



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Análisis y rediseño de la interacción proteína-ligando  
utilizando a la proteína periplásmica de unión a aminoácidos  
básicos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

HÉCTOR GUZMÁN GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO



2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



1. Datos del alumno

Guzmán

García

Héctor

67302680

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306159394

2. Datos del Asesor

Dr.

Sosa

Peinado

Alejandro

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Pulido

Mayoral

Nancy Olivia

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

López

Zepeda

Jorge Luis

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Marché

Cova

Alejandro

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Jiménez

García

Luis Felipe

7. Datos del trabajo escrito.

Análisis y rediseño de la interacción proteína-ligando utilizando a la proteína periplásmica de unión a aminoácidos básicos.

69p

2015





## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al proyecto PAPIIT, UNAM, número IN215612 por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

En general, quiero agradecer a todas las personas que durante mi formación en la Universidad Nacional Autónoma de México han contribuido de manera positiva en mi crecimiento: Gracias a mis padres, a mi hermano y a toda mi familia, por su apoyo incondicional y su solidaridad, gracias a mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, En lo académico gracias a la Facultad de Ciencias, la Facultad de Medicina y la Facultad de Química y en lo deportivo gracias al Equipo de Buceo de la Facultad de Ciencias y al entonces equipo representativo de Triatlón UNAM, en especial a Couch (Dr. Mario Victoria Labrada) quien fuera piedra angular en mi desarrollo deportivo y personal. Gracias a mi colegas de la facultad, a mis profesores y muy en especial quiero agradecer al Dr. Alejandro Sosa Peinado por llevar la tutoría de esta tesis en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, ¡gracias amigos del LFQIP!

*"Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución".*

Theodosius Dobzhansky

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN:</b>	<b>10</b>
<i>Estructura de las proteínas</i>	10
<i>Niveles de organización</i>	12
<i>Funciones de proteínas</i>	17
<i>Relación estructura función de las proteínas</i>	19
<i>Las proteínas periplásmicas de unión: PBP's</i>	20
<i>La clasificación de las PBP's.</i>	20
<i>Proteína de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO-wt)</i>	22
<i>Rediseño e ingeniería de proteínas</i>	25
<i>Técnicas en el estudio de las proteínas</i>	28
<i>La espectroscopia de fluorescencia</i>	29
<b>ANTECEDENTES DEL DISEÑO (TYR-R2-95)</b>	<b>32</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>33</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<i>Objetivo principal:</i>	35
<i>Objetivos particulares:</i>	35
<b>MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<i>Construcción del gene de la mutante LAOY-tyr</i>	36
<i>Sobreexpresión de LAO-tyr</i>	37
<i>Purificación de LAO-tyr</i>	38
<i>Cuantificación de la proteína</i>	39
<i>Experimentos de fluorescencia</i>	40
<i>Determinación de las Kd de LAO-tyr por fluorescencia.</i>	40
<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<i>De ArgT-Y a LAO-tyr</i>	41
Gene de la mutante LAOY-tyr	41
Secuencia (LAO-tyr) obtenida en formato fasta	41
Subclonación de la mutante LAO-tyr a un vector de expresión	43
Purificación y rendimiento de LAO-tyr	44
<i>Espectroscopia de fluorescencia</i>	46
Sistema LAO-wt - Ligandos	46
Sistema LAO-tyr - Ligandos	49
<i>Análisis computacional</i>	56
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<i>Discusiones comparativas entre LAO-wt / LAO-tyr y sus ligandos:</i>	61
LAO-wt y LAO-tyr con L-tirosina:	62
<b>CONCLUSIONES:</b>	<b>65</b>
<i>Conclusiones generales de la tesis:</i>	65
<i>Conclusiones particulares de los experimentos</i>	65
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grupos R de aminoácidos encontrados en las proteínas.	11
Figura 2. Niveles de organización encontrados en las proteínas.	12
Figura 3. Formación e hidrólisis del enlace peptídico.	13
Figura 4. Grafico de Ramachandran.	14
Figura 5. Paisajes energéticos del plegamiento de una proteína.	15
Figura 6. Perfiles energéticos de la transición conformacional apo-holo.	16
Figura 7. Estructura cristalográfica de una proteína con función reguladora del proceso de recombinación homóloga. PDB: 4C1Q.	17
Figura 8. Estructura cristalográfica de una proteína con función contráctil. PDB: 2SDS.	18
Figura 9. Mecanismo de transporte para los importadores de ABC.	21
Figura 10. Clasificación de las PBP's.	21
Figura 11. LAO-wt en el estado abierto (sin ligando).	23
Figura 12. Cambios conformacionales en LAO-wt (estado abierto y estado cerrado).	24
Figura 13. Pasos conceptuales aplicables en el rediseño racional de proteínas.	25
Figura 14. Diagrama Jablonski.	31
Figura 15. Diagrama de la subclonación del gen ArgT-Y.	37
Figura 16. La secuencia del gen ArtT-Y.	41
Figura 17. Traducción de la secuencia del gene LAO-tyr	42
Figura 18. Ensayo de restricción (DNA).	43
Figura 19. Resolución electroforética de la proteína LAO-tyr.	44
Figura 20. Cromatograma de la purificación de LAO-tyr.	45
Figura 21. Espectro de emisión de la proteína LAO-wt + L-arginina.	46
Figura 22. Espectros de fluorescencia LAO-wt + L-arginina y L-histidina.	47
Figura 23. Titulación LAO-wt + L-arginina y L-histidina.	47
Figura 24. La proteína LAO-wt libre de ligando no une L-tirosina.	48
Figura 25. Espectro de emisión LAO-tyr con y sin L-arginina.	49
Figura 26. Unión de L-arginina a la proteína LAO-tyr.	50
Figura 27. Espectros de fluorescencia LAO-tyr + L-histidina	51
Figura 28. Unión de L-histidina a la proteína LAO-tyr.	52
Figura 29. Espectro de emisión L-tirosina.	53
Figura 30. Espectro de emisión LAO-tyr + L-tirosina.	54
Figura 31. Unión de L-tirosina a la proteína LAO-tyr.	55
Figura 32 Imágenes LAO-tyr con MacPyMOL.	57
Figura 33. Estructura sitio de unión LAO-wt + L-histidina. (MacPyMOL).	59
Figura 34. Estructura sitio de unión LAO-tyr + L-tirosina. (MacPyMOL).	59

## ABREVIATURAS

- **aa** Aminoácido.
- **ArgT** Gen que codifica para la proteína LAO-wt.
- **ArgT-Y** Gen ArgT con 5 mutaciones (Tyr14Cys, Ser70Cys, Ala90Asp, Gln160Gly, Asp161Pro).
- **Grupo R** Grupo sustituyente en un aa.
- **K<sub>d</sub>** Constante de disociación aparente.
- **LAO-wt** Proteína periplásmica de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina (silvestre).
- **LAO-tyr** Proteína periplásmica de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina rediseñada para unir L-tirosina (mutante).
- **MD** Molecular docking (Anclaje molecular simulado).
- **TYR-R2-95** Modelo diseñado *in silico* de LAO rediseñado para unir L-tirosina.
- **PBP** Periplasmic Binding Protein (Proteína Periplásmica de Unión).
- **PDB** Protein Data Bank (Banco de Datos Estructurales de Proteínas).
- **pET-12** Plásmido-vector de expresión.
- **pUC-57** Plásmido-vector de subclonación.
- $\phi$  En un a.a. ángulo de rotación entre el enlace N(amido) - C( $\alpha$ ).
- $\psi$  En un a.a. es el ángulo de rotación entre el enlace C( $\alpha$ )-C(carbonilo).

## RESUMEN

Las proteínas son biomacromoléculas que guardan una estrecha relación entre su estructura y su función. Investigar la relación que existe entre la estructura y la función es un importante tema de estudio en biomedicina y ha sido abordado desde diferentes perspectivas, incluido el rediseño racional de proteínas. Las proteínas periplásmicas de unión (PBP's por sus siglas en inglés) son una superfamilia de proteínas muy versátiles, de tamaño pequeño y gran afinidad por una serie de ligandos muy diversos, lo cual las convierte en objetos de estudio ideales para el rediseño de proteínas.

Este estudio consistió en probar experimentalmente si mutaciones racionales diseñadas *in silico*, pueden generar en la proteína periplásmica de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina (LAO-wt) afinidad *de novo* por el ligando L-tirosina. La proteína LAO rediseñada para unir L-tirosina (LAO-tyr), se caracterizó por métodos espectrofluorométricos y de modelaje molecular, posteriormente comparó con datos de la proteína LAO-wt: La afinidad de LAO-tyr por los ligandos L-arginina y L-histidina disminuye con respecto a LAO-wt. Para el ligando L-tirosina, los datos espectrofluorométricos nos proporcionan información sobre cambios conformacionales y afinidad poco selectiva, sin embargo, aún existen dudas sobre los mecanismos moleculares.

Aunque el re-diseño de interacciones biomoleculares con el software Rosetta es una buena aproximación a la realidad, es necesario traer los diseños a la mesa de laboratorio, para obtener información que podemos y debemos integrar al momento de hacer nuevos diseños en este ciclo de retroalimentación del rediseño proteínas.

# INTRODUCCIÓN

## Estructura de las proteínas

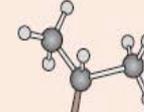
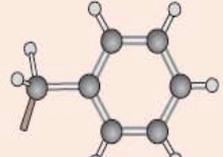
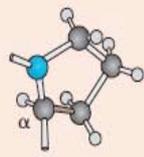
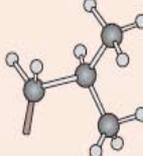
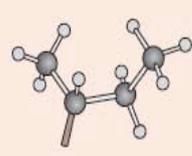
Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes, están presentes en todas las células y en todas las partes de las mismas. El ADN contiene la información codificada para su fabricación y son sintetizadas en los ribosomas. En una sola célula se pueden encontrar miles de clases de proteínas diferentes, que varían en tamaño, estructura y función [1].

Las proteínas son polímeros de aminoácidos (aa) en los que cada residuo de aminoácido está unido al siguiente a través de un tipo específico de enlace covalente. Existen 22 aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas los cuales contienen un grupo  $\alpha$ -carboxilo, un grupo  $\alpha$ -amino y un grupo sustituyente (grupo R) característico unido al carbono  $\alpha$  (Figura 1) [2].

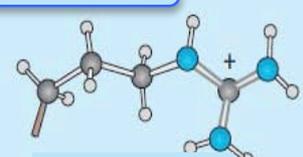
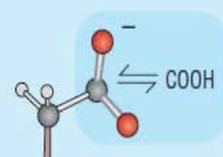
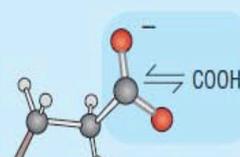
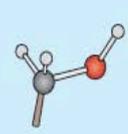
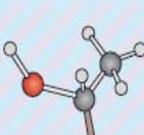
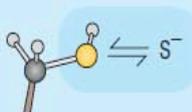
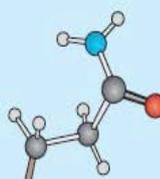
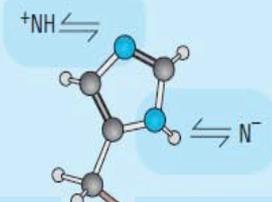
Este carbono  $\alpha$  es asimétrico en todos los aminoácidos excepto la glicina, por lo que los aminoácidos pueden existir en al menos dos formas esteroisoméricas [2]. En proteínas normalmente se encuentran los L-esteroisómeros. Todas las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas derivan de las propiedades químicas del polímero de aminoácidos. También existen D-aminoácidos, los cuales son nada comunes, se encuentran ya sea como constituyentes de polipéptidos o como metabolitos libres [3].

Carbono ● Hidrógeno ○ Nitrógeno ● Oxígeno ● Azufre ● Enlaces Sencillo | Doble | Doble parcial |

**Hidrofóbicos**

					
Alanina Ala A	Valina Val V	Fenilalanina Phe F	Prolina Pro P	Leucina Leu L	Isoleucina Ile I

**Hidrofílicos**

			
Arginina Arg R	Ácido aspártico Asp D	Ácido glutámico Glu E	Serina Ser S
			
Treonina Thr R	Cisteína Cys C	Asparagina Asn, N	Glutamina Gln, Q
			
			Histidina His, H

**Anfipáticos**

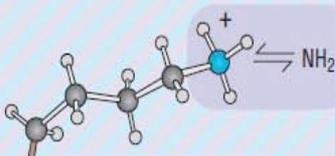
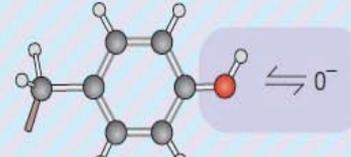
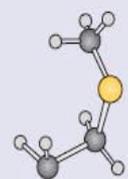
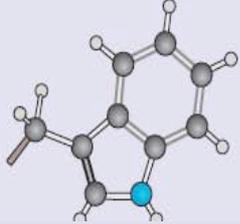
			
Lisina Lys K	Tirosina Tyr Y	Metionina Met M	Triptófano Trp W

Figura 1. Grupos R de aminoácidos encontrados en las proteínas, clasificados de acuerdo a su polaridad (no se incluyen los 22 aa). Modificado de Petsko, 2003 en *Protein Function and Structure (Primers in Biology)*.

