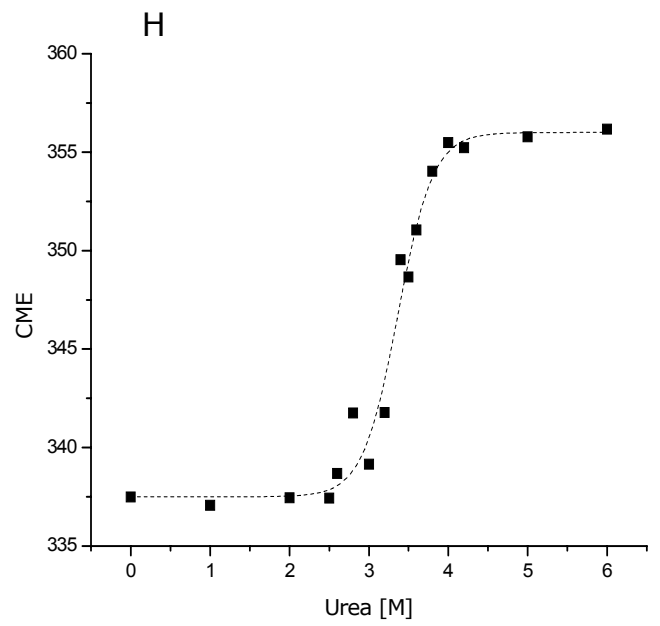
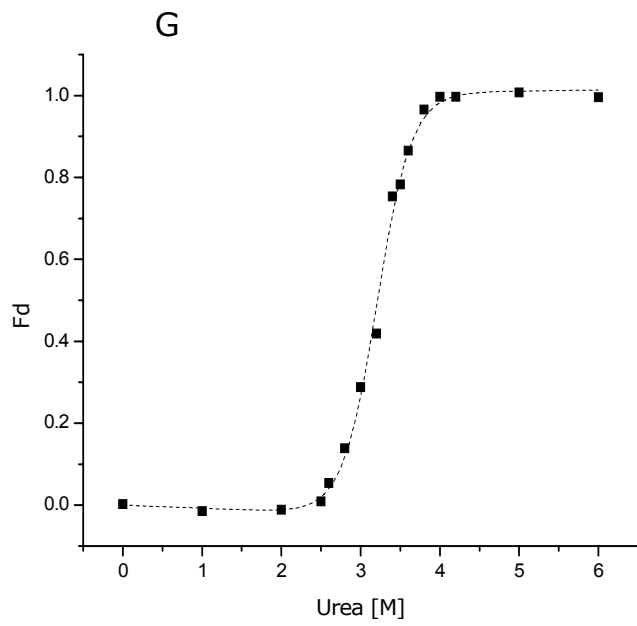
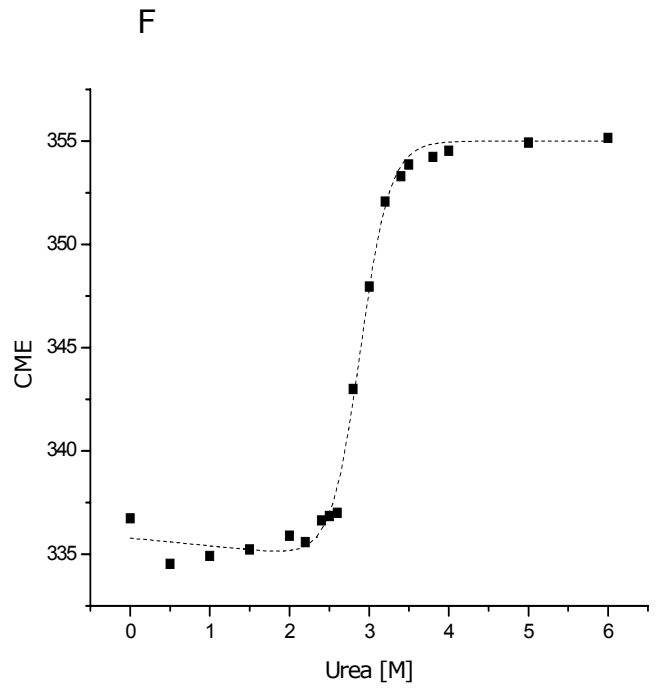
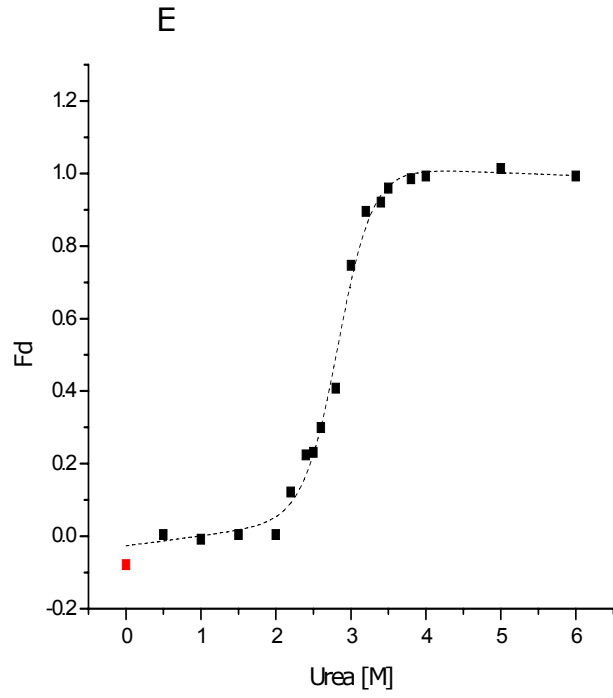
Técnica espectroscópica	ΔG_{H_2O} (Kcal/mol)	m(kcal/molM)	C_m (M)
Fluorescencia	9.31 ± 0.89	2.89 ± 0.28	3.22
Dicroísmo Circular	10.53 ± 2.63	3.71 ± 0.93	2.84

Tabla 2. Muestra los valores estimados de ΔG_{H_2O} , m y C_m para fluorescencia y dicroísmo circular. Estos datos fueron calculados a partir de los gráficos de fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea.

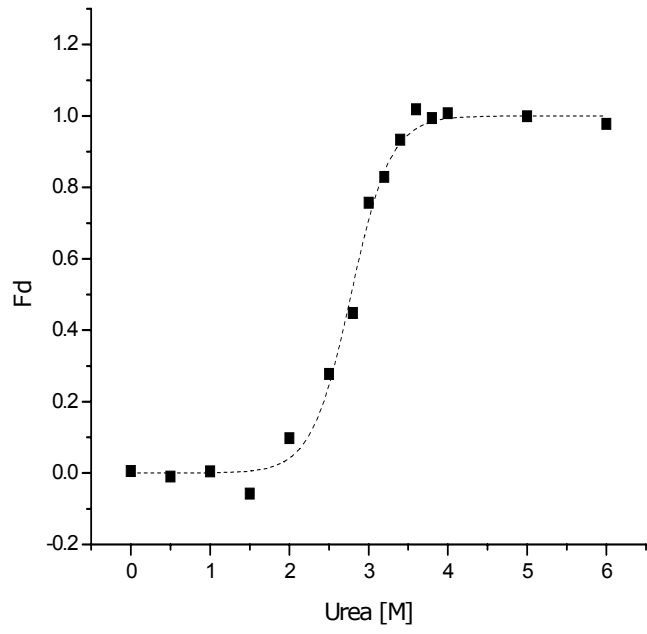
Ensayos a diferentes temperaturas con urea

El experimento de desnaturalización se llevó a cabo a diferentes temperaturas (Figura 11) para determinar el cambio en la estabilidad al variar T.

