



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

Licenciatura en Investigación Biomédica
Básica

**“El desplegamiento de la proteína LAO.
Estudios cinéticos y termodinámicos”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA**

PRESENTA:

JESÚS RENAN VERGARA GUTIÉRREZ

Director de Tesis:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Facultad de Medicina



2011



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.

A mi madre y a la memoria de mi padre...

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

Durante el desarrollo del mismo conté con beca del proyecto PAPIIT IN206510, así como beca Pronabes.

El desarrollo de este proyecto fue financiado parcialmente por PAPIIT IN 206510, Conacyt 102180 y la Facultad de Medicina de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada agradezco a mi poder superior (Dios) tal y como yo lo concibo, por enseñarme que la vida puede ser tan maravillosa o tan miserable como nosotros queramos y que por lo tanto los únicos responsables de lo que sucede en nuestras vidas somos nosotros mismos; por enseñarme que los logros y fracasos no son castigos o premios de absolutamente nada ni nadie, solo son las consecuencias de lo que hemos hecho o dejado de hacer el día de hoy; pero sobretodo por enseñarme que la vida es para disfrutarse, y como diría cierto grupo de personas: un día a la vez.

Agradezco a mi madre por ser tan maravillosa y por toda una serie de razones que no escribo porque son bastantes, y a mi padre† porque en los diecinueve años que me acompañó siempre fue un gran tipo mi viejo. A todos mis hermanos (Ara, Aurora, Mari, Lupe, Martin, Nacho y Claudio) y familiares por su gran compañía y apoyo. A Nequis, Cynthia, Ivonne, Ely, Erika, Belem, Paola, Andres, Chucho 2, Omar, Jovanne, Alberto y Chucho del Lab 7, y a todos mis compañeros del CCH y de la LIBB, por ser personas y amigos maravillosos los cuales me han apoyado y acompañado en todo momento.

Agradezco a mi jefe mayor Alejandro Fernández, así como al jefe Alejandro Sosa y al jefecito Daniel. A Fátima, Mariana, Haven y Sergio, a quienes estimo bastante, por ser grandes compañeros.

Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Isabel Velázquez López y a la M. en C. Laura Álvarez Añorve, y en general a todos los miembros del LFQIP.

Agradezco a todos los miembros del jurado.

Agradezco a Cynthia Lima, secretaria técnica de la LIBB, por el gran apoyo que me ha dado. Y de manera general a la LIBB y a la UNAM, máxima casa de estudios de este país, por haberme formado.

INDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCION.....	6
Plegamiento de proteínas.....	6
La paradoja de Levinthal y los embudos de energía.....	6
Modelos de Plegamiento	10
Velocidad del proceso de plegamiento.....	13
Metodologías empleadas en el plegamiento de proteínas	13
Fluorescencia	14
Dicroísmo Circular	15
Desnaturalización por urea.....	17
Cinética del plegamiento	18
Calorimetría Diferencial de Barrido	21
Transporte bacteriano: Proteínas periplasmicas de unión.....	22
Transportadores ABC.....	22
Proteínas Periplasmicas de Unión	23
Proteína de unión a Lisina-Arginina-Ornitina (LAO).....	29
Plegamiento de PBPs: Antecedentes.....	30
HIPOTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
MATERIALES Y METODOS	33
Purificación de LAO	33
Cuantificación de proteína.....	36
Ensayos de desnaturalización por temperatura seguida por técnicas espectroscópicas.....	36
Ensayos de desnaturalización por urea	37
Experimentos de calorimetría.....	37
Experimentos cinéticos.....	38
Análisis de Datos	38

RESULTADOS	41
Desnaturalización Térmica de LAO seguida por técnicas espectroscópicas	41
Calorimetría Diferencial de Barrido	45
Desnaturalización por urea	50
Curva de estabilidad.....	54
Experimentos cinéticos de replegamiento y desplegamiento.....	55
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	57
REFERENCIAS.....	62

ABREVIATURAS

ASA: Área accesible al solvente

C_m : Concentración media de desnaturalizante

DC: Dicroísmo circular

DSC: Calorimetría diferencia de barrido

ET: Estado de transición

F_D : Fracción de proteína desnaturalizada

HisJ: Proteína de unión a histidina

IF: Intensidad de fluorescencia

LAO: Proteína de unión a lisina, arginina y ornitina

MBP: Proteína de unión a maltosa

PBP: Proteína de unión a ligando

T_m : Temperatura media de desnaturalización

ΔC_p : Cambio en la capacidad calorífica a presión constante

ΔH_{cal} : Cambio en la entalpia calorimetrica

ΔH_{vH} : Cambio en la entalpia de Van't Hoff

RESUMEN

El plegamiento de proteínas es un proceso complejo que implica una serie de cambios conformacionales en la cadena polipeptídica, así como una reorganización en las interacciones con el disolvente. Las proteínas periplásmicas de unión (PBP), forman parte de los sistemas de transporte bacteriano (permeasas) y han demostrado ser buen modelo para el estudio del plegamiento. Las permeasas están conformadas por dos proteínas integrales de membrana; dos de unión a nucleótidos y una o más proteínas de unión a ligando (PBP). Todas las PBPs presentan estructura bilobular, el sitio de unión al ligando se ubica entre los dos lóbulos, cada uno de ellos compuesto por una hoja β rodeada por hélices α . En *Salmonella typhimurium*, la PBP de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO), presenta 238 aa. Cada dominio está formado a su vez por 5 hebras β , cuatro paralelas y una antiparalela, rodeadas por 4 hélices α . En *S. typhimurium* LAO es 70% idéntica y 83% similar a la PBP de unión a histidina (HisJ) con quien comparte el complejo membranal. Estudios de calorimetría de barrido diferencial sugieren que el plegamiento de HisJ presenta un intermediario estable. Sin embargo, estudios realizados con otra PBP, la proteína de unión a maltosa, muestran un mecanismo de dos estados. De esta manera, proteínas con la misma topología bilobular muestran distintos patrones de plegamiento. El objetivo de este proyecto es caracterizar el mecanismo de plegamiento de LAO. Para ello se realizaron estudios de desnaturalización térmica y por urea seguidos por técnicas espectroscópicas, así como calorimetría diferencial de barrido (DSC) y cinéticas de plegamiento y replegamiento.

Al aumentar la temperatura o la concentración de urea, la desnaturalización de LAO seguida por intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular muestra transiciones monofásicas y coincidentes, lo cual es característico de un proceso de dos estados. Esto se observa a cada una de las condiciones de pH realizadas (8.0-9.5). Cabe señalar que el desplegamiento de LAO utilizando ambos agentes desnaturalizantes es reversible. Todas las trazas calorimétricas se ajustan a un modelo de dos estados y al aplicar el criterio calorimétrico ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$) se obtienen valores de aproximadamente 1.0. Los valores de ΔH , T_m , ΔC_p y ΔG para la desnaturalización por temperatura, y de ΔG_{H_2O} , m y cm para la desnaturalización por urea,

calculados de los experimentos realizados por las diversas técnicas no presentan diferencias significativas. Estos resultados en conjunto muestran que el plegamiento de LAO es un proceso de dos estados, en otras palabras, no existen intermediarios al equilibrio. Para determinar el mecanismo de plegamiento, se llevaron a cabo estudios cinéticos. Las cinéticas de desnaturalización son monofásicas y generan una dependencia lineal con la concentración de urea en el gráfico de chevron. En contraste, las cinéticas de renaturalización son complejas: se ajustan a dos exponenciales lo cual genera dos ramas en la zona de replegamiento del chevron y además presentan curvatura a concentraciones bajas de urea. Este comportamiento complejo resulta de la presencia de uno o más intermediarios y/o vías de plegamiento, lo cual abre el camino a la caracterización del mecanismo de plegamiento de LAO.

INTRODUCCION

Plegamiento de proteínas

La paradoja de Levinthal y los embudos de energía

El plegamiento de proteínas es un proceso complejo que implica una serie de cambios conformacionales en la cadena polipeptídica, así como una reorganización en las interacciones de la cadena con el disolvente.

En el año de 1961, Christian Boehmer Anfinsen mostró, a través de experimentos de desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa pancreática bovina, que la información necesaria para que una proteína adquiriera su conformación nativa se encuentra codificada en la secuencia de aminoácidos (Anfinsen, 1961). En 1969, Cyrus Levinthal mostró que la búsqueda de la estructura nativa a través de todo el universo conformacional es prácticamente imposible en un tiempo biológicamente relevante. El número de conformaciones que una proteína puede adoptar aumenta exponencialmente con el número de aminoácidos. Si suponemos que hay dos conformaciones posibles por aminoácido, una proteína de 100 residuos podría adquirir hasta 2^{100} conformaciones diferentes. Si el ir de una conformación a otra tardara un picosegundo, muestrear todo el universo conformacional tomaría un tiempo de 10^{18} segundos, lo que es igual a 10^{10} años. A esto se le conoce como la paradoja de Levinthal (Bryngelson, 1994). Los argumentos de Levinthal asumían que todas las conformaciones tienen la misma probabilidad de ser adquiridas y que el paisaje energético tiene forma de un campo plano de golf, con un solo hoyo correspondiente a la estructura nativa (fig. 1A). Como solución a la paradoja, Levinthal propuso la existencia de vías de plegamiento (fig. 1B). Esta forma de ver dicho proceso implicaba que el estado desnaturalizado estaba formado por un conjunto reducido de conformaciones específicas, las cuales llegaban hasta el estado nativo a través de una serie de pasos secuenciales (Dill, 1997). Los estados parcialmente desplegados jugaban un papel importante puesto que su presencia en el proceso reduciría considerablemente el tamaño del universo conformacional y aceleraría la velocidad del plegamiento. Por esta razón, se aceptaba de manera general que los intermediarios tenían que encontrarse dentro de la vía, entre el estado nativo y el desnaturalizado. Esta visión cambió cuando se encontró que ciertas proteínas

se plegaban muy rápidamente en ausencia de cualquier especie parcialmente plegada (Schmid, 1995). Además, un par de años después se mostró, a través de estudios cinéticos y de intercambio deuterio-hidrógeno, que algunos intermediarios podrían encontrarse fuera de la vía (Wildegger, 1997). La función que describe la energía del sistema proteína–disolvente es la energía libre de Gibbs. Cada conformación que una proteína puede adoptar tiene asociada una energía determinada, al conjunto de las energías correspondientes a todas las conformaciones posibles se conoce como paisaje energético. Actualmente se propone, con base en diversos estudio teóricos y experimentales, que el paisaje energético de las proteínas tiene forma de embudo, donde el estado desnaturalizado se compone de todo un conjunto de conformaciones de alta energía y entropía y el espacio conformacional se va reduciendo conforme la proteína se acerca al estado de menor energía (nativo) en la base del embudo (fig. 2).

El paisaje de energía de cualquier proteína está lleno de mínimos, los cuales corresponden a energías relacionadas con cambios conformacionales sutiles. La energía relacionada con dichos cambios se encuentra en el orden de $k_B T$, esto es de la magnitud de la energía térmica de los átomos. Pasar de un mínimo de este tipo a otro es bastante rápido. Sin embargo, los cambios conformacionales pueden dar lugar a mínimos mucho más profundos con barreras energéticas mayores cuya energía es del orden de varios $k_B T$, salir de un mínimo con estas características lleva mucho más tiempo (Bryngelson, 1995). Cuando un paisaje de energía no presenta mínimos profundos o barreras energéticas grandes el embudo es liso (fig. 2A y C). Los procesos de dos estados presentan este tipo de paisajes. De manera contraria, cuando un paisaje de energía presenta mínimos profundos o barreras energéticas grandes el embudo es rugoso (fig. 2B y D). Los procesos de tres o más estado presentan embudos de este tipo (Bartlett, 2009). A diferencia de lo que Levinthal proponía, una de las implicaciones del embudo de energía es que las proteínas pueden seguir distintas vías del estado desnaturalizado al nativo. Uno de los estudios que apoyan este modelo es el del grupo de Per Jemeth, donde se comparan los estados de transición (ET) de dos proteínas homólogas (PDZ2 y PDZ3). Estas proteínas tienen la misma topología y siguen un plegamiento de tres estados. En este trabajo muestran, a través del análisis de valores ϕ (valores utilizados para determinar el grado de estructuración del ET con respecto al estado nativo, obtenidos del cociente $\Delta\Delta G^{TS-D} / \Delta\Delta G^{N-D}$, donde $\Delta\Delta G^{TS-D}$ y $\Delta\Delta G^{N-D}$

son la diferencia de ΔG del ET y el estado nativo al estado desnaturalizado respectivamente, entre la proteína silvestre y una mutante) , que la estructura del segundo ET es más parecida entre ambas proteínas, en comparación a la del primero. Además de ello, muestran como el segundo ET presenta un número mayor de interacciones nativas. Con esto concluyen que en etapas tempranas del plegamiento las proteínas pueden seguir distintas vías, las cuales se reducen y están determinadas por la topología del estado nativo en etapas tardías (Calosci, 2008). Si esto es así, ¿Por qué se sigue hablando de que el plegamiento de ciertas proteínas presenta intermediarios dentro o fuera de la vía, o vías paralelas? Lo que realmente sucede es que, por ejemplo, para un plegamiento de tres estados donde el intermediario se encuentra dentro de la vía, la proteína va a llegar a un mínimo de energía sin importar el camino que tome en el embudo (fig. 3A). En este caso el intermediario no es una conformación específica, si no un conjunto de conformaciones que comparten ciertas características.

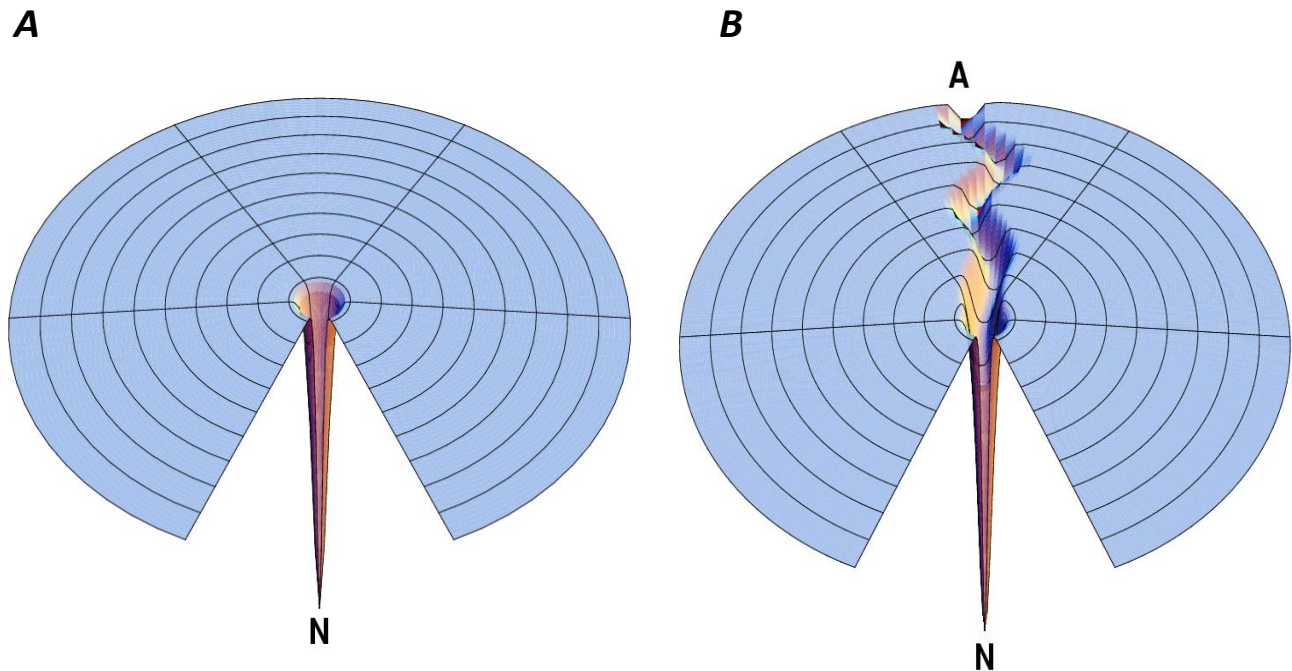


Figura 1. (A) Representación de campo de golf del paisaje energético de una proteína donde todas las conformaciones tienen la misma probabilidad de ser adquiridas y hay un sólo mínimo correspondiente a la estructura nativa N. (B) Paisaje energético propuesto por Levinthal en el cual hay una vía específica para llegar del estado desplegado A al nativo N. Imágenes (Dill, 1997)

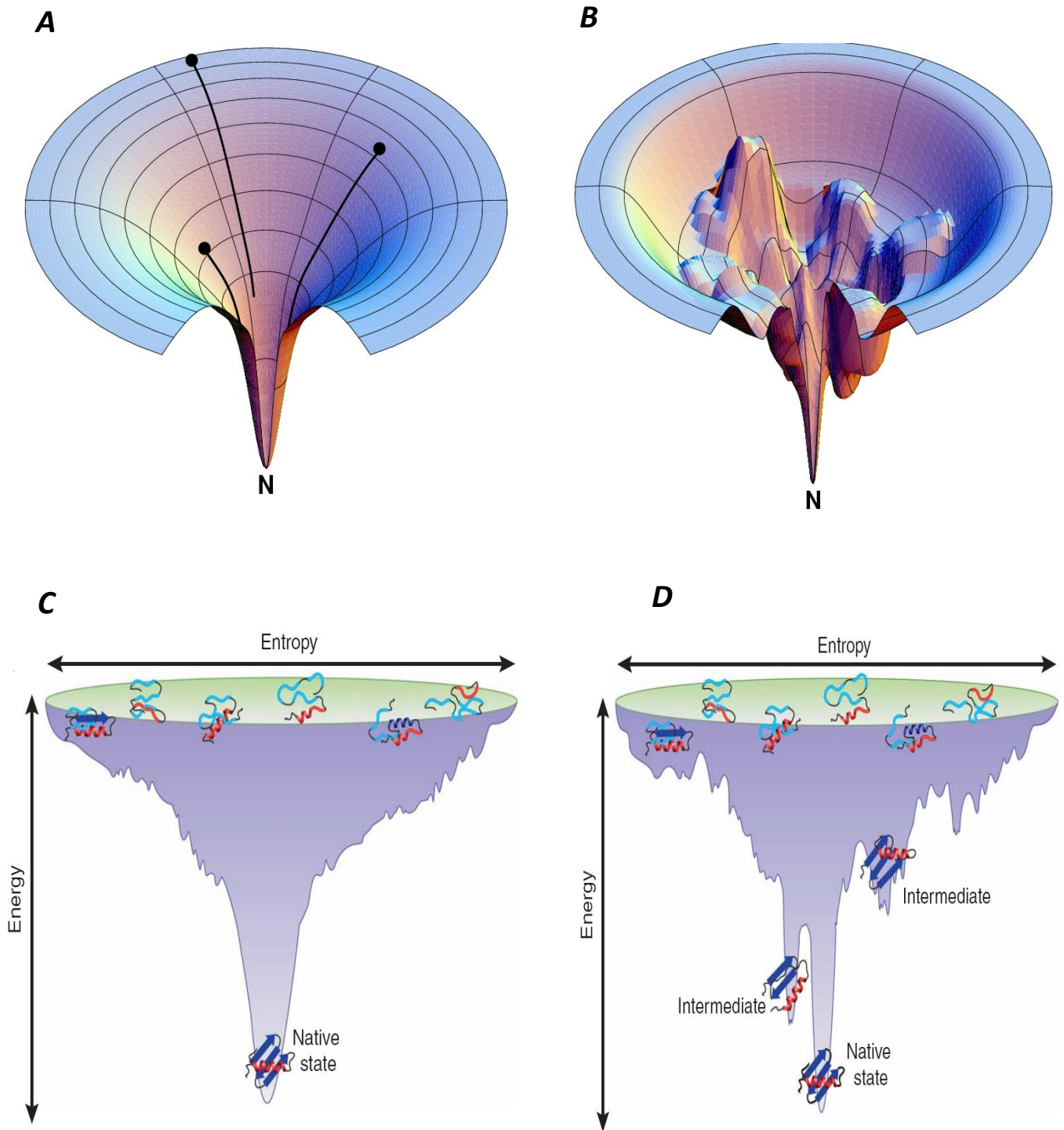


Figura 2. Representación tridimensional y bidimensional de un embudo de energía liso (A y C), sin mínimos ni grandes barreras energéticas, y uno rugoso (B y D), con mínimos correspondientes a estructuras parcialmente plegadas. Imágenes (Dill, 1997; Bartlett, 2009)