## Niveles de organización

Se han clasificado cuatro niveles de organización estructural en proteínas: primario, secundario, terciario y cuaternario. La estructura primaria es una descripción de todos los enlaces covalentes que unen los residuos aminoácidos de una cadena polipeptídica, es decir, la secuencia ordenada de los residuos de aminoácidos. La estructura secundaria se refiere a la disposición estable que da lugar a patrones estructurales repetitivos, tales como hojas  $\beta$  o hélices  $\alpha$ . La estructura terciaria describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más cadenas polipeptídicas se dice que su disposición estructural es cuaternaria [4] (Figura 2).

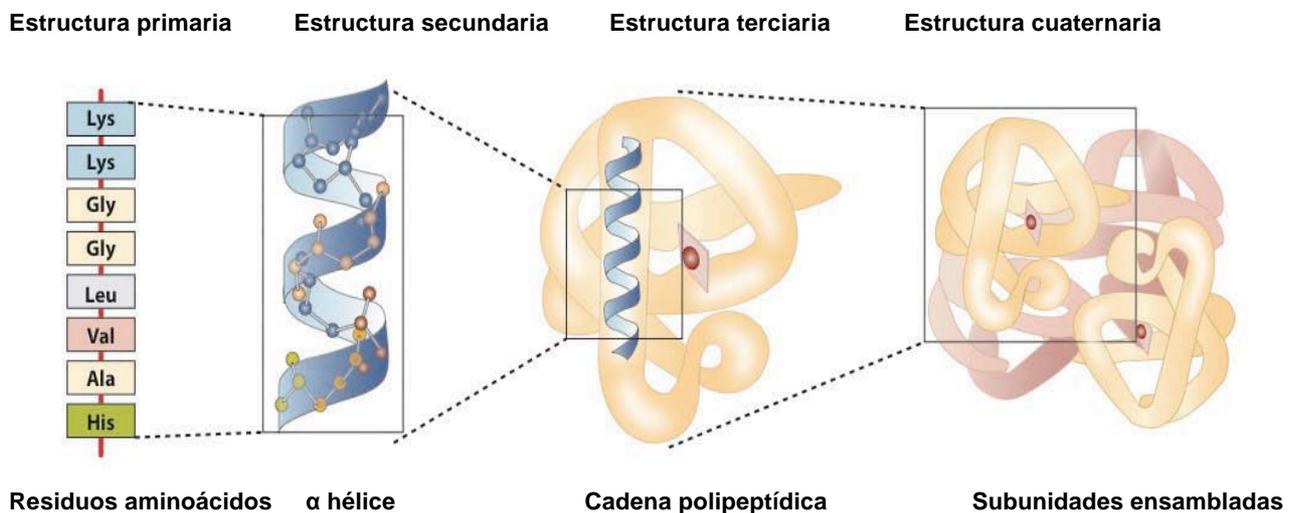


Figura 2. Niveles de organización encontrados en las proteínas. Tomado de Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*.

## Enlace peptídico y conformación de las proteínas

En una proteína, los aminoácidos están unidos covalentemente el uno al otro en un enlace denominado enlace peptídico, el cual ocurre entre el C(carbonilo) de un aa y el N(amido) del siguiente residuo. El enlace peptídico es planar y no permite rotación. No obstante, sí hay rotación entre el enlace C( $\alpha$ )-C(carbonilo), cuyo ángulo de rotación es llamado psi( $\psi$ ), y entre el N(amido) - C( $\alpha$ ) es llamado phi ( $\phi$ ). La formación este enlace se cataliza enzimáticamente en los ribosomas dirigido por un mRNA (Figura 3) [5].

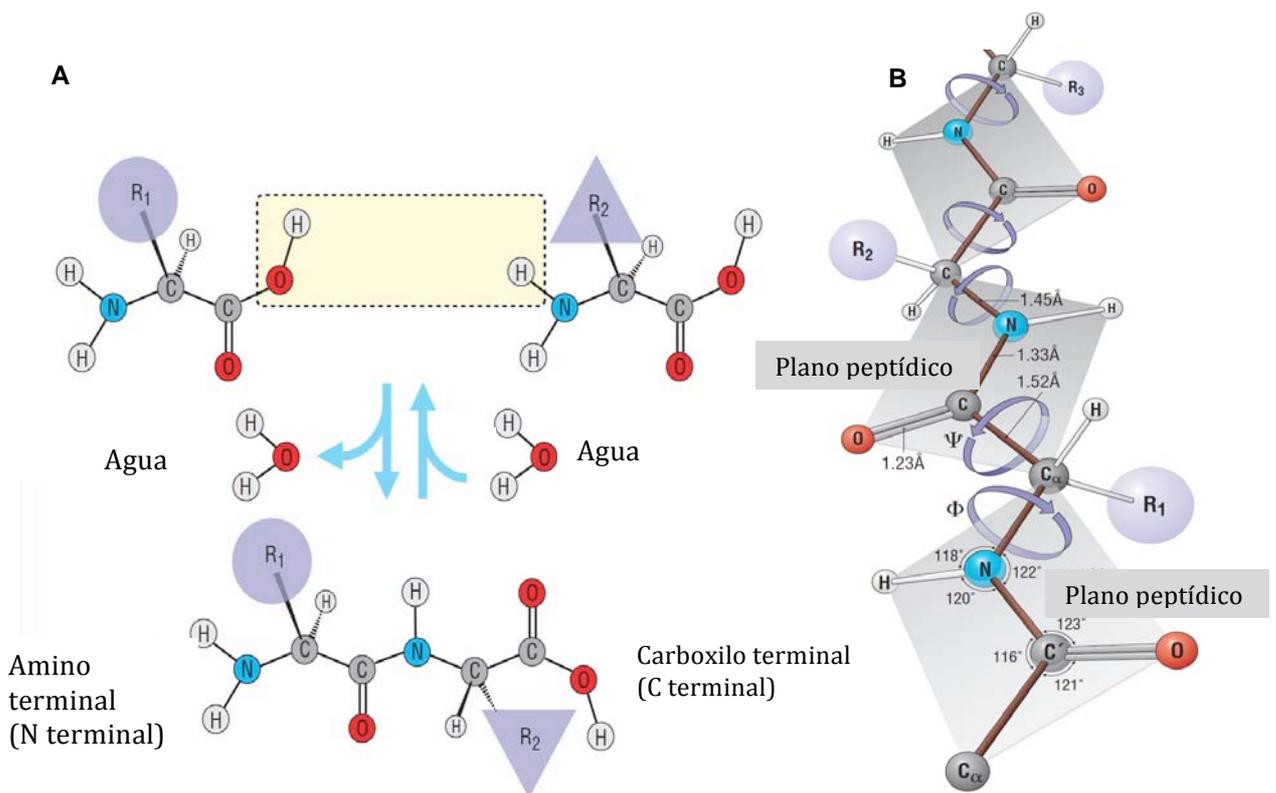


Figura 3. **A.** Formación e hidrólisis del enlace peptídico. Formación (De arriba hacia abajo) e hidrólisis (De abajo hacia arriba) requieren conceptualmente la pérdida y ganancia de una molécula de agua respectivamente. Por convención un grupo R es usado para denotar una cadena lateral. **B.** Enlaces del esqueleto de un tripéptido (en color guinda) y eje imaginario sobre el cual rotan los enlaces (en morado), en gris se muestra el plano sobre el cual se encuentran los enlaces peptídicos (plano peptídico). Modificado de Petsko, 2003 en *Protein Function and Structure (Primers in Biology)*.

El par de ángulos de enlaces  $\phi$  y  $\psi$  para cada aminoácido determina la conformación de la proteína, la cual se refiere a la disposición espacial de la misma. Las posibles conformaciones de una proteína incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. Por lo tanto un cambio conformacional puede ser, por ejemplo, el resultado de la rotación alrededor de enlaces sencillos. Debido a los choques estéricos entre los átomos de cada aminoácido, la mayoría de los ángulos de enlace ( $\phi$  y  $\psi$ ) no ocurren. Esto se puede explicar en el llamado diagrama de Ramachandran, donde cada punto representa un par de ángulos de enlaces observados en una proteína (figura 4) [7].

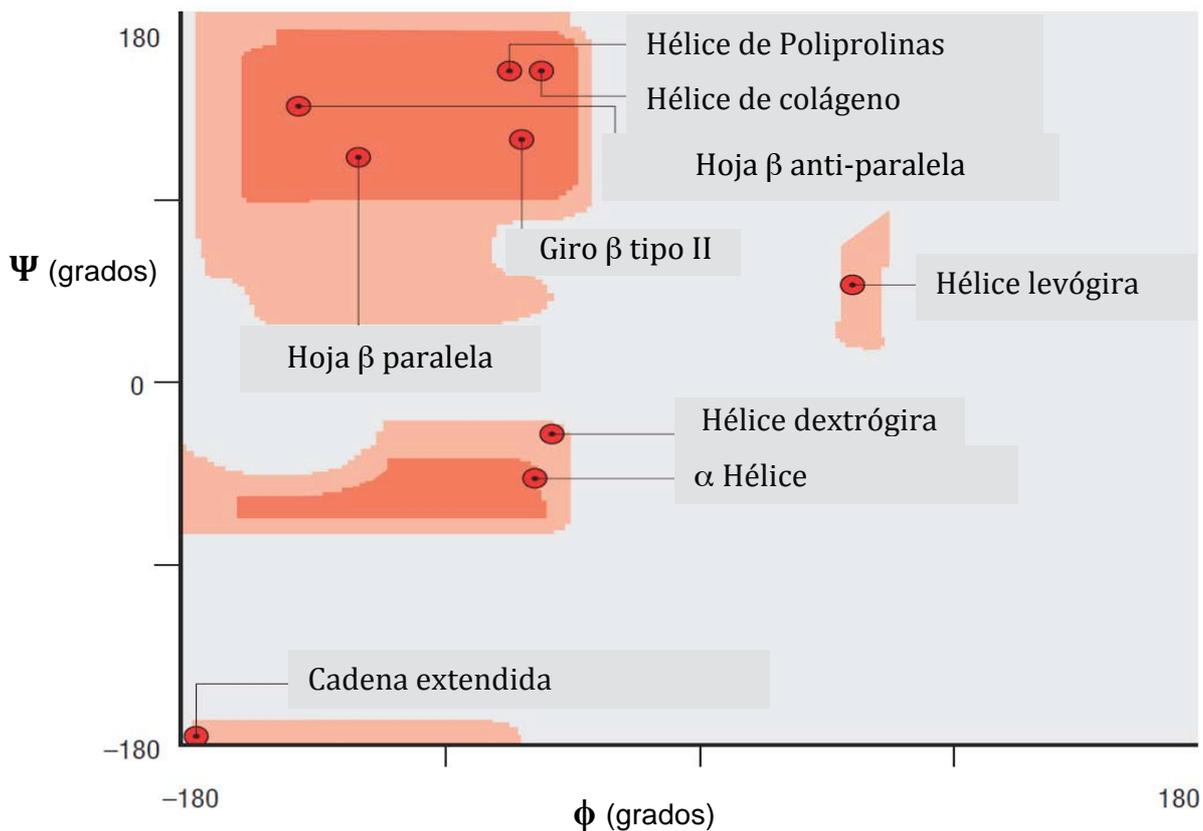


Figura 4. Grafico de Ramachandran. Se muestran en rojo las combinaciones para la torsión de los ángulos phi y psi con mínimos energéticos porque no resultan de limitaciones estéricas. En puntos rojos se observan algunas de las estructuras secundarias mas comunes. Modificado de Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*.

De entre numerosas conformaciones teóricamente posibles para una proteína que contiene cientos de enlaces sencillos, hay una o más generalmente unas pocas, que predominan en condiciones biológicas. Las conformaciones existentes en condiciones biológicas (proteína nativa) son generalmente las más estables termodinámicamente y las que poseen la menor energía libre de Gibbs. De acuerdo con el paisaje termodiámico del plegamiento de una proteína propuesto por Bryngelson, Wolynes y colaboradores (Figura 5) [8,9], existen valles y embudos energéticos que direccionan el plegamiento de una secuencia lineal de aminoácidos, a la proteína nativa en tiempos y condiciones fisiológicamente relevantes, a través de una serie de cambios conformacionales. García Colín [10] propone que este proceso ha sido optimizado por un proceso evolutivo que ha seleccionado secuencias con mínimos de frustración energética.

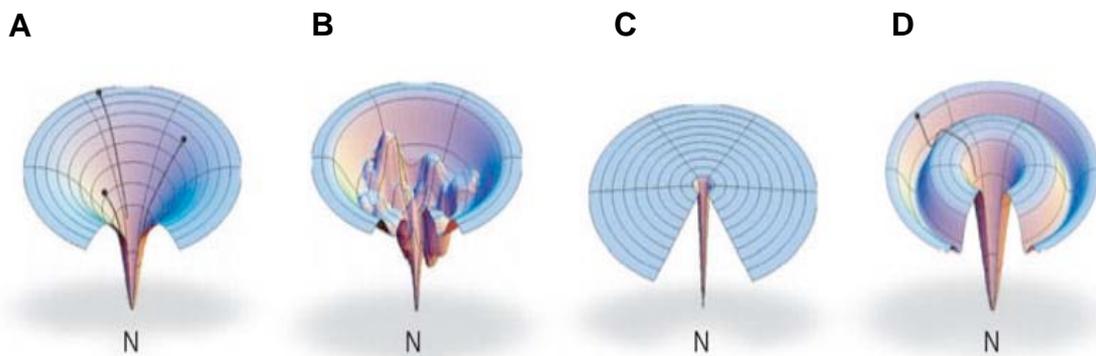


Figura 5. Paisajes energéticos del plegamiento de una proteína. **A.** Un paisaje energético “suave” con un plegamiento rápido, **B.** un panorama energético “resistente con trampas cinéticas”, **C.** Un paisaje energético “campo de golf” en el que plegamiento está dominado por búsqueda conformacional, y **D.** un paisaje energético “foso”, donde plegado debe pasar por un intermediario obligatorio. La letra N representa el estado nativo de la proteína.