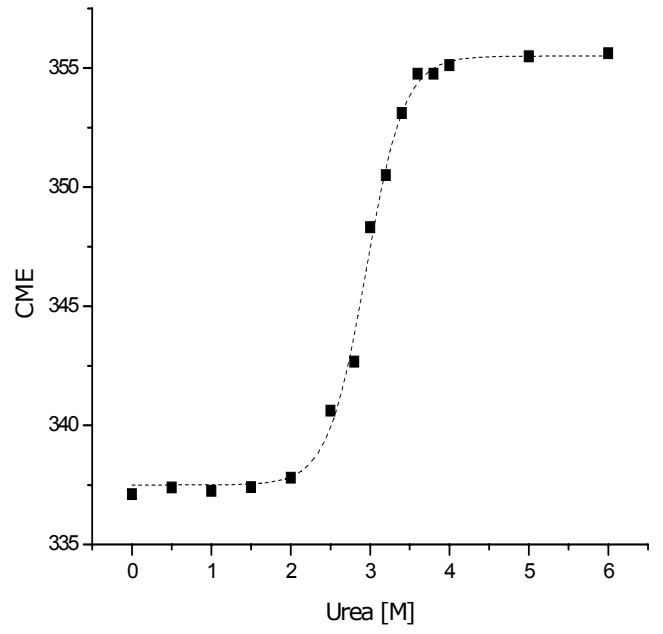




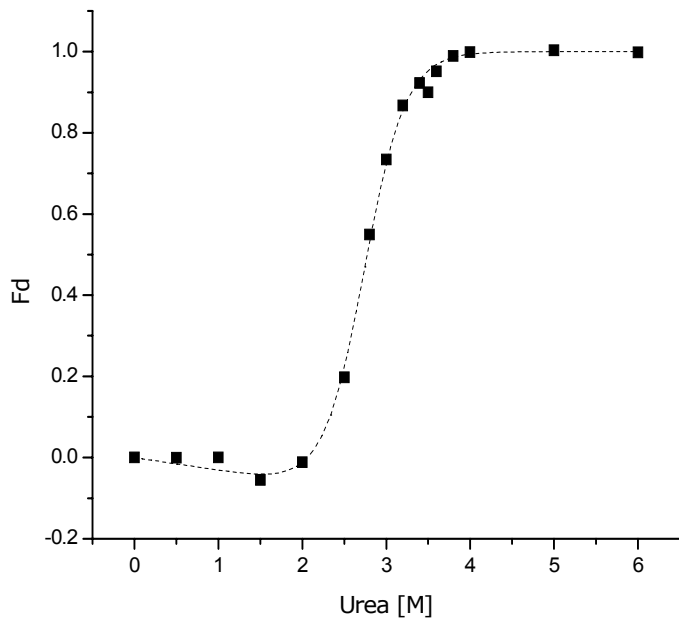
I



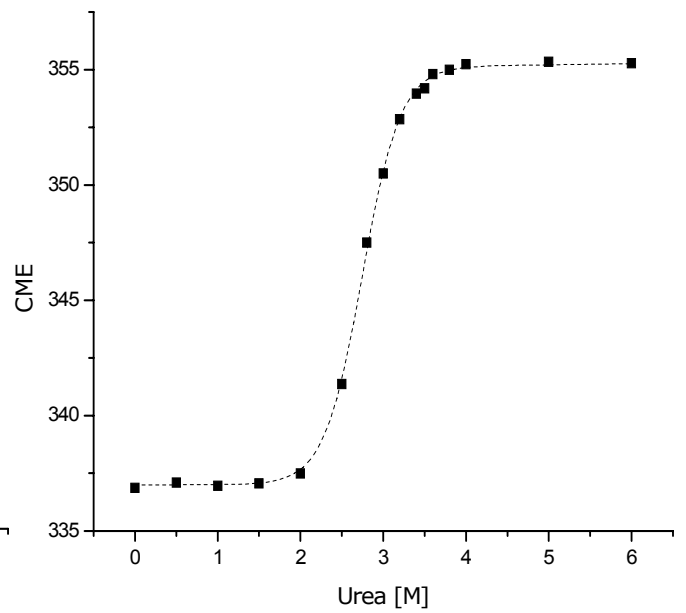
J



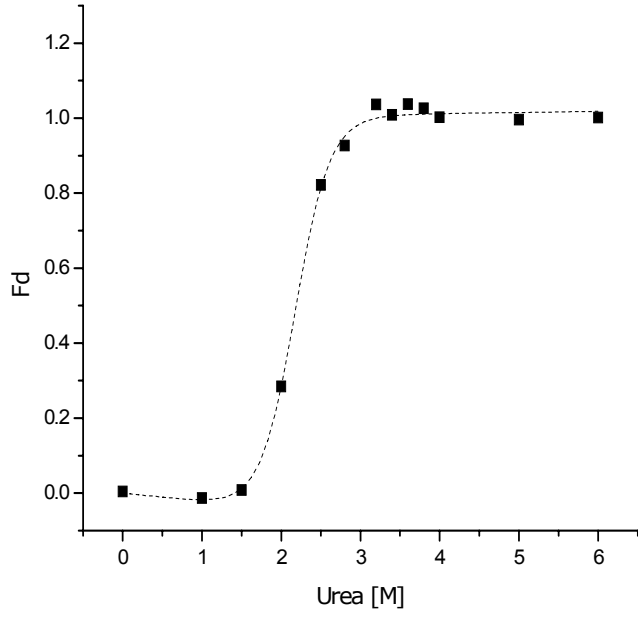
K



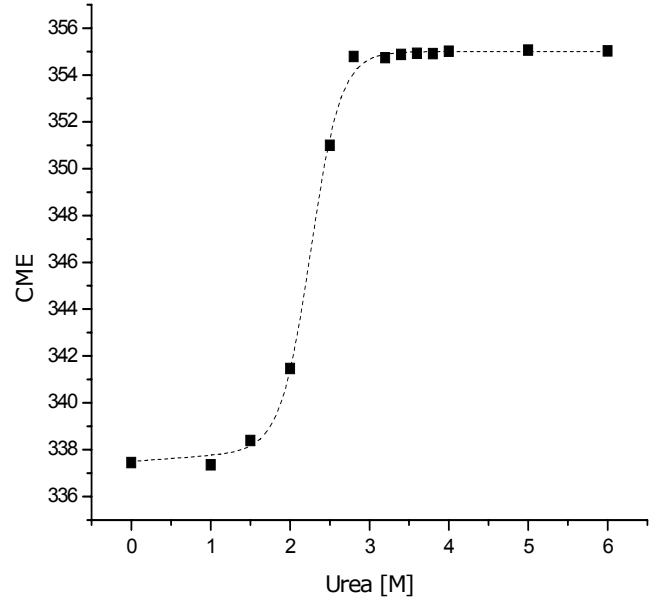
L



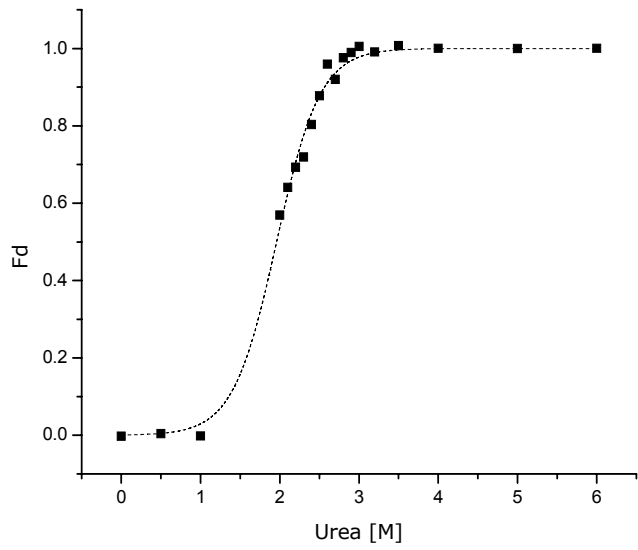
M



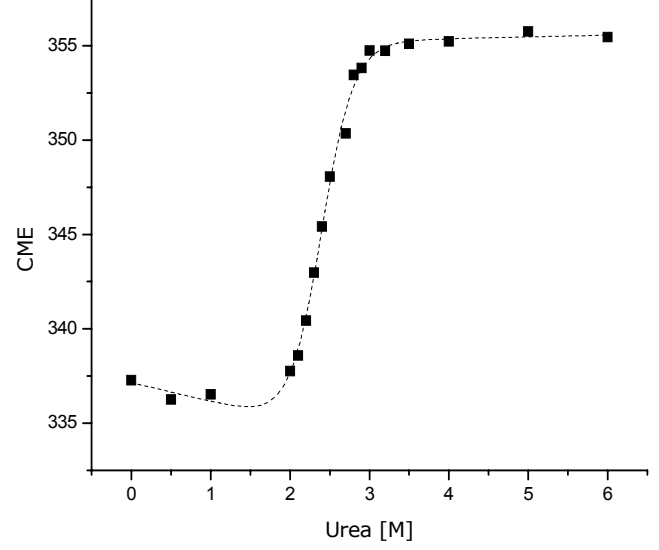
N



O



P



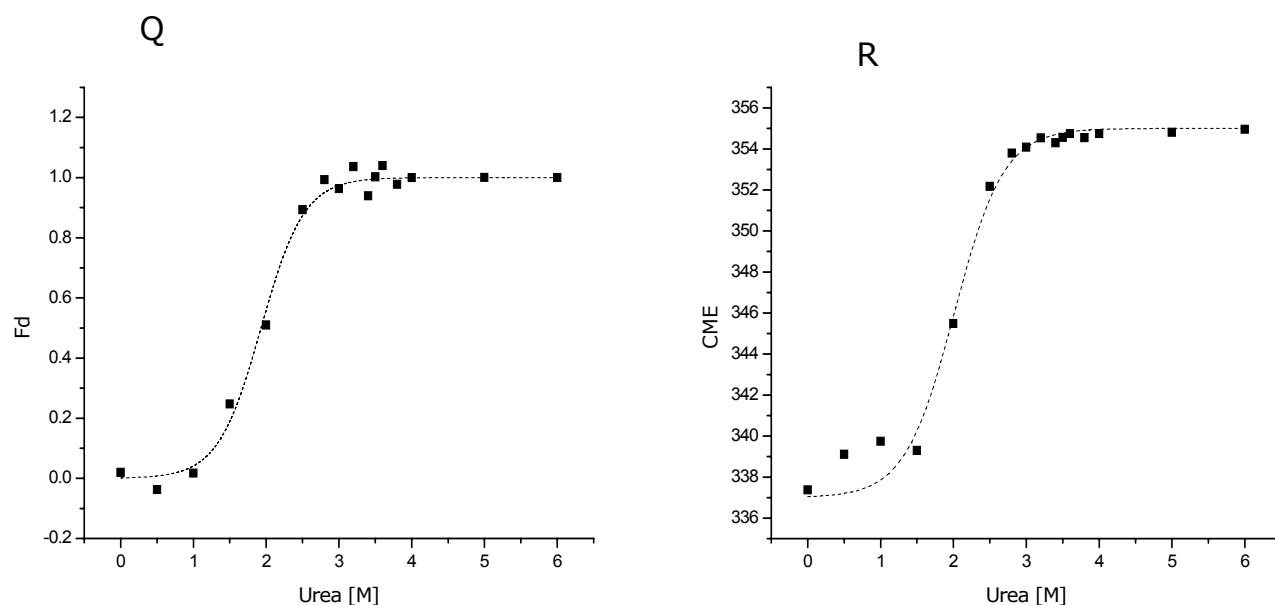


Figura 11. Desnaturalización de la proteína LAO silvestre a diferentes temperaturas.

Condiciones: concentración de proteína: 50 $\mu\text{g/mL}$, $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm y , $\lambda_{\text{em}}= 310\text{-}410$ nm. A y B: Temperatura 5°C (278.15 K); C y D: Temperatura 15°C (288.15 K); E y F: Temperatura 20°C (293.15K); G y H: Temperatura 25°C (298.15K); I y J: Temperatura 30°C (303.15 K); K y L: Temperatura 32°C (305.15 K); M y N: Temperatura 35°C (308.15 K); O y P: Temperatura 37°C (310.15 K); Q y R: Temperatura 40°C (313.15 K). Los paneles A, C, E, G, I, K, M, O, Q muestran los datos de intensidad de fluorescencia en λ_{max} (321-324 nm) normalizados de acuerdo a la ec. 13. Los paneles: B, D, F, H, J, L, N, P, R muestran los datos de CME calculados a partir de ec. 12.

A partir de los gráficos obtenidos a diferentes temperaturas, se ajustaron los datos a un modelo de dos estados, el cual permitió calcular el $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ y la pendiente para cada una de las temperaturas. Con estos datos se estimó la C_m (concentración media de desnaturante) (Tabla 3).

Temperatura (K)	$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ (Kcal/mol)	m(kcal/molM)	C_m (M)
278.15	7.54 ± 1.12	2.26 ± 0.33	3.34
288.15	8.28 ± 1.05	2.63 ± 0.33	3.15

293.15	6.77±0.64	2.43±0.23	2.77
298.15	9.31±0.89	2.89±0.28	3.22
303.15	6.76±0.87	2.43±0.30	2.78
305.15	7.57±0.75	2.72±0.27	2.78
308.15	6.65±0.59	3.03±0.27	2.20
310.15	4.39±0.38	2.24±0.18	1.96
313.15	4.06±0.43	2.11±0.22	1.92

Tabla 3. Muestra los valores estimados de ΔG_{H_2O} , m , y C_m para las diferentes temperaturas. Estos datos fueron calculados a partir de los gráficos de IF en función de la concentración de urea (Paneles: A, C, E, G, I, K, M, O, Q de la figura 11).

De acuerdo con los datos observados en la tabla 3, la tendencia es una disminución de la C_m al aumentar la temperatura, es decir, la concentración de urea en donde existe la misma proporción de fracción nativa y desnaturizada disminuye.

Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia

Se llevaron a cabo ensayos de desnaturalización térmica en un intervalo de 20°C (293.15 K) a 75°C (348.15 K) con una concentración de proteína de 100 µg/ml y una velocidad de barrido de 0.5°C/min.

Al graficar el valor de la IF a 322 nm en función de la temperatura se obtuvo el siguiente patrón (Figura 12).

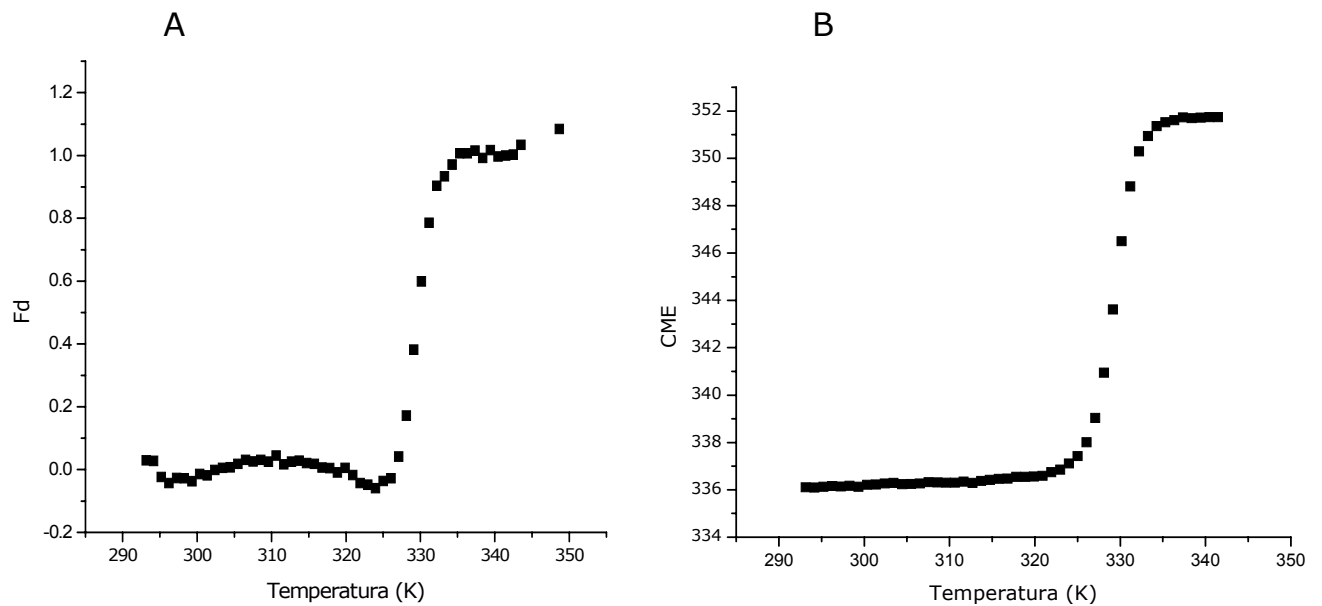


Figura 12. Desnaturalización por temperatura. A. Fracción desnaturalizada en función de la temperatura. B. Centro de masa espectral en función de la temperatura. Condiciones: concentración de proteína: 100 µg/mL, $\lambda_{ex}=295$ nm y $\lambda_{em}= 310-410$ nm.

En la desnaturalización por temperatura se observa una sola transición, aparentemente la proteína pasa de un estado nativo a un estado desnaturalizado sin intermediarios.

De las fracciones desnaturalizadas se obtuvo la constante de equilibrio para cada una de las temperaturas (ec. 16) y se calculó la energía libre de Gibbs ΔG (ec. 17).

$$k_{eq} = \frac{f_d}{1-f_d} \dots\dots\dots \text{(ec. 16)}$$

$$\Delta G = -0.001987 \times T \times \ln(k_{eq}) \dots\dots\dots \text{(ec. 17)}$$

Los valores de temperatura que nos interesan son aquellos en los cuales es posible estimar la Fd con mayor precisión, esto es, en la zona de la transición (Tabla 4).

Temperatura (K)	Fd	ΔG (kcal/mol)
327.074	0.04156	2.03238
328.102	0.17147	1.02335
329.13	0.38153	0.3148
330.158	0.59878	-0.26173
331.186	0.78573	-0.85208
332.214	0.90332	-1.46992
333.242	0.93361	-1.74428
334.27	0.97092	-2.32187

Tabla 4. Valores de ΔG . Calculados a partir de las fracciones desnaturalizadas a las temperaturas donde se observa la transición en la curva de desnaturalización (Figura 12).

Con los valores de ΔG se estimó el valor de ΔH , al graficar la energía libre en función de la temperatura, obteniéndose una ecuación con pendiente negativa. Con ella, se calculó la T_m , es decir donde $\Delta G=0$, dando un valor de 329.94 K, este valor se multiplicó por la pendiente y de esta manera se obtuvo el $\Delta H_m=192.05\pm 10.83$ kcal/mol.

Ecuación al graficar ΔG vs T: $Y=192.06-0.5821x$

Sabemos que,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \dots \dots \dots \text{(ec. 18)}$$

Por tanto, $\Delta H = 192.05 \pm 10.83$ kcal/mol (ver apéndice 10.7 para cálculo de la desviación estándar) cuando ΔG es igual a 0 y $T = T_m: 329.94$

Debido a que obtuvimos ΔG_{H_2O} con curvas de desnaturalización isotérmicas con urea seguidas por F y DC a 298.15 K. Se calculó el ΔG (298.15 K) con la ec. 15 obteniendo un valor de: 13.89 kcal/mol.

El ΔC_p usado para este cálculo fue estimado a partir de una relación en la cual por cada residuo de proteína se tiene un C_p de 12 cal/molK:

$$\Delta C_p = 12 \times (\text{n}^\circ \text{ de residuos de la proteína}) \dots\dots\dots (\text{ec. 19})$$

Utilizando esta relación se obtuvo un ΔC_p de 2.86 kcal/molK

Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular

El siguiente perfil de desnaturalización fue obtenido al graficar los datos de elipticidad normalizados en función de la temperatura.