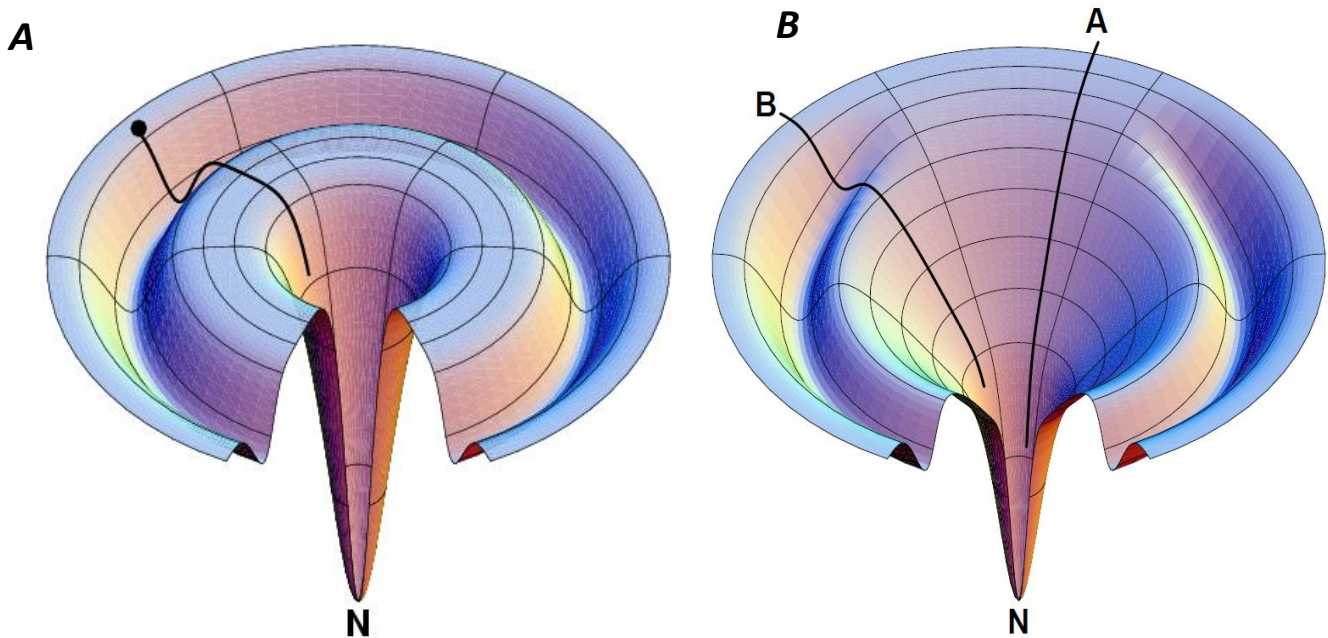


Figura 3. Representación tridimensional del embudo de energía para el plegamiento de una proteína con un intermediario dentro de la vía (A), y para el plegamiento de una proteína con vías paralelas (B), en el cual se observa que vía B que pasa por un intermediario y la A que va directamente al estado nativo. Imágenes (Dill, 1997)

Modelos de Plegamiento

A raíz de la paradoja de Levinthal surgieron diversos modelos que tratan de explicar el mecanismo general del plegamiento de proteínas. En 1973 Oleg Ptitsyn sugirió que el plegamiento es un proceso jerárquico, el cual inicia con la formación de la estructura secundaria. De acuerdo a este modelo, de nombre *framework*, la estructura adquirida en cada paso estabiliza a la ya existente. Tres años después Karplus y Weaver propusieron el modelo de difusión-colisión. Este modelo asume que las proteínas están formadas por pequeños microdominios cuya secuencia de aminoácidos contiene la información para su plegamiento en pequeñas porciones de estructura secundaria. Estos microdominios pueden colisionar por difusión y una colisión productiva lleva a la formación de intermediarios, los cuales llegan a la conformación nativa a través de colisiones productivas posteriores. Más adelante Ptitsyn

introdujo el modelo de colapso hidrofóbico, el cual consiste en el colapso rápido de la proteína a una estructura compacta donde subsecuentemente se forma la estructura secundaria (Fersht, 2008; Gianni, 2008). Anteriormente Levinthal ya había propuesto un modelo de nucleación-crecimiento el cual sugiere que el plegamiento inicia con la formación de un pequeño núcleo de estructura secundaria seguido de su rápido crecimiento. Este modelo no fue tomado en cuenta puesto que no implicaba la presencia de intermediarios y como se mencionó arriba, las especies semiplegadas jugaban un papel importante en la visión que se tenía sobre el plegamiento. Basado en el análisis de valores ϕ de la proteína CI2, los cuales muestran que la estructura secundaria y terciaria se forman simultáneamente, Fersht propuso el modelo de nucleación-condensación. Dicho modelo consiste en la formación de un núcleo de estructura secundaria estabilizado por interacciones terciarias, en el estado de transición, alrededor del cual la estructura se condensa (Itzhaki, 1995). En este caso, el estado de transición es una forma distorsionada de la estructura nativa, donde la zona más ordenada es el núcleo y la distorsión aumenta con la distancia. De acuerdo a la propuesta de Fersht, los modelos de colapso hidrofóbico y *framework* son casos extremos del de nucleación-condensación (Daggett, 2003).

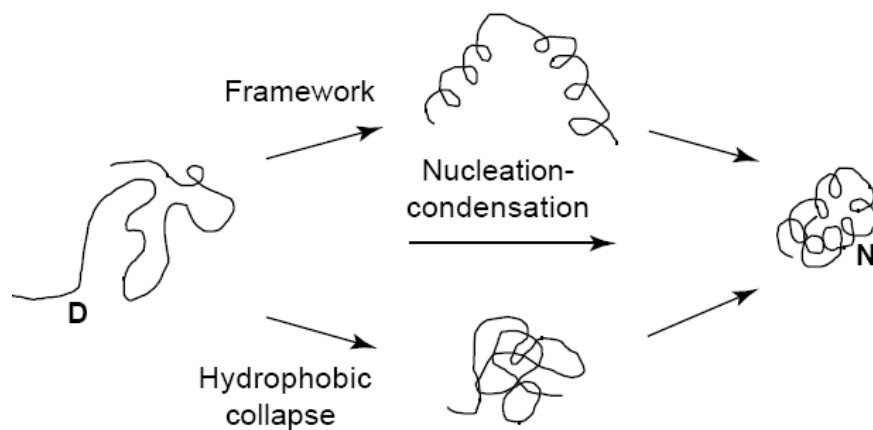


Figura 4. Representación esquemática de los modelos de colapso hidrofóbico, framework y nucleación-condensación, propuestos para el plegamiento de proteínas. (Daggett, 2003).

Estudios realizados por el grupo de Mikael Oliveberg arrojan indicios sobre las características estructurales que son importantes en la determinación del patrón de plegamiento y su plasticidad. Del análisis de los estados de transición de la proteína ribosomal S6, Oliveberg concluye que dicho patrón y su susceptibilidad a ser modificado dependen del número de unidades mínimas cooperativas que tiene la proteína, así como de su acoplamiento. Dichas unidades cooperativas son motivos estructurales que pueden plegarse de manera independiente, a las cuales los autores llaman “foldones” (Lindberg, 2007). De acuerdo a esto, proteínas con un solo foldon van a presentar un plegamiento de dos estados, el cual no será modificado por perturbaciones (i. e. mutaciones). Por otra parte, proteínas que tengan dos o más foldones acoplados (fig. 5) mostrarán un plegamiento de dos estados susceptible a cambios. El tercer caso implica proteínas con varios foldones no acoplados, las cuales seguirán un proceso de tres o más estados también susceptible a cambios (fig. 6).

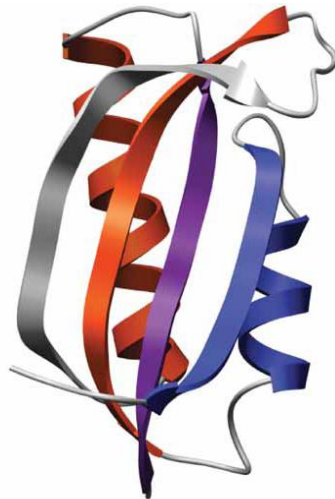


Figura5. Estructura de la proteína S6 formada por dos foldones acoplados. En rojo y en azul se muestran los núcleos de plegamiento de ambos foldones respectivamente. En morado se muestra la hebra que comparten y que los acopla. (Lindberg, 2007)

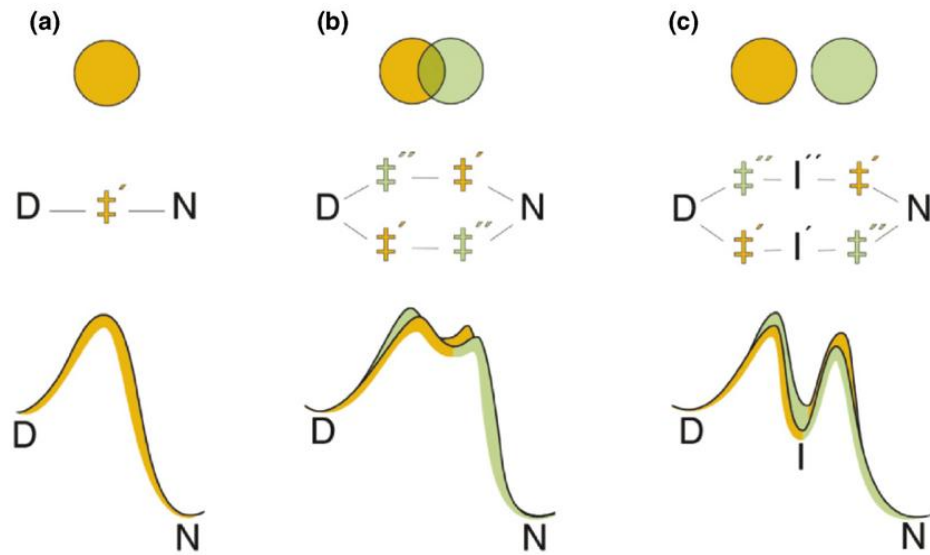


Figura 6. Representación esquemática del patrón de plegamiento de proteínas compuestas de un solo foldon (a), dos foldones acoplados (b) y dos foldones no acoplados (c). De acuerdo a este modelo, el plegamiento de proteínas de un solo foldon no presenta intermediarios cinéticos o al equilibrio; por otro lado, el plegamiento de proteínas con dos foldones acoplados tiene dos estados de transición (cada uno correspondiente a un foldon), pero no presenta intermediarios estables al equilibrio, mientras que el de proteínas con dos foldones desacoplados presenta dos estados de transición y un intermediario al equilibrio. (Lindberg, 2007)

Velocidad del proceso de plegamiento

La mayor parte de las proteínas pequeñas de un solo dominio presentan un plegamiento de dos estados (Jackson, 1998). Sin embargo, existen diferencias de hasta seis órdenes de magnitud entre las velocidades del proceso para este tipo de proteínas. Se han propuesto varios parámetros que tratan de explicar dichas discrepancias. La hipótesis de la brecha estadística señala que un criterio necesario y suficiente para que una proteína se pliegue es que la energía del estado nativo sea un mínimo bien definido con respecto a los demás estados compactos (Dinner, 1999). Z es una medida estadística relacionada con la diferencia de energía entre estado nativo y el promedio de los otros estados compactos. Se ha reportado que Z

correlaciona muy bien con la velocidad de plegamiento, sin embargo, no es un parámetro que se pueda medir experimentalmente (Gutin, 1995). También se ha sugerido, en base al modelo de nucleación-condensación, que la estabilidad del núcleo determina la velocidad de plegamiento. Sin embargo, aunque se ha encontrado cierta correlación, no es suficiente para explicar los seis órdenes de magnitud. El parámetro que mejor describe la velocidad de plegamiento es el orden de contacto, el cual se relaciona con el número de interacciones entre residuos lejanos en la secuencia de aminoácidos (Plaxco, 1998). De este modo, la velocidad de plegamiento disminuye al aumentar el número de interacciones entre residuos lejanos. El modelo de búsqueda de topómeros sugiere que las velocidades de plegamiento dependen del número de topologías “gruesas” (topómeros) que una proteína debe muestrear para llegar al estado nativo. De acuerdo a este modelo el primer paso del plegamiento es dinámico conforme el estado desnaturalizado fluctúa entre un topómero y otro. Cuando el topómero nativo es encontrado, se forman interacciones que lo estabilizan, atrapando a la proteína en la conformación nativa. La probabilidad de adquirir un topómero está dominada por pares de residuos que se encuentran distantes en la secuencia y la velocidad de plegamiento dependerá de la probabilidad de adquirir el topómero nativo (Gillespie, 2004).

Metodologías empleadas en el plegamiento de proteínas

Fluorescencia

La emisión de luz de cualquier sustancia se conoce como luminiscencia y surge cuando un electrón regresa del estado excitado (S_1) a su estado fundamental (S_0). Existen dos tipos de luminiscencia: fluorescencia y fosforescencia. La fluorescencia ocurre cuando el electrón excitado presenta un spin opuesto al del estado fundamental con el que se encuentra apareado. En este caso su regreso al estado fundamental está permitido y sucede rápidamente con la liberación de un fotón. Por otra parte la fosforescencia se da cuando el electrón excitado y el electrón en el estado fundamental tienen el mismo spin. De este modo el regreso está prohibido y por lo tanto ocurre más lentamente. La fluorescencia presenta dos características principales, la primera es que la energía de emisión es menor a la de absorción (movimiento de Stokes), y la segunda es que el espectro de emisión es independiente a la longitud de onda de la

excitación. La polaridad del disolvente y el ambiente local modifican las características del espectro de emisión y son causa de movimiento de Stokes. Los tres aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas (triptofano W, tirosina Y, fenilalanina F) presentan fluorescencia en el ultravioleta. La emisión de una proteína está dominada por los triptófanos, los cuales absorben a la longitud de onda mayor (295 nm) y tienen el coeficiente de extinción más grande. El máximo de emisión de la fenilalanina es a 282 nm. La tirosina en agua emite a 303 nm y es insensible a la polaridad del solvente mientras que el triptófano emite a 350 nm y es altamente sensible a la polaridad del solvente y al ambiente local. Generalmente las proteínas son excitadas a 280 nm o longitudes mayores. A 280 nm las fenilalaninas prácticamente no absorben de modo que a esa longitud la absorción se debe principalmente a las tirosinas y triptófanos. A longitudes mayores a 295 nm las tirosinas no absorben y por lo tanto solo se excitan los triptófanos (Lakowicz 2006). La alta sensibilidad de la emisión del triptófano al solvente es de gran utilidad en el estudio del plegamiento de proteínas. Por ejemplo, cuando este aminoácido se encuentra en el interior de la proteína, totalmente protegido del solvente, presenta una emisión máxima a 330 nm la cual cambia a 350 nm (movimiento de Stokes) cuando el residuo se expone (Creighton, 1997).

Dicroísmo Circular

Una de las técnicas más importantes para el estudio de proteínas es la de dicroísmo circular. El plano de luz polarizada puede visualizarse como la suma de dos haces de luz circular de la misma magnitud pero girando en direcciones opuestas. El fenómeno de dicroísmo circular (DC) se refiere a la absorción desigual por una muestra de los componentes circulares. Si la absorción es igual el haz plano de luz polarizada se restituirá después de pasar por la muestra, si no es así el haz resultante presentara elipticidad. Generalmente los cromóforos quirales presentan dicroísmo circular. Los espectropolarímetros miden la absorción diferencial de la luz circular que gira hacia la derecha y la que gira hacia la izquierda ($\Delta A = A_L - A_R$), sin embargo, esa diferencia la expresan como elipticidad (Θ) en grados. Θ es igual a la tangente del eje menor sobre el eje mayor de la elipse resultante (fig. 6). $\Theta = 32.98 \Delta A$

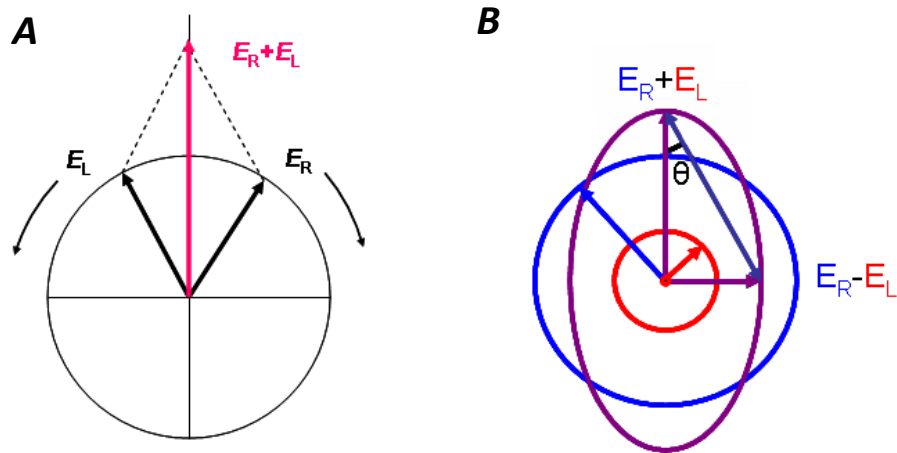


Figura 6. (A) Un plano de luz polarizada (flecha roja) puede verse como la suma de los haces de luz circular de la misma magnitud girando en direcciones opuestas (flechas negras). (B) LA absorción diferencial de ambos componentes circulares (rojo y azul) da como resultante una elipse (morado) donde θ es la tangente del eje menor sobre el mayor.

En proteínas los cromóforos de importancia son el enlace peptídico que absorbe debajo de 240 nm, los aminoácidos aromáticos que absorben entre 260 nm y 320 nm, y los puentes disulfuro con absorción a 260 nm. Si diversos cromóforos del mismo tipo se encuentran en cercanía, se comportaran como una sola unidad con características espectrales específicas. Los elementos de estructura secundaria (hélices- α , hebras- β y random coil) de la proteína tienen espectros característicos debajo de los 240 nm (fig. 7A). Existen algoritmos que permiten estimar el porcentaje de cada elemento de estructura secundaria en una proteína a partir del espectro de DC. También es posible seguir cambios en estructura terciaria monitoreando la absorbancia de los residuos aromáticos. Los triptófanos presentan varias bandas entre 290 nm y 305 nm, las tirosinas entre 275 nm y 282 nm, y las fenilalaninas entre 255 nm y 270 nm (fig. 7B). (Kelly, 2005).

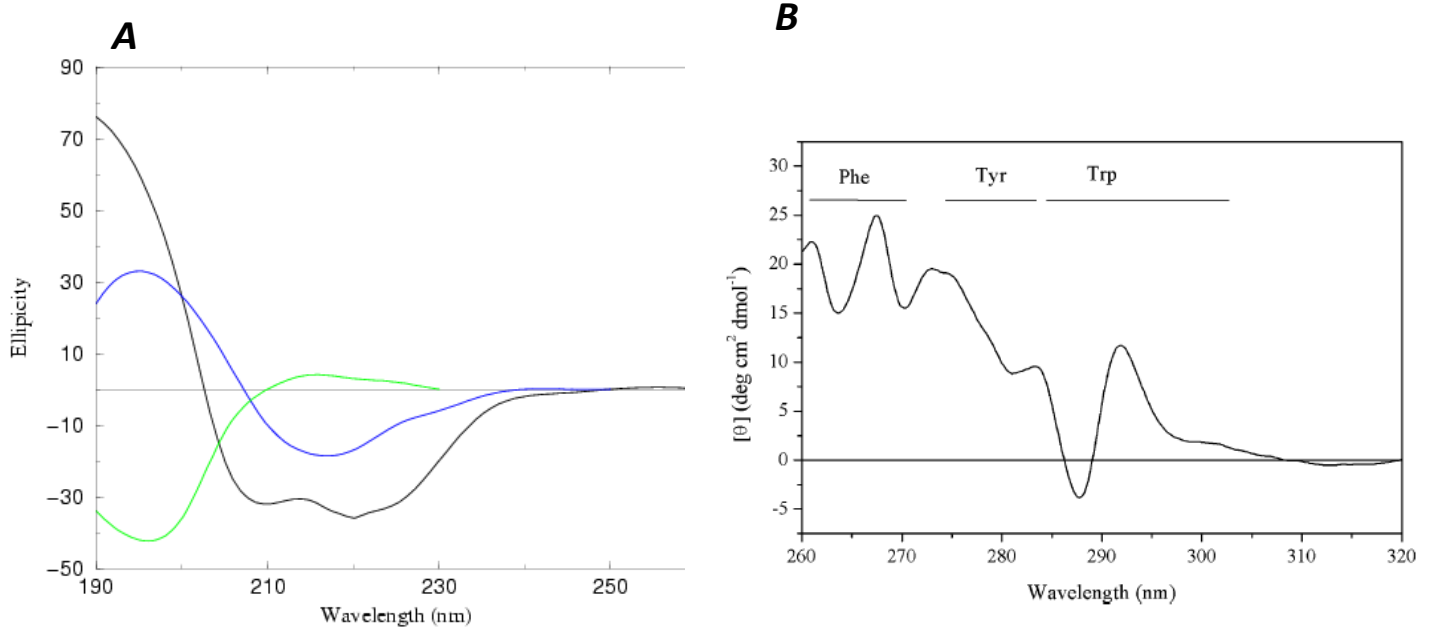


Figura 6. (A) Espectros de DC en el UV lejano característicos de hélices- α (—), hebras- β (—) y random coil (—). (B) Espectro de DC de la dihidroquinasa tipo II de *Streptomyces coelicolor* en el UV cercano a las longitudes de onda donde absorben los aminoácidos aromáticos. (Kelly, 2005)

Desnaturalización por urea

La urea presenta una solubilidad considerable en agua (10.5M a 25°C) debido a que puede formar puentes de hidrogeno y a que la distribución espacial de las moléculas de agua alrededor de una molécula de agua es muy similar a la distribución de las moléculas de urea alrededor de una molécula de agua y viceversa. Se ha estimado que una molécula de urea puede formar hasta 5.7 puentes de hidrogeno. El ΔG de transferencia de los residuos no polares presentes en proteínas, del agua a la urea es favorable. Se ha propuesto que esto se debe a que las moléculas de urea sustituyen a las de agua en la capa de hidratación alrededor de los grupos no polares y modifican los puentes de hidrogeno e interacciones de Van der Waals, de tal manera que aumenta la solubilidad de dichos residuos. Algunos estudios han mostrado que la urea se une mejor a la proteína que el agua, de modo que la concentración de urea es más grande cerca de la proteína que la del disolvente. De este modo, al aumentar la concentración

de urea se favorece el estado desnaturalizado por el hecho de que tiene mayor superficie para interactuar con ella.