Imagen tomada de: Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S., & Weikl, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annual review of biophysics*, 37, 289.

Otro tipo de cambios conformacionales de importancia son aquellos que ocurren en proteínas que unen ligandos: Las transiciones entre dos estados:

- 1) Estado abierto sin ligando unido (apoproteína)
- 2) Estado cerrado con ligando unido (holoproteína)

A estos dos estados se les llama también confórmers. Para el caso de dos proteínas periplásmicas de unión se ha propuesto un paisaje energético que oscila entre ambos confórmers (apo-estado y holo-estado) (Figura 6) [11].

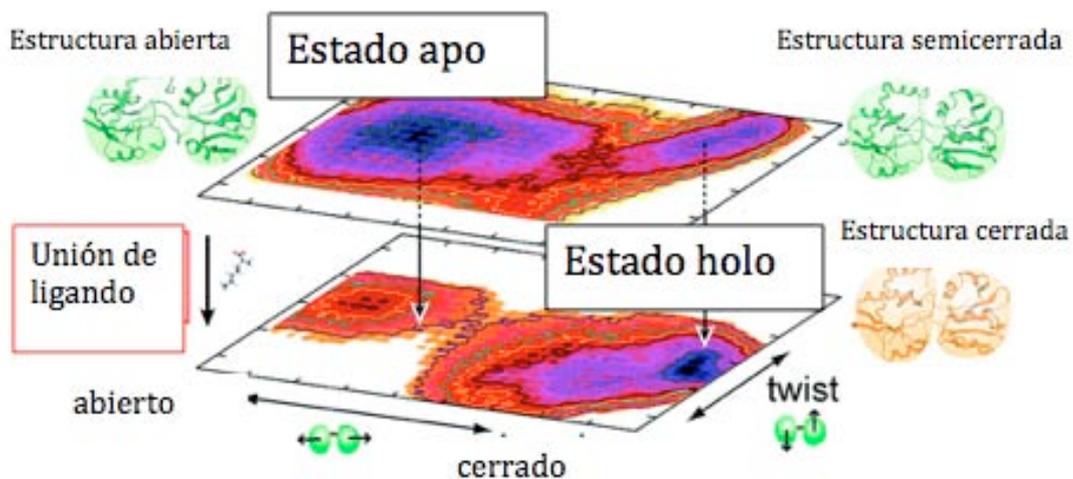


Figura 6. Perfiles energéticos de la transición conformacional apo-holo, generados por un enfoque de simulación molecular. Modificado de: Kondo, H. X., Okimoto, N., Morimoto, G., & Taiji, M. (2011). Free-energy landscapes of protein domain movements upon ligand binding. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(23), 7629-7636.

## Funciones de proteínas

Las funciones de las proteínas son sumamente variadas, las cuales incluyen actividades enzimáticas, de transporte, de regulación (Figura 7), estructurales, hormonales, de motilidad, por mencionar algunas, no obstante, las funciones de las proteínas son específicas, interactuando con alguna proteína o ligando específico con exquisita selectividad [8].

Algunas otras funciones de las proteínas son las siguientes:

Determinadas proteínas tienen una función defensiva, ya que crean anticuerpos y regulan factores contra agentes extraños o infecciones. Algunas toxinas bacterianas o venenos de serpientes también son proteínas con funciones defensivas [9]. Otras proteínas forman estructuras celulares como las histonas, que junto con el DNA forman la cromatina [10].

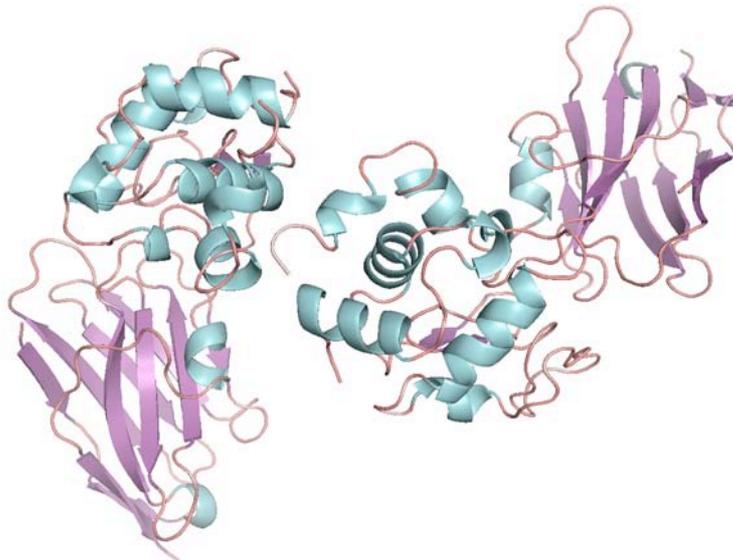


Figura 7. Estructura cristalográfica del dominio PRDM9 de H3K4ME2 y ADOHCY: una proteína con función reguladora del proceso de recombinación homóloga. PDB: 4C1Q. Representación "Cartoon".

También hay proteínas que actúan como receptores formando parte de las membranas celulares o facilitan el transporte de sustancias, tal es el caso de las acuaporinas, una familia de proteínas que facilitan el paso de moléculas de agua a través de la membrana [11]

Si fuera necesario, las proteínas son también una fuente de energía para el organismo, a través de su incorporación y oxidación en el ciclo de Krebs, pudiendo aportar hasta 4.0 kcal por gramo. Ejemplos de la función de reserva de las proteínas son la lactoalbúmina de la leche o la ovoalbúmina de la clara de huevo, la hordeína de la cebada y la gliadina del grano de trigo [12]. La contracción de los músculos (en un proceso cíclico dependiente de la hidrólisis de ATP) a través del complejo la miosina de tipo II con interacción de la actina es una función de las proteínas implicada en el movimiento (Figura 8) [13]. Ejemplos de proteínas que realizan funciones de transporte son la hemoglobina y la mioglobina, proteínas transportadoras del oxígeno en la sangre de los organismos vertebrados y los músculos respectivamente [1].

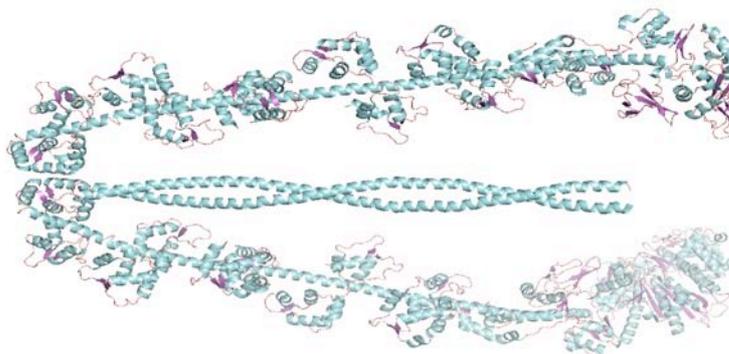


Figura 8. Estructura cristalográfica de la miosina V en estado inhibido, una proteína con función contráctil. Representación "Cartoon" PDB: 2DFS.

## **Relación estructura función de las proteínas**

El plegamiento de una proteína permite interacciones entre los aminoácidos que pueden encontrarse distantes unos de otros en la secuencia primaria de la proteína. Así como cambios en la secuencia primaria de una proteína pueden llevar a estructuras tridimensionales con topologías diferentes. A Alteraciones (mutaciones) en la secuencia lineal de aa pueden llevar como consecuencia cambios a diferentes niveles, ya sea que estos cambios no sean perceptibles biológicamente o incluso podrían llegar a ser mutaciones letales. Esta relación estructural y funcional, no está completamente resuelta y su estudio es crucial en bioquímica de proteínas [14].

Para que una proteína lleve a cabo su función biológica esta se debe encontrar en una conformación estructuralmente “correcta”. En algunos casos, es la transición entre conformaciones la que permite a las proteínas ser biológicamente funcionales. Las características de este(os) cambio(s) conformacional(es) están ligadas íntimamente a la estructura tridimensional de la proteína, dichos cambios conformacionales son también susceptibles de la unión de un ligando a la proteína, el cambio en la concentración de algún metabolito, o el pH por mencionar algunos [15]. Mediante técnicas especializadas es posible caracterizar conformaciones biológicamente funcionales y de esta manera determinar el equilibrio entre una conformación y otra y así conocer más sobre la relación estructura-función de las proteínas en función de alguna variable [16].

## **Las proteínas periplásmicas de unión: PBPs**

El espacio periplásmico de las bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* posee una gran variedad de proteínas con un amplio rango de funciones, entre ellas están las proteínas de unión a sustratos (SBP), asociadas principalmente con el metabolismo de los nutrientes, transporte, quimiotaxis, resistencia a antibióticos y utilización de la energía. Los sistemas bacterianos de transporte periplásmico de tipo ABC se componen de una proteína periplásmica de unión (PBP, por sus siglas en inglés Periplasmic Binding Protein) (Figura 9) que une al ligando y un complejo membranal constituido por dos proteínas integrales de membrana y dos proteínas que hidrolizan ATP [17].

### **La clasificación de las PBP's.**

Una clasificación de las PBP's toma en cuenta el número y disposición de las láminas  $\beta$  que conforman la región núcleo de cada lóbulo y se agrupan en dos clases: Las PBP's clase I tienen 6 laminas  $\beta$  mientras que las de la clase II presentan 5 láminas  $\beta$ . (Figura 10)

Otra clasificación toma en cuenta el número de segmentos polipeptídicos que unen ambos lóbulos. Sin embargo existe una clasificación mas reciente, donde se incluyen proteínas de unión a sustrato de los tres dominios de la vida, entre ellas PBP's, la cual toma en cuenta características de sus estructuras tridimensionales [18].

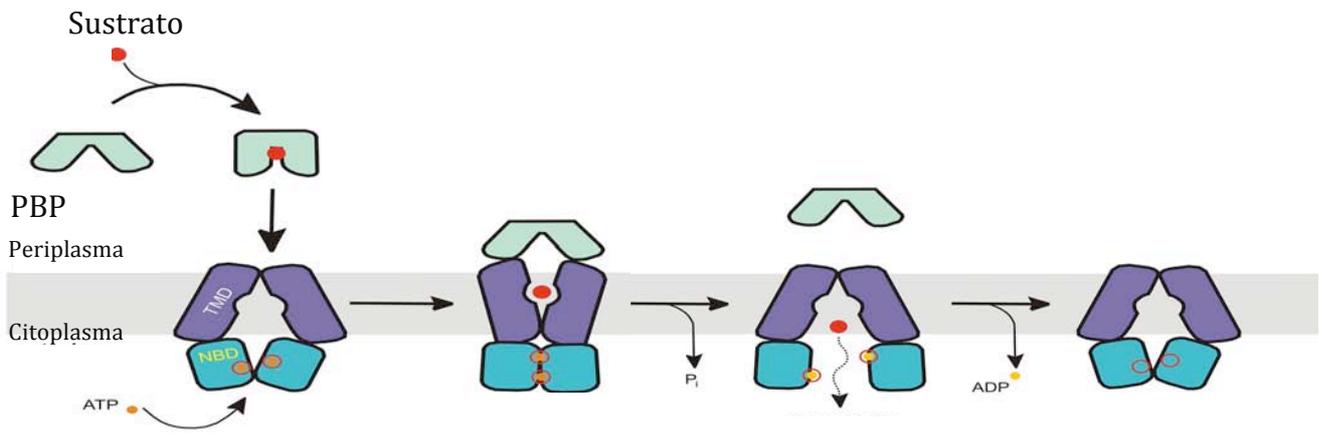


Figura 9. Mecanismo de transporte para los importadores de ABC.