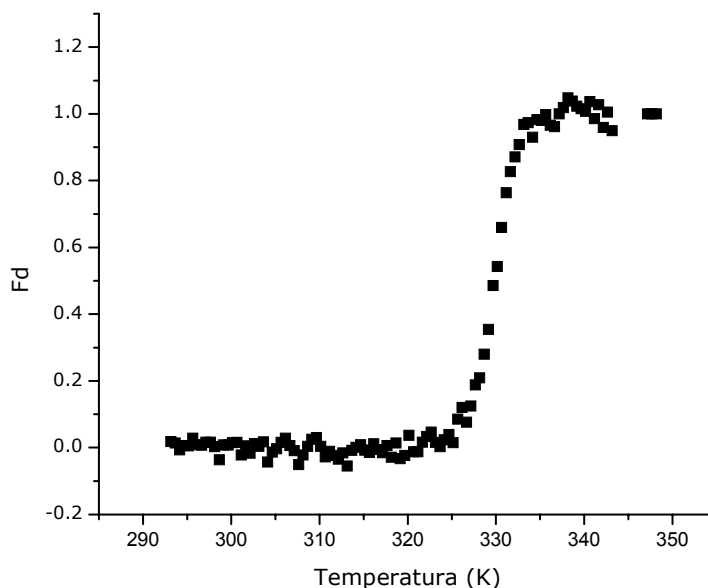


Figura 13. Curva de desnaturalización de LAO silvestre por DC. Fracción desnaturalizada en función de la temperatura. Condiciones: 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, intervalo de temperatura: 20°C-75°C, $\lambda = 220 \text{ nm}$, Velocidad de barrido: 0.5°C/min.

En la desnaturalización por temperatura seguida por DC también se observó una sola transición, sugiriendo que la proteína pasa de un estado nativo a un estado desnaturalizado.

Posteriormente se realizó el mismo tratamiento de datos que con la desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia: se calcularon las fracciones desnaturalizadas para estimar la constante de equilibrio en la zona de la transición (Ver tabla 5) (ec. 16) y se calculó la energía libre de Gibbs ΔG (ec. 17).

Temperatura (K)	Fd	ΔG (kcal/mol)
326.65	0.07588	1.62252
327.15	0.12471	1.26674
327.65	0.18771	0.95381
328.15	0.20921	0.86704
328.65	0.28042	0.61544
329.15	0.35458	0.39175
329.65	0.4854	0.03826
330.15	0.54256	-0.112
330.65	0.65948	-0.4343
331.15	0.76323	-0.7702
331.65	0.82665	-1.0294
332.15	0.87143	-1.263
332.65	0.90804	-1.5137

Tabla 5. Valores de ΔG . Calculados a partir de las fracciones desnaturalizadas a las temperaturas donde se observa la transición en la curva de desnaturalización (Figura 13).

Con los valores de ΔG se estimó el valor de ΔH , al graficar la energía libre en función de la temperatura, obteniéndose una ecuación con pendiente negativa. Con ella, se calculó la T_m , es decir donde $\Delta G=0$, dando un valor de 329.78 K, este valor se multiplicó por la pendiente y de esta manera se obtuvo el $\Delta H=170\pm 3.39$ kcal/mol (ec. 18).

También se calculó el ΔG a 298.15K (ec. 15), como en el caso de la desnaturalización seguida por F, obteniendo un valor de: 11.77 kcal/mol.

Ahora bien, al comparar las curvas de desnaturalización térmica seguida por las dos técnicas (Figura 14), se observó que la mayoría de los puntos coinciden.

Los valores de ΔH calculados para los perfiles de desnaturalización térmica no fueron iguales por las técnicas de F y DC (Tabla 7)

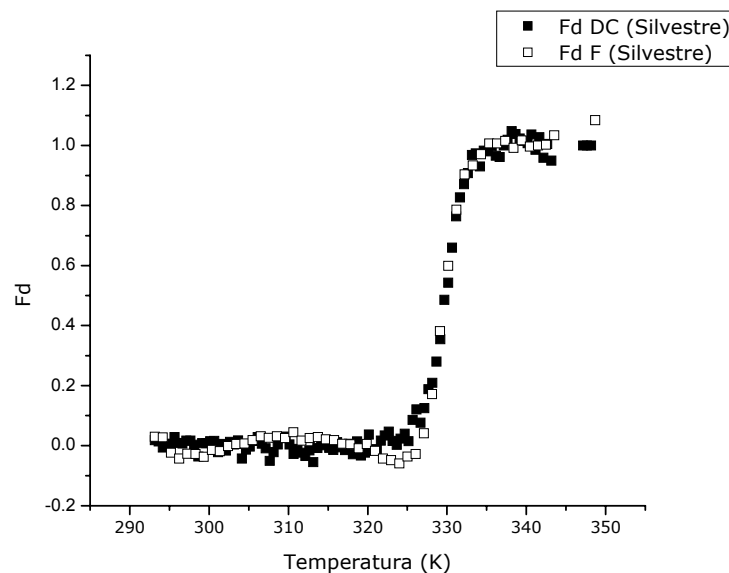


Figura. 14. Curvas normalizadas de desnaturalización de LAO silvestre. (■) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 200 $\mu\text{g/mL}$, técnica DC, $\lambda = 220 \text{ nm}$. (□) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 100 $\mu\text{g/mL}$, técnica: fluorescencia, $\lambda = 322 \text{ nm}$.

Curva de estabilidad de LAO

Con los datos de ΔG calculados a partir del experimento de desnaturalización térmica seguida por ambas técnicas (Tabla 4 y 5) y los valores obtenidos a partir

de los experimentos isotérmicos de desnaturalización por urea (Figura 11 y Tabla 2 y 3) se construyó la curva de estabilidad de la proteína LAO.

Posteriormente los datos se ajustaron a la ecuación de Gibbs Helmholtz (ec. 15) para obtener un estimado del ΔH y ΔC_p del proceso de desnaturalización. Al valor entálpico calculado se le conoce como $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$, el cual se puede comparar con los valores estimados por las curvas de desnaturalización térmica (Tabla 7).

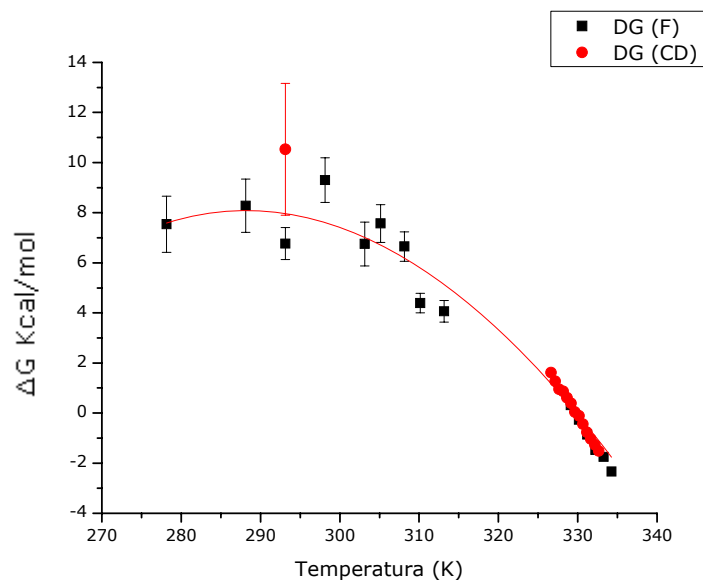


Figura.15. Curva de estabilidad de LAO Silvestre. Los valores de ΔG a bajas temperaturas fueron obtenidos de la desnaturalización por urea y los valores a altas temperaturas de la realizada por temperatura. (●) Resultados por DC. (■) Resultados por F.

Del ajuste, se calculó un valor de $\Delta H = 125.25 \pm 9.73$ kcal/mol y un $\Delta C_p = 2.81 \pm 0.47$ kcal/molK. El valor de T_m utilizado para este cálculo fue: 329.86 (promedio de las T_m s estimadas en las curvas de desnaturalización térmica).

Calorimetría

La mejor evidencia que el desplegamiento de la proteína se puede adecuar a un mecanismo de dos estados es mostrando que el ΔH de van't Hoff es similar al ΔH determinado caloriméricamente. Por lo tanto se realizaron barridos de temperatura en el calorímetro de 20°C a 75°C, con una velocidad de 1.5°C/min y a una concentración de proteína de 0.03845 mM. Los experimentos se realizaron a diferentes valores de pH con el objeto de estimar el ΔC_p .

Los gráficos muestran que al aumentar en basicidad, el termograma se ajustó mejor a un modelo de dos estados (Figuras 16, 17 y 18).

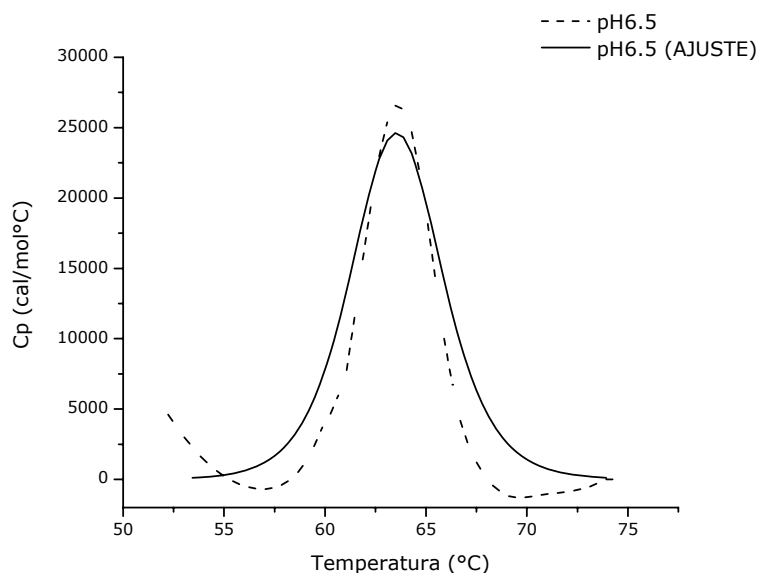


Figura 16. LAO silvestre a pH de 6.5. La línea punteada muestra el termograma obtenido del ensayo y la línea sólida es el ajuste a un modelo de dos estados.

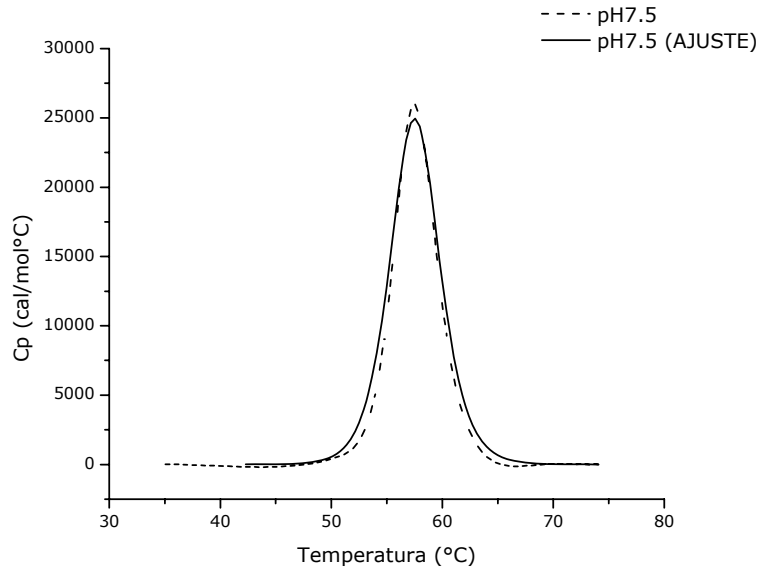


Figura 17. LAO silvestre a pH de 7.5. La línea punteada muestra el termograma obtenido del ensayo y la línea sólida es el ajuste a un modelo de dos estados.

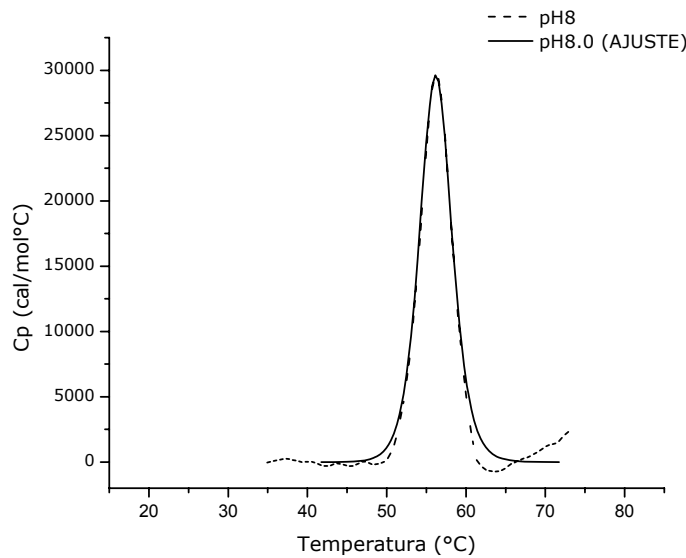


Figura 18. LAO silvestre a pH de 8.0. La línea punteada muestra el termograma obtenido del ensayo y la línea sólida es el ajuste a un modelo de dos estados.

Al juntar los tres experimentos, se observó que la T_m aumenta al aumentar la acidez (Figura 19) y el ΔH disminuye (Tabla 6).