De las curvas de desnaturalización por urea se puede calcular la K_{eq} (ec. 12 en materiales y métodos). El ΔG° , esto es, la diferencia de energía libre entre el estado nativo y el desnaturalizado en condiciones estándar (25°C, una atmósfera de presión), se puede calcular a partir de la K_{eq} (ec. 1).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{ec. 1})$$

El ΔG depende linealmente de la concentración de urea en la zona de la transición (ec. 2). Si extrapolamos dicha dependencia hasta un valor de 0 M de urea, suponiendo que la linealidad se conserva, podemos obtener el ΔG en ausencia de desnaturalizante (ΔG_{H_2O}).

$$\Delta G^\circ = \Delta G_{H_2O}^\circ + m [\text{urea}] \quad (\text{ec. 2})$$

donde m es una medida de la dependencia del ΔG con respecto a la concentración de urea y está relacionada con el área accesible al solvente de la proteína (ec. 10). En 1988, Santoro y Bolen publicaron una función (ec. 15 en materiales y métodos) para obtener dichos parámetros directamente del ajuste de la curva de desnaturalización (Santoro, 1998).

Cinética del plegamiento

La mayor parte de los estudios de plegamiento se han realizado en proteínas monoméricas pequeñas cuyas cinéticas de plegamiento tienen la ventaja de que cualquier reacción observada es de primer orden. De este modo, los cambios en la señal por la cual se sigue el proceso son descritos por la suma de un número dado de exponenciales (ec. 3).

$$Pt = \sum_{n=1}^n A e^{-\lambda t} \quad (\text{ec. 3})$$

donde Pt es la señal a tiempo t y A es la amplitud de la curva. Las constantes aparentes λ son función de las constantes microscópicas k . La amplitud A depende de las concentraciones iniciales de las especies cinéticas. Cualquier mecanismo cinético con un número n de especies conectadas por reacciones de primer orden presenta $n-1$ constantes aparentes.

Para un plegamiento de dos estados (ec. 4), la constante aparente observada es igual a la suma de las constantes microscópicas (ec. 5).



$$\lambda = kf + ku \quad (\text{ec. 5})$$

En estado estacionario la relación entre las constantes microscópicas y la constante de equilibrio es la siguiente:

$$\frac{d[U]}{dt} = kf[D] - ku[N] = 0 \quad (\text{ec. 6})$$

$$\frac{kf}{ku} = \frac{[N]}{[D]} = Keq$$

De este modo a partir de las constantes microscópicas se puede obtener el valor de ΔG° :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln Keq = -RT \ln \left(\frac{[N]}{[D]} \right) = -RT \ln \left(\frac{kf}{ku} \right) \quad (\text{ec.7})$$

El valor de ΔG° es igual a la energía libre de activación del estado nativo al estado de transición (ΔG^{\ddagger}_f) menos la energía libre de activación desde el estado desplegado (ΔG^{\ddagger}_u) (ec. 8).

$$\Delta G^\circ = \Delta G^{\ddagger}_f - \Delta G^{\ddagger}_u \quad (\text{ec.8})$$

Al igual que en los experimentos de desnaturalización al equilibrio, en los experimentos cinéticos existe una relación lineal entre la energía de activación con la concentración de desnaturalizante (ec. 9).

$$\Delta G^{\ddagger}_f = \Delta G^{\ddagger}_{f(H2O)} + m_f [urea] \quad (\text{ec. 9})$$

$$\Delta G^{\ddagger}_u = \Delta G^{\ddagger}_{u(H2O)} + m_u [urea]$$

Tomando en cuenta las ecuaciones 2, 8 y 9 obtenemos las siguientes relaciones:

$$\Delta G^{\circ}_{H2O} = \Delta G^{\circ}_{f(H2O)} - \Delta G^{\circ}_{u(H2O)} \quad (\text{ec.10})$$

$$m = m_f \cdot m_u$$

$$m = \frac{dG}{d[\text{desnaturalizante}]}$$

La grafica del logaritmo natural del las constantes aparentes de las cinéticas de desnaturalización y renaturalización contra la concentración de desnaturalizante, tiene forma de V y se le conoce como gráfico de chevron (fig. 7). De este gráfico se pueden obtener los valores de las constantes microscópicas en ausencia de desnaturalizante así como los valores de m_f y m_u . Estos últimos miden la dependencia de la energía de activación de los estados nativo y desnaturalizado al ET con la concentración de desnaturalizante, su relación con m se muestra en la ecuación 10. La comparación entre los parámetros obtenidos de los experimentos cinéticos con los del equilibrio se realiza para corroborar que el proceso es de dos estados. Si existen diferencias entre ellos el proceso es de tres o más estados. Cinéticas de más de una exponencial y curvatura en las ramas del chevron son indicios de la presencia de intermediarios. (Kiefhaber 2005).

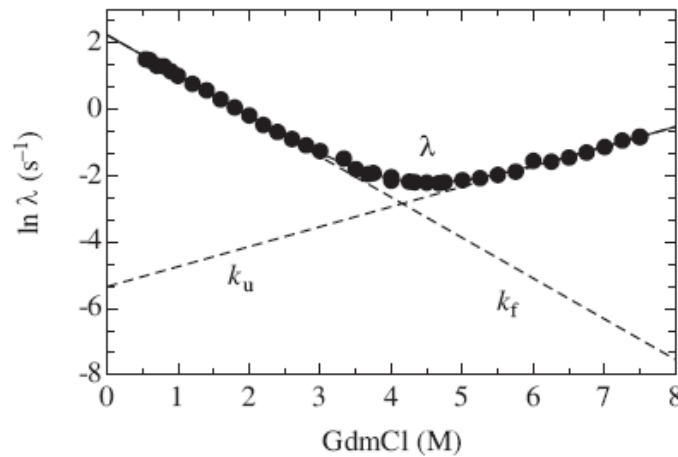


Figura 7. Gráfico de chevron para un proceso de dos estados. Del ajuste de las ramas de desnaturalización y renaturalización a una recta y su extrapolación a 0 M de desnaturalizante se obtienen los valores de las constantes microscópicas k_f y k_u . Las pendientes de las rectas corresponden a m_f y m_u . (Kiefhaber, 2005)

Calorimetría Diferencial de Barrido

Los experimentos de desnaturalización y renaturalización seguidos por técnicas espectroscópicas nos dan información indirecta sobre los cambios energéticos en el plegamiento y desplegamiento de las proteínas. Para un proceso de dos estados las curvas de desnaturalización, ya sea por temperatura o urea, son sigmoideas con una sola transición, donde la señal observada es la suma de la señal correspondiente a la población de los estados nativo y desnaturalizado (fig. 8). De esta manera, los parámetros termodinámicos calculados de curvas con estas características se basan en un modelo de dos estados.

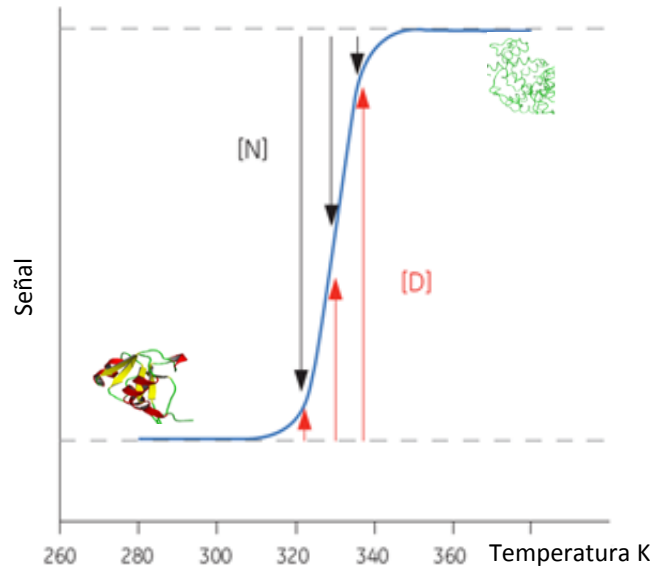


Figura 8. Curva de desnaturalización para un proceso de dos estados. Las flechas negras y rojas indican la población de proteína nativa y desnaturalizada que contribuye a la señal en cada punto de la curva. La mayor parte las proteínas que presentan este comportamiento son proteínas pequeñas (aprox. 100 aminoácidos) como es el caso del inhibidor de la quimiotripsina 2 (CI2) y la proteína de choque por frío (CspB).

La única técnica que mide directamente la energética del proceso sin importar el patrón de plegamiento es la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Freire, 1995). Por esta razón es la técnica de elección para caracterizar cambios conformacionales inducidos por temperatura en proteínas y otras moléculas biológicas. De los experimentos de DSC se puede obtener tres tipos principales de información: 1) capacidad calorífica absoluta de la molécula, 2) parámetros termodinámicos (ΔH , ΔS , T_m y ΔC_p), 3) población de los estados intermediarios y sus parámetros termodinámicos (Freire, 1995).

Los calorímetros de barrido están constituidos por dos celdas, una para la muestra y otra de referencia donde se coloca amortiguador sin proteína. El aparato calienta ambas celdas a una velocidad constante, de manera que la diferencia de temperatura entre las dos sea igual a cero. Para ello, el calorímetro aplica un voltaje determinado a cada celda y mide la diferencia. La división de la potencia entre la velocidad de barrido da como resultado el valor de C_p reportado. Un buen experimento de calorimetría consta de tres corridas, la primera con amortiguador en ambas celdas para obtener la línea base instrumental, y las dos restantes con la misma muestra de proteína. La tercera corrida se realiza para determinar el grado de reversibilidad. Si una proteína no es reversible no se pueden realizar análisis termodinámicos debido a que la agregación es un proceso que también tiene implicaciones energéticas. Las trazas calorimétricas se normalizan a partir de la concentración de proteína y restando las líneas base instrumental y química, obteniendo así el C_p en exceso ($\langle C_p^{exc} \rangle$). El área bajo la curva corresponde al valor de ΔH del proceso y la temperatura del punto máximo en la curva la T_m . El ΔS se obtiene del cociente $\Delta H/T_m$. El valor de ΔC_p corresponde a la diferencia de los valores de C_p en las líneas pre y pos transición.

Transporte bacteriano: Proteínas periplasmicas de unión

Transportadores ABC

Los transportadores ABC juegan un papel muy importante en el transporte de diversas moléculas en células eucariontes, procariontes y archeas. Aproximadamente el 5% de genoma de *Escherichia coli* codifica para transportadores ABC; en humanos, mutaciones en estas proteínas son la causa de diversas enfermedades. La mayor parte de las proteínas ABC son

transportadores activos que requieren energía de ATP para translocar sustancias a través de la membrana. Existen tres categorías principales: 1) los importadores, 2) los exportadores, 3) y aquellos que están involucrados en otras funciones celulares. La mayor parte de los sistemas ABC en eucariontes exportan sustancias del citoplasma al exterior de la célula o al interior de organelos. De manera contraria, en bacterias generalmente son importadores. En este caso requieren de otras proteínas conocidas como proteínas periplásmicas de unión (PBPs) de las cuales hablaremos posteriormente. Las proteínas ABC pertenecientes al tercer grupo han evolucionado para acoplar los cambios conformacionales generados por la unión e hidrólisis de ATP a otros procesos como reparación de DNA o regulación de canales de potasio (Higgins, 2004). Todos los transportadores ABC comparten la misma estructura la cual consiste de cuatro dominios, dos transmembranales y dos de unión a nucleótidos. Los cuatro dominios pueden estar organizados de manera distinta, en eucariontes generalmente se encuentran en una misma cadena polipeptídica, mientras que en procariontes se encuentran en cadenas distintas. Las proteínas transmembranales forman el canal por el cual el sustrato es translocado. Generalmente están formadas de cinco o seis hélices, aunque el número puede variar (Kos, 2009).

Proteínas Periplásmicas de Unión

Los sistemas de transporte periplásmico bacteriano (permeasas) transportan diversas moléculas tales como aminoácidos, péptidos, azúcares, vitaminas y iones inorgánicos, al citoplasma de bacterias y arqueas (Fukami-Kobayashi, 1999). Están constituidas por una proteína de unión a ligando (PBP) y un complejo de membrana, formado a su vez por dos proteínas integrales y dos proteínas de unión a nucleótido. Las PBPs llevan a cabo dos funciones principales: la unión del sustrato y la asociación al complejo de membrana. Dichas funciones se ubican en diferentes zonas de la proteína. Varios estudios han permitido dilucidar diversos detalles del mecanismo de translocación de las permeasas. En ausencia de PBP, el complejo de membrana se encuentra abierto del lado del citoplasma y cerrado del lado del periplasma. Una vez que la PBP se unió a su ligando, interactúa con el complejo, el cual sufre un cambio conformacional que cierra el extremo citoplasmático. Posteriormente, la unión de ATP a las

proteínas de unión a nucleótido, promueve la apertura del extremo periplasmático del complejo así como de la PBP, de esta manera, el sustrato puede unirse al sitio de unión del transportador. La hidrólisis del ATP propicia la liberación de la PBP y la translocación del sustrato hacia el citoplasma (Oldham, 2011).

Todas las PBPs comparten ciertas características: 1) estructura bilobular, 2) el sitio de unión al ligando ubicado entre los dos dominios, 3) cada dominio se compone de una hoja β rodeada por hélices α (Ames, 1992). Existen dos clasificaciones principales de las PBPs de acuerdo a su estructura, la primera se basa en el número y posición de las hebras β que conforman la región central de cada lóbulo (Dwyer, 2004), y la segunda se basa en el número de segmentos polipeptídicos que unen ambos dominios (Shi, 2009). La primera clasificación agrupa a las PBPs en dos conjuntos: proteínas de tipo I y proteínas de tipo II. Las proteínas de tipo I presentan seis hebras β en orden 213456 dentro de la hoja y las de tipo II presentan solo cinco, en orden 21354 (fig. 9), donde los números representan la posición de las hebras β en la secuencia de aminoácidos, desde el extremo amino al carboxilo (1-6). La segunda clasificación consta de tres grupos: las proteínas del grupo I presentan tres segmentos polipeptídicos uniendo ambos lóbulos, las del grupo II presentan dos y las del grupo III solo uno (fig. 10). El segmento transglobular de las proteínas de tipo III, grupo descubierto recientemente (Shi, 2009), adopta la estructura de una hélice.

La PBP sin ligando se encuentra en un estado conformacional abierto mientras que unida a su ligando se encuentra en un estado cerrado, donde los lóbulos se acercan y “encierran al ligando” (fig. 11). El movimiento de apertura y cierre ha sido descrito a partir de un modelo “Pac-Man” y parece ser común para todas las PBPs. En un principio se propuso que los segmentos que conectan a los dos dominios son flexibles y son los responsables del cambio conformacional inducido por el ligando. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la cadena principal de los segmentos presenta una serie de conformaciones bien definidas. Además, el ligando no forma ninguna interacción con la región de la bisagra (Ames, 1993).

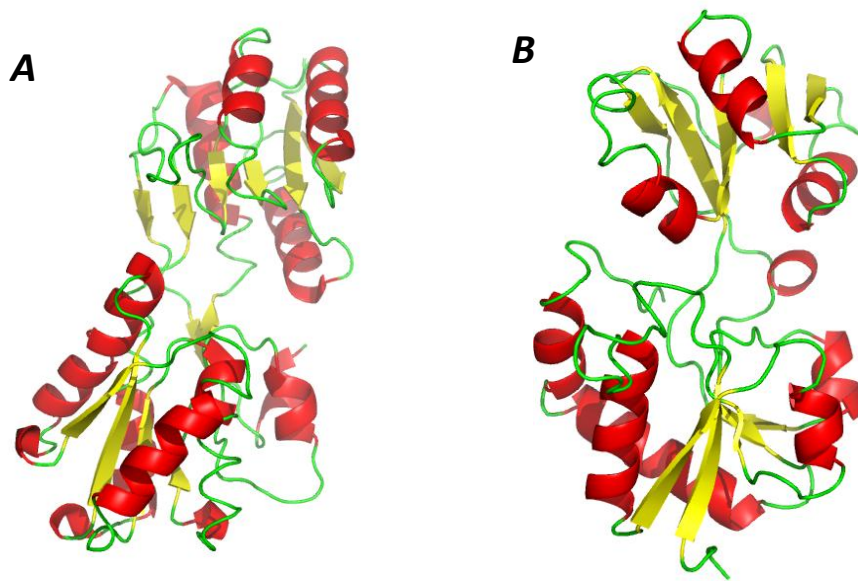


Figura 9. PBPs de tipo I (A) y tipo II (B) de acuerdo a la clasificación basada en el número de hebras β (amarillo) presentes en cada lóbulo (Fukami-Kobayashi, 1999). PDB: 2WRZ (proteína de unión a arabinosa) y 1MPC (proteína de unión a maltosa) respectivamente.

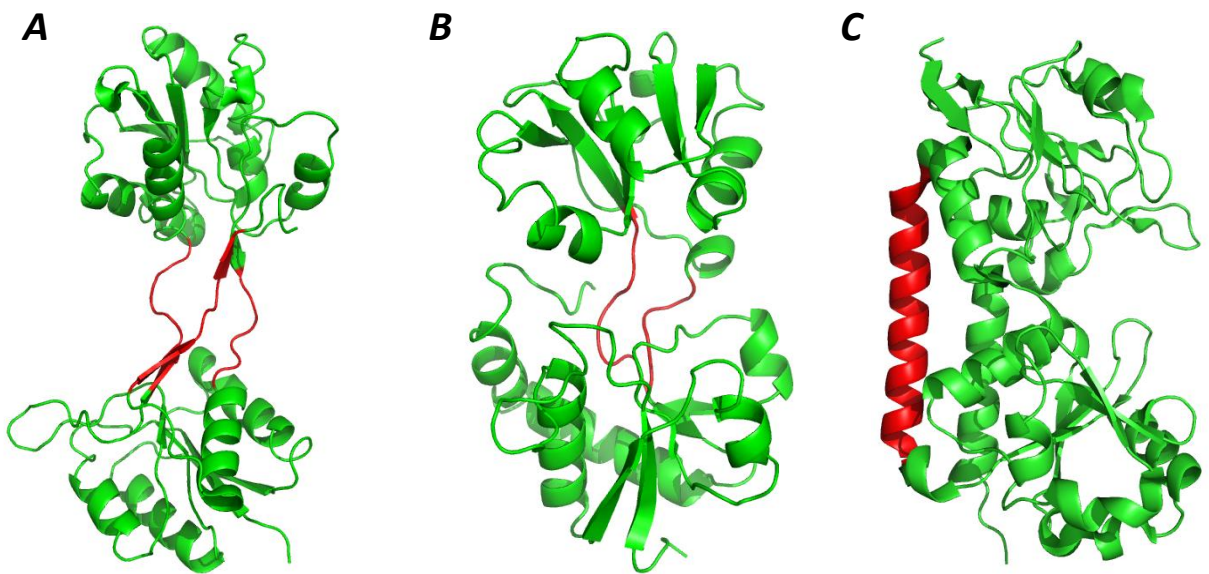


Figura 10. PBPs de tipo I (A), tipo II (B) y tipo III (C) de acuerdo a la clasificación basada en el número de segmentos polipeptídicos (rojo) que unen a los lóbulos (Shi, 2009). PDB: 2WRZ (proteína de unión a arabinosa), 2LAO (LAO) y 3BE5 (proteína de unión a hierro) respectivamente.

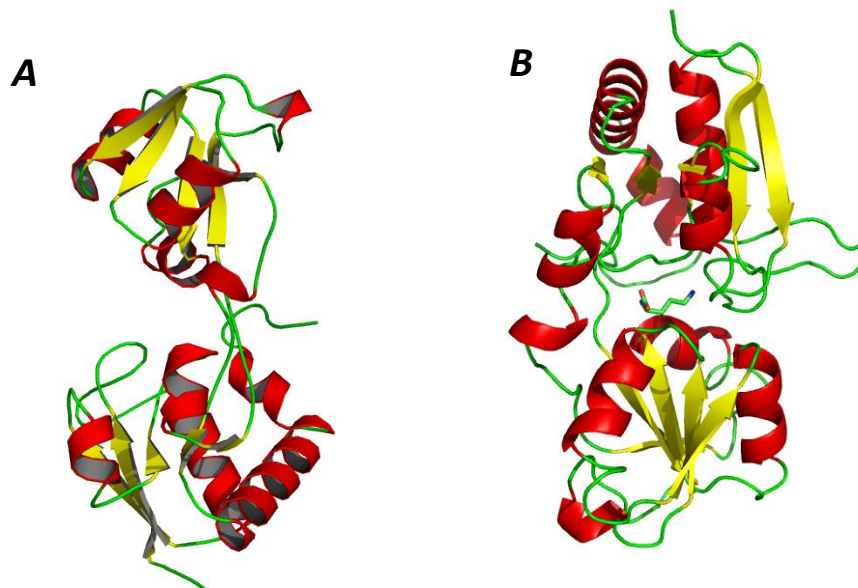


Figura 11. Estructura de una PBP en estado abierto (A), sin ligando, y en estado cerrado (B), con ligando. PDB: 2LAO (LAO sin ligando), 2LST (LAO uniendo lisina)

A pesar de la baja identidad de secuencia y las diferencias de tamaño que existe entre las PBPs, las características estructurales que comparten indican que todas ellas se originaron de un ancestro común. En *E. coli* las PBPs se encuentran codificadas en el mismo operón que sus respectivas proteínas del complejo membranal. El orden de los genes de cada proteína es el mismo en todos los operones, lo que sugiere que todos ellos surgieron de la duplicación de un operón ancestral. La existencia de dos grupos principales de PBPs, con base en el número de hebras β y su disposición en cada lóbulo, sugiere que dichas diferencias debieron haberse generado a partir de un ancestro común. Se propone que estos cambios estructurales surgieron de la pérdida e intercambio entre ambos lóbulos de hebras β , proceso llamado dislocación de dominios (Fukami-Kobayashi, 1999). Los árboles filogenéticos generados a partir del alineamiento de ciertas regiones de secuencia de 15 PBPs, así como de sus similitudes en topología, agrupan en conjuntos distintos a las proteínas de tipo I y a las de tipo II (fig. 12). Estos resultados indican que efectivamente ambos grupos de proteínas comparten un ancestro común y que la dislocación de dominios se llevó a cabo una sola vez en el proceso evolutivo. No se sabe a ciencia cierta qué tipo dio lugar al otro, sin embargo, se sugiere que las PBPs de tipo I

dieron lugar a las de tipo dos y que la topología del ancestro común podría ser la misma de la proteína de unión a galactosa (MglB) (fig. 13). Esto se debe a que MglB presenta características topológicas que ninguna otra PBP tiene. Además, se ha propuesto que las PBPs se generaron a partir de la duplicación y fusión del gen de la proteína CheY (Fukami-Kobayashi, 1999).