La PBP (en verde) se une al ligando (en rojo) ocasionando un cambio conformacional de su estructura abierta a su estructura cerrada. La proteína en su conformación cerrada reconoce el complejo transmembranal (en morado) y este reconocimiento ocasiona un cambio conformacional en el componente de membrana. A continuación se acopla la hidrólisis de ATP por las subunidades de ATPasa (en turquesa) para que ocurra la translocación del sustrato del periplasma al citoplasma, regresando así a las conformaciones iniciales de las proteínas. *Adaptado de Oldham, M.L.; A.L. Davidson; J. Chen. 2008.*

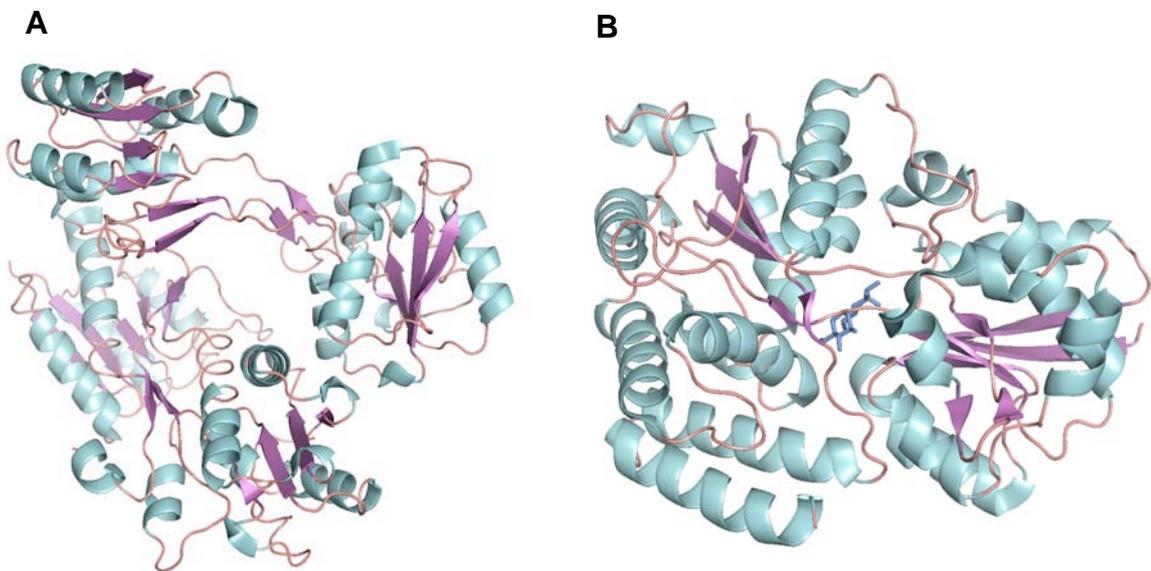


Figura 10. Clasificación de las PBP's fundada en número y disposición de láminas  $\beta$  presentes en cada lóbulo (en color violeta)

**A)** proteína de clase II: Proteína de unión a maltodextrina (mutante TRP-230-ARG) PDB: 1MPC.

**B)** proteína de clase I: Proteína de unión a arabinosa con ligando PDB: 2WRZ

## **Proteína de unión a lisina, arginina y ornitina (LAO-wt)**

La estructura cristalográfica de la proteína de unión a L-lisina, L-arginina y L-ornitina de *Salmonella typhimurium* (Figura 11), la cual se encuentra en el espacio periplásmico, fue descubierta a finales de 1991 por C. H. Kang y colaboradores en la universidad de Berkeley, California [19]. La resolución a la que se realizaron los experimentos (2.7 Å) muestra que la proteína es una estructura bi-lobulada unida por una estructura tipo bisagra y que su estructura topológica difiere de otras proteínas de unión a aminoácidos pero es similar a proteínas de unión a fosfato y maltosa. LAO posee 238 aminoácidos y consta de un primer lóbulo (A) discontinuo formado por los residuos 1-88 y 195-238, el segundo lóbulo (B) es continuo y lo forman del residuo 93-185. Cada dominio a su vez está formado por 5 láminas  $\beta$ , cuatro paralelas y una antiparalela, rodeada por 4 hélices alfa ( $\alpha$ ) y están conectados por dos segmentos polipeptídicos (la estructura tipo bisagra consta de los residuos 89-92 y 186-194). Se han identificado dos conformaciones: una abierta sin ligando unido y otra cerrada con ligando unido. El cambio conformacional que sufre LAO entre el estado abierto y el estado cerrado, es un movimiento de cuerpo rígido de un lóbulo con respecto al otro, en el cual la cadena principal de ambos prácticamente no cambia. Este movimiento es una rotación de 52° alrededor de un eje imaginario que se ubicaría en la región de la bisagra. Es decir, el cambio conformacional entre un estado y otro (“estado abierto” y “estado cerrado”), está dado principalmente por un movimiento en la bisagra que conecta a los dominios (Figura 12), el cual se puede seguir mediante fluorescencia intrínseca [20].

Se conocen cuatro ligandos fisiológicos (todos de alta afinidad) para la LAO: L-arginina, L-lisina, L-ornitina y L-histidina, con constantes de disociación ( $K_d$ ) de 14, 15, 30 y 500 nM respectivamente [46]. En estudios de competencia de ligando se han probado compuestos similares a estos aminoácidos como: ácido L-arginínico, L-glutamina y los enantiómeros-D de los ligandos arginina, lisina y ornitina. Todos han mostrado ser substratos de baja afinidad comparados con los ligandos fisiológicos ( $K_d \approx$  "orden mM") [46]. Tampoco se ha reportado que el aminoácido L-tirosina se una a LAO. Estos datos indican que en LAO el reconocimiento del ligando está determinado, además de por interacciones polares, por la forma y el tamaño. Los ligandos de LAO comparten las características de tener carga positiva, lo que sugiere que esta carga genera una importante contribución electrostática para la unión [11, 13].

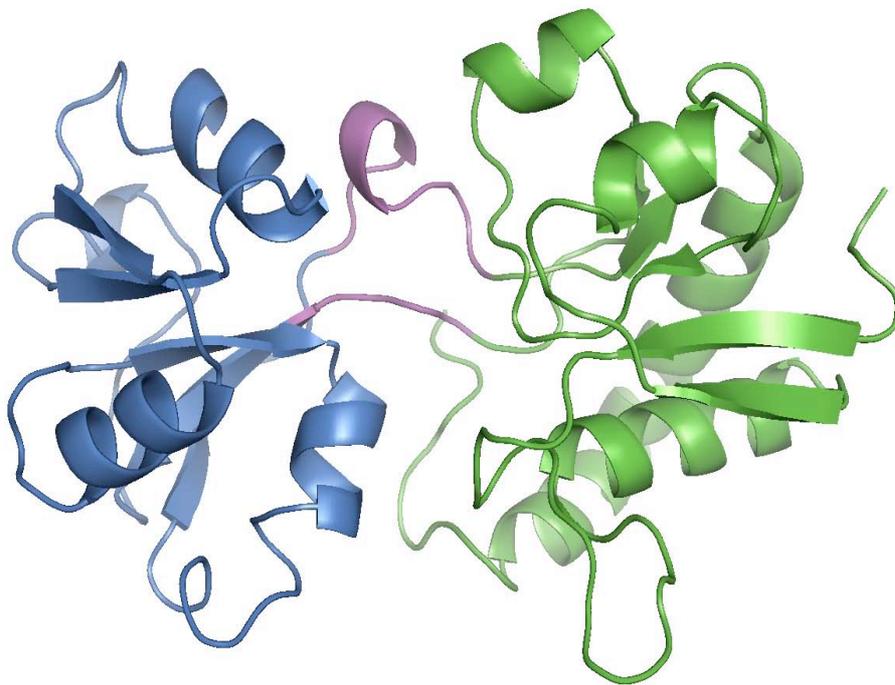


Figura 11. LAO-wt en el estado abierto (sin ligando). Lóbulo I (verde), lóbulo II (azul) y región bisagra que une a los dominios (morado). PDB: 2LAO. Representación "Cartoon".

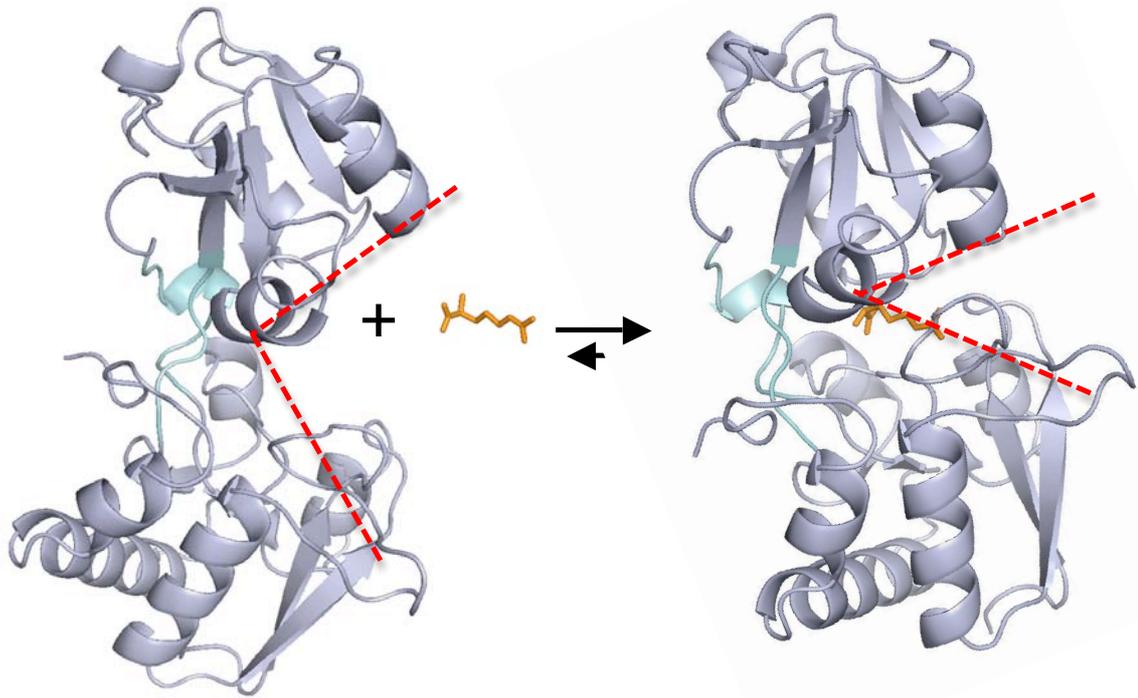


Figura 12. Cambios conformacionales en LAO. **A:** LAO en el estado abierto. Representación: “caricatura” (PDB: 2LAO). **B:** LAO en el estado cerrado (ligando arginina) en naranja) . Representación: “caricatura” (PDB: 1LAF).

Es importante mencionar que aunque en la familia de las PBPs no se ha encontrado conservación en la estructura primaria, existe una alta conservación en la estructura terciaria, la cual consiste en dos dominios globulares conectados por una “región bisagra” [22].

## Rediseño e ingeniería de proteínas

El rediseño de proteínas consiste poner a prueba nuestro entendimiento sobre las relaciones entre la estructura y función de las proteínas con el fin de modificar o crear nuevas funciones a partir de la estructura original, en particular algunos avances han permitido manipular las secuencias peptídicas para obtener nuevas proteínas tanto *de novo*, como nuevas modificaciones de las proteínas naturales [23].

El rediseño racional de proteínas se basa en el conocimiento detallado de la estructura y función de las proteínas para proponer nuevas variantes; no obstante, es necesario el conocimiento previo de la estructura tridimensional de la proteína para así manipular la secuencia y obtener mejores propiedades o mejor estabilidad. En resumen el flujo de trabajo en el rediseño de proteínas consiste en los pasos de acuerdo a la figura 13 [24].

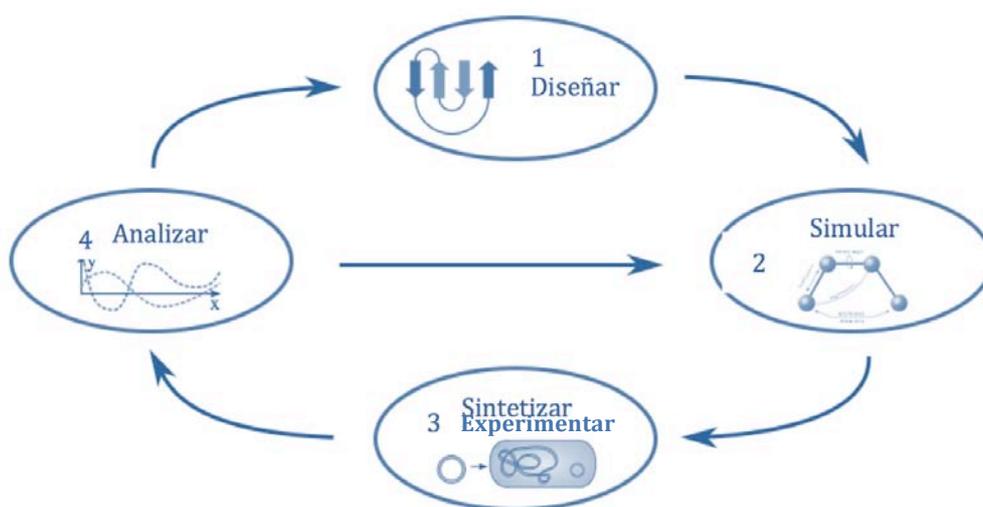


Figura 13. Pasos conceptuales aplicables en el rediseño racional de proteínas

1. *DISEÑAR*: Realizar cálculos computacionales para obtener una secuencia de aminoácidos deseada.
2. *SIMULAR*: Hacer simulaciones de dinámica molecular (MD) en los que se observe que la proteína realice la actividad deseada.
3. *SINTETIZAR* la secuencia del gen en un plásmido-vector, expresar la proteína y *EXPERIMENTAR*.
4. *ANÁLISIS* de la evidencia computacional y evidencia experimental.

El problema del rediseño de las proteínas se ha enfocado en realizar las mutaciones sobre el sitio de unión a ligando principalmente. Localizar el sitio de unión de un ligando en una estructura proteica es un problema complejo que ha sido abordado por el método computacional conocido como anclaje molecular simulado (MD por sus siglas en inglés), el cual, no solo examina las conformaciones espaciales con propiedades fisicoquímicas favorables para la interacción entre una proteína y su ligando, si no que también estima la energética de la interacción. El anclaje molecular simulado, depende de una función que calcula las conformaciones espaciales, mientras que mide la energética de la interacción, y así determina cuales conformaciones poseen mayor probabilidad de protagonizar un complejo biológicamente significativo [25].