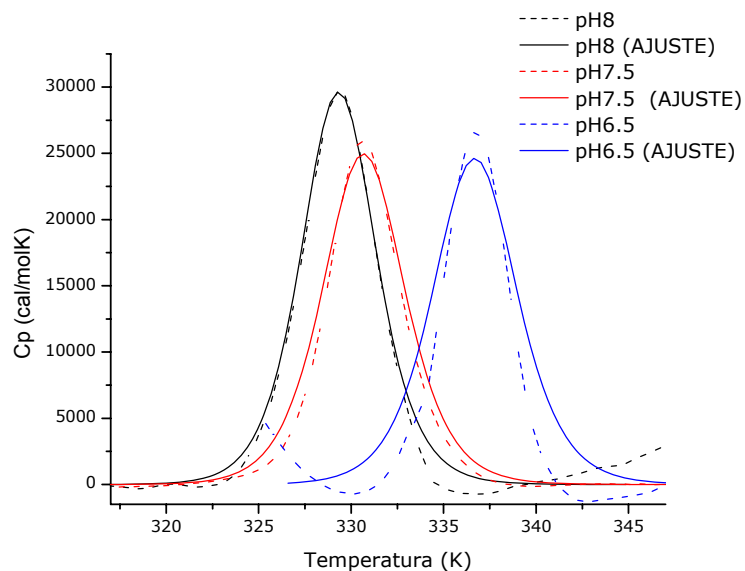


Figura 19. Termogramas a diferentes valores de pH. Se observa como la Tm aumenta con la acidez.

Ph	ΔH_{cal} (kcal/mol)	Tm (K)
8.0	155±1.34	329.29
7.5	147.3±1.03	330.69
6.5	149±3.45	336.71

Tabla 6. Muestra los datos obtenidos por calorimetría a diferentes valores de pH

Con estos datos no fue posible construir un gráfico de ΔH_{cal} en función de la Tm para obtener el ΔC_p (Ver marco teórico 3.13) ya que al realizarlo con los tres puntos se obtuvo una pendiente negativa de -1.07 kcal/molK, lo cual no va acorde con la literatura, en donde el ΔC_p de desnaturalización es positivo.

Esto podría indicar un cambio de mecanismo al variar el pH, explicando el porqué el ajuste a dos estados es bueno a pH 8 e inadecuado a pH 6.5 y 7.5.

Resumiendo los valores obtenidos mediante las diferentes técnicas se pueden observar dos cosas importantes:

1. El ΔH_{cal} y los de van't Hoff no son similares, la variación entre el ΔH_{cal} y los demás valores calculados va desde un 8% hasta un 23% (Tabla 7).
2. El valor estimado de $\Delta C_{p_{cal}}$ no lo consideramos como un valor confiable debido a la falta de datos para respaldar el valor calculado. Sin embargo, el ΔC_p obtenido de la curva de estabilidad con el estimado con la relación C_p -residuo son prácticamente iguales (Tabla 7).

Ensayo	ΔH_{desnat} (Kcal/mol)	%variación entre el ΔH_{cal} y los de van't Hoff (Apéndice 10.5)	ΔC_p (kcal/molK)	ΔG (Kcal/mol) a 25°C
Desnaturalización isotérmica con urea seguida por F				9.31±0.89
Desnaturalización isotérmica con urea seguida por DC				10.53±2.63
Desnaturalización térmica seguida por F.	192.05±10.83	22.84		13.89
Desnaturalización térmica seguida por DC.	170±3.39	8.74		11.77
Curva Estabilidad	125.25±9.73	12.16	2.81±0.47	

Calorimétrico	155±1.34	0	-1.07	
Relación Cp-residuo			2.86	

Tabla 7. Resumen de los valores estimados por las diferentes técnicas y ajustes. Estos parámetros fueron estimados al pH de trabajo: 8.0

Por último, de acuerdo a la tabla 7, existe un gran variación de los valores entálpicos lo que indica que el mecanismo de desplegamiento térmico de la proteína LAO no sigue un modelo de dos estados.

LAO W47F

Fluorescencia y Dicroísmo circular a 25°C y 37°C

LAO silvestre muestra un triptofano en cada lóbulo (Figura 6) por lo que los cambios en fluorescencia reportan los cambios conformacionales promedio de ambas regiones, con el fin de focalizar nuestra atención en lo que sucede en cada lóbulo, se estudió la mutante W47F, que sólo tiene el triptofano 130 localizado en el lóbulo grande.

Se realizaron ensayos análogos a los hechos con la proteína silvestre.

En la desnaturalización isotérmica con urea seguida por DC, a 25°C, el gráfico muestra una sola transición y se ajusta a un modelo de dos estados (Figura 20).

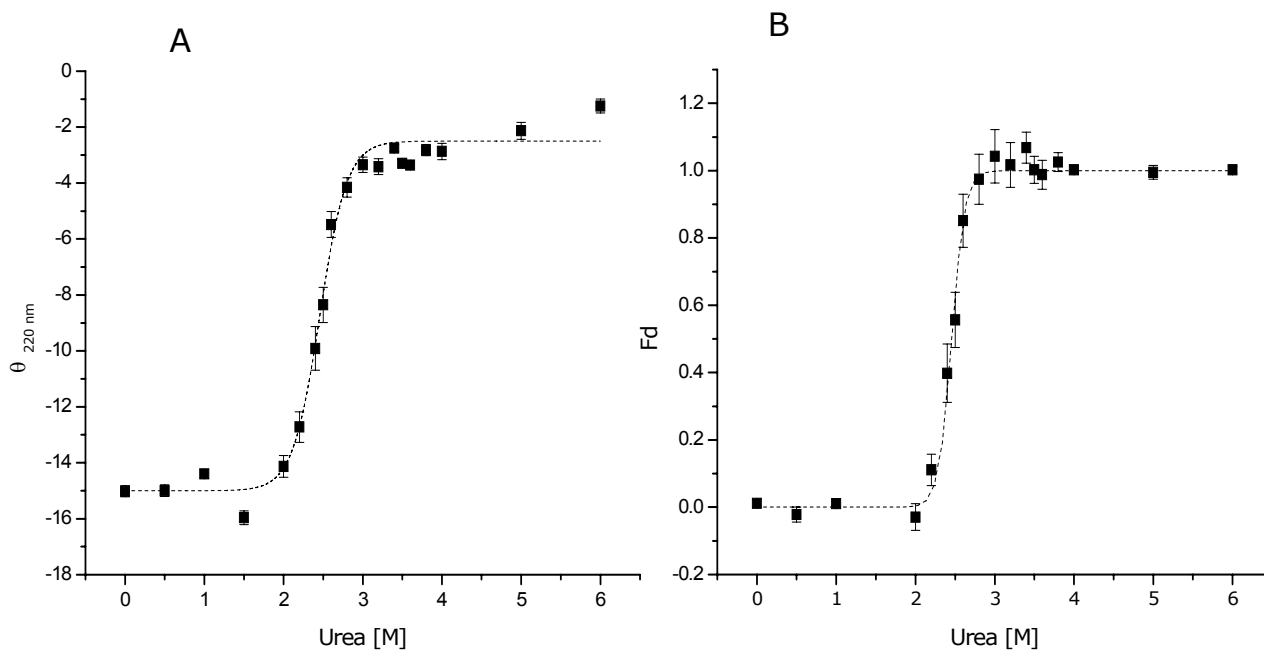


Figura 20. Curvas de desnaturalización (■) de la proteína LAO W47F. La línea roja muestra la curva de ajuste simultáneo. A. Promedio \pm DE (n=10) de los datos de elipticidad (θ) a $\lambda = 220$ nm. B. Promedio \pm DE (n=10) de los datos de Fd a $\lambda = 220$ nm. Condiciones experimentales: 6 h de incubación, concentración de proteína de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 25°C de temperatura.

En la desnaturalización isotérmica con urea seguida por fluorescencia, tanto a 25°C como 37°C, el perfil que se obtuvo se ajustó, también a un modelo de dos estados.

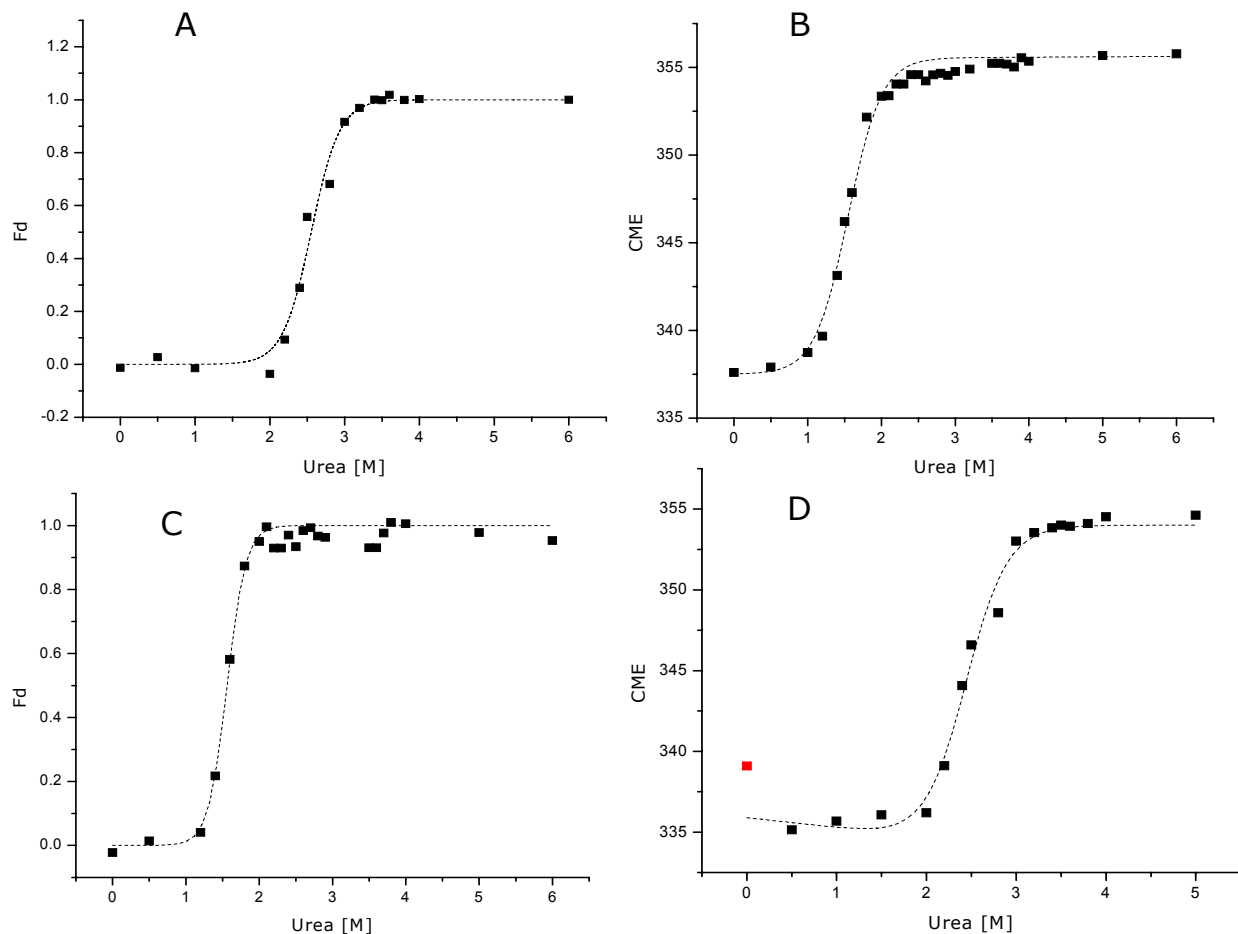


Figura 21. Desnaturalización de la proteína LAO mutante (W47F). A y B. Curvas a 25°C Fracción desnaturada y CME en función de la concentración de urea, respectivamente. C y D. Curvas a 37°C Fracción desnaturada y CME en función de la concentración de urea, respectivamente. Condiciones: concentración de proteína: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$ y , $\lambda_{\text{em}}= 310\text{-}410 \text{ nm}$.

Para determinar si la desnaturalización de LAO W47F se puede adecuar a un proceso de dos estados, se compararon las señales normalizadas de F y CD a 25°C (Figura 22). Aunque ambas curvas son monofásicas y las C_m son muy parecidas, la pendiente, m , es diferente (Tabla 8).

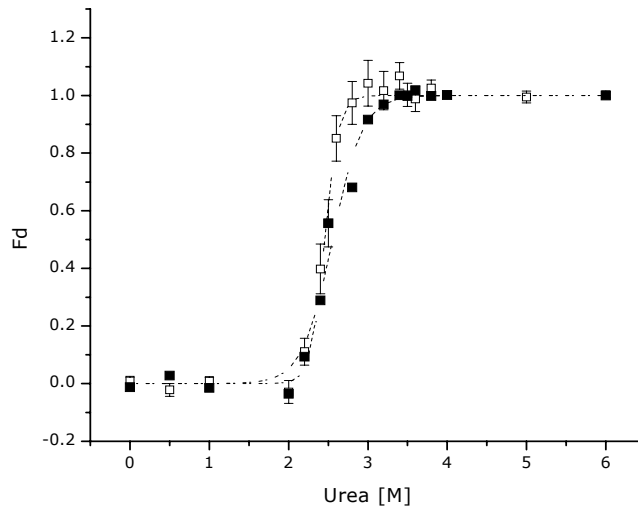


Figura. 22. Curvas normalizadas de desnaturalización de LAO W47F. Línea punteada muestra el ajuste simultáneo. (■) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, técnica: fluorescencia, $\lambda = 223 \text{ nm}$. (□) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, técnica DC, $\lambda = 220 \text{ nm}$. Condiciones experimentales: 6 horas de incubación a 25°C.

En las figuras 23 y 24 se comparan los patrones de desnaturalización de LAO silvestre y LAO W47F. Tanto por Fluorescencia (Figura 23) como por DC (Figura 24) es claro que la C_m es menor para la mutante en comparación con LAO silvestre.