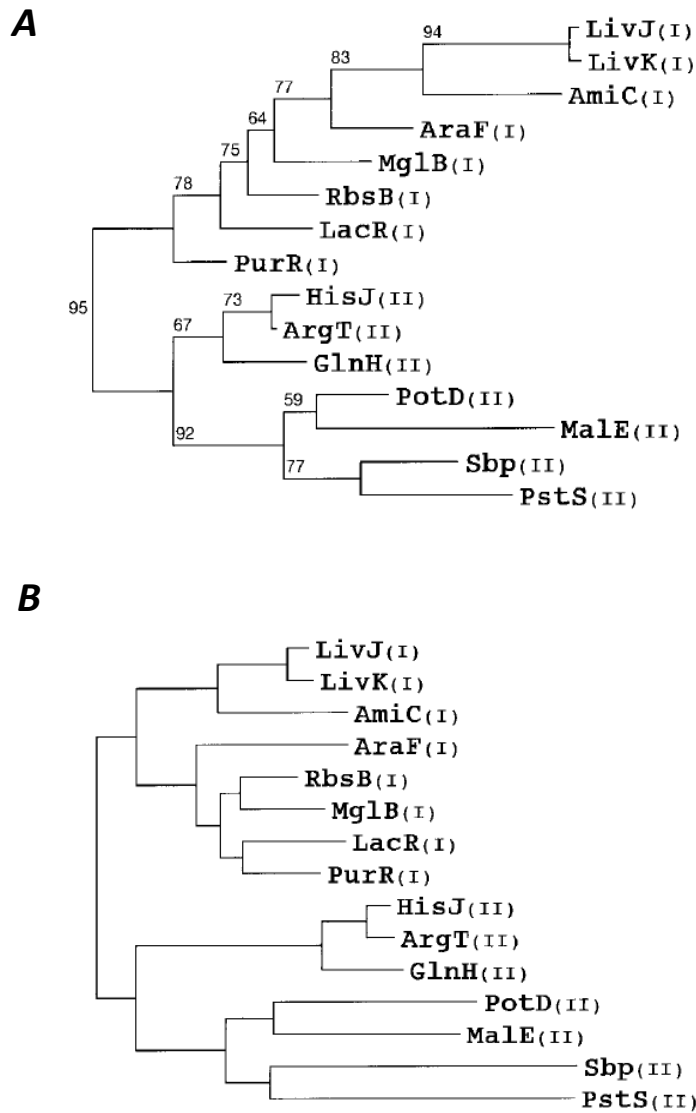
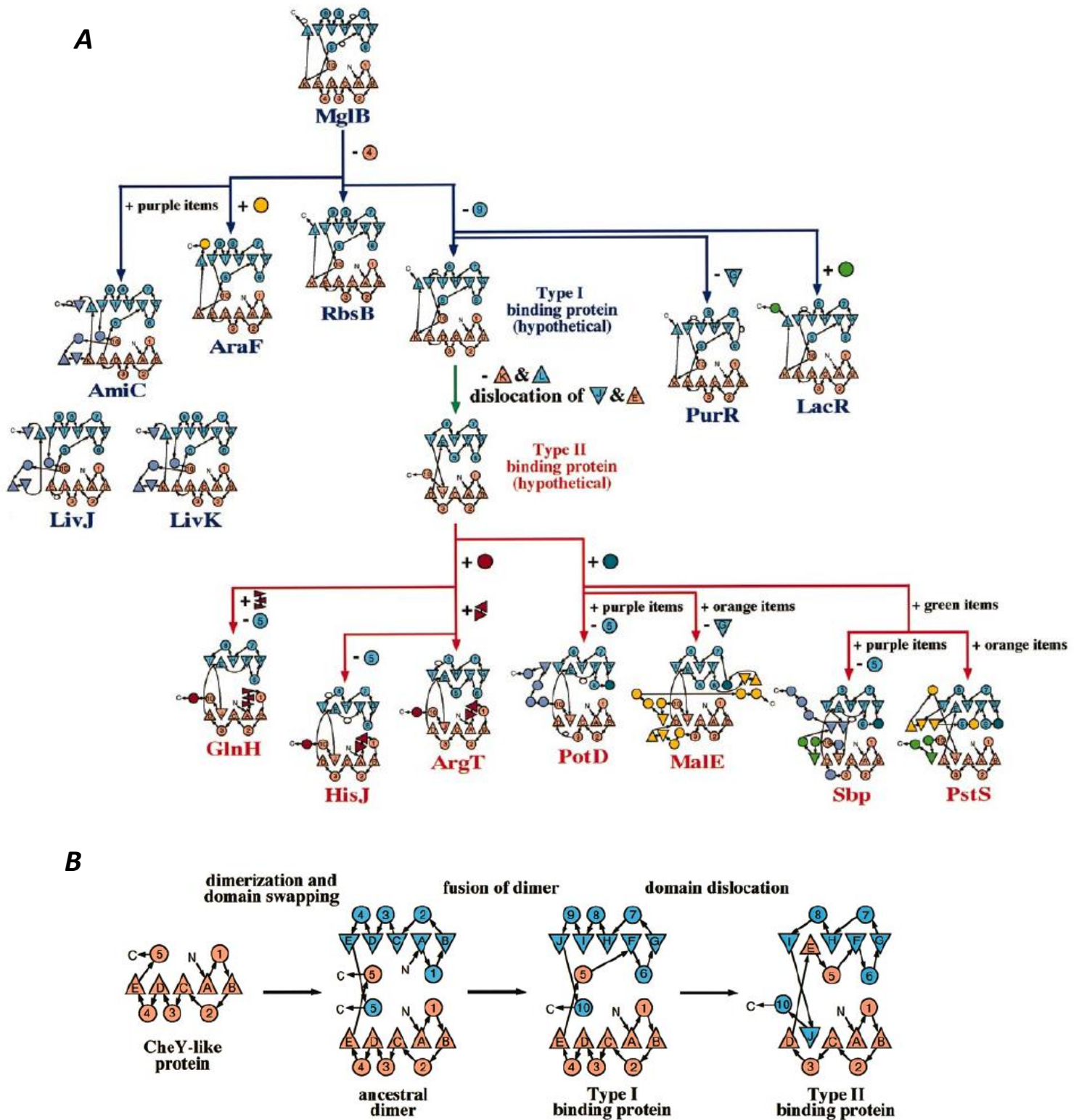


Figura 12. Árboles filogenéticos generados a partir del alineamiento de las regiones de secuencia de 15 PBPs donde hay correspondencia de estructura secundaria entre todas ellas (A), así como sus similitudes topológicas (B). (Fukami-Kobayashi, 1999)



Proteína de unión a Lisina-Arginina-Ornitina (LAO)

Tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium*, el transporte de los aminoácidos básicos L-histidina, L-lisina, L-arginina y L-ornitina, del periplasma al citoplasma, esta mediado principalmente por la permeasa de histidina, la cual presenta dos PBPs: la proteína de unión a lisina-arginina-ornitina (LAO) y la proteína de unión a histidina (HisJ).

LAO, de 238 aminoácidos, tiene una estructura bilobular, característica de todas las PBPs. El primer lóbulo (A) es discontinuo y está formado por los residuos 1 al 88 y 195 al 238, el segundo (B) es continuo y lo forman los residuos 93 al 185 (fig. 14). Cada dominio está constituido a su vez por 5 hebras β , cuatro paralelas y una antiparalela, rodeadas por 4 hélices α , y están conectados por dos segmentos polipeptídicos (residuos 89 al 92 y 186 al 194). LAO tiene un puente disulfuro entre los residuos 38 y 45, y dos triptófanos en las posiciones 47 y 130 (Ames, 1993). En *S. typhimurium* LAO es 70% idéntica y 83% similar a HisJ. Ambas PBPs unen L-lisina, L-arginina, L-ornitina y L-histidina. La afinidad de LAO por sus ligandos es muy alta (15nM, 14nM, 30nM y 500 nM para lisina, arginina, ornitina e histidina respectivamente) (Ames, 1994). La estructura cristalográfica con lisina muestra que la proteína une a su ligando a través de varios puentes de hidrogeno. Además de ello, los anillos aromáticos de la Tyr 14 y la Phe 52 mantienen a la cadena lateral de la lisina en una estructura tipo "sándwich" y la Leu 117 establece una interacción hidrofóbica con el grupo metileno. Estas interacciones mantienen a la lisina completamente aislada del disolvente. A diferencia de otras PBPs, que unen a los grupos amino y carboxilo del aminoácido a través de interacciones con la cadena principal, LAO usa cadenas laterales cargadas y grupos hidroxilo para unirlos.

El lóbulo A establece una mayor cantidad de interacciones con la lisina que el lóbulo B. Dado que los residuos del lóbulo A que llevan a cabo dichas interacciones se mantienen prácticamente iguales en los estados cerrado y abierto, se ha propuesto que este dominio es suficiente para la unión del ligando. El cambio conformacional que sufre la proteína LAO después de la unión del ligando es un movimiento de cuerpo rígido de un lóbulo con respecto al otro, en el cual la cadena principal de ambos dominios prácticamente no cambia. Este movimiento es una rotación de 52° alrededor de un eje imaginario ubicado en la zona de bisagra, formada por los dos segmentos polipeptídicos. El análisis de la estructura muestra que

no existen interacciones de la lisina con la región de bisagra lo cual indica que el ligando no provoca directamente el cambio conformacional (Ames, 1993).

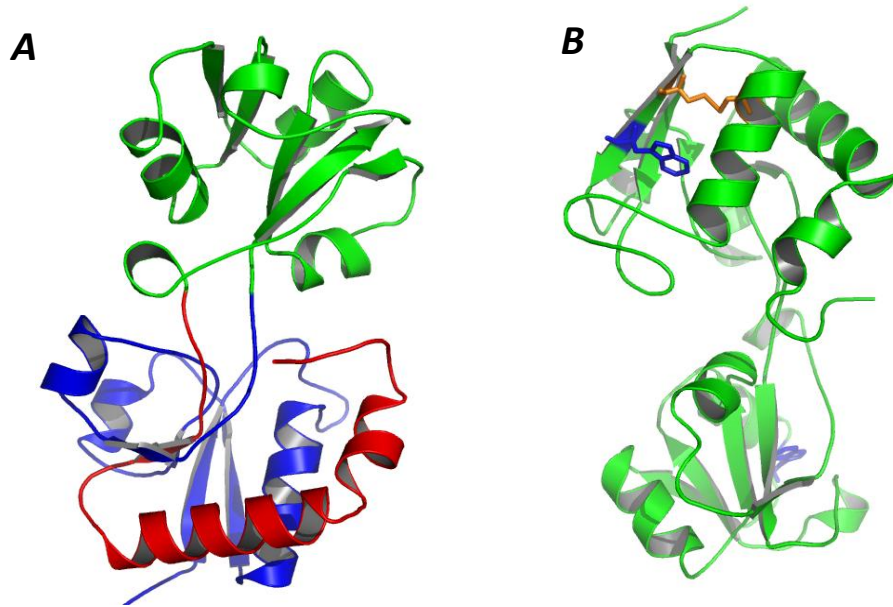


Figura 14. (A) Estructura de LAO en estado abierto, en rojo y azul se muestran los segmentos de la secuencia que componen al lóbulo A y en verde se muestra la continuidad del lóbulo B. (B) En naranja se observa el puente disulfuro formado por los residuos 38 y 45, los triptófanos 47 y 130 se encuentran en azul.

Plegamiento de PBPs: Antecedentes

Se han realizado estudios de plegamiento de varias PBPs, como es el caso de la proteína de unión a histidina (HisJ) y la proteína de unión a maltosa (MBP). Experimentos de DSC muestran que al equilibrio HisJ presenta un patrón de plegamiento de tres estados. Las trazas calorimétricas de desnaturalización se ajustaron a dos transiciones de dos estados. Ya que las diferencias entre los parámetros termodinámicos obtenidos de ambas transiciones concuerda con las diferencias de tamaño entre los lóbulos, el grupo de Shnyrov propuso que ambos dominios se pliegan de manera independiente (Kreimer, 2000). En contraste, la desnaturalización térmica y por urea de la MBP, seguida por técnicas espectroscópicas y DSC,

muestra que el plegamiento de esta proteína es un proceso de dos estados (Ganesh, 1997). El hecho de que la PBP más grande y más compleja (MBP) presente el patrón de plegamiento más sencillo resulta interesante. Por otra parte estudios de desnaturalización a través de espectroscopia de fuerza de molécula única, demostraron la existencia de vías paralelas en el plegamiento de MBP, una de las cuales presenta un intermediario no observable al equilibrio (Aggarwal, 2011).

Los resultados expuestos muestran como una familia de proteínas con topologías semejantes pueden presentar mecanismos de plegamiento diversos. Puesto que no existe un estudio completo sobre el plegamiento de las PBPs, en este trabajo caracterizamos detalladamente el patrón de plegamiento de LAO.

HIPOTESIS

Con base en sus características estructurales y a los antecedentes que existen acerca del plegamiento de otras PBPs, se espera que LAO presente un mecanismo de plegamiento complejo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el mecanismo de plegamiento de la proteína de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar experimentos al equilibrio de desnaturalización por temperatura a distintas condiciones de pH, utilizando técnicas espectroscópicas (intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular) y DSC.
- Realizar experimentos al equilibrio de desnaturalización por urea utilizando distintas técnicas espectroscópicas (intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular en el UV cercano y lejano).
- Realizar experimentos cinéticos de plegamiento y replegamiento seguidos por intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular.

MATERIALES Y METODOS

Purificación de LAO

La sobreexpresión de LAO se realizó en células de la cepa BL21 AI de *Escherichia coli*, las cuales tienen el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *araBAD*. Se transformaron 100 μ l de células electrocompetentes con el plásmido portador del gen de LAO (PET 12b) y se inocularon dos tubos de 10 ml de medio LB + ampicilina (50 μ l de células por tubo). Ambos cultivos se crecieron toda la noche a 37 °C, 250 rpm. Posteriormente se inocularon dos matraces de 1L con 250 ml de medio YT2x + ampicilina, cada uno con un tubo de LB, y se incubaron por una hora en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Es muy importante que a partir de este paso se use solo medio YT2x. Transcurrido el tiempo se transfirió cada cultivo a un matraz de 2L con 750 ml de medio + ampicilina y se dejó crecer hasta alcanzar una DO_{550} entre 0.8 y 1. Una vez alcanzada la densidad se indujo la expresión de LAO agregando arabinosa al 2.5% y se incubó por un tiempo de 4 hrs. Después de la expresión, los 2 litros de medio se colectaron en seis tubos de centrifuga para el rotor SLA-1500 y se centrifugaron a 5000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución de Tris 50 mM, pH 7.5 (50 ml por tubo), para lavar y eliminar el medio remanente. Las células se juntaron en solo dos tubos y se centrifugaron a 5000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución de sacarosa al 20% y 1 mM de EDTA, en amortiguador de acetatos de potasio (AcK) 10 mM, pH 5.1 (150 ml por tubo). Se dejó reposar en hielo por 10 min y se centrifugó a 5000rpm por 15 min. Nuevamente se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió por tercera ocasión, ahora en una solución de AcK 10 mM, pH 5.1 (30 ml por tubo), esto con el fin de provocar un choque osmótico y permitir la liberación de LAO del periplasma celular. Se centrifugó por última ocasión, a 10000 rpm por 20 min y se colectó el sobrenadante, el cual contiene a la proteína.

Los 60 ml de sobrenadante se filtraron con un filtro WHATMAN® para jeringa, de 0.2 μ m, y posteriormente se concentró hasta un volumen de 10 ml en un tubo Amicon® 8400. Se agregó una solución de cloruro de guanidina (GdnCl) 2M hasta un volumen de 50 ml y se volvió a concentrar a 10 ml. Esto se realizó cinco veces con el objetivo de desnaturalizar a LAO y

eliminar la mayor cantidad posible de ligando. Después de ello, se agregó amortiguador bis-tris-propano 5mM, pH 8.5, hasta un volumen de 50 ml y nuevamente se concentró hasta 10 ml. Al igual que con el GndCl, este procedimiento se realizó cinco veces para eliminar el desnaturalizante y propiciar la renaturalización de la proteína. Para el tubo Amicon® se usaron membranas de celulosa con poros de 5000 kDa.

Para purificar la proteína se usó una columna de intercambio aniónico (Source 15Q) equilibrada con bis-tris-propano 5 mM, pH8.5, conectada a un equipo de HPLC Waters 600. Se colectaron los 10 ml de muestra del tubo Amicon® y se filtraron. La muestra se inyectó en el equipo y posteriormente se aplicó un gradiente de 0% a 30% de una solución de NaCl a 250 mM, en un tiempo de 90 min. La proteína eluyó a una concentración de 50 mM (20%) de sal (fig. 15). Las fracciones con la proteína se colectaron en un tubo Amicon® Ultra de 4 ml y se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 2 ml por centrifugación a 5000 rpm. La muestra se diluyó con una solución de bis-tris propano 10 mM, hasta un volumen de aproximadamente 4 ml, y se volvió a concentrar hasta 2ml. Esto se repitió 5 veces más con el fin de eliminar la sal proveniente del gradiente y dejar a la proteína en el amortiguador al pH requerido para los experimentos. Es importante agitar antes de cada centrifugación. Por último, la muestra se llevó a un volumen de 4 ml y se alicuotó en fracciones de 1ml, las cuales se refrigeraron.

En el gel de acrilamida (fig. 17) podemos observar que hay cierta pérdida de proteína en los primeros pasos de la purificación, al resuspender en Tris 50 mM y en la solución de sacarosa al 20% (carriles 2 y 3 respectivamente). Sin embargo, la intensidad y tamaño de dichas bandas es mucho menor al observado en la banda correspondiente al sobrenadante obtenido del choque osmótico (carril 4). En el carril 6 se muestra a la proteína después de pasar por la columna donde se observan, además de la banda de LAO, una serie de bandas muy tenues de menor tamaño. Un análisis de densitometría indica que la pureza es > 92%. Además, ya no se encuentran las dos bandas más evidentes, una de menor y otra de mayor tamaño, que se ven en los carriles 4 y 5. Se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 20 mg de LAO por cada litro de cultivo.

Se verificó que efectivamente la LAO purificada no tuviera ligando midiendo los cambios en la IF al agregar L-arginina, ya que la proteína con ligando presenta una IF mayor que la proteína libre (fig. 16). Con el protocolo de purificación utilizado anteriormente se observaba un pico muy pequeño en el perfil de elución correspondiente a LAO con ligando, el cual aparecía 15 minutos antes del pico de la proteína libre. Con el protocolo utilizado en esta ocasión, descrito en la sección de materiales y métodos, no se observa dicho pico (fig. 16).

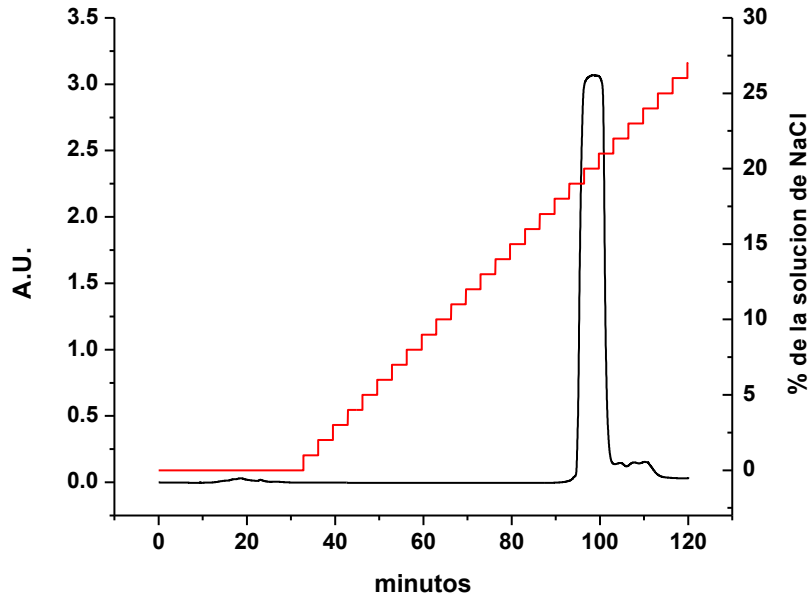


Figura 15. Perfil de elución de LAO (—), gradiente de NaCl utilizado para despegar la proteína de la columna de intercambio aniónico (—).