En nuestro laboratorio, utilizamos una versión reciente del programa ROSETTA, llamado ROSETA-LIGAND, el cual cuenta con una función de evaluación de las interacciones proteína-ligando. De hecho el programa Rosetta es una función parametrizada proveniente de campos de fuerza, que son funciones que

describen las interacciones covalentes y no covalentes de una proteína. Este programa ha permitido encontrar la secuencia de aminoácidos requerido para plegar una proteína, por lo que ahora, es importante utilizar esta información, para hacer diseños de interacciones proteína-ligando. [26]

Las modificaciones al programa Rosetta para hacer diseños de interacciones están basadas en lo siguiente:

- i. Un potencial de Lennard Jones 12-6 estándar para modelar interacciones de atracción con pozos de dispersión y radios de van der Waals obtenidos del campo de fuerza CHARMM27.
- ii. Un término de repulsión que conecta la amplitud y la pendiente con el potencial  $12E-6$  a  $1E 0$ , y que después es lineal hasta que dos átomos se encuentran a  $0 \text{ \AA}$  de distancia.
- iii. Un término de solvatación similar al de Lazaridis–Karplus con un modelo de solvatación implícita.
- iv. Un potencial explícito de puentes de hidrógeno.
- v. Un modelo de Coulomb con una constante dieléctrica dependiente de la distancia que usa las cargas parciales del campo de fuerza CHARMM27.

## Técnicas en el estudio de las proteínas

Existen técnicas tales como cristalografía de rayos X, [27] o Resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) [28], que permiten una caracterización detallada al nivel de resolución atómica. Aunque proporcionan alguna información sobre la energética de unión, normalmente ofrecen una descripción estructural de la interacción.

Por otra parte, técnicas espectroscópicas y calorimétricas, que proporcionan información global sobre el proceso de unión, se emplean para llevar a cabo una caracterización termodinámica global [29,30]. Una caracterización global de una reacción intermolecular implica la determinación de la estequiometría y el cambio de los potenciales termodinámicos entre el estado inicial y final: afinidad, energía de Gibbs, entalpía y entropía de unión. Los parámetros del equilibrio de unión se obtienen fenomenológicamente mediante regresión no-lineal de la señal medida experimentalmente (calor, absorbancia, fluorescencia, etc.) proporcional al avance de la reacción. Estas técnicas proporcionan, por tanto, una descripción energética de la interacción. Adicionalmente, cambiando las variables experimentales (temperatura, pH, etc.) y modificando los ligandos de unión, es posible obtener información sobre las interacciones atómicas determinantes en el proceso de unión (enlaces de hidrógeno, van der Waals, electrostáticas, etc).

## La espectroscopia de fluorescencia

También llamada espectrofotometría; es una clase de espectroscopia electromagnética, la cual mide la fluorescencia de una muestra. Esto implica el uso de un haz de luz (normalmente de luz UV) que excita a los electrones en las moléculas y que posteriormente genera la emisión de fotones. El equipo que mide la fluorescencia es llamado fluorómetro.[31]

La espectrofotometría se ocupa esencialmente de estados electrónicos y vibratorios de las moléculas. Normalmente los electrones de las moléculas poseen un estado fundamental electrónico ( $S_0$ ) y uno o más estados electrónicos excitados de una energía mayor ( $S_{1,2}$ ). Cuando los electrones son excitados por la absorción de un fotón, desde su estado electrónico fundamental ( $S_0$ ), a uno de los diferentes estados vibratorios en el estado electrónico excitado ( $S_{1,2}$ ), estos vuelven a declinar a alguno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental emitiendo un fotón en un proceso llamado luminiscencia. 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 es rápido. Por otro lado, en la fosforescencia el electrón excitado presenta un spin igual al del estado fundamental con el que se encuentra apareado. [32]

En un experimento, las diferentes longitudes de onda de luz fluorescente emitidas por una muestra se miden usando un monocromador, sosteniendo la

luz de excitación en una longitud de onda constante. Esto es llamado espectro de emisión. En un espectro de excitación por el contrario, la luz emitida se mantiene constante en una longitud de onda, y la luz de excitación es leída a través de diferentes longitudes de onda. [35,36]

La luz procedente de una fuente de excitación pasa a través de un filtro o un monocromador y golpea la muestra. Una porción de la luz incidente es absorbida por la muestra. La luz fluorescente es emitida en todas las direcciones. Algunas de estas luces fluorescentes pasan a través de un segundo filtro o un monocromador y alcanzan un detector, el cual es usualmente colocado a noventa grados de la incidencia del haz de luz para minimizar el riesgo de reflejo de la luz buscada en el detector.

Existen varias fuentes de luz pueden ser usadas como fuentes de excitación, incluyendo láseres, fotodiodos y lámparas; faros de xenón y lámparas de vapor de mercurio. [36]

El diagrama de Jablonski (Figura 14) permite visualizar los procesos de una molécula asociados a la irradiación con luz: absorción fotónica y excitación del estado fundamental ( $S_0$ ) a un nivel energético electrónico, vibracional o rotacional superior ( $S_{1,2}$ ), y recuperación del estado fundamental ( $S_0$ ) a través de diferentes estados electrónicos singlete  $S_1$  y/o triplete  $T_1$ , con emisión de fluorescencia o fosforescencia. [37]

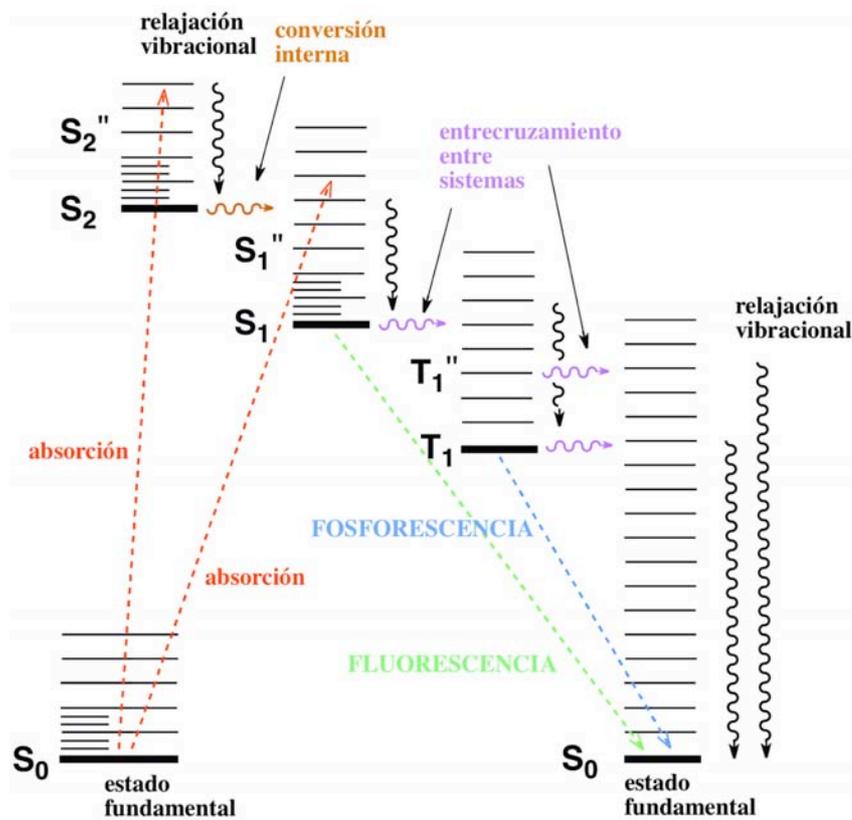


Figura 14. Diagrama de Jablonski. Las transiciones no radiativas son indicadas por medio de flechas onduladas y las transiciones radiativas por medio de flechas rectas. Los estados vibracionales basales de cada nivel electrónico se indican con líneas mas gruesas, los estados vibracionales elevados, se indican con líneas delgadas.

## **ANTECEDENTES DEL DISEÑO (TYR-R2-95)**

*Nuestro modelo de estudio:* Como parte de la tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, en 2007 Daniel Adriano Silva Manzano diseñó *in silico* una mutante de LAO [38], a la cual se le realizaron 5 mutaciones (Tyr14Cys, Ser70Cys, Ala90Asp, Gln160Gly, Asp161Pro) para optimizar la energía de interacción del sitio activo de LAO con el aminoácido L-tirosina. La proteína de unión a L-lisina L-arginina y L-ornitina fue rediseñada mediante el software ROSETTA, a partir del cual se generaron varias estructuras de las cuales se tomó *TYR-R2-95* para realizar los experimentos de esta tesis.

## **HIPÓTESIS**

Los métodos de rediseño e ingeniería de proteínas empleados en los antecedentes de este trabajo son lo suficientemente robustos para poder generar afinidad *de novo* en la proteína LAO por el ligando L-tirosina.

## JUSTIFICACIÓN

Existen muchas razones para rediseñar proteínas: en medicina y la industria, la habilidad para rediseñar proteínas con funciones en un rango mas amplio de condiciones o para desarrollar proteínas con funciones totalmente nuevas, tiene un potencial enorme: Pensar en el rediseño de proteínas para hacer una proteína terapéutica o para corregir una proteína que causa una enfermedad porque tiende a agregarse o a plegarse inadecuadamente es una de entre muchas aplicaciones. Rediseñar a la proteína LAO-wt tiene ventajas sobre otras proteínas por ser miembro de una superfamilia de proteínas periplásmicas con características que la hacen ideal para el rediseño, tales como su tamaño, su relativa fácil manipulación y purificación, así como la información termodinámica que poseemos.

Además el diseño racional de las proteínas, permite que el conocimiento obtenido se ligue para construir un entendimiento mas completo de las fuerzas que dirigen el plegamiento de una proteína determinada. Estos avances en el diseño de proteínas podrían ayudar a la construcción de otras macromoléculas autoorganizadas. Uno de los fines en el diseño de proteínas es conocer si podremos descubrir estructuras de proteínas viables que la evolución simplemente omitió.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal:**

Obtener evidencia experimental de la afinidad reportada *in silico* en la proteína LAO-tyr por el aminoácido L-tirosina.

### **Objetivos particulares:**

- Subclonar el gene que codifica para la proteína LAO-tyr de un vector de clonación (vector pUC-57) a un vector de expresión de proteínas (vector pET-12).
- Estandarizar las condiciones de purificación de la proteína LAO-tyr, por similitud con la proteína silvestre (LAO-wt)
- Expresar la proteína LAO-tyr y obtener las constantes de disociación ( $K_d$ 's) por medio de titulaciones de fluorescencia para los ligandos L-Arginina, L-Histidina, y L-Tirosina

## MÉTODOS

### Construcción del gene de la mutante LAOY-tyr

La mutante de la proteína silvestre que contiene las cinco modificaciones fue sintetizada por la compañía GenScript (Piscataway NJ, USA), el gene fue insertado en un vector pUC-57 con los sitios de restricción NdeI y BamHI para su posterior subclonación.

Los genes que expresan la proteína LAO-tyr (ArgT-Y), se subclonaron en el vector de expresión pET-12. Para llevar a cabo la subclonación de LAO-Y se realizó una digestión de 6 h a 37° C con las enzimas de restricción BamHI y NdeI (*de NewEngland Biolabs*) sobre el vector pUC-57, el cual contenía el inserto (ArgT-Y). El inserto se purificó mediante el kit de extracción *QIAquick Gel* y se ligó a 16° C durante 24 h con la T4 DNA ligasa (*de NewEngland Biolabs*) con el vector linearizado de expresión pET-12 (Figura 15). Posteriormente se realizaron ensayos de restricción y se mandó secuenciar el inserto al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para realizar un BLAST en EMBOSS Needle (online) y verificar que la secuencia fuera la deseada (Condiciones en tabla 1)

Enzima de restricción (BamHI y NdeI)	1µL (10 unidades)
DNA	1µL
10X NEBuffer	5µL
Volumen total de la reacción	50µL
Tiempo de incubación	6h
Temperatura de incubación	37 °C

Tabla 1. Protocolo de digestión DNA. Para optimizar la reacción endonucleasa de las enzimas se extendió el tiempo de incubación con respecto a las sugerencias de *NewEngland Biolabs*.

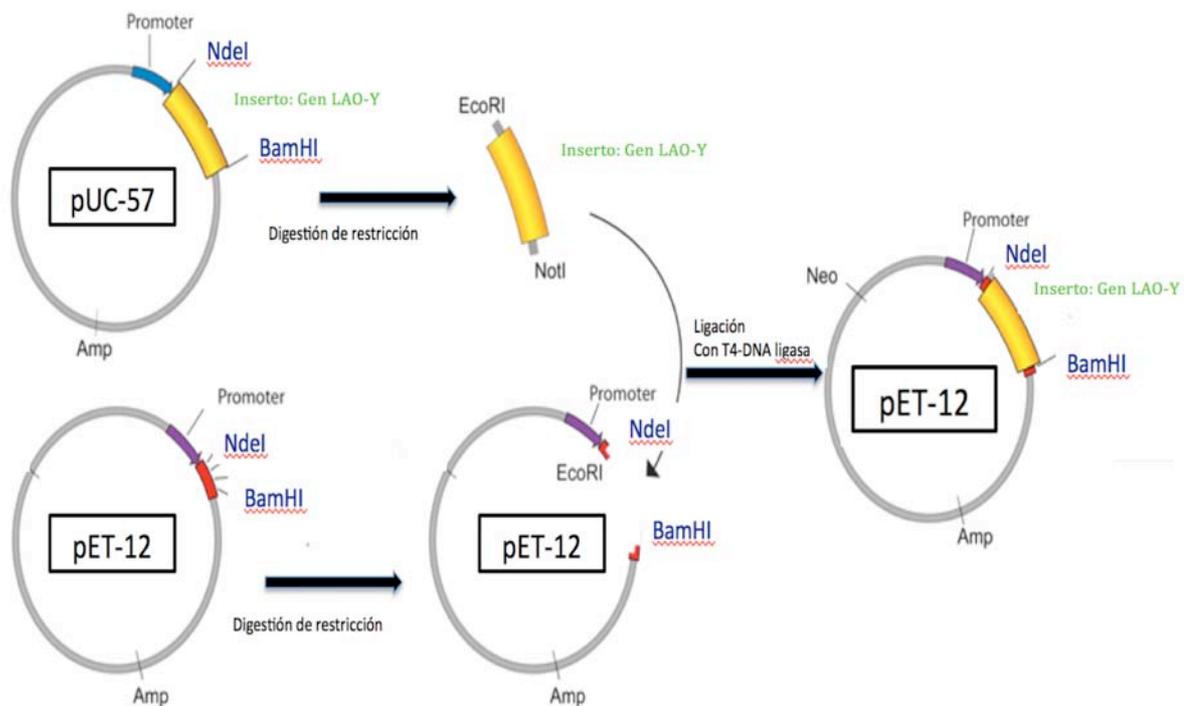


Figura 15. Diagrama de la subclonación del gen ArgT-Y del vector pUC-57 al vector pET-12, utilizando las enzimas de restricción NdeI y BamHI, así como la ligasa T4-DNA. Todas las enzimas de “NewEngland Biolabs”.