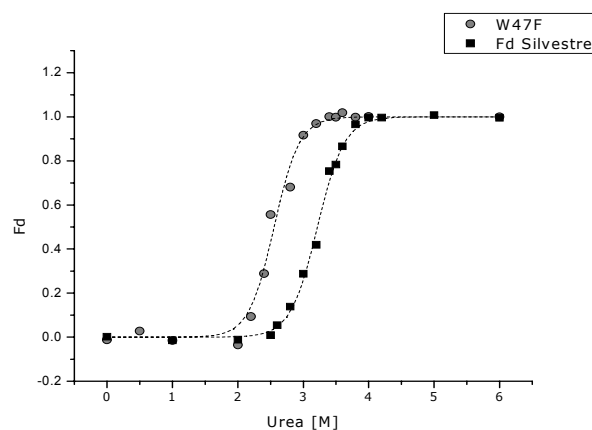


Figura 23. Comparación de la proteína LAO silvestre y LAO mutante (W47F) a 25°C. Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea. Condiciones: concentración de proteína: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\lambda_{IF} = 323 \text{ nm}$ para LAO silvestre y $\lambda_{IF} = 324 \text{ nm}$ para LAO W37F.

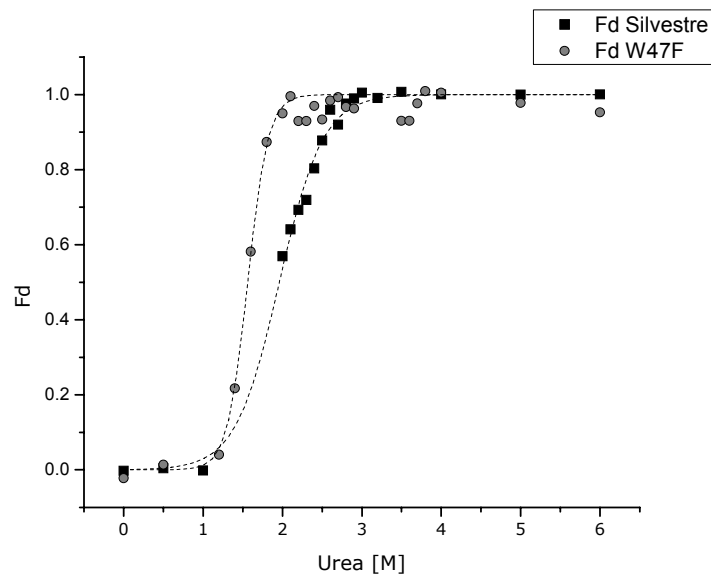


Figura 22. Comparación de la proteína LAO silvestre y LAO mutante (W47F) a 37°C. Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea. Condiciones: concentración de proteína: 50 $\mu\text{g/mL}$, $\lambda_{\text{IF}}=321$ nm para ambas proteínas.

Una vez calculados los datos de $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ m y C_m para la proteína LAO W47F se compararon con los valores estimados para LAO silvestre (Tabla 8). LAO silvestre fue más estable que la mutante; además como ya se había mencionado, la C_m de la mutante es menor que la de la silvestre observándose esta tendencia en ambas técnicas espectroscópicas a 25°C. Sin embargo, a 37°C aunque la disminución en la C_m sugiere una disminución en la estabilidad, el análisis de los datos de acuerdo a un modelo de dos estados muestra que el ΔG de LAO silvestres es menor que el de W47F lo cual sugiere que a esta temperatura la mutante es más estable que la silvestre, esto se debe a que en la mutante la pendiente es mayor.

Técnica espectroscópica	Proteína	ΔG_{H_2O} (kcal/mol)	${}^1\Delta\Delta G_{H_2O}$	${}^2\Delta\Delta G_{H_2O}$	m(kcal/molM)	Cm (M)
Fluorescencia a 25°C	Silvestre	9.31±0.89	1.36	2.01	2.89±0.28	3.22
	Mutante	7.95±1.45			3.11±0.57	2.55
Dicroísmo Circular 25°C	Silvestre	10.53±2.63	2.05	1.36	3.71±0.93	2.84
	Mutante	8.48±1.63			3.45±0.66	2.46
Fluorescencia a 37°C	Silvestre	4.39±0.38	3.1	1.41	2.24±0.3	1.96
	Mutante	7.49±0.98			4.8±0.63	1.56

Tabla 8. Muestra los valores calculados por ambas técnicas: F y CD con LAO silvestre y W47F a dos temperaturas.

1 Diferencia entre los ΔG_{H_2O} . 2 Diferencia de los valores de Cm. por la diferencia de los valores de m.

Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia

Se realizaron curvas de desnaturalización térmica a una velocidad de 0.5°C/min. Iniciando a 20°C y finalizando en 75°C. Los perfiles obtenidos tanto en Fd como en CME en función de la temperatura muestran una sola transición

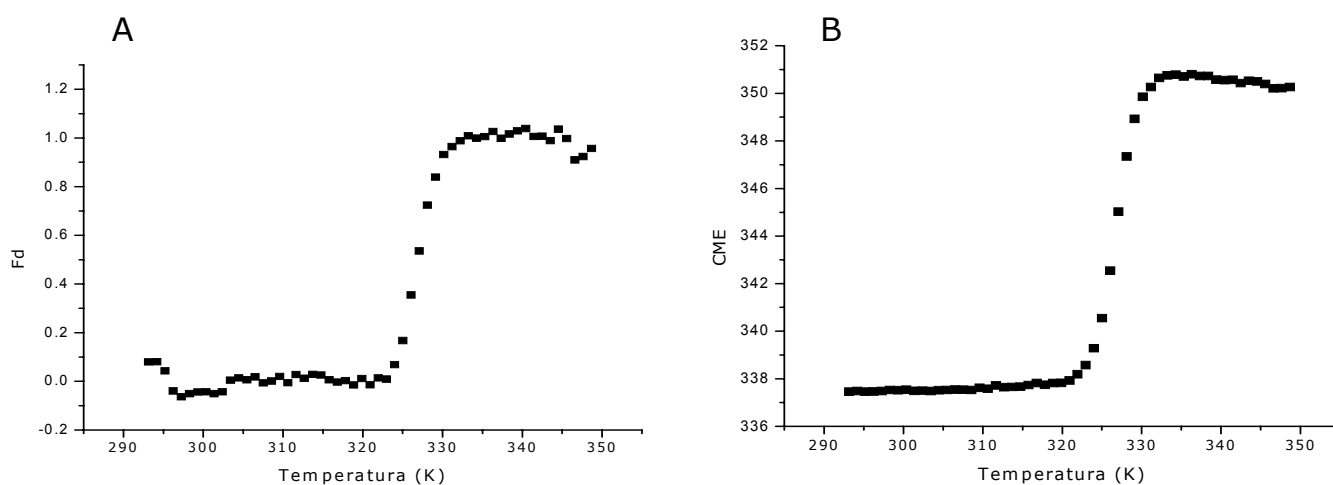


Figura 23. Desnaturalización por temperatura seguida por Fluorescencia. A. Fd en función de la temperatura. B. CME en función de la temperatura. Condiciones: concentración de proteína: 100 µg/mL.

Se obtuvo ΔG a partir de los datos de F_d de la transición (Tabla 9), el procedimiento seguido para tal cálculo fue el utilizado en el Apartado 6.2.3 de este capítulo.

Temperatura (K)	F_d	ΔG (kcal/mol)
323.99	0.06823	1.67701
325.018	0.16764	1.03122
326.046	0.3546	0.38662
327.074	0.53567	-0.0926
328.102	0.72397	-0.6264
329.13	0.83865	-1.0741
330.158	0.93182	-1.7094
331.186	0.96378	-2.1517
332.214	0.98795	-2.8988

Tabla 9. Valores de ΔG en la transición de la curva de desnaturalización térmica.

La T_m calculada fue de: 326.99 K y un ΔH_m de desnaturalización: 175.07 ± 3.4 kcal/mol. También estimamos el valor del ΔG a 25°C: 12.26 kcal/mol para poderlo comparar con los valores obtenidos mediante otras técnicas,

Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular

La figura 24 muestra el perfil de desnaturalización térmica, en el cual se observa una sola transición.

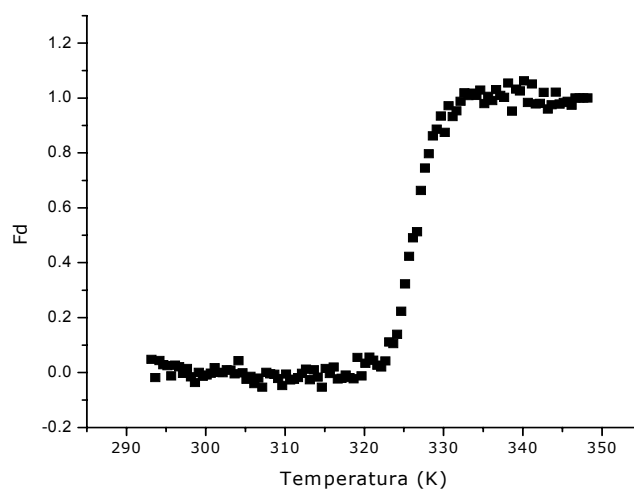


Figura 24. Curva de desnaturalización térmica seguida por D.C. Fracción desnaturalizada en función de la temperatura. Condiciones: 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, intervalo de temperatura: 20°C-75°C, $\lambda = 220 \text{ nm}$, Velocidad de barrido: 0.5°C/min.

De los valores de Fd en la transición (Tabla 10) se estimó una T_m de 324.65 K y con este valor se calculó el ΔH_m de desnaturalización: $185.28 \pm 15.81 \text{ kcal/mol}$ y ΔG (25°C) de 13.24 kcal/mol.

Temperatura (K)	Fd	ΔG (kcal/mol)
323.65	0.10566	0.25058
324.15	0.13962	0.16746
324.65	0.2228	-0.0203
325.15	0.32309	-0.2439
325.65	0.42319	-0.4784
326.15	0.49072	-0.6516

326.65	0.51319	-0.7121
327.15	0.6629	-1.2317
327.65	0.74479	-1.7102
328.15	0.79681	-2.2908
328.65	0.8617	-2.605

Tabla 10. Valores de ΔG en la transición de la curva de desnaturalización térmica.

Al comparar los gráficos de la desnaturalización térmica seguida por F y DC, observamos que la mayoría de los puntos coinciden. Al comparar los parámetros obtenidos por estas técnicas (Tabla 11) se observaron valores similares para la T_m y ΔG (25°C). En el valor calculado de ΔH_m existe una variación del 5% entre ambas técnicas; por lo tanto podríamos pensar que el desplegamiento de la proteína LAO W47F sigue un mecanismo de dos estados por desnaturalización térmica.

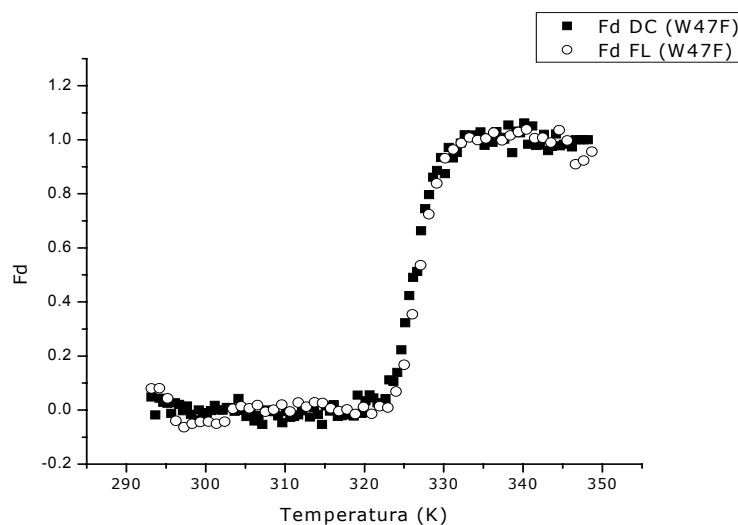


Figura. 25. Curvas normalizadas de desnaturalización de LAO W47F. (■) Fracción desnaturalizada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

técnica DC, $\lambda = 220$ nm. (°) Fracción desnaturada en función de la concentración de urea, concentración de proteína: 100 $\mu\text{g/mL}$, técnica: fluorescencia, $\lambda = 322$ nm.

Comparación de las curvas de desnaturación térmica de LAO silvestre y LAO W47F seguidas por Fluorescencia y Dicroísmo Circular.

Se observa en las curvas de desnaturación térmica tanto seguidas por fluorescencia como por DC que la T_m de LAO W47F es menor que la T_m de LAO silvestre.