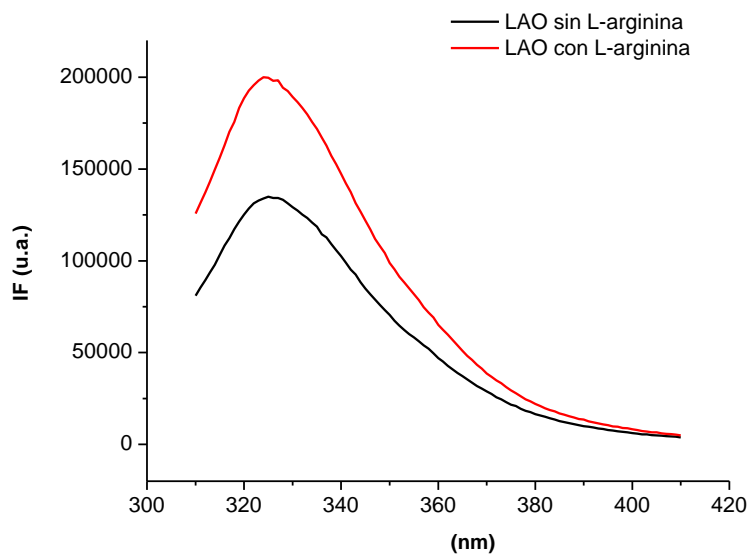


Figura 16. Espectros de IF de LAO en presencia (—) y ausencia (—) de L-arginina.

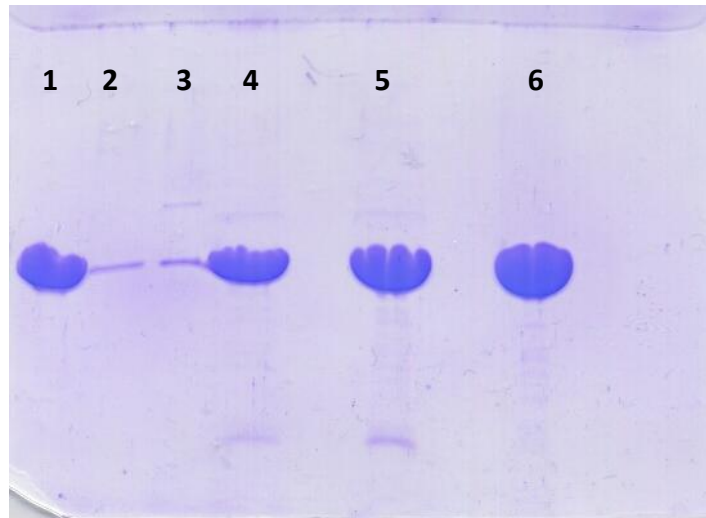


Figura 17. Gel de acrilamida de los pasos de purificación de LAO. En cada uno de los carriles se muestra: 1) LAO pura, 2) sobrenadante después de la resuspensión con Tris 50 mM, 3) sobrenadante después de la resuspensión con Sacarosa 20%, 4) sobrenadante después del choque osmótico, 5) muestra antes de pasar por la columna, 6) muestra después de pasar por la columna.

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se cuantificó por el método de ácido bicinónico (BSA) y por absorbancia a 280 nm (coeficiente de extinción de $26025 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los valores obtenidos por ambos métodos fueron coincidentes.

Ensayos de desnaturalización por temperatura seguida por técnicas espectroscópicas

Se realizaron experimentos de desnaturalización térmica de LAO a distintas condiciones de pH (8.0 a 9.5). Los ensayos se hicieron a una concentración de proteína de 0.2 mg/ml, en bis-tris-propano 10 mM (este amortiguador se usó para todos los experimentos mostrados en esta tesis). Las rampas de temperatura se hicieron de 20 °C a 75 °C, calentando a una velocidad de 0.5 grados por minuto. Una vez alcanzados los 75 °C se disminuyó inmediatamente la temperatura.

Los cambios en la estructura terciaria y secundaria de LAO se siguieron por intensidad de fluorescencia (IF) y dicroísmo circular (DC). Los ensayos de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro ISS PC1, en celdas de cuarzo de 0.5 x 0.5 cm, con rejillas de paso de luz de 1 mm. La muestra se excitó a 295 nm y se tomaron espectros (uno cada 0.5°C) de 310 a 410 nm, midiendo cada nm y realizando 4 iteraciones por medición. Los ensayos de DC se llevaron a cabo en un espectropolarímetro JASCO-700, en una celda de cuarzo de 0.1 mm de paso de luz. En este caso se siguió la señal a 220 nm a lo largo de toda la rampa. Se usaron 0.5 ml y 0.42 ml de muestra para cada desnaturalización seguida por IF y DC respectivamente.

Ensayos de desnaturalización por urea

Se realizaron experimentos de desnaturalización a distintas concentraciones de urea (0.25 M a 6 M) y se siguieron por IF y DC. Los ensayos de IF se realizaron a una concentración de proteína de 0.2 mg/ml (pH 8.0) o de 0.1 mg/ml (pH 9.0). Las muestras se excitaron a 295 nm y se midió la señal de fluorescencia a 322 nm a lo largo de 3 minutos, posteriormente dichos valores se promediaron. Los ensayos de DC en el UV lejano se hicieron en las mismas condiciones que los experimentos anteriores, siguiendo la señal a 220 nm. En ambos casos se hicieron tres repeticiones por concentración de urea. Los ensayos de DC en el UV cercano se realizaron a una concentración de proteína de 1 mg/ml, y se tomaron espectros de 250 nm a 320 nm. Se utilizaron 1.7 ml de muestra por medición, usando una celda de cuarzo de 1 x 1 cm. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C y las muestras se incubaron por 12 hrs a esa temperatura antes de hacer las mediciones.

Experimentos de calorimetría

Los experimentos de calorimetría de barrido diferencial (DSC) se realizaron en un calorímetro VP-DSC de MicroCal (FQ-UNAM). Todos los ensayos se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 0.62 mg/ml (0.0238 mM), en las mismas condiciones de pH utilizadas en los experimentos de desnaturalización térmica seguidos por técnicas espectroscópicas. Se corrieron líneas base (amortiguador contra amortiguador) por un tiempo de 12 horas antes de cada experimento. Los experimentos de desnaturalización térmica se llevaron a cabo de 20 °C a 75 °C, a una velocidad de barrido de 90/hora. Una vez alcanzados los 75 °C, la temperatura se

disminuyo inmediatamente y se mantuvo constante (a 20 °C) por 20 min antes de volver a calentar. Para verificar la reversibilidad de LAO se realizaron dos barridos consecutivos en cada condición.

Experimentos cinéticos

Los experimentos cinéticos (de flujo detenido) se realizaron en un espectropolarimetro Chirascan™ de AppliedPhotophysics. Todos los ensayos se hicieron a una concentración de proteína de 0.1 mg/ml, a pH 9.0. La muestra de proteína y las soluciones de urea se mezclaron utilizando jeringas de 0.25 ml y 2.5 ml respectivamente, lo que implica una dilución de 1:10. Los experimentos de renaturalización se realizaron a partir de una muestra de proteína a 1.1mg/ml, desnaturalizada en 5 M de urea. Dicha muestra se mezcló con las soluciones adecuadas para llegar a concentraciones finales de desnaturalizante de 0.45 M a 2.75 M. Los experimentos de desnaturalización se hicieron a concentraciones finales de urea de 0.27 M a 5 M. En ambos casos se siguió IF y DC. Los ensayos de fluorescencia se hicieron excitando a 280 nm y utilizando un filtro de 320 nm en la emisión. En los ensayos de DC se siguió la señal a 220 nm, con un ancho de banda de 4nm para disminuir el ruido. No fue posible tomar tiempos mayores a los 250 seg debido un problema de difusión entre las tuberías y la celda. Por esta razón los experimentos de desnaturalización y renaturalización se hicieron con las jeringas en distintas posiciones. Se realizaron 5 repeticiones por cada condición y todos los ensayos fueron hechos a 25 °C.

Análisis de Datos

Los datos experimentales de los ensayos de desnaturalización térmica se normalizaron y transformaron a fracción de proteína desnaturalizada (ec. 10) basándose en un modelo de dos estados (ec. 11).

$$fD = \frac{(y_{obs} - (y_{N+mNT}))}{((y_{D+mDT}) - (y_{N+mNT}))} \quad (\text{ec. 10})$$

donde fD es la fracción de proteína desnaturalizada, y_{obs} es la señal observada (IF o DC) y y_{N+mNT} y y_{D+mDT} son las ecuaciones del ajuste de las zonas pre y post transición a una recta (y = ordenada al origen, m = pendiente y T = temperatura en K o [urea]).



Se obtuvieron las constantes de equilibrio (ec. 12) de la transición y su logaritmo natural se graficó contra el inverso de la temperatura (grafico de Van't Hoff). De este gráfico se obtuvieron los valores de ΔH y la T_m (ec. 13).

$$K_{eq} = \frac{fD}{1-fD} \quad (\text{ec. 12})$$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H_{vh}}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{ec. 13})$$

donde R es la constante de los gases ($0.001987 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

El ΔC_p se calculó del gráfico de ΔH contra la T_m (ec. 14).

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT} \quad (\text{ec. 14})$$

Los datos obtenidos de los experimentos de desnaturalización por urea se transformaron a fracción de proteína desnaturalizada (ec. 10) y se ajustaron a la ecuación de Santoro y Bolen (ec. 15), la cual supone un modelo de dos estados.

$$y_{obs} = \frac{\{(y_{N+mN} [urea]) + (y_{D+mD} [urea]) * \exp -\left(\frac{\Delta G_{H2O} - m [urea]}{RT}\right)\}}{\left(1 + \exp -\left(\frac{\Delta G_{H2O} - m [urea]}{RT}\right)\right)} \quad (\text{ec. 15})$$

donde ΔG_{H2O} es la energía libre de desnaturalización en ausencia de urea, m es la pendiente de la transición, y mN y mD son las pendientes de las zonas pre y post transición, respectivamente.

A las trazas calorimétricas se les restó la línea base instrumental y se normalizaron con respecto a la concentración de proteína. Posteriormente se restó la línea base química para obtener la capacidad calorífica en exceso ($\langle C_p^{exc} \rangle$). Las curvas normalizadas se ajustaron a un modelo de dos estados en Origin® 7, y se obtuvieron los valores de ΔH_{cal} (ec. 16) y T_m . De la diferencia en el área bajo la curva entre la primera y la segunda desnaturalización se obtuvo el porcentaje de reversibilidad.

$$\Delta H_{cal} = \int \langle C_p^{exc} \rangle dT \quad (\text{ec. 16})$$

Las cinéticas de desnaturalización y renaturalización se ajustaron a una o dos exponenciales (ec. 17 y 18) en Origin® 8.

$$y = y_0 + A_1 e^{x/t_1} \quad (\text{ec. 17})$$

$$y = y_0 + A_1 e^{x/t_1} + A_2 e^{x/t_2} \quad (\text{ec. 18})$$

Los promedios del logaritmo natural de las constantes de velocidad para cada condición, obtenidas de los ajustes, se graficaron contra la concentración de urea para obtener gráficos de Chevron.

La curva de estabilidad se generó a partir de la ecuación de Gibbs-Helmholtz (ec. 19), usando los valores de ΔH y T_m obtenidos de los experimentos de DSC a pH 8.0, y el ΔC_p calculado del regráfico de ΔH contra T_m obtenidos a diferentes pHs.

$$\Delta G(T) = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \left[T - T_m - T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (\text{ec. 19})$$

El ΔC_p teórico se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta C_p = -300.4 + 18.6 N_{res} \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \quad (\text{ec. 20})$$

donde N_{res} es el número de residuos de la proteína.

RESULTADOS

Desnaturalización Térmica de LAO seguida por técnicas espectroscópicas

En la figura 18 se muestran los espectros de IF y DC de LAO, a pH 8.0, en estado nativo a 20 °C, desnaturalizada a 75 °C y renaturalizada a 20 °C. El espectro de DC de LAO nativa muestra mínimos a 210 nm y 220 nm, característicos de una proteína con hélices α y hojas β plegadas en su estructura. Dicho espectro se pierde cuando la proteína se desnaturaliza por temperatura y regresa exactamente a su posición y forma original cuando se renaturaliza, indicando que toda la población recupera su estructura secundaria. El espectro de IF a 20 °C presenta un máximo a 322 nm, a 75 °C el máximo corre a 340 nm y la intensidad disminuye en un 80%. El corrimiento de espectro hacia el rojo se debe a la exposición de triptófano al solvente. El máximo regresa a 322 nm al renaturalizar a 20 °C, y la intensidad se recupera arriba de un 70 %. Estos datos indican que la desnaturalización de LAO es reversible y que por lo tanto es posible obtener los parámetros termodinámicos del proceso.

En la figura 19 se muestran las curvas de desnaturalización térmica de LAO a pH 8.0, seguidas por IF (322 nm) y DC (220 nm). La intensidad de fluorescencia presenta una dependencia muy drástica con la temperatura, principalmente de 20 °C a 50 °C, zona donde la proteína aun se encuentra en estado nativo. Las curvas de la fracción desnaturalizada de LAO (F_D) de los ensayos de IF y DC son monofásicas y completamente coincidentes en todas las condiciones de pH realizadas (fig. 20). Esto indica que la fracción de la población de proteína que ha perdido su estructura secundaria a cada una de las temperaturas es igual al porcentaje que ha perdido su estructura terciaria. Además, el carácter monofásico de los trazos nos habla de que la desnaturalización por temperatura de LAO es un proceso cooperativo de una etapa. Esta serie de datos son evidencia de un proceso de dos estados.

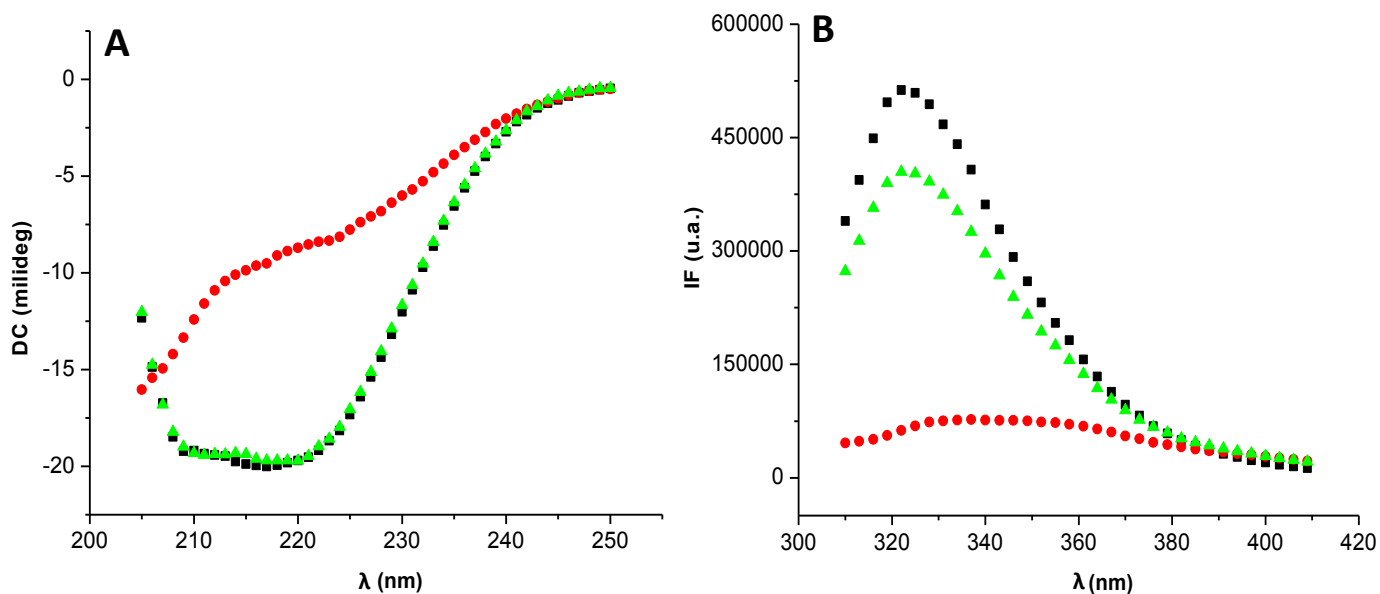


Figura 18. Espectros de DC (A) e IF (B) de LAO (pH 8.0) en estado nativo a 20 °C (■), estado desnaturalizado a 75 °C (●) y renaturalizada a 20 °C (▲).

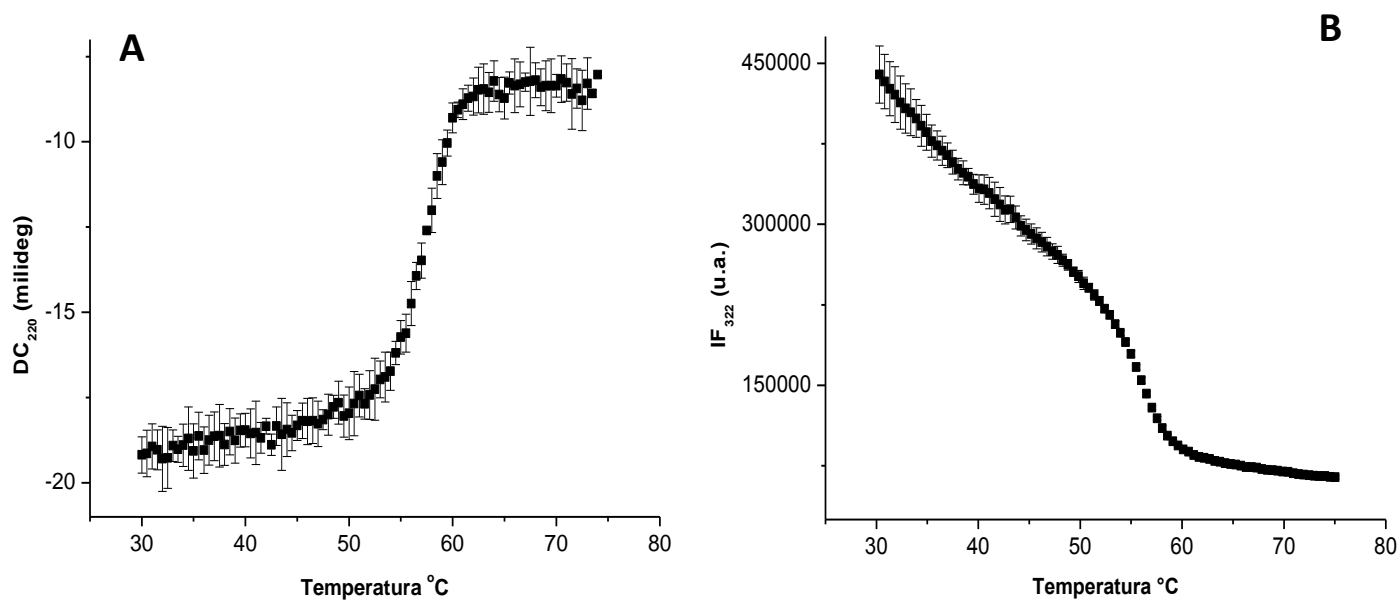


Figura 19. Curvas de desnaturalización por temperatura de LAO, seguidas por DC a 220 nm (A) e IF a 322 nm (B). Las rampas se realizaron de 20 °C a 75 °C, calentando a una velocidad de 0.5 °C/min. La concentración de proteína de las muestras fue de 0.2 mg/ml. En la desnaturalización seguida por IF la muestra se éxito a 295 nm.