### Sobreexpresión de LAO-tyr

Para sobreexpresar la proteína LAO-tyr se transformaron 100  $\mu$ L de células de *Escherichia coli* (densidad óptica 0.8 a 550 nm) de la cepa BL21 A1, con el plásmido pET-12, el cual portaba el gen que expresa la proteína LAO-tyr, así como resistencia al antibiótico ampicilina. Con las células transformadas se inocularon dos tubos con 10 mL de medio LB + 10  $\mu$ L de ampicilina cada uno y se incubaron por 12 h. Con los dos tubos de 10 mL se inocularon dos matraces con 250 mL de medio YT2X + 250  $\mu$ L de ampicilina y se incubaron 1hr, para después ser transferidos a dos matraces con 750ml de medio YT2X + 750 $\mu$ L de ampicilina, esta vez incubándose hasta que alcanzaron una

densidad óptica a 550 nm de  $0.9 \pm 0.1$ . Posteriormente a cada matraz se le agregaron 4gr de arabinosa y se dejaron en la incubadora por 6 hrs. Esto con el fin de inducir la expresión de LAO-tyr. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C y 300 rpm.

Las células en el medio YT2X fueron cosechadas en 6 tubos con 330 mL c/u a 5000 rpm durante 15 min y el pellet se resuspendió en 50 mL (por tubo) de solución Tris 50mM pH= 7.5 para lavar el medio remanente. Las células resuspendidas se juntaron en solo 2 tubos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15min para posteriormente volverse a resuspender, ahora en 150 mL (por tubo) de solución de sacarosa al 20% y 10 mM de acetato de potasio pH=5.1. Las células en solución se dejaron reposar en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos.

Nuevamente se resuspendió el paquete celular, esta vez en de solución 10 mM de acetato de potasio sin sacarosa (30 mL por tubo), con el objetivo de provocar un choque osmótico y permitir que LAO-tyr se liberara del periplasma celular.

### **Purificación de LAO-tyr**

Los 60 mL de sobrenadante que contienen a la proteína fueron concentrados a un volumen de 10 mL en un tubo Amicon 8400. Con el fin de desnaturalizar a LAO-tyr y permitir la liberación de ligando fisiológico, se le agregó una solución de cloruro de guanidina (GdnCl) 2 M hasta un volumen de 50ml y se

reconcentró hasta 10 mL. Este proceso se repitió 5 veces. Para poder renaturalizar a LAO-tyr se tuvo que eliminar el GdnCl repitiendo el proceso anterior pero esta vez con una solución amortiguadora bis-tris-tropano 5 mM, pH= 8.5. Para el tubo Amicon se utilizaron membranas de celulosa de 5000 kDa.

Para purificar LAO-tyr se utilizó una columna de intercambio aniónico Source15Q equilibrada con bis-tris-propano 5 mM pH= 8.5 conectada al equipo HPLC Waters 600, en la cual fueron inyectados los 10 ml de solución provenientes del Amicon, previamente filtrados. Una vez inyectada la muestra en la columna, se aplicó un gradiente de 0% a 30% de una solución NaCl 300 mM en un tiempo de 90 minutos. La proteína eluyó a una concentración de 50 mM (25% de NaCl) y las fracciones con la proteína se concentraron en un tubo Amicon de 4 mL hasta un volumen de 2 mL aproximadamente por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. La muestra se diluyó hasta un volumen de 4 mL aprox con una solución 10 mM hepes pH= 8.5 y se reconcentró hasta un volumen de 2 mL. Este último paso se repitió 5 veces con el fin de eliminar el NaCl proveniente del gradiente del HPLC y dejar a la proteína en amortiguador requerido para los experimentos. Todos los experimentos con LAO-tyr se realizaron en 10 mM hepes pH= 8.5.

### **Cuantificación de la proteína**

La proteína se cuantificó por el método del ácido bisinconínico y por Nanodrop2000, ambos resultados fueron coincidentes. Se obtuvo un rendimiento de 22 mg/L.

## Experimentos de fluorescencia

Para realizar los experimentos de fluorescencia se utilizó un equipo espectrofluorómetro ISS PCI (ISS Inc., Champine, IL, USA) acoplado a un controlador de temperatura (Quantum Northwest). Las rejillas (slits) de paso de luz utilizadas para la excitación y la emisión fueron de 1 y 2 mm respectivamente.

### Determinación de las $K_d$ de LAO-tyr por fluorescencia.

Para determinar las  $K_d$ 's de la proteína LAO-tyr, se realizaron experimentos a una concentración de 10 $\mu$ M de proteína en un volumen final de 2 mL. En todas las titulaciones, las soluciones de ligandos utilizados fueron de 5 mM de L-Arginina, 5 mM de L-Histidina, 5 mM de L-Ornitina y 2.48 mM de L-Tirosina, las cuales fueron adicionados en alícuotas de varían desde 0.5 a 5 $\mu$ L, sin exceder el 5% del volumen final, en amortiguador 10 mM hepes pH= 8.5 a 25 °C La longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) fue 290 nm para L-arginina, L-histidina y L-ornitina y 295 nm para L-tirosina. La longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) fue en el rango de 315–335 nm para L-arginina, L-histidina y L-ornitina y 320-340 nm para L-tirosina. Los cambios en los espectros de fluorescencia fueron analizados para obtener la  $K_d$  del complejo proteína-ligando, utilizando la siguiente ecuación uno [39]:

$$\frac{[PL]}{[P_{tot}]} = \frac{[K_d] + [P_{tot}] + [L_{tot}] - \sqrt{K_d + [P_{tot}] + [L_{tot}]^2 - 4[P_{tot}][L_{tot}]}}{2 [P_{tot}]}$$

**Ec. 1** Ecuación general de unión. Donde  $P_{tot}$  y  $L_{tot}$  son la concentración de proteína y ligando presentes respectivamente,  $K_d$  es la constante de disociación.

## RESULTADOS

### De ArgT-Y a LAO-tyr

La proteína LAO rediseñada por Daniel Silva Manzano durante sus tesis de maestría fue el producto del rediseño con el programa Rosetta en la modalidad Rosetta-ligand, de las secuencias obtenidas, se seleccionó la variante TY-R2-95 (Figura 16), ya que en los datos del proceso de docking y de simulaciones de unión a través de técnicas de dinámica, parece interactuar con la tirosina [34].

### Secuencia (LAO-tyr) obtenida en formato fasta

```
>Tyr_R2_95_SIT_REST 811 residuos, dir 5-3  
  
CATATGAAGAAGACCGTTCTCGCTTTGTCTTTGCTGATAGGTCTGGGCGCGACGGCGCCAGTTAC  
GCCGCGCTCCCGCAAACGGTTCGTATTGGAACAGATACCACCTGCGCGCCTTTCTCATCAAAAGAT  
GCCAAAGGCGAGTTTATTGGCTTTGATATCGATCTCGGTAATGAAATGTGTAAGCGTATGCAGGTG  
AAATGTACCTGGGTGCCAGCGACTTTGATGCGCTTATCCCTCACTAAAAGCGAAAAAATTGAT  
GCCATTATTTTCAGGGCTCTCTATCACCGATAAACGCCAGCAAGAAATTGCGTTTTCCGACAAACTT  
TACGCGGATGATTACGCCTGATTGCGGCAAAAGGGTCTCCCATTCAGCCGACGCTGGAATCGCTG  
AAAGGCAAGCATGTCGGCGTGCTGCAAGGGTCCACGCAAGAGGCTTACGCCAATGATAACTGGCGC  
ACTAAAGGTGTGGATGTGGTGGCTTATGCCAACCCAGGATCTTATCTATTCCGATTTAACCGCCGGT  
CGTCTGGATGCCGATTAGGTCCGGAAGTCGCCCGCAGCGAAGGTTTCCTGAAGCAGCCAGCGGGC  
AAAGAGTATGCGTTTTGCCGGTCCTTCCGTGAAGGATAAAAAATATTTTGGCGACGGGACGGGGTT  
GGGCTGCGTAAAGATGATACCGAGCTAAAAGCCGCTTTGATAAAGCGCTGACCGAACTGCGCCAG  
GACGGAACCTACGACAAAATGGCCAAAAGTACTTCGATTTTAATGTTTACGGCGATTGAGGGAAG  
  
GGGATAACGCGCCGGATCC
```

Figura 16. Secuencia del gen ArgT-Y. Verificada en la unidad de secuenciación de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Las mutaciones a partir de la secuencia original fueron solamente, cinco, todos estas modificaciones se encuentran en el sitio de unión. Los aminoácidos mutados fueron Tyr14Cys, Ser70Cys, Ala90Asp, Gln160Gly, Asp161Pro (indicados en arriba) En la figura 17 se esquematiza la secuencia del gen ArgT-Y con algunos sitios de importancia.

NdeI	
1	CAT ATG AAG AAG ACC GTT CTC GCT TTG TCT TTG CTG ATA GGT CTG 45
1	His Met Lys Lys Thr Val Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Gly Leu 15
46	GGC GCG ACG GCG GCC AGT TAC GCC GCG CTC CCG CAA ACG GTT CGT 90
16	Gly Ala Thr Ala Ala Ser Tyr Ala Ala Leu Pro Gln Thr Val Arg 30
91	ATT GGA ACA GAT ACC ACC TGC GCG CCT TTC TCA TCA AAA GAT GCC 135
31	Ile Gly Thr Asp Thr Thr Cys Ala Pro Phe Ser Ser Lys Asp Ala 45
136	AAA GGC GAG TTT ATT GGC TTT GAT ATC GAT CTC GGT AAT GAA ATG 180
46	Lys Gly Glu Phe Ile Gly Phe Asp Ile Asp Leu Gly Asn Glu Met 60
181	TGT AAG CGT ATG CAG GTG AAA TGT ACC TGG GTC GCC AGC GAC TTT 225
61	Cys Lys Arg Met Gln Val Lys Cys Thr Trp Val Ala Ser Asp Phe 75
226	GAT GCG CTT ATT CCC TCA CTA AAA GCG AAA AAA ATT GAT GCC ATT 270
76	Asp Ala Leu Ile Pro Ser Leu Lys Ala Lys Lys Ile Asp Ala Ile 90
271	ATT TCA GGG CTC TCT ATC ACC GAT AAA CGC CAG CAA GAA ATT GCG 315
91	Ile Ser Gly Leu Ser Ile Thr Asp Lys Arg Gln Gln Glu Ile Ala 105
316	TTT TCC GAC AAA CTT TAC GCG GAT GAT TCA CGC CTG ATT GCG GCA 360
106	Phe Ser Asp Lys Leu Tyr Ala Asp Asp Ser Arg Leu Ile Ala Ala 120
361	AAA GGG TCT CCC ATT CAG CCG ACG CTG GAA TCG CTG AAA GGC AAG 405
121	Lys Gly Ser Pro Ile Gln Pro Thr Leu Glu Ser Leu Lys Gly Lys 135
406	CAT GTC GGC GTG CTG CAA GGG TCC ACG CAA GAG GCT TAC GCC AAT 450
136	His Val Gly Val Leu Gln Gly Ser Thr Gln Glu Ala Tyr Ala Asn 150
451	GAT AAC TGG CGC ACT AAA GGT GTG GAT GTG GTG GCT TAT GCC AAC 495
151	Asp Asn Trp Arg Thr Lys Gly Val Asp Val Val Ala Tyr Ala Asn 165
496	CAG GAT CTT ATC TAT TCC GAT TTA ACC GCC GGT CGT CTG GAT GCC 540
166	Gln Asp Leu Ile Tyr Ser Asp Leu Thr Ala Gly Arg Leu Asp Ala 180
541	GCA TTA GGT CCG GAA GTC GCC GCC AGC GAA GGT TTC CTG AAG CAG 585
181	Ala Leu Gly Pro Glu Val Ala Ala Ser Glu Gly Phe Leu Lys Gln 195
586	CCA GCG GGC AAA GAG TAT GCG TTT GCC GGT CCT TCC GTG AAG GAT 630
196	Pro Ala Gly Lys Glu Tyr Ala Phe Ala Gly Pro Ser Val Lys Asp 210
631	AAA AAA TAT TTT GGC GAC GGG ACG GGG GTT GGG CTG CGT AAA GAT 675
211	Lys Lys Tyr Phe Gly Asp Gly Thr Gly Val Gly Leu Arg Lys Asp 225
676	GAT ACC GAG CTA AAA GCC GCG TTT GAT AAA GCG CTG ACC GAA CTG 720
226	Asp Thr Glu Leu Lys Ala Ala Phe Asp Lys Ala Leu Thr Glu Leu 240
721	CGC CAG GAC GGA ACT TAC GAC AAA ATG GCC AAA AAG TAC TTC GAT 765
241	Arg Gln Asp Gly Thr Tyr Asp Lys Met Ala Lys Lys Tyr Phe Asp 255
766	TTT AAT GTT TAC GGC GAT TGA GGG AAG GGG ATA ACG CGC CCG ATCC 810
256	Phe Asn Val Tyr Gly Asp TERMINO .....270
BamHI	

Figura 17. Traducción de la secuencia del gene LAO-tyr. En la secuencia se indicaron: los **sitios de restricción** en los extremos (para las **enzimas** NdeI y BamHI), los codones de **inicio** y de **termino** así como **las mutaciones**. La numeración incluye, 23 residuos de más que corresponde a la secuencia de exportación, el aminoácido 24 corresponde al **aminoácido 1 de la secuencia madura**.