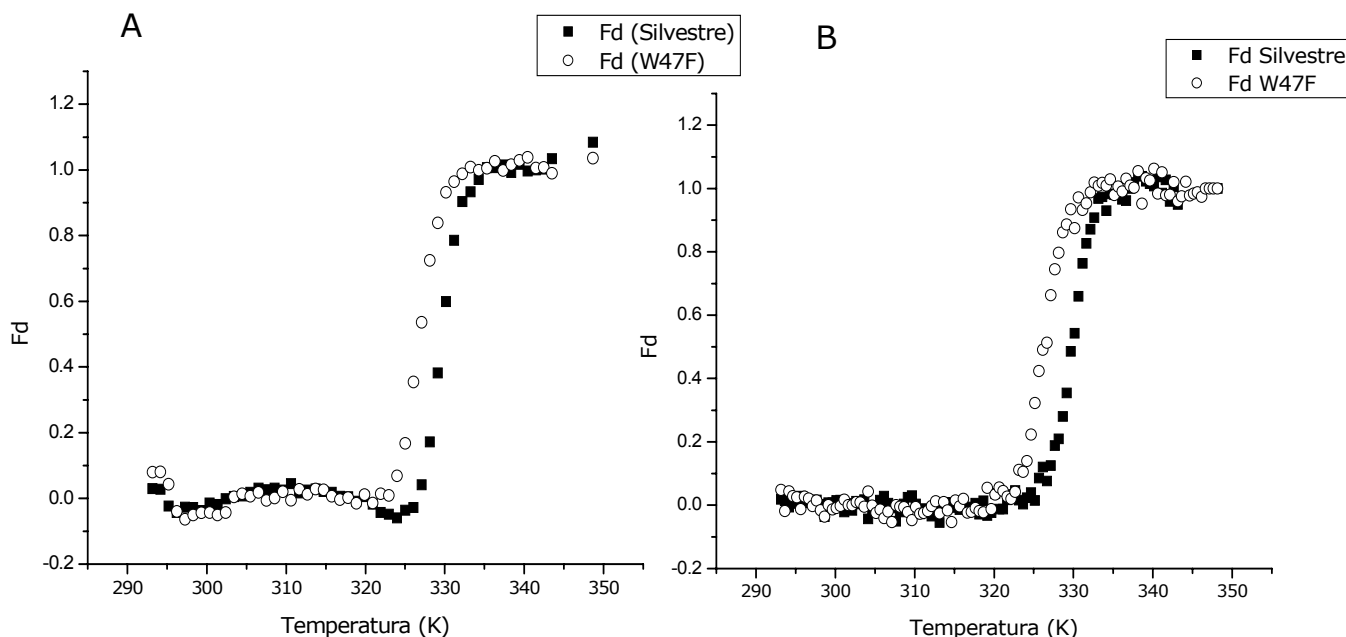


Figura 26. Curvas normalizadas de desnaturación térmica de LAO silvestre y LAO W47F. (■) LAO silvestre, (°) LAO W47F. A. Fluorescencia. B. Dicroísmo circular.

Comparando los valores de los parámetros obtenidos con LAO silvestre y LAO W47F, es evidente la disminución de la T_m observada en los gráficos.

Técnica	Proteína	T _m (K)	ΔH _m (kcal/mol)
Fluorescencia	Silvestre	329.94	192.05±10.83
	Mutante	326.99	175.07±3.40
Dicroísmo circular	Silvestre	329.78	170±3.39
	Mutante	324.65	185.28±15.81

Tabla 11. Muestra los valores estimados en los ensayos de desnaturalización térmica para LAO silvestre y LAO W47F.

1. Discusión

El objetivo de realizar los experimentos presentados en esta tesis fue conocer como la proteína LAO se despliega hasta llegar a un estado desnaturalizado, es decir, al estar formada por dos lóbulos (uno más grande que el otro), existen al menos dos posibilidades en el mecanismo de desplegamiento; que los dos lóbulos se desplieguen de manera cooperativa o que lo hagan secuencialmente (como es el caso de His J).

Para conocer si existían estados intermedios estables en el camino tomado por LAO para llegar a una conformación desnaturalizada, se decidió hacer estudios al equilibrio, para ello, fue necesario realizar dos experimentos, uno de reversibilidad y otro a diferentes tiempos de incubación para verificar que la reacción de desnaturalización es reversible y se encuentre en equilibrio, demostrando así que es posible la caracterización termodinámica.

Cumpléndose ambas condiciones: equilibrio y reversibilidad, nos dispusimos a caracterizar la reacción.

De la técnica de fluorescencia se obtuvieron 9 curvas de desnaturalización con urea a diferentes temperaturas, en las cuales se observó una sola transición y se ajustaron a un modelo de dos estados. A partir de ellas se obtuvo el ΔG_{H_2O} , la m y la C_m , la tendencia fue que al aumentar la temperatura se requiere menos concentración de urea para desnaturalizar a la proteína, este resultado es lógico, ya que al acrecentar la temperatura existe un aumento en la energía cinética provocando la ruptura de interacciones no covalentes (como puentes de hidrógeno) por tanto al tener también en solución cierta concentración de urea, existe una "suma de efectos" producidos tanto por la temperatura y como por la urea.

Las curvas de desnaturalización realizadas con urea y temperatura por fluorescencia se ajustaron a un modelo de dos estados, mas esto no es una prueba contundente de que el proceso se lleve a cabo de esta manera; por lo tanto se realizaron sendas curvas de desnaturalización por dicroísmo circular

mostrando, también, una sola transición tanto por urea como por temperatura. Los perfiles de desnaturalización con ambas técnicas se compararon y no fueron completamente coincidentes, desfavoreciendo la premisa de un mecanismo de desplegamiento de dos estados seguido por LAO.

La evidencia rotunda de que el desplegamiento se puede adecuar a un mecanismo de dos estados es demostrar que el ΔH determinado por la relación de van't Hoff, $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$, es el mismo al estimado calorimétricamente, ΔH_{cal} estos valores fueron de 125.25 ± 9.73 kcal/mol y 155 ± 1.34 kcal/mol, respectivamente por tanto los ΔH calculados son diferentes y la variación es de 12%. Cuando la entalpía obtenida por van't Hoff es menor a la calorimétrica, esto es una evidencia contundente de que están presentes concentraciones de intermediarios al equilibrio (Pace et al, 1989).

El ΔC_p de desnaturalización obtenido en el ajuste de la curva de estabilidad es de 2.81 ± 0.47 kcal/molK, el cual es análogo al estimado con la relación Cp-residuo: 2.86 kcal/molK, por tanto el parámetro no cambia al ser calculado por dos métodos diferentes.

Los valores obtenidos de ΔC_p obtenidos son grandes. La magnitud del ΔC_p se debe a que al desnaturalizarse la proteína, el interior no polar entra en contacto con el solvente, por lo que las moléculas de agua toman cierta estructura permitiendo solvatar a los grupos no polares, por tanto el aumento en el Cp de la proteína desnaturalizada refleja la energía requerida para calentar a estas moléculas de agua que solvatan a los grupos no polares.

Estos experimentos se realizaron teniendo en cuenta el comportamiento de una proteína análoga a LAO: HisJ, por lo que al comparar ciertos parámetros conocidos de esta proteína podremos cerciorarnos, utilizando otra fuente, de los valores obtenidos en los experimentos de este trabajo. El ΔC_p de HisJ es de 2.6 kcal/molK (Kreimer, 2000) mientras que el de LAO es de 2.84 ± 0.04 kcal/molK, por tanto existe una variación del 9.23% tomando el valor de His J como el más preciso.

El ΔH_{cal} de LAO: 155 ± 1.34 kcal/mol con una T_m de 329.29 K es igual al ΔH_{cal} estimado para el lóbulo de mayor tamaño de His J: 155 kcal/mol con una T_m de 330.55 K

Los ensayos realizados con la mutante tuvieron como objetivo conocer la estabilidad de esta proteína en comparación con la silvestre y ayudarnos a esclarecer el mecanismo de desplegamiento.

Las curvas de desnaturalización realizadas con los dos agentes caotrópicos utilizados y por las dos técnicas espectroscópicas se ajustaron a un modelo de dos estados; sin embargo, los gráficos de fracción desnaturalizada de ambas técnicas no se superponen lo cual supone que el patrón de desplegamiento de la mutante W47F por urea no sigue un modelo de dos estados.

Ahora bien, suponiendo que ambas proteínas, silvestre y mutante, siguen el mismo patrón de desplegamiento (por los perfiles obtenidos mediante las técnicas espectroscópicas) se compararon las curvas de desnaturalización y se observó un desplazamiento a menores concentraciones de urea en la transición con la mutante, esto es, la mutante se desnaturaliza a menores concentraciones de desnaturalizante que la silvestre, además los valores de energía libre muestran un valor más alto para LAO silvestre a 25°C suponiendo mayor estabilidad de la proteína silvestre. Sin embargo, a 37°C, se obtiene un valor de energía mayor en la mutante que en la silvestre, aunque el gráfico mostró un corrimiento a menores concentraciones de desnaturalizante. Tal vez, a temperaturas altas (>310.15) LAO W47F es más estable que LAO silvestre, para confirmar esta premisa sería necesario realizar experimentos a esta temperatura y temperaturas más altas. Por otro lado, en las curvas de desnaturalización térmica, LAO W47F presenta una menor T_m en ambas técnicas espectroscópicas. La desviación del comportamiento de dos estados en urea es mayor por la mutante que para la silvestre, esto podría significar que el desplegamiento de LAO silvestre no se ajusta a un modelo de dos estados.

Conclusiones

LAO silvestre

En la proteína de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina al utilizar urea como agente perturbante, la transición entre la conformación nativa y la desnaturalizada llega al equilibrio en menos de 6 h.

El mecanismo de desplegamiento de la proteína LAO por medio de las técnicas espectroscópicas de fluorescencia y dicroísmo circular se ajusta a un modelo de dos estados con ambos agentes desnaturalizantes: urea y temperatura. Sin embargo, los gráficos de las curvas de desnaturalización isotérmicas obtenidas por fluorescencia y dicroísmo circular no son coincidentes, siendo la primera prueba de que el desplegamiento de LAO no se lleve a cabo por un mecanismo de dos estados.

Al ser el valor entálpico calorimétrico mayor al de van't Hoff es una señal inequívoca de la presencia de intermediarios al equilibrio, por tanto el desplegamiento de LAO no se puede adecuar a un modelo de dos estados.

LAO W47F

LAO w47F se ajusta a un modelo de dos estados al seguir la desnaturalización por fluorescencia y dicroísmo circular con los dos agentes desnaturalizantes. No obstante, los gráficos de las curvas de desnaturalización seguidas por fluorescencia y dicroísmo circular no son coincidentes.

La estabilidad de la mutante es menor que la de la silvestre a 25°C ya que en todas las curvas de desnaturalización (por urea y temperatura seguida por Fluorescencia y Dicroísmo Circular) presenta un corrimiento a menores condiciones de desnaturalizante, además el valor calculado de energía libre es menor que el valor estimado para LAO silvestre.

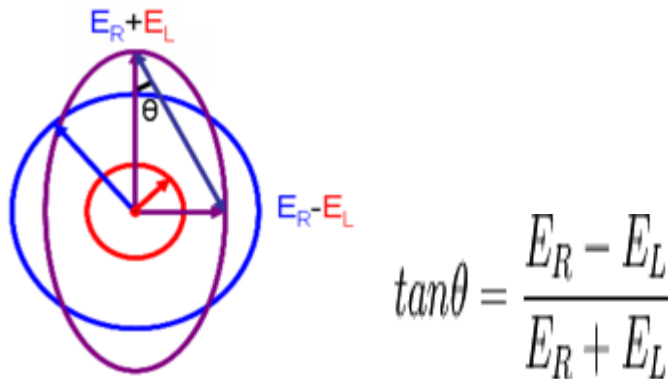
Perspectivas

- Con los datos obtenidos por las dos técnicas espectroscópicas, ajustarlos a un modelo de tres estados.
- Realizar la técnica espectroscópica de dicroísmo circular en longitudes de onda donde se puedan detectar los aromáticos, esto es de 270-300 nm.
- Realizar termogramas a valores de pH que vayan de un intervalo de 7.5 a 6.5. Para poder completar el gráfico de entalpía en función de la T_m y así tener una mejor estimación del ΔC_p .
- Realizar experimentos a diferentes concentraciones de urea en una columna de exclusión molecular para identificar al intermediario.
- Sobreexpresar y caracterizar el patrón de desplegamiento de la mutante W130X.
- Obtener termogramas de ambas mutantes y comparar los parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste con la proteína silvestre.

Apéndices

Obtención de elipticidad en dicroísmo circular

El dicroísmo circular mide la capacidad de moléculas ópticamente activas de absorber diferencialmente la luz polarizada circularmente a izquierda y a derecha. La elipticidad es una medida dada en instrumentos de DC en grados, es pequeño en general, y puede describirse de la siguiente manera: $\tan \theta = \theta$ (radianes).



Donde E_R y E_L son el campo eléctrico de la derecha (R) e izquierda (L), respectivamente. El círculo azul representa el E de la derecha y el rojo el E de la izquierda, mientras que el óvalo morado es la propagación de la luz, ya que los campos son perpendiculares a ella.

Además, la intensidad de la radiación I es proporcional a E^2

$$\theta(\text{radians}) = \frac{(I_R^{1/2} - I_L^{1/2})}{(I_R^{1/2} + I_L^{1/2})} \quad I = I_0 e^{-A \ln 10}$$

$$\theta(\text{radians}) = \frac{(e^{-\frac{A_R}{2} \ln 10} - e^{-\frac{A_L}{2} \ln 10})}{(e^{-\frac{A_R}{2} \ln 10} + e^{-\frac{A_L}{2} \ln 10})} = \frac{e^{\Delta A \frac{\ln 10}{2}} - 1}{e^{\Delta A \frac{\ln 10}{2}} + 1}$$

Como $\Delta A \ll 1$, se puede aproximar usando serie de Taylor y convirtiendo radianes a grados

$$\theta(\text{degrees}) = \Delta A \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right)$$

$$\theta \text{ (deg)} = 33 \Delta A$$

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MW}{c \text{ (mg mL)} \times l \text{ (cm)}}$$

$$[\theta] \text{ (deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) = 3300 \Delta \epsilon$$

Estructuras cristalinas de LAO.