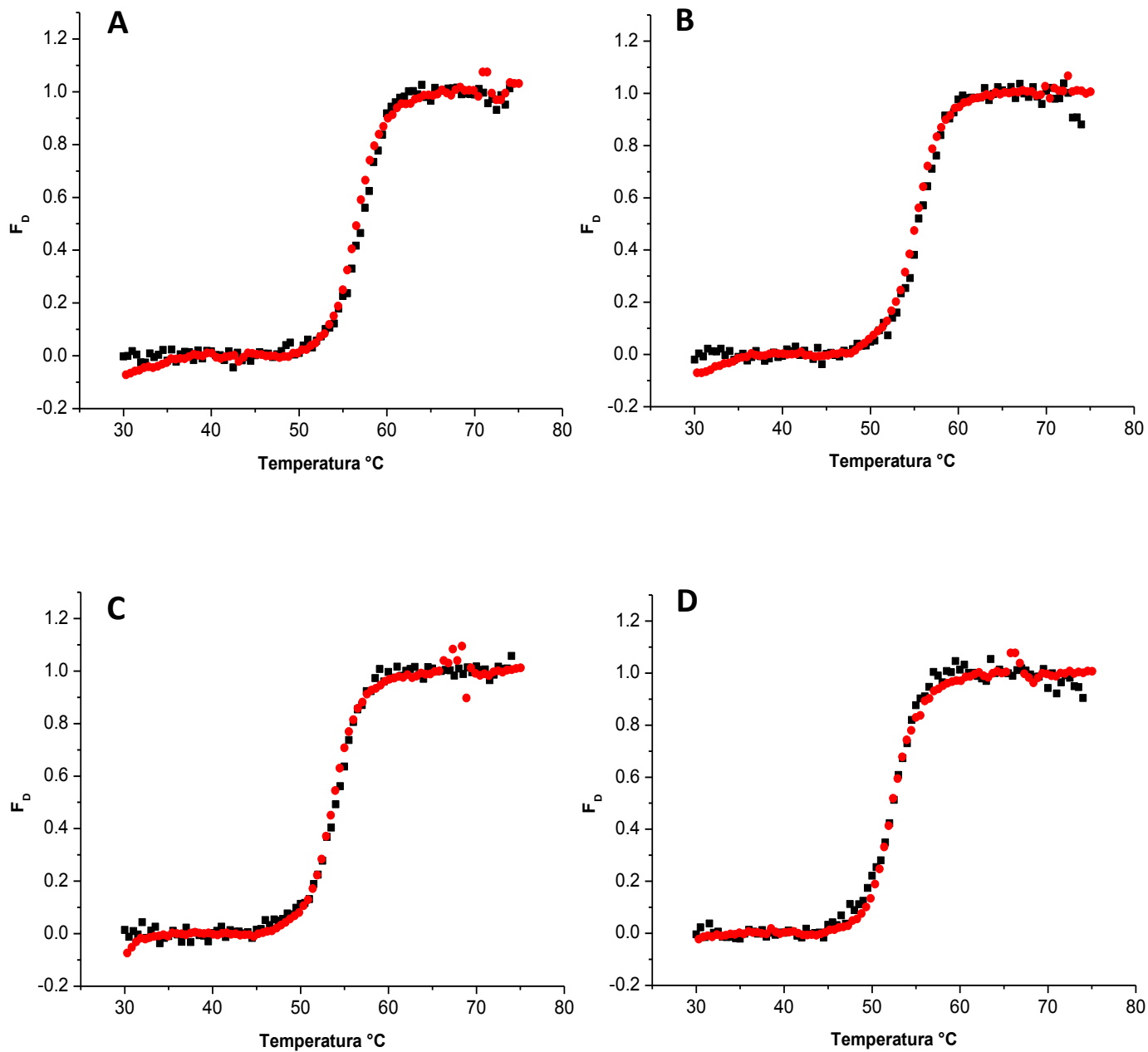


Figura 20. Curvas de la fracción desnaturalizada de proteína de los experimentos de desnaturalización térmica seguidos por fluorescencia (■) y DC (●), a pH 8.0 (A), 8.5 (B), 9.0 (C) y 9.5 (D).

De las curvas de desnaturalización se calcularon los valores de ΔH y T_m del proceso (Tabla 1), a través de la ecuación de Van't Hoff. Como se puede observar no existen diferencias significativas entre los parámetros calculados de los experimentos de IF y los de DC. Los gráficos del ΔH contra la T_m se ajustaron a una línea recta ($R= 0.89$ y 0.91 para IF y DC respectivamente) y de la pendiente se obtuvo un estimado de ΔC_p (fig. 21). Los ΔC_p calculados para LAO fueron de $2.27 \pm 0.34 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (IF) y $2.4 \pm 0.32 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (DC). Estos valores son menores al valor esperado, de $4.1 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, para una proteína del tamaño de LAO (ec. 20 en materiales y métodos). Ya que existe una correlación entre el ΔC_p y el área accesible al solvente (ASA), un valor de ΔC_p menor al predicho teóricamente indica que la proteína desnaturalizada presenta un ASA menor a la que presentaría si todos los residuos estuvieran expuestos. Dicha diferencia en el ASA sugiere que el estado desnaturalizado de LAO tiene estructura residual, como ya se ha reportado para otras proteínas (Dobson, 1992), y concuerda con la presencia de estructura secundaria en la muestra a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ (fig. 18A), lo cual se hace evidente al comparar con el espectro de la proteína en 6 M de urea (fig. 26A).

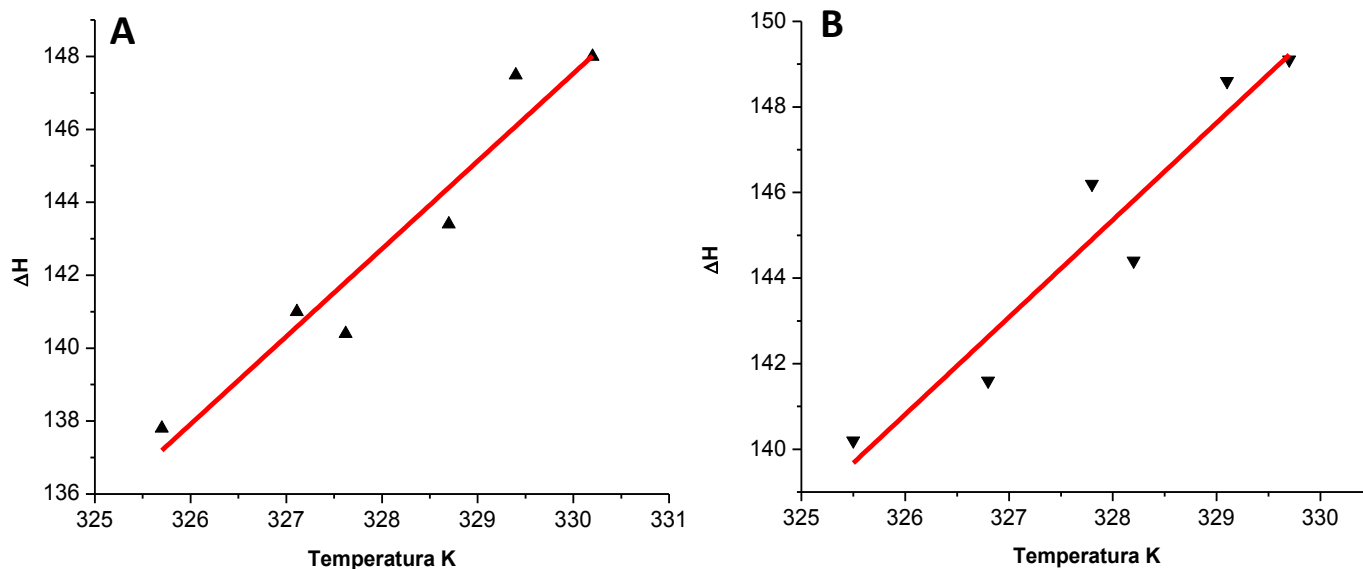


Figura 21. Dependencia del ΔH con la temperatura, de los experimentos de DC (A) e IF (B). De la pendiente de la recta se obtiene un estimado de ΔC_p .

pH	T _m IF (C°)	ΔH _{vh} IF (Kcal mol ⁻¹)	T _m DC (C°)	ΔH DC (Kcal mol ⁻¹)
8	56.5	149.1 ± 1.0	57	148.0 ± 3.9
8.25	55.9	148.6 ± 1.4	56.2	147.5 ± 4.6
8.5	55	144.4 ± 1.3	55.5	143.4 ± 6.5
8.75	54.6	146.2 ± 2.2	54.4	140.4 ± 4.3
9	53.6	141.6 ± 1.6	53.9	141.0 ± 4.3
9.5	52.3	140.2 ± 3.4	52.5	137.8 ± 4.9

Tabla 1. Valores de T_m y ΔH calculados a partir de las curvas de desnaturalización térmica de los experimentos seguidos por IF y DC.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Los resultados anteriores sugieren que el desplegamiento por temperatura de LAO es un proceso de dos estado. Sin embargo, es posible que la desnaturalización sea de tres o más estados si existen intermediarios con propiedades espectroscópicas semejantes a las de los estados nativo o desnaturalizado. Para probar que efectivamente en el proceso de desnaturalización la población de proteína está conformada solo por los estados nativo y desplegado, se realizaron experimentos de DSC. Como se mencionó anteriormente, esta es la única técnica a través de la cual podemos medir directamente la energética del proceso y por lo tanto obtener el valor calorimétrico de ΔH. En la figura 22 se muestran las trazas calorimétricas de desnaturalización y re-desnaturalización de la muestra a pH 9.0, además de la línea base instrumental. De acuerdo a estos experimentos, LAO presenta una reversibilidad del 86 % a pH 8.0 y 8.5, y del 96 % a pH 9.0 y 9.5, confirmando así, que el desplegamiento de LAO es altamente reversible. A pH 8.0 y 8.5 hay cierto grado de agregación lo cual se observa en la disminución del C_p en las trazas después de 65 °C, a diferencia de los pHs 9.0 y 9.5 donde se puede distinguir muy bien la diferencia de C_p entre el estado nativo y el desnaturalizado (fig. 23). La T_m de la desnaturalización solo difiere 0.3 °C cuando el experimento se lleva a cabo a

una velocidad de barrido de 90 °C/hr con respecto a una velocidad de 30 °C/hr. Por lo tanto, podemos asegurar que la desnaturalización no está bajo control cinético.

Todas las curvas normalizadas se ajustan muy bien a un modelo de dos estados (fig. 24). Cuando se comparan los valores del ΔH_{cal} y de la T_m obtenidos de la calorimetría (Tabla 2) con los del ΔH_{vh} y de la T_m calculados de los experimentos espectroscópicos (Tabla 1), podemos observar que no hay diferencias significativas. Si tomamos los valores de ΔH_{cal} y los de ΔH_{vh} para cada condición y les aplicamos el criterio calorimétrico ($\Delta H_{\text{cal}}/\Delta H_{\text{vh}}$), obtenemos valores cercanos a 1 en todos los caso (Tabla 3). El criterio calorimétrico, así como los ajustes de las curvas de DSC y de los ensayos espectroscópicos en conjunto prueban que la desnaturalización por temperatura es de dos estados.

De la grafica del ΔH_{cal} contra la T_m se calculó un valor de ΔC_p de $2.25 \pm 0.52 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (fig. 25), el cual concuerda muy bien con los valores obtenidos de los experimentos seguidos por IF y DC ($2.27 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $2.4 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ respectivamente).

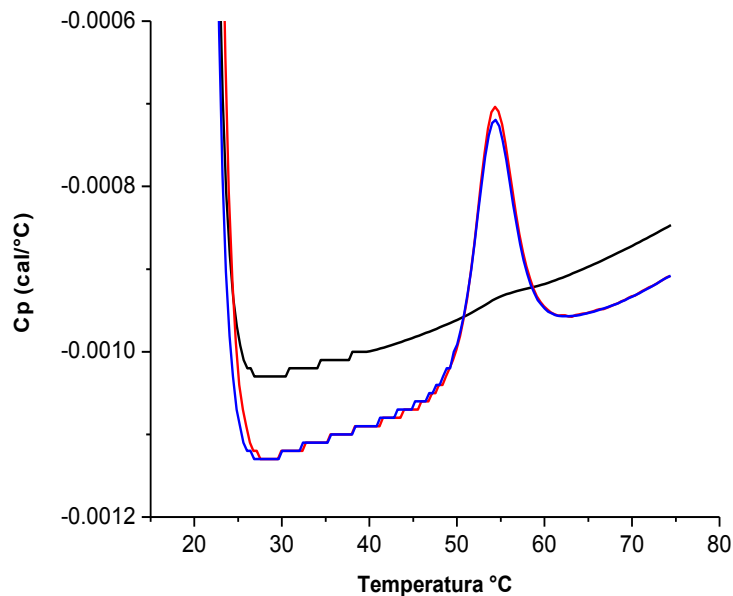


Figura 22. Ensayo de DSC de LAO a pH 9.0, donde se muestra la traza calorimétrica de la desnaturalización (—), re-desnaturalización (—) y la línea base instrumental (—). Todos los barridos se realizaron de 20 °C a 75 °C, a una velocidad de 1.5 °C/min. La concentración de proteína fue de 0.62 mg/ml.

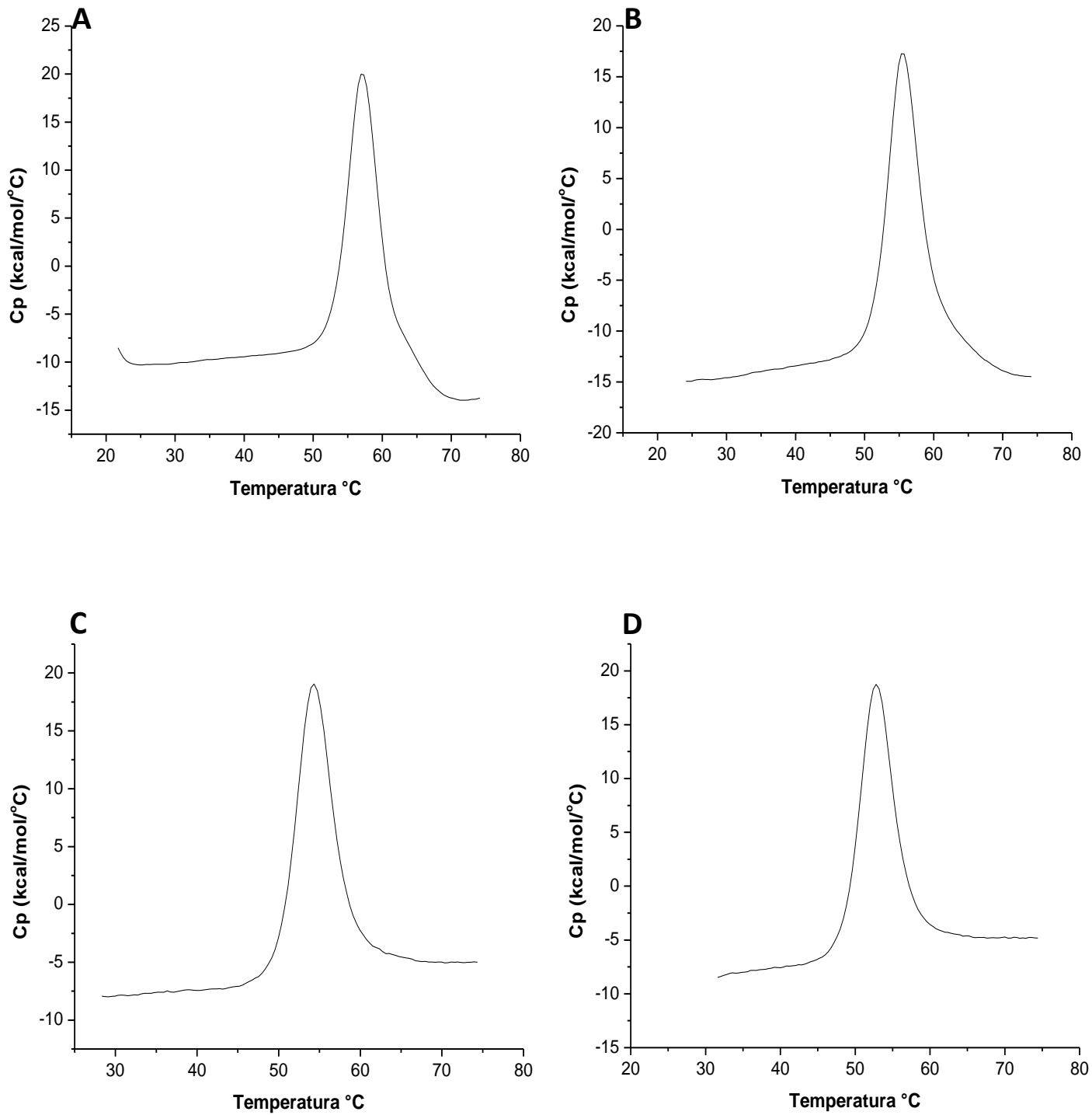


Figura 23. Trazas calorimétricas (sin restar la línea base química) de la desnaturalización de LAO a pH 8.0 (A), 8.5 (B), 9.0 (C) y 9.5 (D).

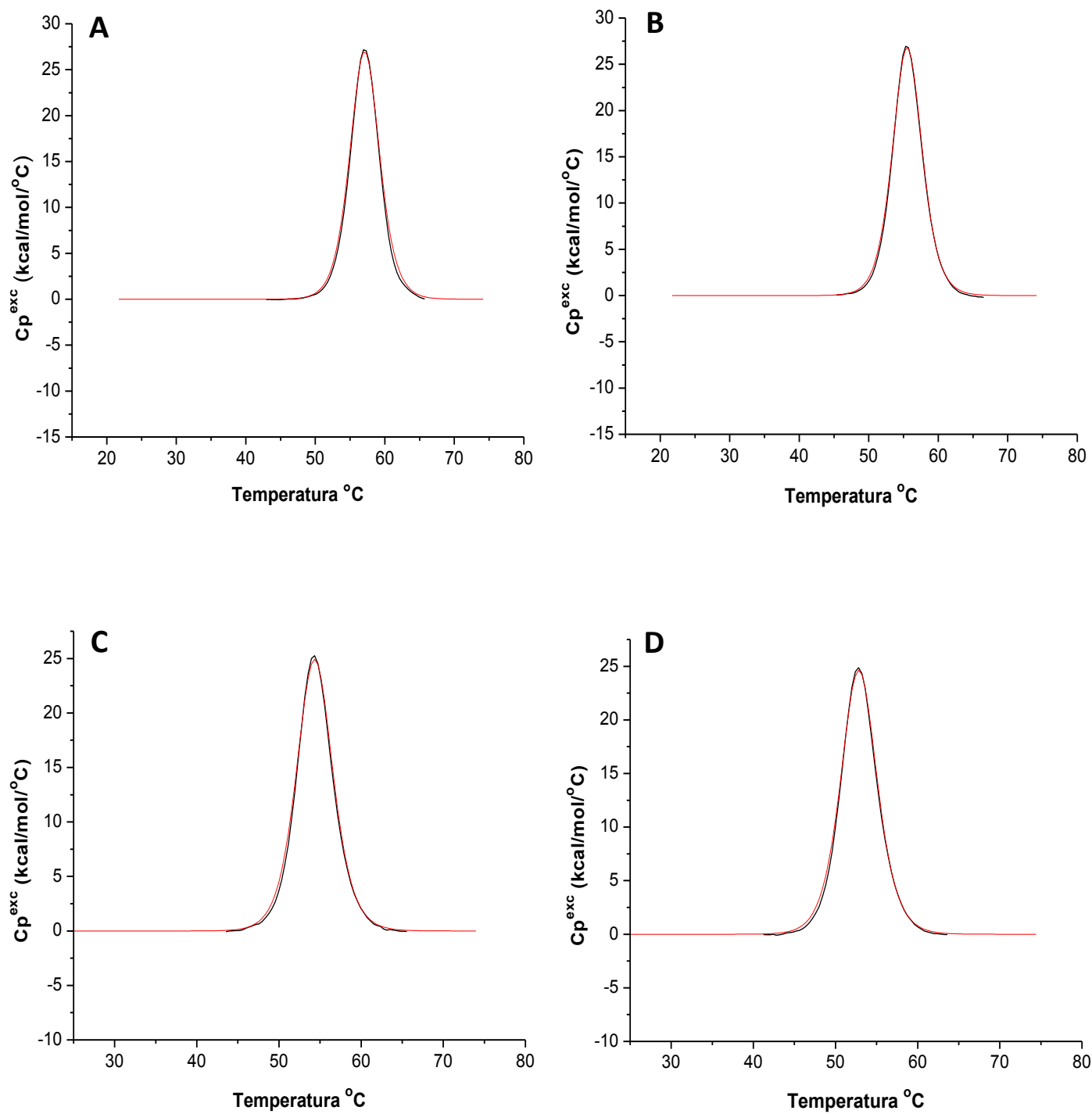


Figura 24. Ajuste a un modelo de dos estados (—) de las trazas calorimétricas (normalizadas) de LAO (—) a pH 8.0 (A), 8.5 (B), 9.0 (C) y 9.5 (D).

pH	Tm DSC (C°)	ΔH_{vh} DSC (Kcal mol ⁻¹)
8	57.1	153.0 ± 0.586
8.25	55.56	151.7 ± 0.343
8.5	54.36	145.8 ± 0.467
8.75	52.8	144.2 ± 0.413

Tabla 2. Valores de Tm y ΔH calculados a partir de las trazas calorimétricas de los experimentos de DSC.

pH	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{vh}$
8	1.026
8.25	1.05
8.5	1.029
8.75	1.028

Tabla 3. Criterio calorimétrico ($\Delta H_{cal} / \Delta H_{vh}$) para todas las condiciones de pH. El valor de ΔH_{vh} usado se obtuvo de los experimentos de desnaturalización seguidos por IF.

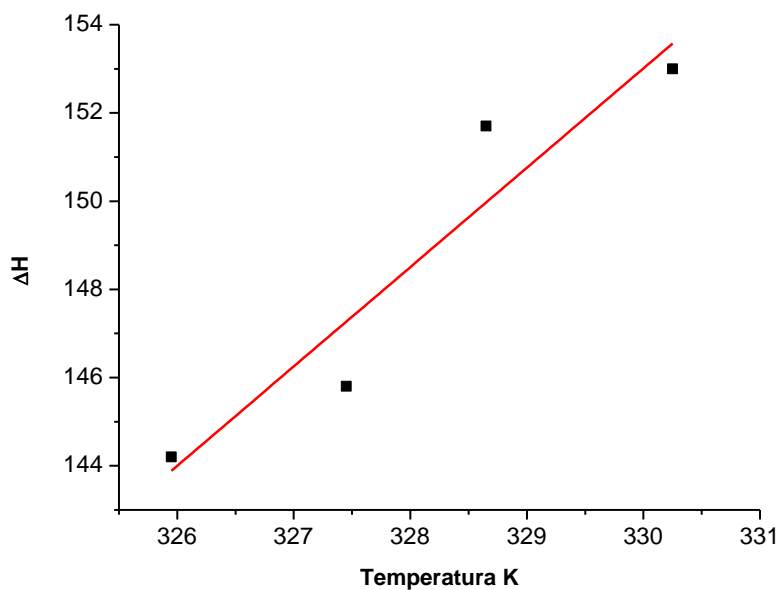


Figura 25. Dependencia del ΔH_{cal} con la temperatura, de los experimentos de DSC.