## Subclonación de la mutante LAO-tyr a un vector de expresión

Se realizaron las digestiones enzimáticas sobre el vector pUC-57, el cual contenía el inserto (ArgT-Y). El inserto se purificó mediante el kit de extracción *QIAquick Gel* y se ligó con el vector linearizado de expresión pET-12. Posteriormente se realizaron ensayos de restricción y se confirmó mediante un gel de agarosa que se encontrara el inserto (ArgT-tyr) (Figura 18). Posteriormente se confirmó de manera inequívoca mediante la secuenciación de este en un secuenciador Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer A. Biosystems) en el IFC, UNAM, México.

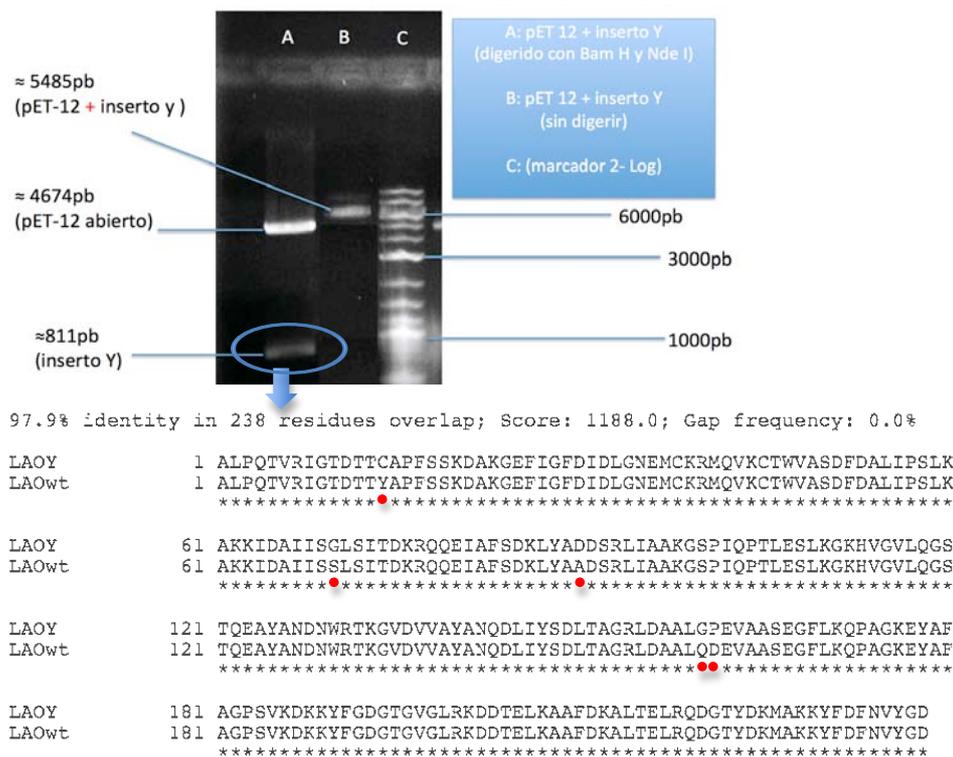


Figura 18. Ensayo de restricción del plásmido pET-12. En la parte superior se muestra un gel de agarosa con 3 carriles: A) pET-12 + ArgT-Y digerido con enzimas de restricción BamHI y NdeI B) pET-12 + ArgT-Y sin digerir y C) Marcador de peso molecular DNA-2-Log. En la parte inferior se muestra un alineamiento hecho por EMBOSNeedle de la secuencia de aminoácidos de LAO-wt (fuente: PDB) y de LAO-tyr (fuente: Secuenciación en el IFC, UNAM). Los puntos rojos coinciden con las mutaciones deseadas.

## Purificación y rendimiento de LAO-tyr

La purificación de LAO-tyr se llevó a cabo en dos etapas: la primera comprendió un choque osmótico, seguida de una cromatografía de intercambio aniónico. El método de purificación fue optimizado en cada una de sus etapas, obteniendo un rendimiento de proteína de 22.5 mg/L de cultivo.

Debido a que LAO-tyr cuenta con un péptido señal que envía a la proteína al periplasma celular, la cantidad de LAO-tyr que se purifica mediante choque osmótico es casi exclusiva, como se puede observar en el SDS-PAGE (Figura 19).

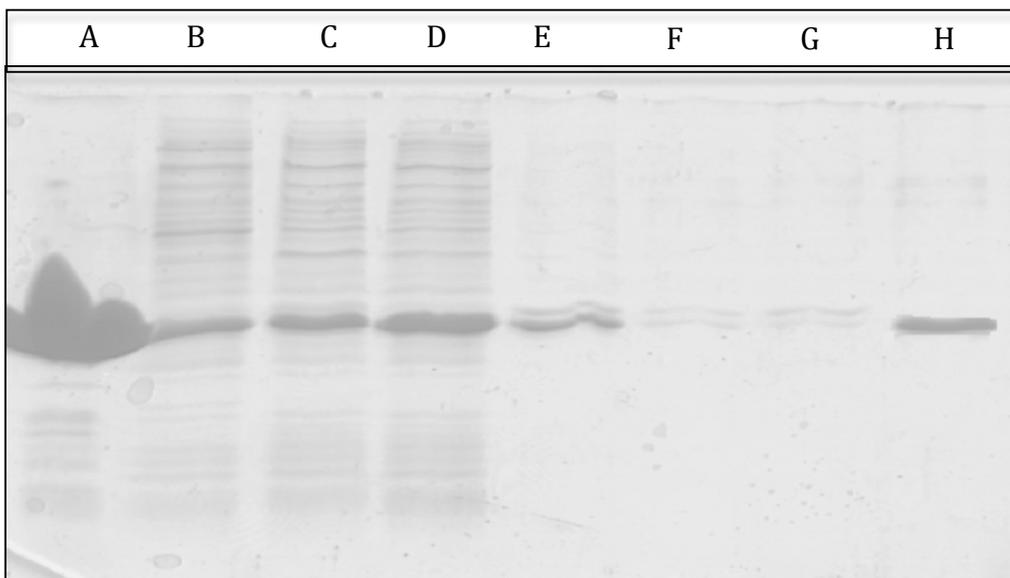


Figura 19. Resolución electroforética de las fracciones a partir de la purificación de la proteína LAO-tyr.

Carril A: LAO-wt usada como marcador de peso molecular (26085.5 kDa)

Carril B,C,D: Medio de cultivo en 4,6 y 8hrs de inducción respectivamente

Carril E: Proteína después del choque osmótico

Carril F: Primer sobrenadante (sacarosa)

Carril G: Segundo sobrenadante (acK)

Carril H: Fracciones de Source Q 15

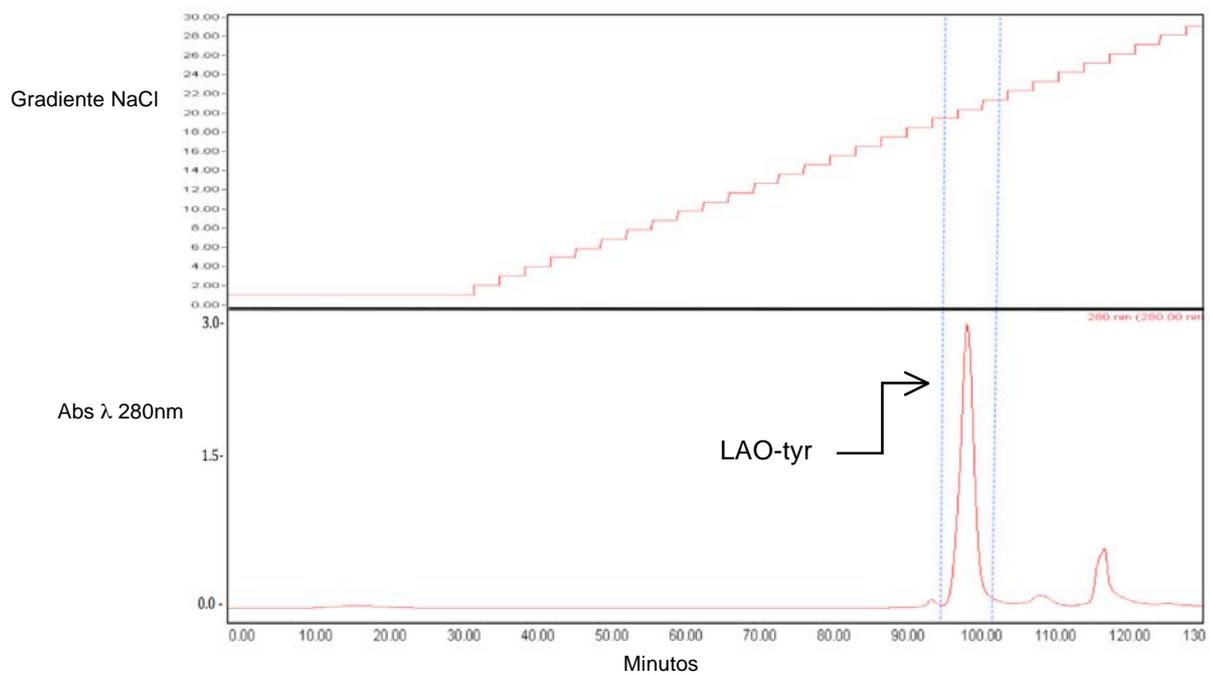


Figura 20. Cromatograma de las fracciones correspondientes a la purificación de la proteína LAO-tyr en una columna Source Q. Condiciones experimentales: fase móvil de Bis-Tris-Propanol 10 mM pH= 8.5; gradiente de NaCl en la misma fase móvil de 0 a 300 mM en 100 minutos a un flujo de 1mL/min; detección a 280 nm

En la Figura 20 se muestra un cromatograma de la purificación de LAO-tyr. Después de pasar por la columna, la proteína se cambió de buffer a 10 mM Hepes pH= 8.5 para realizar los experimentos de fluorimetría y calorimetría.

## Espectroscopia de fluorescencia

### Sistema LAO-wt - Ligandos

Para poder determinar las constantes de disociación de LAO-tyr para los ligandos deseados (incluido el aminoácido anfipático L-tirosina), primeramente se realizaron controles de la proteína silvestre (LAO-wt) con ligandos conocidos y de esta manera comprobar que nuestro sistema esta funcionando en un determinado intervalo de condiciones. En nuestros experimentos utilizamos los cambios en fluorescencia intrínseca de la proteína cuando une ligandos. Estos cambios en la fluorescencia intrínseca fueron asociados a su vez, a los cambios conformacionales que lleva la proteína al unir el ligando.

En la figura 21 se muestra un espectro de emisión de la proteína LAO-wt, en ausencia de ligando y en presencia de ligando. En esta figura se observa como al añadir un ligando de alta afinidad, la intensidad del espectro de LAO-wt aumenta, este aumento está asociado a un cambio de conformación (P. abierta → P. cerrada). Estos cambios en la intensidad de la fluorescencia se utilizaron para realizar titulaciones al equilibrio con los aminoácidos L-arginina y L-histidina, para el aa L-tirosina no se detectaron cambios (Figura 22 y 24).