Estructuras cristalinas de la proteína LAO con los y sin ligandos encontradas en el pdb:

- LAO sin ligando: 2LAO.pdb, resolución: 1.9 Å.
- LAO con lisina: 1LST.pdb, resolución: 1.8 Å.
- LAO con arginina: 1LAF.pdb, resolución: 2.08 Å
- LAO con Ornitina: 1LAH.pdb, resolución: 2.06 Å

Ensayos con LAO silvestre

Espectros de fluorescencia de la curva de desnaturalización isotérmica

La intensidad en la señal de fluorescencia disminuye a mayores concentraciones de urea, esto se debe a que el ambiente que rodea al triptofano (fluoróforo) en el estado nativo es diferente al estado desnaturalizado, ya que en este último, el triptofano tiene una mayor área de contacto con el disolvente. Y el máximo se corre hacia la derecha (mayores

longitudes de onda), es decir hacia el rojo del espectro de luz visible (Figura 27)

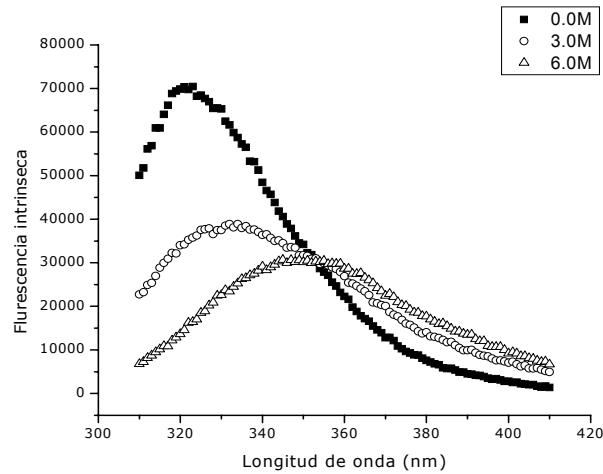


Figura 27. Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína LAO. Espectros de emisión a diferentes concentraciones de urea (0 M, 3 M, 6 M) de LAO silvestre. La concentración de la proteína fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm y $\lambda_{\text{em}}= 310\text{-}410$ nm a 25°C.

Ensayo de reversibilidad

El ensayo de reversibilidad se llevó a cabo a diferentes concentraciones de urea y a una concentración de proteína silvestre de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estas muestras fueron incubadas por 8 h a 25°C. La figura 28 muestra la fracción desnaturada y el centro de masa espectral en función de la concentración de urea. Se observa una sola transición (monofásica) y además la renaturalización sigue prácticamente el mismo camino que la desnaturación.

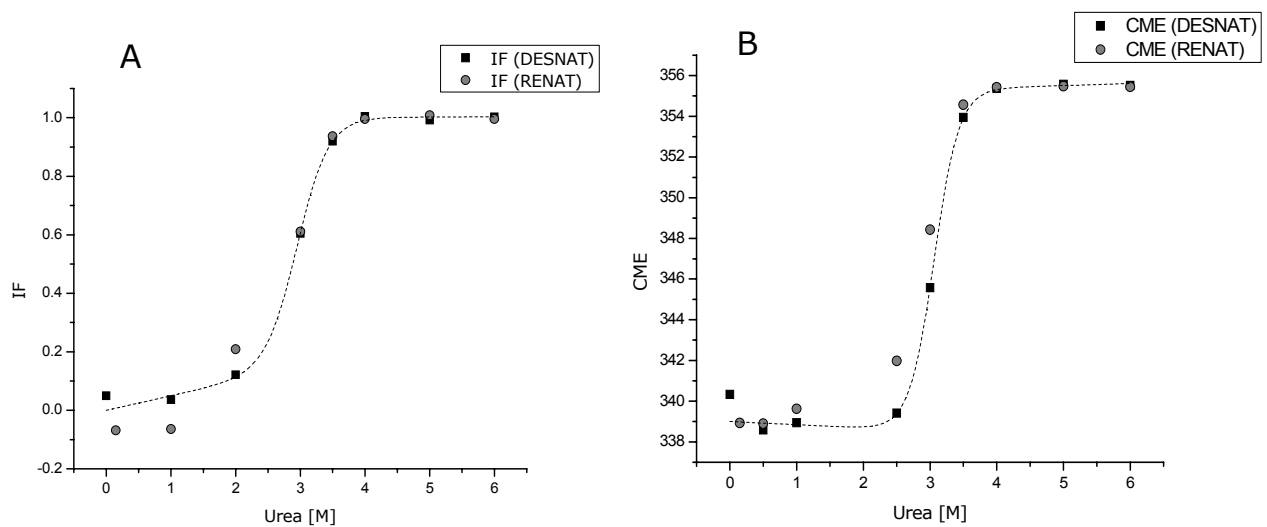


Figura 28. Reversibilidad de LAO silvestre. A. Intensidad de fluorescencia en función de la concentración de urea. B. Centro de masa espectral en función de urea. Condiciones: 8 ho de incubación a 25°C, concentración de proteína 50 µg/mL.

Tiempos de equilibrio

Se realizaron curvas de desnaturalización a tres tiempos de incubación. En la figura 29 se observa que en los tres tiempos de incubación, se obtienen perfiles coincidentes por tanto el sistema se encuentra en equilibrio.

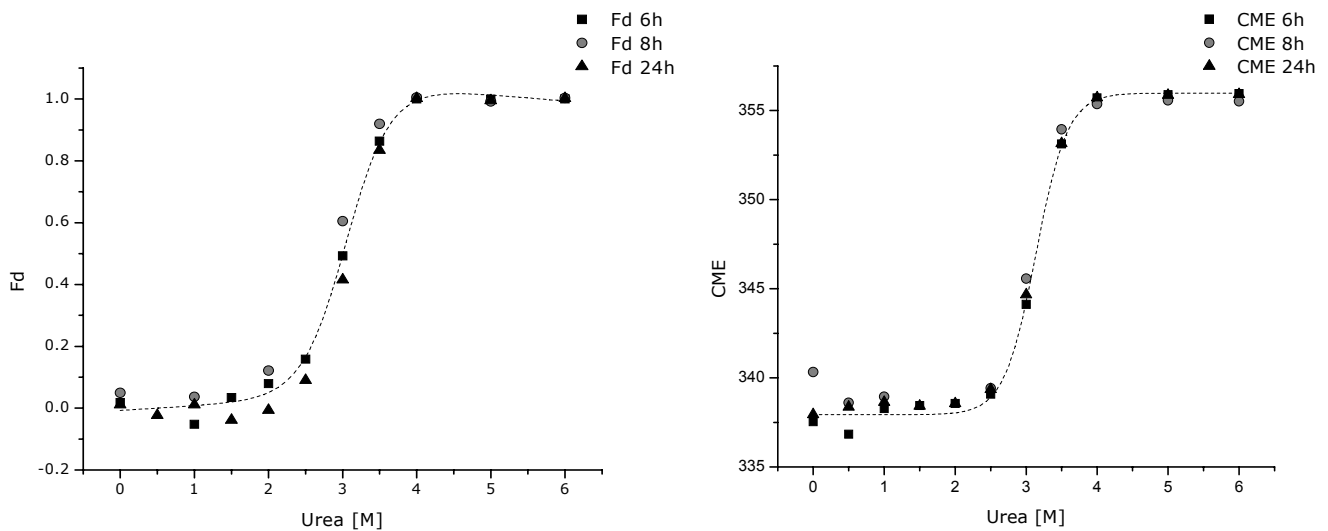


Figura 29. Tiempos de equilibrio de LAO silvestre. Centro de masa espectral en función de urea. Condiciones: 6, 8, 24 h de incubación a 25°C, concentración de proteína 50 µg/mL.

Espectros de emisión a diferentes temperaturas

De acuerdo a sendos espectros de emisión, a 25°C se tiene una mayor señal (70000 cuentas) mientras que a temperaturas que se alejan de ella, la señal disminuye considerablemente (25000 cuentas aproximadamente).

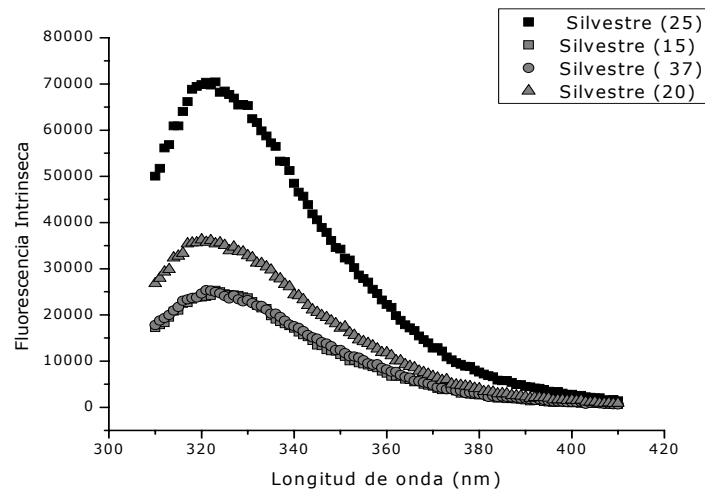


Figura 30. Espectro de emisión de LAO silvestre a cuatro diferentes temperaturas. La concentración de la proteína fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, urea 0.0 M, $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm y $\lambda_{\text{em}}= 310\text{-}410$ nm, con paso de luz de 1 mm de excitación y emisión. (■):25°C, (●): 15°C, (▲):37°C, (▼): 20°C

Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia. Ensayo de reversibilidad

Se obtuvo un espectro a 20°C antes y después de la desnaturalización por temperatura.

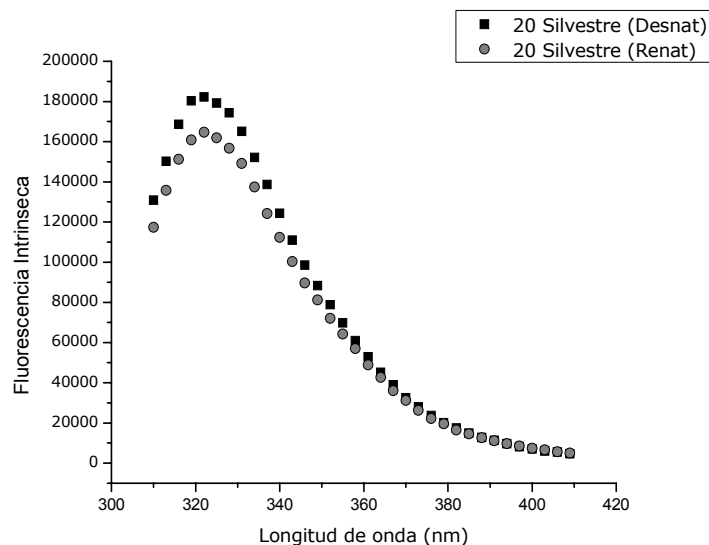


Figura 31. Espectro de emisión de LAO silvestre. Proteína nativa a 20°C (■), proteína renaturalizada a 20°C (◦). Condiciones: concentración de proteína: 100 µg/mL, λ_{ex} =295 nm y λ_{em} = 310-410 nm, con paso de luz de 1 mm de excitación y emisión.

En la figura 31, el espectro a priori y a posteriori del barrido son semejantes esto es la proteína una vez desnaturalizada se renaturaliza y adopta una conformación cercana al estado inicial. Por tanto el sistema es reversible.

Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular. Ensayo de reversibilidad.

Se obtuvo un espectro a 20°C antes y después de la desnaturalización por temperatura y cuando se encontraba totalmente desnaturalizada.

Ambos espectros mostraron perfiles similares esto habla de la reversibilidad de LAO por ambas técnicas: Fluorescencia (Figura 31) y DC (Figura 32).

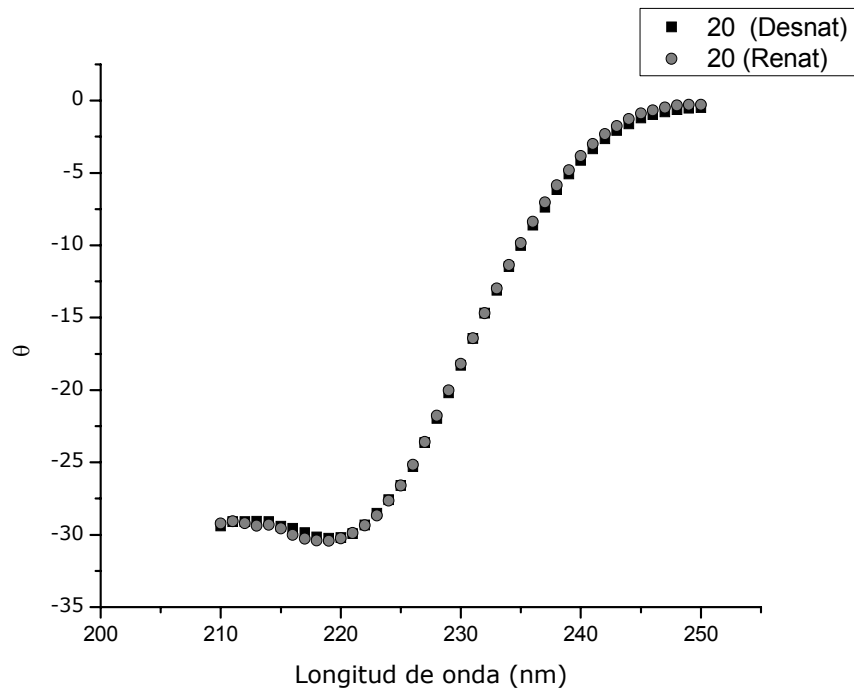


Figura 32. Espectro de emisión de LAO silvestre en su conformación nativa por D.C. (■) Temperatura: 20°C a priori desnaturalización. (°) Temperatura: 20°C a posteriori desnaturalización. Condiciones: 200 µg/mL de proteína, $\lambda = 210\text{-}250$ nm.

Ensayos con LAO W47F

Espectros de fluorescencia de la curva de desnaturalización isotérmica

Se obtuvieron espectros a diferentes concentraciones de urea en un intervalo de emisión de 310- 410 nm. La intensidad en la señal de fluorescencia disminuyó, al igual que en la proteína silvestre, a mayores concentraciones de urea, la razón es por el ambiente en que se encuentra el triptofano el cual es diferente cuando la proteína se encuentra en una conformación nativa que cuando está desnaturalizada.