Desnaturalización por urea

Todos los experimentos anteriores muestran que el desplegamiento de LAO inducido por temperatura es un proceso de dos estados y que por lo tanto no hay intermediarios estables al equilibrio en estas condiciones. Con el objetivo de estudiar las características del proceso en otras condiciones de desnaturalización y compararlas con los resultados obtenidos hasta el momento, se realizaron experimentos utilizando un agente desnaturalizante distinto, que fue la urea.

Como se mostró anteriormente, el espectro de DC en el UV lejano de la proteína nativa (0M de urea) presenta dos mínimos, uno a 210 nm y otro a 220 nm, los cuales se pierden cuando se desnaturaliza en 6 M de urea (fig. 26A). El espectro de IF tiene un máximo a 322 nm y se mueve a 350 nm a 6M de urea, además, la intensidad disminuye en un 37% (fig. 26B). Hay una diferencia de 10 nm en la intensidad máxima de la proteína desnaturalizada por temperatura con respecto a la desnaturalizada por urea. Esto se debe a que la fluorescencia del triptófano depende de las características del solvente. Los espectros DC en el UV cercano de la proteína en estado nativo presentan un pico positivo a 295 nm, propio de la absorción de los triptófanos, y otro negativo a 285 nm debido a la absorción de la tirosinas (fig. 26C). Dichos picos se pierden conforme la proteína se desnaturaliza. La presencia de un punto isodicroico a 291 nm es característico de un proceso de dos estados. Al igual que en la desnaturalización por temperatura, las curvas de desnaturalización por urea monitoreadas mediante diferentes técnicas presentan una sola transición y se ajustan a un modelo de dos estados (fig. 27). Cuando las curvas de F_D obtenidas de las diversas técnicas espectroscópicas se superponen coinciden totalmente (fig. 28) y no hay diferencias significativas entre los parámetros termodinámicos calculados para cada una de ellas y los obtenidos de un ajuste global (Tabla 4). Del mismo modo, las curvas de F_D de los experimentos de desnaturalización a pH 9.0 se ajustan a un modelo de dos estado y no hay diferencias significativas entre los parámetros termodinámicos calculados de los experimentos seguidos por IF y DC en el UV lejano. Hay una pequeña disminución en el valor de estos parámetros con respecto a pH 8.0, esto indica que la estabilidad de LAO a pH 9.0 es menor, lo cual concuerda con los resultados de la

desnaturalización por temperatura los cuales muestran como la estabilidad de la proteína disminuye conforme aumenta el pH.

Estos resultados en conjunto muestran que, al igual que en la desnaturalización por temperatura, la desnaturalización por urea no presenta intermediarios estables al equilibrio

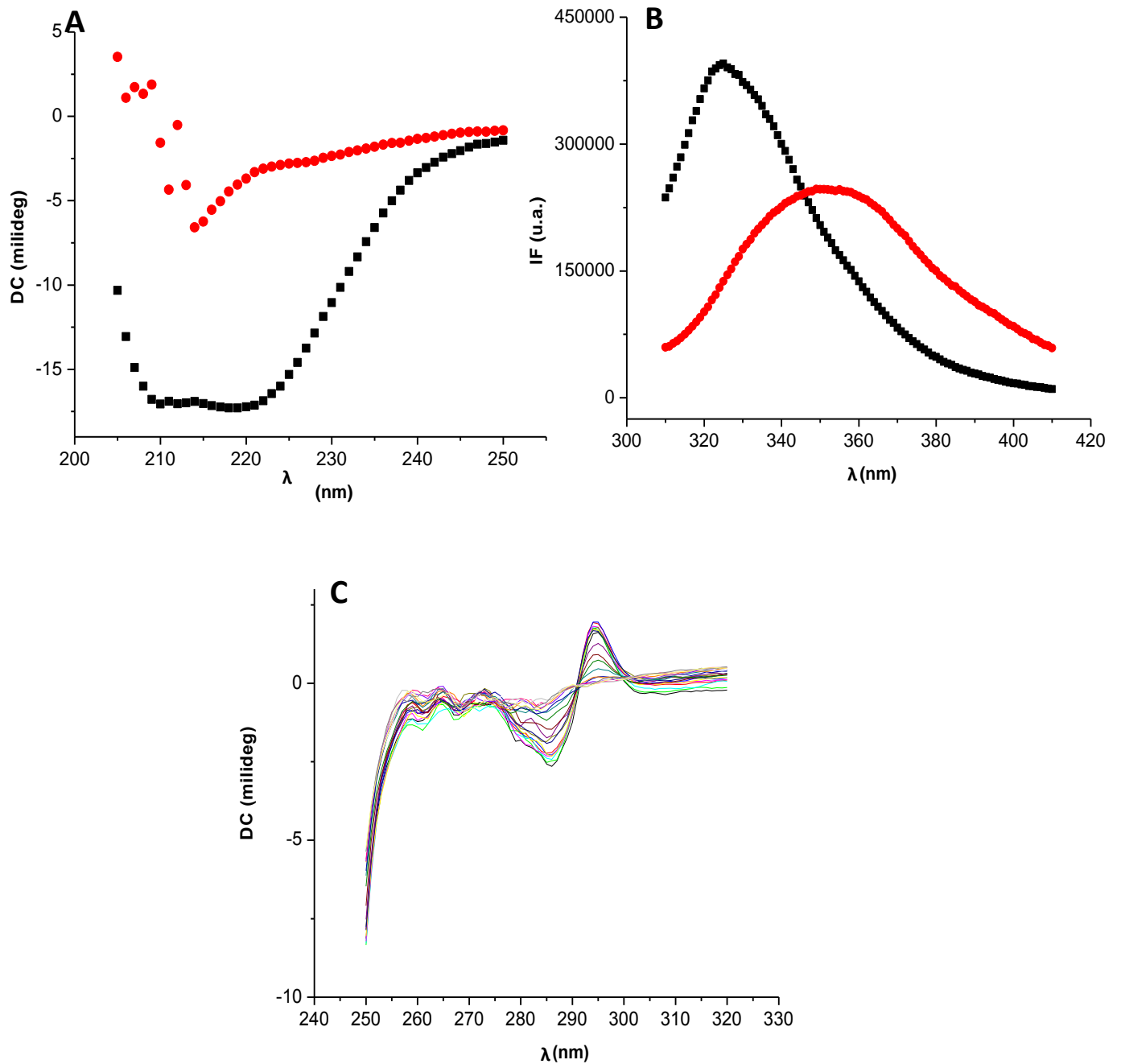


Figura 26. Espectros de DC en el UV lejano (A) e IF (B) de LAO (pH 8.0) en estado nativo (■) y desplegado en 6 M de urea (●). Espectros de DC en el UV cercano (C) a distintas concentraciones de urea (0 M a 6 M).

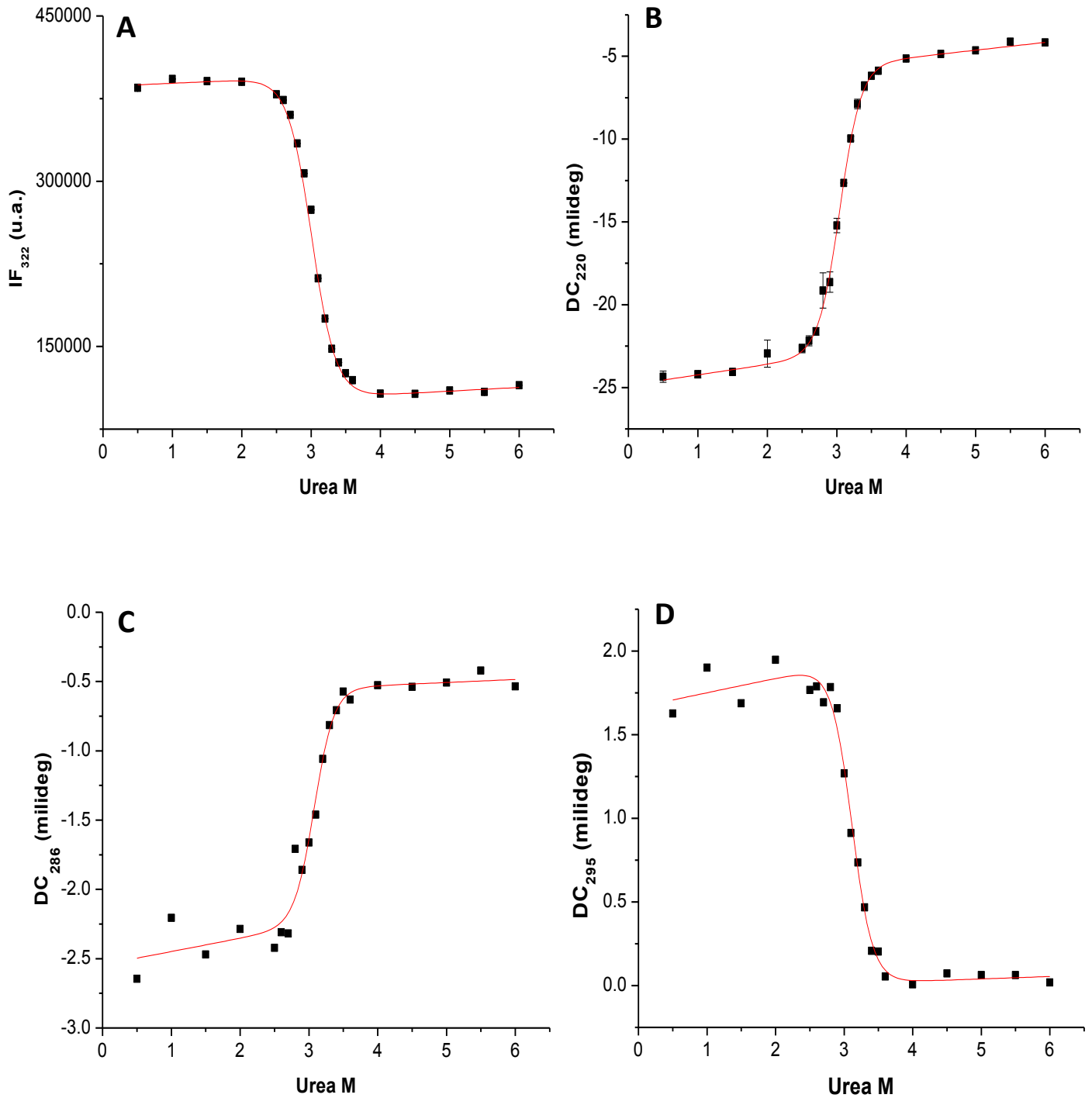


Figura 27. Curvas de desnaturalización por urea de LAO, seguidas por IF a 322 nm (A), DC en el UV lejano a 220 nm (B) y DC en el UV cercano a 286 nm y 295 nm (C y D). Ajuste a un modelo de dos estados (—). Los experimentos se realizaron a concentraciones de urea de 0 M a 6 M, a una concentración de proteína de 0.2 mg/ml. Las muestras se incubaron por 12 hrs a 25 °C antes de llevar a cabo las mediciones. La longitud de onda de excitación en los ensayos de fluorescencia fue de 295 nm.

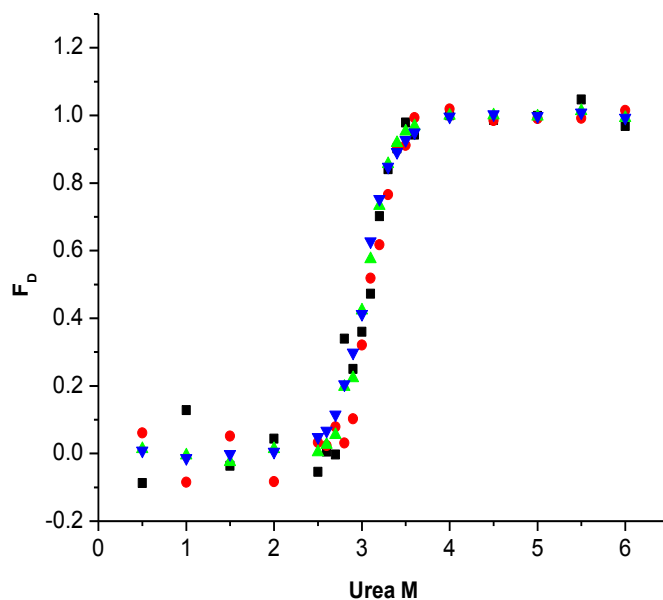


Figura 28. Comparación de las curvas de F_D de los experimentos de desnaturalización por urea seguidos por IF a 322 nm (\blacktriangledown) y DC a 220 nm (\blacktriangle), 285 nm (\blacksquare) y 295 nm (\bullet)

pH 8.0	IF 322 nm	DC 220 nm	DC 295 nm	DC 285 nm	Ajuste global
ΔG_{H_2O} (Kcal mol ⁻¹)	11.34 ± 0.72	12.01 ± 0.8	12.65 ± 0.72	12.16 ± 1.4	12.16 ± 2.3
Cm (M)	3.03	3.05	3.08	3.13	3.1
m (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	3.74 ± 0.23	3.95 ± 0.27	4.11 ± 0.23	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.76
pH 9.0					
ΔG_{H_2O} (Kcal mol ⁻¹)	9.9 ± 0.7	10.7 ± 0.3			9.8 ± 0.8
Cm (M)	2.8	2.76			2.8
m (Kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	3.5 ± 0.28	3.8 ± 0.1			3.45 ± 0.3

Tabla 4. Valores de ΔG_{H_2O} , Cm y m calculados a partir de las curvas de desnaturalización por urea de los experimentos seguidos por IF y DC en el UV cercano (285nm y 295nm) y lejano (220nm), a pH 8.0 y 9.0.

Curva de estabilidad

Con los valores de ΔH , T_m y ΔC_p , calculados de los experimentos de DSC a pH 8.0, se generó una curva de estabilidad (fig. 29). Los valores de ΔG de la desnaturalización por temperatura seguida por IF y DC, de la zona de la transición, se ajustan muy bien a la curva. Los valores de ΔG_{H_2O} de la desnaturalización por urea a 25°C se encuentran ligeramente arriba, aproximadamente una Kcal, aunque los errores se sobrelapan con ella (ΔG_{H_2O} de la curva =11.2 Kcal mol⁻¹). De acuerdo a la curva, la temperatura de máxima estabilidad es de -4.5 °C y una temperatura de desnaturalización por frio de -61.5 °C.

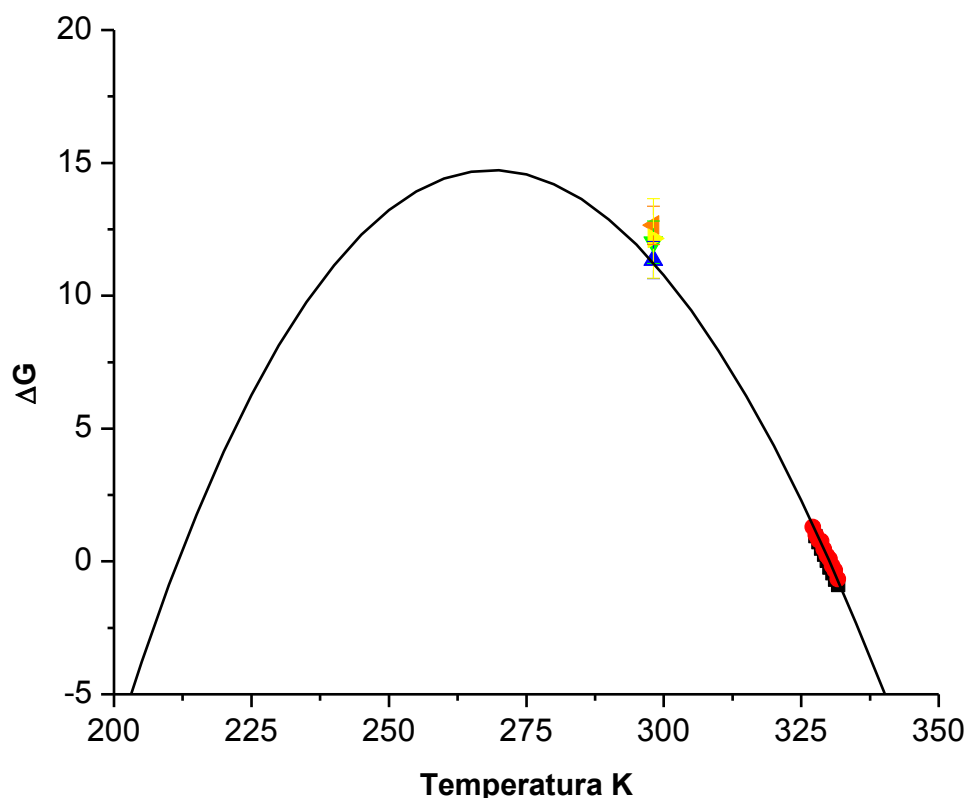


Figura 29. Curva de estabilidad de LAO (—) generada con los valores de ΔH , T_m y C_p de los experimentos de DSC a pH 8.0. En la grafica se muestra los valores de ΔG de los experimentos de desnaturalización por temperatura seguidos por IF (■) y DC (●), así como los valores de ΔG_{H_2O} de la desnaturalización por urea seguida por IF a 322 nm (▲) y DC a 220 nm (▼), 285 nm (◀) y 295 nm (▶).

Experimentos cinéticos de replegamiento y desplegamiento

En la figura 30 se muestran las cinéticas de desplegamiento y replegamiento de LAO seguidas por DC a 220 nm (promedio de 5 repeticiones). Las curvas de desplegamiento a todas las concentraciones se ajustan a una sola exponencial, por otra parte, las curvas de replegamiento se ajustan a una exponencial de 2.7M a 1.75M de urea y a dos exponenciales a partir de 1.5M. En el gráfico de chevron se observa claramente como la zona de replegamiento presenta dos ramas, una de las cuales presenta una curvatura a bajas concentraciones (fig. 32). Esto es una muestra clara de que el plegamiento de LAO presenta por lo menos un intermediario cinético.

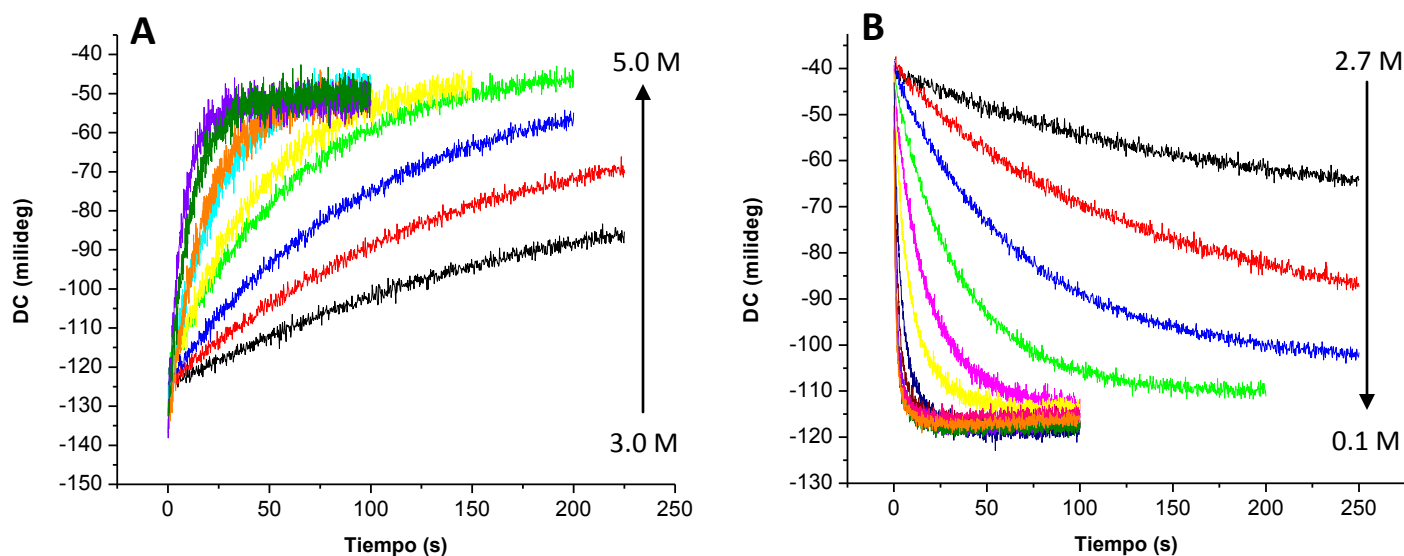


Figura 30. Cinéticas de desnaturalización (A) y renaturalización (B) de LAO seguidas por DC₂₂₀, realizadas de 3.0 M a 5.0 M y de 2.75 M a 0.1 M de urea respectivamente. Todos los ensayos se realizaron a 25 °C, a una concentración de proteína de 0.1 mg/ml.