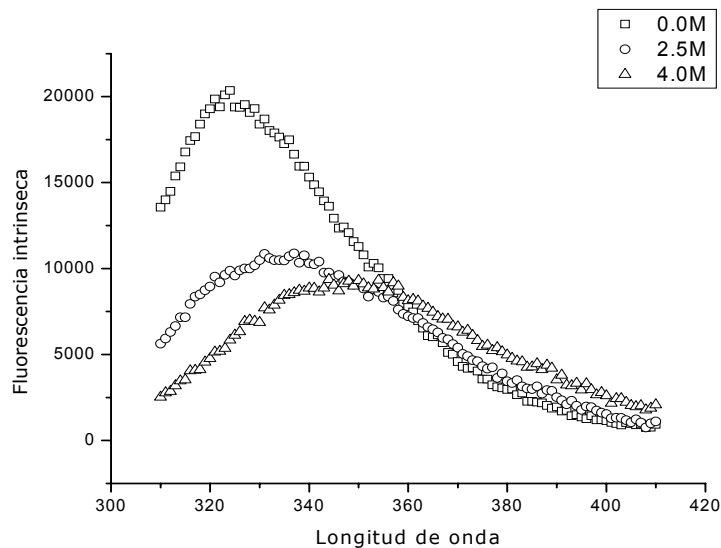


Figura 33. Espectros de emisión a diferentes concentraciones de urea (0 M, 2.5 M y 4 M) de LAO mutante W47F. La concentración de la proteína fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$ y , $\lambda_{\text{em}}=310\text{-}410 \text{ nm}$, con paso de luz de 1mm de excitación y emisión a temperatura de 25°C.

Desnaturalización térmica seguida por Fluorescencia. Ensayo de reversibilidad

Se obtuvo un espectro al iniciar el barrido de temperatura a 20°C y al finalizar el barrido de temperatura se regresó a la temperatura inicial y se adquirió otro. Como se muestra en la figura 34, los espectros son casi similares, sugiriendo que la proteína W47F una vez desnaturalizada regresa a su conformación nativa, es decir, es reversible.

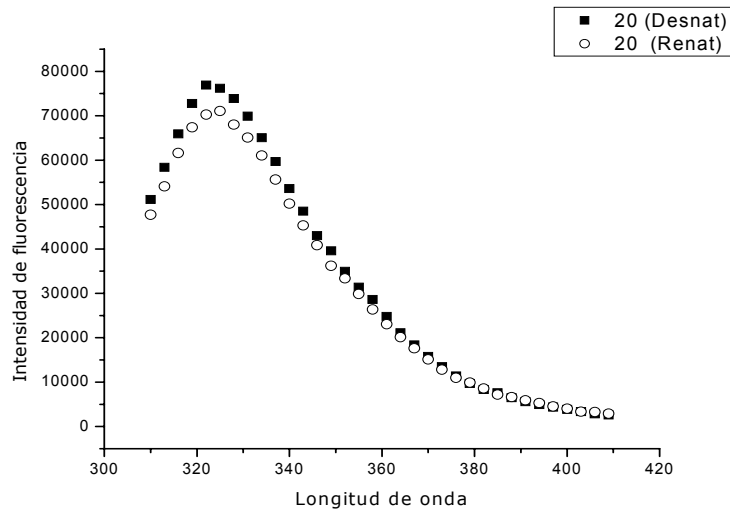


Figura 34. Proteína nativa a 20°C (■), proteína renaturalizada a 20°C (○). Condiciones: concentración de proteína: 100 µg/mL, λ_{ex} =295 nm y λ_{em} = 310-410 nm

Desnaturalización térmica seguida por Dicroísmo Circular. Ensayo de reversibilidad

De la misma manera que con la técnica de fluorescencia, se obtuvo un espectro al iniciar el barrido y otro al finalizarlo a 20°C. Como se muestra en la figura 35, los espectros son casi similares mostrando que la proteína W47F es reversible.

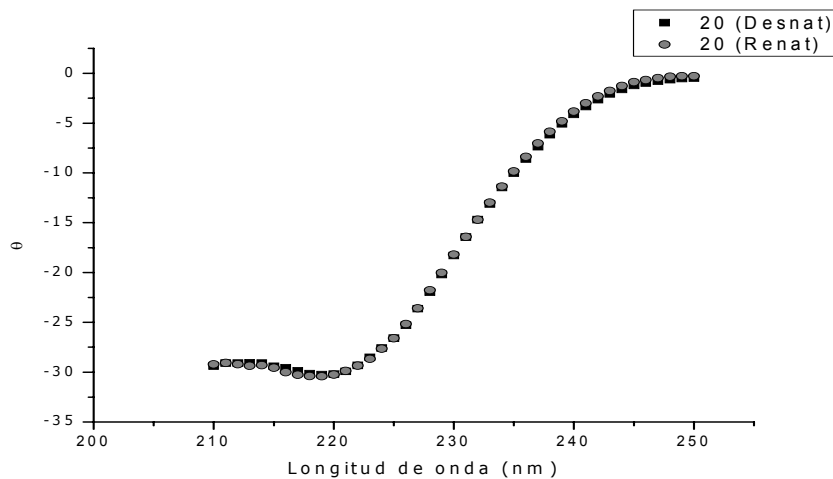


Figura 35. Espectro de emisión de LAO silvestre en su conformación nativa por D.C. (■) Temperatura: 20°C antes de la desnaturalización térmica. (○) Temperatura: 20°C a después de la desnaturalización térmica. Condiciones: 200 µg/mL de proteína, λ = 210- 250 nm.

Porcentaje de variación de los datos calculados

El porcentaje de variación lo calculé como un error relativo, en donde se asume un valor como el preciso, X_p y el otro como un valor experimental, X_e :

$$\% \text{variación} = \frac{X_e - X_p}{X_p} \times 100 \dots\dots\dots (\text{ec. 20})$$

Análisis de la curva de desnaturalización por temperatura

El cálculo de ΔG a cualquier temperatura se realiza por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \times \left(1 - \left(\frac{T}{T_m}\right)\right) - \Delta C_p \times \left((T_m - T) + \left(T \times \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right) \right) \dots\dots\dots (\text{ec. 21})$$

Por tanto se necesita conocer los valores de ΔH_m , T_m , y ΔC_p para poder calcular $\Delta G(T)$. El método más simple para determinar ΔH_m y T_m es graficando ΔG (obtenido del barrido por temperatura, los valores de la transición) como función de la temperatura y utilizar $T_m = T$ a $\Delta G = 0$ y $\Delta H_m = (T_m \text{ en K}) \times$ la pendiente. Y de esta manera se obtiene el $\Delta G(T)$ a cualquier temperatura.

Desviación estándar de la ordenada al origen al obtener la ecuación de la recta.

La desviación estándar de la ordenada al origen y la pendiente se calculan en términos de la desviación estándar de la distribución de valores de dy alrededor de la mejor línea, que llamaremos S_y . Esta última está dada por:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(\delta y_i)^2}{N-2}} \dots\dots (ec. 22)$$

Donde δy_i está dado por:

$$\delta y_i = y_i - (mx_i + b) \dots\dots (ec. 23)$$

Por tanto el valor de S_b está dado por:

$$S_b = S_y \times \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} \dots\dots (ec. 24)$$

Abreviaturas

Amp: ampicilina.

Cm.: Concentración media de desnaturizante

CME: Centro de masa espectral

D.S.C: Calorimetría de barrido diferencial.

DC: Dicroísmo circular

Fd: Fracción de proteína desnaturizada

Fn: Fracción de proteína nativa

HisJ: Proteína periplásmica de unión a histidina.

IF: Intensidad de Fluorescencia

LAO: Proteína periplásmica de unión a lisina, arginina y Ornitina.

LB: Luria-Bertani.

PPU: Proteína periplásmica de unión

Sd: Señal del estado desnaturizado

Sn: Señal del estado nativo

T_m: Temperatura de fusión

W47F: Mutante de LAO cuyo triptofano 47 está sustituido por fenilalanina

Bibliografía

- Ames GFL. 1986. "Bacterial Periplasmic Transport Systems: Structure, Mechanism, and Evolution." Annual Review of Biochemistry. 55: 397- 425.
- Ames GFL. 1994. "Isolation and purification of periplasmic binding proteins." Methods in enzymology 235, 234-240.
- Ames GFL and Lever J. 1972. "The histidine- binding protein J is a component of histidine transport. Identification of its structural gene, his J." J Biol Chem 247(13):4309-16.
- Anfinsen CB. 1973. "Principles that govern the folding of Protein Chains." Science. 181(4096):223-230.
- Baird DC. 1991. "Experimentación: Una introducción a la teoría de mediciones y al diseño de experimentos." Prentice Hall 130-131.
- Baldwin RL. 1995. "The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view." J. of Biomolecular NMR. 5: 103-109.
- Bolen DW and Santoro MM. 1988. "Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of delta G degrees N-U values in a thermodynamic cycle". Biochemistry 27(21): 8069-8074.
- Cheng EL, Liu PQ, Wolf A, Lin E and Ames FG-L. 1998. "Both Lobes of the Soluble Receptor of the Periplasmic Histidine Permease, an ABC Transporter (Traffic ATPase), Interact with the membrane- bound Complex." J. Biol. Chem. 274(2): 739- 747.
- Chowdhry B and Leharne S. 1997. "Simulation and Analysis of Differential Scanning Calorimetry Output: Protein Unfolding Studies 1." J. Chem. Edu., 74: 236
- de Lorimier RM and Smith JJ. 2002. "Construction of a fluorescent biosensor family." Protein Sci 11(11): 2655- 75.
- Dill AK. and Chan HS. 1997. "From Levinthal to pathways to funnels." Nat. Struc. Biol. 4(1), 10-18.

- Dobson CM, Evans PA. and Radford SE. 1994. "Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far." Trends. Biochem. Sci 19: 31- 37.
- Eftink MR. 1994. "The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins." J. Biophys 66: 482- 501.
- Fernández- Velasco DA. 1995. "Plegamiento de proteínas." Boletín de educación Bioquímica 14(2):5-10.
- Fersht A. 1999. "Structure and Mechanism in Protein Science." Freeman and company, United States of America.
- Higgins and Ames GF.-L. 1981. "Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences." Proc. Natl. Acad. Sci 78:6038-6042.
- Hu C-Q, Strutevant JM, Thomson JA, Erickson RE and Pace CN. 1992. "Thermodynamics of ribonucleasa T1 denaturation." Biochemistry 31: 4876-4882.
- Jaenicke R. 1987. "Folding and association of proteins." Prog. Biophys. Molec.Biol 49: 117-237.
- Kang C-H, Shin W-C, Yamagata Y, Gokcen S, Ames GF-L., Kim S-H. 1993. "Crystal structure of the lysine-, arginine-, ornithine- binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium* at 2.7Å resolution." J. Biol. Chem 266: 23893-23899.
- Kreimer DI, Malak H, Lakowicz JR, Trakhanov S, Villar E, Shnyrov VL. 2000. "Thermodynamics and dynamics of histidine-binding protein, the water-soluble receptor of histidine permease." Eur. J. Biochem. 267, 4242-4252.
- Lakowicz JR. 2006 "Principles of fluorescence spectroscopy." (3rd edition) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Levinthal C. 1968. "Are there pathways for protein folding?" J.Chem. Phys. 65: 44-45.
- Mathews CR. 1991. "The mechanism of protein folding." Curr. Op. Struct. Biol 1:28- 35.
- Mathews CR. 1993. "Pathways of protein folding." Annu. Rev. Biochem 62: 653- 683.

- Miller DM, Olson JS, Pflugrath JW, Quioco FA. 1983. "Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis." *J. Biol. Chem.* 258: 13665-13672.
- Mogi T, Marti T and Khorana G. 1989. "Structure- function studies on bacteriorhodopsin." *J. Biol. Chem* 264(24): 14197- 14201.
- Nikaido K, Ames GF-L. 1992. "Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine- binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*." *J. Biol. Chem.* 267: 20706-20712.
- Oh B-H, Kang C-H, Bondt H, Kim S-H., Nikaido K, Joshi AK, Ames G F.-L. 1994. "The bacterial periplasmic histidine-binding protein." *J. Biol. Chem.* 269: 4135-4143.
- Oh BH, Pandit J, Kang C-H, Nikaido K, Gokcen S, Ames GF.-L., Kim S-H. 1993 "Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand." *J. Biol. Chem.* 268: 11348-11355.
- Pace CN, Shirley B.A. and Thomson JA. 1989. "Measuring the conformational stability of a protein." En: *Folding proteins in Protein Structure a practical approach.* Creighton, T.E.(Ed) IRL Press, Oxford University. 311-330.
- Pande VS, Grosberg AY, Tanaka T and Rokhsar DS. 1998 "Pathways for protein folding: is a new view needed?" *Curr.Op.Struct.Biol.* 8:68-79.
- Privalov PL. 1992. "Basis of the stability of the folded conformations of proteins." En *protein Folding.* Editor: TE Creighton, W.H. Freeman & Co New York, 83- 126.
- Royer CA, Mann CJ and Mathews R. 1993 "Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants." *Protein Science* 2: 1844- 1852.
- Santoro MM and Bolen D. 1988. "Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl .alpha.-chymotrypsin using different denaturants." *Biochemistry* 27(21): 8063-8068

- Smith PK, Krohn RI, *et al.* 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem 150(1): 76-85.
- Speiser D and Ames GF-L. 1990. "Salmonella typhimurium Histidine Periplasmic Permease Mutations that allow transport in the absence of Histidine- Binding protein." J. Bacteriology 173(4): 1444- 1451.
- Telmer PG and Shilton BH. 2003. "Insights into conformational equilibria of maltose- binding protein by analysis of high affinity mutants." J Biol Chem 278(36): 34555-67.
- Warren JR and Gordon J. 1966. "On the refractive indices of aqueous solutions of urea." J. Phys. Chem 67: 1524.