Al igual que en los experimentos cinéticos seguidos por DC, todas las curvas de desnaturalización seguidas por IF se ajustaron a una sola exponencial, mientras que las curvas de renaturalización se ajustaron a una exponencial a concentraciones de urea mayores a 1.5 M y a dos exponenciales a concentraciones menores (fig. 31). La presencia de dos ramas en la zona de replegamiento del chevron es evidente. En este caso parece que ambas presentan cierta curvatura. La sobreposición de los chevrones obtenidos por IF y DC muestra claramente que son coincidentes (fig. 32), indicando que los cambios en estructura secundaria y terciaria

se llevan a cabo de manera simultánea. Estos resultados, además de mostrar que existe por lo menos un intermediario cinético, parecen concordar con el modelo de nucleación-condensación para el plegamiento de LAO, lo cual tendría que comprobarse con un análisis de valores ϕ .

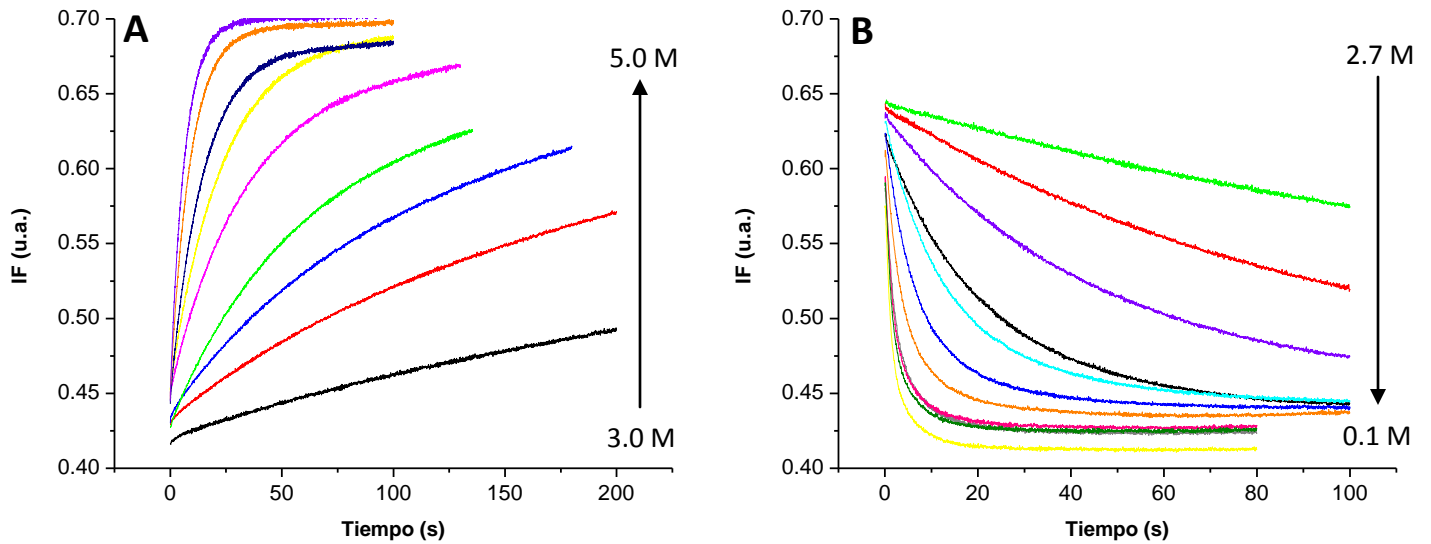


Figura 31. Cinéticas de desnaturalización (A) y renaturalización (B) de LAO seguidas por IF_{280} , realizadas de 3.0 M a 5.0 M y de 2.75 M a 0.1M de urea respectivamente. Todos los ensayos se realizaron a 25 °C, a una concentración de proteína de 0.1 mg/ml.

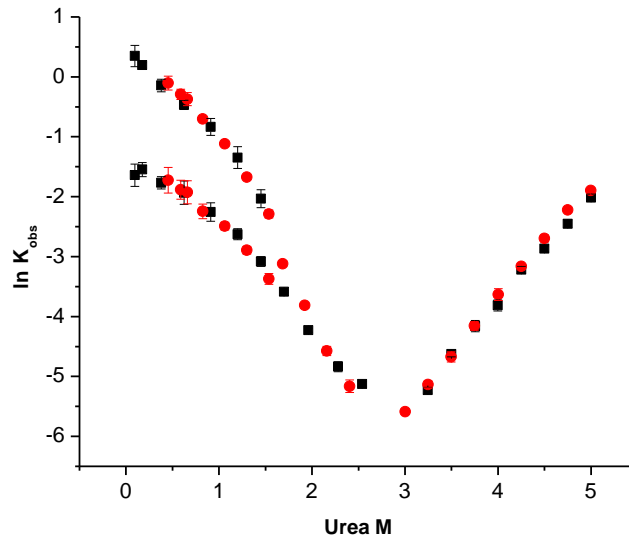


Figura 32. Comparación de los gráficos de Chevron de los experimentos cinéticos seguidos por DC (■) e IF (●).

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Las PBPs son un buen modelo para el estudio del plegamiento ya que presentan ciertas características que les dan varias ventajas con respecto a otras proteínas. Puesto que son proteínas periplasmicas, su purificación es más sencilla en comparación a las proteínas citosólicas, y se obtienen con un alto grado de pureza (>90%). Además, las PBPs estudiadas han presentado un alto grado de reversibilidad (>80%) lo que permite su análisis termodinámico. La mayor parte de las proteínas reversibles y de fácil manejo son proteínas pequeñas (<100 aminoácidos) y de un solo dominio. Las PBPs son proteínas más grandes, de dos dominios y de una complejidad topológica mayor, al tener esta serie de características se vuelven un gran modelo para estudiar a profundidad el proceso de plegamiento. La proteína LAO en particular presenta una reversibilidad mayor al 90% al utilizar temperatura y urea como agentes desnaturizantes, a diferencia de otras proteínas modelo del mismo tamaño, como es el caso de la triosa fosfato isómerasa cuya desnaturización térmica es irreversible.

Estudios de desnaturización de LAO realizados anteriormente en el laboratorio y reportados en la tesis de licenciatura de Ana Ramos, sugerían que el patrón de plegamiento de esta PBP era de tres o más estados. Esto debido a que las curvas de desnaturización por urea seguidas por DC e IF (25°, en Hepes pH 8.0 en lugar de bis tris propano) no eran totalmente coincidentes, presentando diferencias de 0.35 M en la cm y 0.8 Kcal mol⁻¹M⁻¹ en el valor de m . De la misma manera, las curvas de desnaturización por temperatura de LAO silvestre y de la mutante W47F presentaban diferencias de 3°C en la T_m y de 20 Kcal mol⁻¹ en el valor de ΔH . Sin embargo estos resultados no eran concluyentes.

Los estudios presentados en esta tesis no dejan duda alguna de cuál es el patrón de plegamiento de LAO y abren paso a una caracterización más profunda del proceso.

La desnaturización térmica de LAO, seguida por intensidad de fluorescencia y dicroísmo circular tanto en el UV cercano como en el lejano, presenta transiciones monofásicas y coincidentes, lo que nos indica que el desplegamiento es un proceso cooperativo y que la población de proteína que ha perdido su estructura secundaria a una temperatura determinada es igual a la población de proteína que ha perdido su estructura terciaria. Esto se observa en

todas las condiciones de pH realizadas (8.0-9.5). Todas las trazas calorimétricas de los experimentos de DSC se ajustan a un proceso de dos estados y al aplicar el criterio calorimétrico se obtienen valores de aproximadamente de 1.0. Además de ello, los parámetros termodinámicos de la desnaturalización seguida por las diversas técnicas no presentan diferencias significativas. Estos resultados demuestran que la desnaturalización de LAO es un proceso de dos estados, en otras palabras que no existen intermediarios estables al equilibrio. La desnaturalización utilizando otro agente desnaturalizante, que fue la urea, también presentó transiciones monofásicas y coincidentes entre las técnicas usadas, sin diferencias significativas en los parámetros termodinámicos. De esta manera queda demostrado que, al igual que la MBP, el plegamiento de LAO es un proceso de dos estados al equilibrio.

El ΔC_p de $2.3 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ obtenido experimentalmente para el plegamiento de LAO es mucho menor al de $4.1 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ calculado para una proteína del mismo tamaño, y al de $7.9 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ de MBP que es 100 aminoácidos mas grande. Además, los espectros de desnaturalización por temperatura muestran la presencia de estructura residual. Tener un ΔC_p menor al esperado, así como estructura residual, indica que el estado desnaturalizado de LAO no está completamente expuesto al solvente y que presenta cierto grado de estructura secundaria. El hecho de que los valores de ΔG_{H_2O} obtenidos de los experimentos de desnaturalización por urea a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ concuerden muy bien con los valores predichos por la curva de estabilidad generada a partir de los experimentos de desnaturalización por temperatura, indica que en ambos casos se llegó al mismo estado desplegado. Sin embargo, los espectros de DC de LAO desnaturalizada por temperatura y urea son diferentes. Esto sugiere que los estados desplegados obtenidos de la desnaturalización inducida por ambos agentes desnaturalizantes son distintos pero comparten la misma energética.

La complejidad del grafico de chevron generado de los estudios cinéticos de replegamiento y desplegamiento de LAO muestran claramente la presencia de un intermediario cinético en el plegamiento de esta proteína. Aun es necesario determinar, por una parte, si existe heterogeneidad del estado desnaturalizado, y por otra, la posición del intermediario en la vía de plegamiento. Estudios cinéticos realizados para el citocromo C muestran un gráfico de

chevron muy similar al que obtuvimos para LAO. Puesto que citocromo C presenta vías paralelas de plegamiento (Borgia, 2006), lo cual también se ha observado para MBP, sugerimos que este podría ser el caso para LAO. Para comprobarlo es necesario realizar experimentos de dobles saltos, los cuales nos permiten distinguir entre vías paralelas o una vía con el intermediario dentro o fuera. Cuando no existen vías paralelas la distinción entre las últimas dos posibilidades se lleva a cabo a través del ajuste del chevron a los dos modelos.

Estos resultados son muy interesantes ya que, de manera contraria a lo esperado, HisJ y LAO presentan patrones de plegamiento distintos a pesar de compartir el 70% de identidad y 80% de similitud. Sin embargo, no es la primera vez que se observa este comportamiento. El plegamiento de la proteína Im7 presenta un intermediario estable a pH 7.0, el cual está ausente en el plegamiento de la proteína Im9 con la que comparte el 60% de identidad. No obstante, a pH alto el plegamiento de Im9 pasa a ser de dos a tres estados, indicando que ambas proteínas pueden presentar el mismo comportamiento y que muy probablemente solo cambia la estabilidad del intermediario (Friel, 2004). En este trabajo observaron, a través del análisis de valores ϕ , que efectivamente los intermediarios para cada proteína tienen la misma estructura e identificaron las interacciones no nativas que le dan estabilidad. Cuando mutan los residuos que participan en esas interacciones en Im 9 por los de Im 7 logran estabilizar a la especie semiplegada a pH 7.0. Lo más sorprendente fue que la velocidad de plegamiento de la mutante incrementó con respecto a la silvestre lo cual nos lleva a cuestionarnos sobre la importancia de las especies semiplegadas.

Esto nos lleva a plantearnos diversas preguntas y abre paso a la especulación. Las primeras preguntas que surgen son ¿el intermediario cinético de LAO presenta las mismas características que el intermediario al equilibrio de HisJ?, ¿cuáles son las diferencias responsables de que LAO y HisJ sigan patrones de plegamiento distintos al equilibrio? Tomando en cuenta los estudios realizados para Im 7 e Im 9, es muy probable que el intermediario al equilibrio de HisJ y el cinético de LAO tengan las mismas características estructurales y que difieran en su estabilidad. Como ya se ha mencionado, LAO e HisJ presentan un 70% de identidad y un 80% de similitud, por lo cual podríamos pensar que las interacciones responsables de las diferencias en el patrón

de plegamiento se encuentran en los residuos que son distintos. Especulando un poco y con la perspectiva de obtener información que lo compruebe, cabe la posibilidad de que ambos lóbulos se comporten como unidades cooperativas independientes (foldones) que se plieguen a velocidades distintas. Si nos basamos en la teoría del orden de contacto, podríamos pensar que el lóbulo continuo se pliega a una velocidad mayor a la del lóbulo discontinuo. Diferencias en las interacciones hechas por ciertos residuos podrían causar que los dominios se encuentren acoplados para el caso de LAO y desacoplados en el caso de HisJ. De esta manera, condiciones que propicien el plegamiento del lóbulo continuo pero no el del discontinuo permitirían observar la presencia de dicho intermediario, lo cual no sucedería si los dominios estuvieran acoplados ya que el plegamiento del primero propiciaría el plegamiento del segundo. Esto concuerda con los resultados del grupo de Shnyrov que sugiere que los dominios de HisJ se pliegan independientemente. Cabe señalar que ambas proteínas presentan un orden de contacto muy parecido (24.4 para LAO y 25.5 para HisJ). La caracterización del intermediario al equilibrio de HisJ y el estudio de mutantes monotriptofanadas de LAO, así como un análisis de valores ϕ , probarían si nuestras especulaciones son ciertas o no.

También es posible que la estructura residual presente en el estado desnaturalizado, al ser estabilizada por interacciones terciarias, den lugar a un núcleo o núcleos de plegamiento en el estado de transición. Diferencias en la estabilidad de la estructura residual también podría lugar a diferencias en el patrón de plegamiento de LAO, como ya se ha propuesto anteriormente para otras proteínas.

Otra serie de preguntas interesantes que surgen son: ¿qué influencia tienen los ligandos en el mecanismo de plegamiento de LAO y HisJ? ¿hay diferencias en el plegamiento de las proteínas unidas a los diferentes ligandos?, ¿es probable que las diferencias que cambian las afinidades de LAO y HisJ por los ligandos sean las mismas que cambien el patrón de plegamiento? Como se mencionó anteriormente, estudios de desnaturalización de MBP por espectroscopia de fuerza de molécula única mostraron que la unión de maltosa modifica la proporción de las poblaciones que siguen una u otra vía. De este modo es posible que el mecanismo de plegamiento de LAO también se vea afectado por la presencia de ligando.

Las perspectivas de este proyecto son las siguientes:

- Realizar experimentos de dobles saltos para determinar el mecanismo de plegamiento de LAO.
- Realizar experimentos cinéticos de replegamiento utilizando prolil-isomerasa para determinar si existe isomerización de prolinas en el proceso de plegamiento.
- Construir mutantes de LAO para realizar un análisis de valores ϕ que nos permita caracterizar los estados de transición del proceso.
- Realizar experimentos cinéticos de plegamiento y desplegado de los lóbulos individuales utilizando mutantes monotriptofanadas.
- Estudiar la cinética y termodinámica del plegamiento de LAO unida a sus distintos ligandos.
- Realizar experimentos de intercambio deuterio-hidrógeno.
- Estudiar la cinética y termodinámica del plegamiento de HisJ.
- Estudiar la cinética y termodinámica del plegamiento de LAO con una perspectiva evolutiva, esto es, estudiar las PBPs de otras especies así como PBPs ancestrales.

REFERENCIAS

- Aggarwal, V., Kulothungan, S. R., Balamurali, M. M., Saranya, S. R., Varadarajan, Raghavan, & Ainavarapu, S. R. K. (2011). Ligand-modulated parallel mechanical unfolding pathways of maltose-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*, 286, 28056-65.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M., & White, F. H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 1309-14.
- Barrick, D. (2010). What have we learned from the studies of two-state folders, and what are the unanswered questions about two-state protein folding? *Phys Biol*, 6, 1-17.
- Bartlett, A. I., & Radford, S. E. (2009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature structural & molecular biology*, 16, 582-8.
- Borgia, A., Bonivento, D., Travaglini-Allocatelli, C., Di Matteo, A., & Brunori, M. (2006). Unveiling a hidden folding intermediate in c-type cytochromes by protein engineering. *The Journal of biological chemistry*, 281, 9331-6.
- Brockwell, D. J., Radford, S. E., & Biology, C. (2007). Current Opinion in Structural Biology Intermediates : ubiquitous species on folding energy landscapes ? *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 30-37.
- Bryngelson, J. D. (1995). Funnels, Pathways and the Energy Landscape of Protein Folding: A Synthesis. *Proteins*, 21, 164-195.
- Büchner, J., & Kiefhaber, T. (2004). *Protein folding handbook*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Calosci, N., Chi, C. N., Richter, B., Camilloni, C., Engström, A., Eklund, L., et al. (2008). Comparison of successive transition states for folding reveals alternative early folding pathways of two homologous proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 19241-6.
- Creighton, T. E., (1997). *Proteins*. W.H. Freeman and Company.
- Daggett, V., & Fersht, A. R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends in biochemical sciences*, 28, 18-25.
- Dill, K. a, & Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology*, 4, 10-9.
- Dinner, a R., Abkevich, V., Shakhnovich, E., & Karplus, M. (1999). Factors that affect the folding ability of proteins. *Proteins*, 35(1), 34-40.
- Dobson, C. M. (1992). Unfolded proteins, compact states and molten globules. *Current Biology*, 2, 82.

- Dwyer, M. a, & Hellinga, H. W. (2004). Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Current opinion in structural biology*, 14, 495-504.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer.
- Englander, S. W., Mayne, L., & Krishna, M. M. G. (2007). Protein folding and misfolding: mechanism and principles. *Quarterly reviews of biophysics*, 40, 287-326.
- Fersht, A. R. (2008). folding : delights and scepticisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 650-654.
- Freire, E. (1995). Differential Scanning Calorimetry. *Protein Stability and Folding: Theory and Practice* (Vol. 40, pp. 191-218). Humana Press Inc.
- Friel, C. T., Beddard, G. S., & Radford, S. E. (2004). Switching two-state to three-state kinetics in the helical protein Im9 via the optimisation of stabilising non-native interactions by design. *Journal of molecular biology*, 342, 261-73.
- Friel, C. T., Smith, D. A., Vendruscolo, M., Gsponer, J., & Radford, S. E. (2009). The mechanism of folding of Im7 reveals competition between functional and kinetic evolutionary constraints. *Nature structural & molecular biology*, 16, 318-24.
- Fukami-Kobayashi, K., Tateno, Y., & Nishikawa, K. (1999). Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *Journal of molecular biology*, 286, 279-90.
- Ganesh, C., Shah, a N., Swaminathan, C. P., Surolia, a, & Varadarajan, R. (1997). Thermodynamic characterization of the reversible, two-state unfolding of maltose binding protein, a large two-domain protein. *Biochemistry*, 36, 5020-8.
- Gillespie, B., & Plaxco, Kevin W. (2004). Using protein folding rates to test protein folding theories. *Annual review of biochemistry*, 73, 837-59.
- Gutin, a M., Abkevich, V. I., & Shakhnovich, E. I. (1995). Evolution-like selection of fast-folding model proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1282-6.
- Higgins, C. F., & Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology*, 11, 918-26.
- Ibarra-molero, B., & Sanchez-ruiz, J. M. (2006). Differential Scanning Calorimetry of Proteins : an Overview and Some Recent Developments. In J. L. R. Arondo (Ed.), *Advanced Techniques in Biophysics* (pp. 27-48). Springer.
- Itzhaki, L. S., Otzen, D. E., & Fersht, a R. (1995). The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *Journal of molecular biology*, 254, 260-88.
- Ivarsson, Y., Travaglini-Allocatelli, C., Brunori, M., & Gianni, S. (2008). Mechanisms of protein folding. *European biophysics journal : EBJ*, 37, 721-8.

- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta*, 1751, 119-39.
- Kiefhaber, T. (1995). Kinetic traps in lysozyme folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9029-33.
- Kloss, E., Courtemanche, N., & Barrick, D. (2008). Repeat-protein folding: new insights into origins of cooperativity, stability, and topology. *Archives of biochemistry and biophysics*, 469, 83-99.
- Kos, V., & Ford, R. C. (2009). The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66, 3111-26.
- Kreimer, D. I., Malak, H., Lakowicz, J. R., Trakhanov, S., Villar, E., & Shnyrov, V. L. (2000). Thermodynamics and dynamics of histidine-binding protein, the water-soluble receptor of histidine permease. Implications for the transport of high and low affinity ligands. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 4242-52.
- Lindberg, M. O., & Oliveberg, M. (2007). Malleability of protein folding pathways: a simple reason for complex behaviour. *Current opinion in structural biology*, 17, 21-9.
- Nikaido, K., & Ames, G. F. (1992). Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry*, 267, 20706-12.
- Oh, B. H., Ames, G. F., & Kim, S. H. (1994). Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 269, 26323-30.
- Oh, B.-ha, Pandits, J., Kang, C.-hee, Nikaidoii, K., Gokcen, S., Amesll, G. F.-luzzi, et al. (1993). Three-dimensional Structures of the Periplasmic Lysine/Arginine/ Ornithine-binding Protein with and without, 268, 11348-11355.
- Oldham, M. L., & Chen, J. (2011). Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6034), 1202-5.
- Onuchic, J. N., & Wolynes, P. G. (2004). Theory of protein folding. *Current opinion in structural biology*, 14, 70-5.
- Plaxco, K W, Simons, K. T., & Baker, D. (1998). Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *Journal of molecular biology*, 277, 985-94.
- Portman, J. J. (2010). Cooperativity and protein folding rates. *Current opinion in structural biology*, 20, 11-5. Elsevier Ltd.
- Santoro M, Bolen D. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*. 1988;27:8063–8068.
- Schmid, F. (1995). Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nature structural biology*, 2, 663-673.

- Shi, R., Proteau, A., Wagner, J., Cui, Q., Purisima, E. O., Matte, A., et al. (2009). Trapping open and closed forms of FitE: a group III periplasmic binding protein. *Proteins*, 75, 598-609.
- Wildegger, G., & Kiefhaber, T. (1997). Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *Journal of molecular biology*, 270, 294-304.