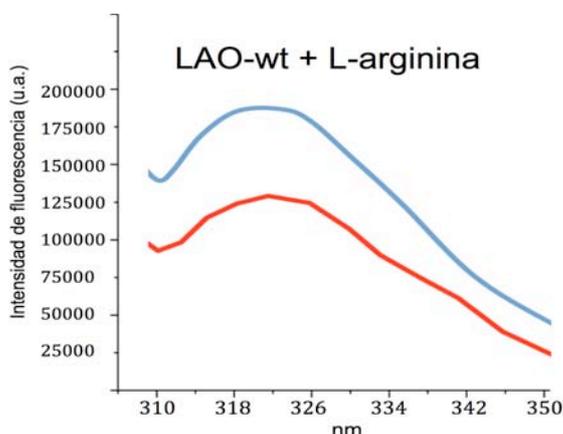


Figura 21. Espectro de emisión de la proteína LAO-wt. En ausencia de ligando (rojo). LAO + L-arginina en condiciones saturantes (azul)

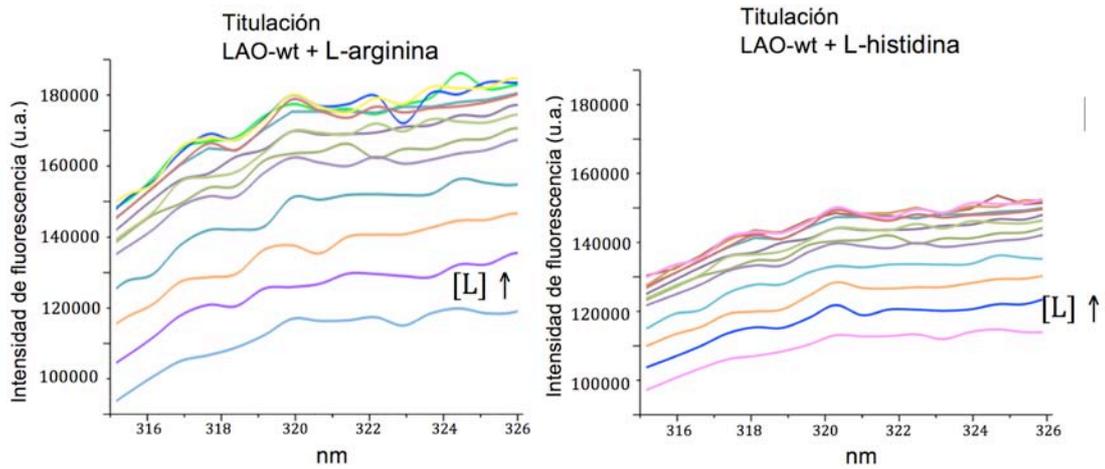


Figura 22. A) Espectros de fluorescencia de la proteína LAO-wt a concentraciones crecientes de L-arginina (0.2 - 4.0 mM) y L-histidina (0.2 - 12.0 mM) En la parte inferior de ambas graficas se muestra a la proteína sin ligando, conforme aumenta la concentración de ligando aumenta la intensidad de la fluorescencia hasta un punto de saturación. ( $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 315\text{--}325 \text{ nm}$  con pasos de luz (slits) de 1mm y 2mm respectivamente a 25°C.

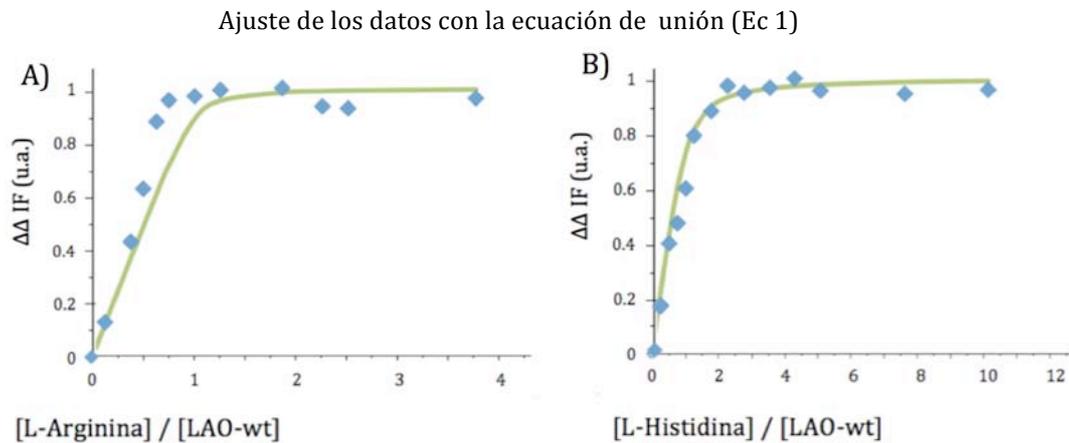


Figura 23. Titulación de la proteína LAO-wt con L-arginina y L-histidina

A) Titulación en fluorescencia LAO-wt con L-Arginina. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos con una  $K_d = 15 \text{ nm}$ . B) Titulación en fluorescencia LAO-wt con L-Histidina. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos con una  $K_d = 500 \text{ nm}$ .

El ajuste de los datos con la ecuación de unión hace evidente la concordancia de las  $K_d$  obtenidas experimentalmente con mediciones reportadas por métodos radiactivos (Nikaido y Ames, 1992).

Por otra parte, LAO-wt no tiene reportada afinidad por el a.a. L-tirosina, por lo cual se realizó un experimento de emisión de fluorescencia en condiciones “saturantes” (figura 24). No ocurrieron cambios en la forma del espectro y por ello podemos determinar que el aminoácido L-tirosina no se une a LAO-wt o no provoca cambio de conformación.

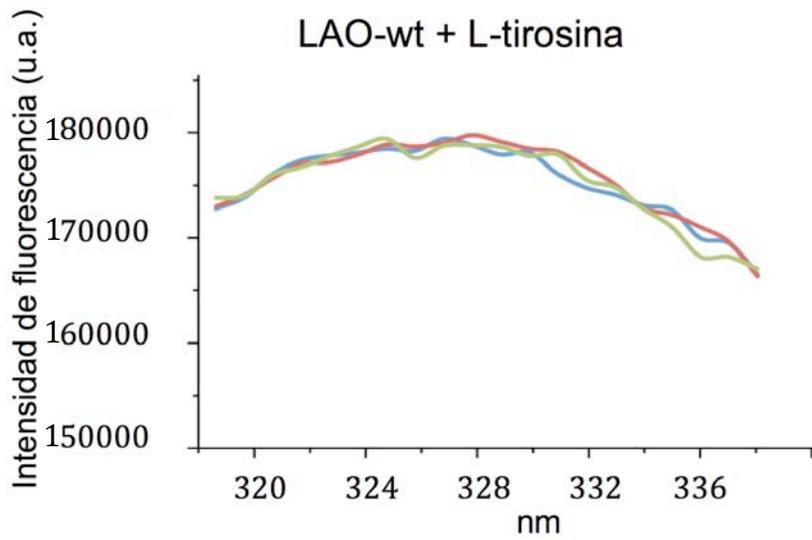


Figura 24. La proteína LAO-wt libre de ligando no une L-tirosina

A) Espectros de fluorescencia de la proteína LAO-wt a diferentes concentraciones de L-Tirosina. En rojo LAO, en verde 10mM LAO + 50mM L-tirosina, en azul LAO + 100mM L-tirosina

[L-tirosina]=2.48mM

## Sistema LAO-tyr - Ligandos

Una vez estandarizadas las condiciones con nuestro sistema de referencia LAO-wt se procedió a realizar experimentos de espectroscopia de fluorescencia con LAO-tyr

### *Sistema LAO-tyr + L-arginina*

Los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO-tyr sin ligando muestran que la proteína sin ligando incrementa la intensidad de la fluorescencia al adicionarle L-arginina en una condición saturante. (figura 25)

Los cambios en las intensidades de fluorescencia de LAO-tyr se pueden utilizar para realizar titulaciones con diferentes ligandos para de esta manera obtener las  $K_d$  aparentes. LAO-tyr sigue el mismo patrón de desplazamiento de la curva de intensidad de la fluorescencia que LAO.

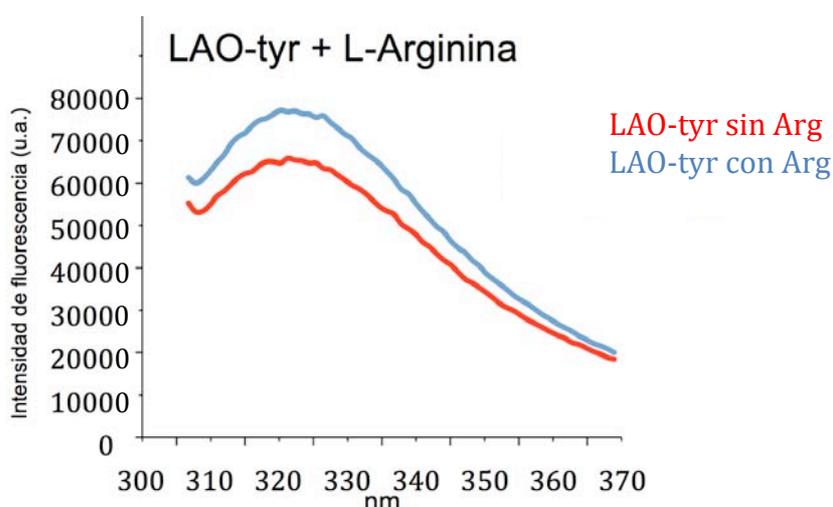


Figura 25. Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO-tyr con y sin ligando ( $\lambda_{ex}$ ) 290 nm y ( $\lambda_{em}$ ) en el rango de 310–370 nm con pasos de luz (slits) de 1mm y 2mm respectivamente a 25°C

## Determinación de la $K_d$ de la proteína LAO-tyr + L-arginina

El aumento en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 324nm fue utilizada para seguir la unión de ligandos de la proteína LAO-tyr en experimentos de titulación al equilibrio. Este cambio en la intensidad de la fluorescencia es atribuido principalmente al cambio de ambiente local de los triptófanos (W47 y W130) al pasar de la forma abierta a la forma cerrada. (figura 26)

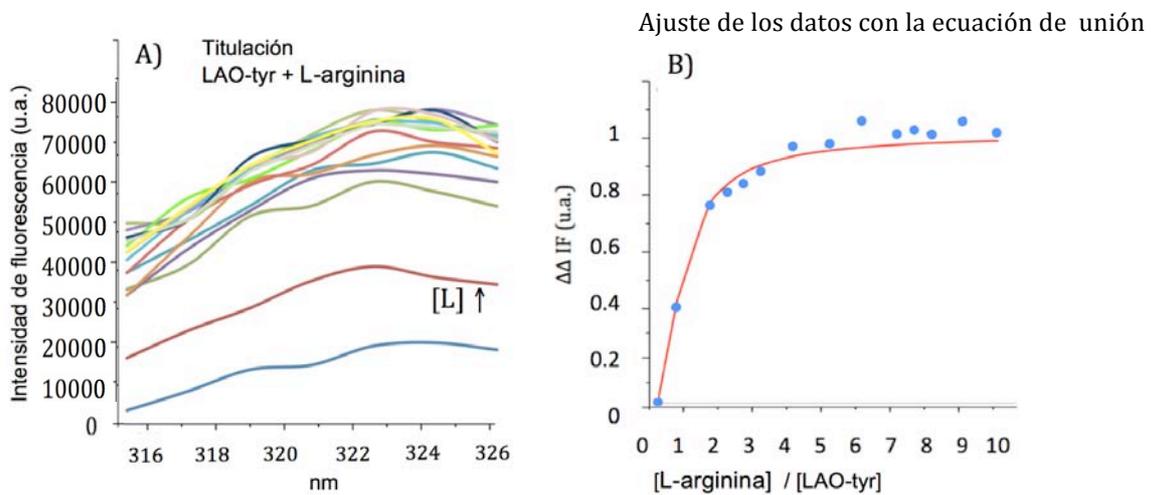


Figura 26. Unión de L-arginina a la proteína LAO-tyr

A) Espectros de fluorescencia de la proteína LAO-tyr a diferentes concentraciones de L-arginina (0-100mM) ( $\lambda_{ex} = 290$  nm y  $\lambda_{em} = 315-325$  nm con pasos de luz (slits) de 1mm y 2mm respectivamente a 25°C B) Ajuste de los datos de la titulación con L-arginina. La línea sólida corresponde al ajuste con una  $K_d=270$ nM.

## Sistema LAO-tyr + L-histidina

Los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO-tyr sin ligando muestran que la proteína sin ligando incrementa la intensidad de la fluorescencia al adicionarle L-histidina en una condición saturante (figura 27).

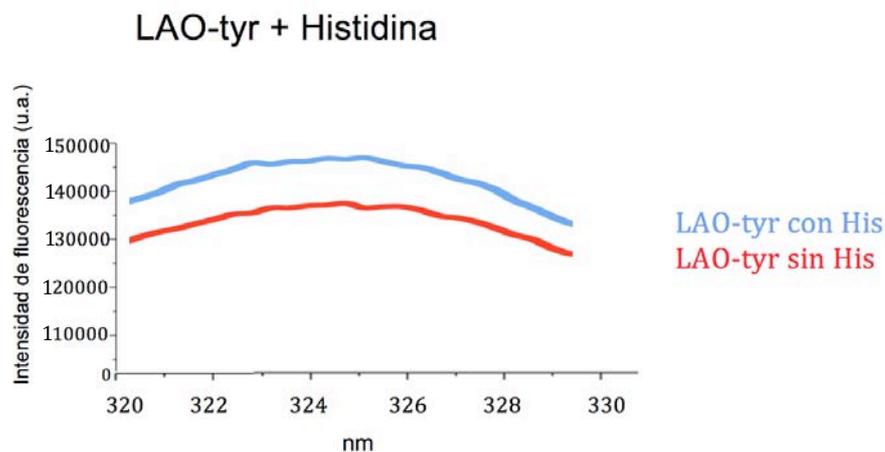


Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO-tyr con y sin Histidina ( $\lambda_{ex}$ ) 290 nm y ( $\lambda_{em}$ ) en el rango de 310–380 nm con pasos de luz (slits) de .1 mm y 2mm respectivamente a 25°C. En rojo se muestra el espectro de LAO-tyr sin ligando y en azul un aumento en la intensidad de la fluorescencia de LAO-tyr al agregar L-Histidina en condiciones saturantes.

Los cambios en las intensidades de fluorescencia de LAO-tyr se utilizaron para realizar titulaciones al equilibrio y obtener la  $K_d$  LAO-tyr + L-histidina .

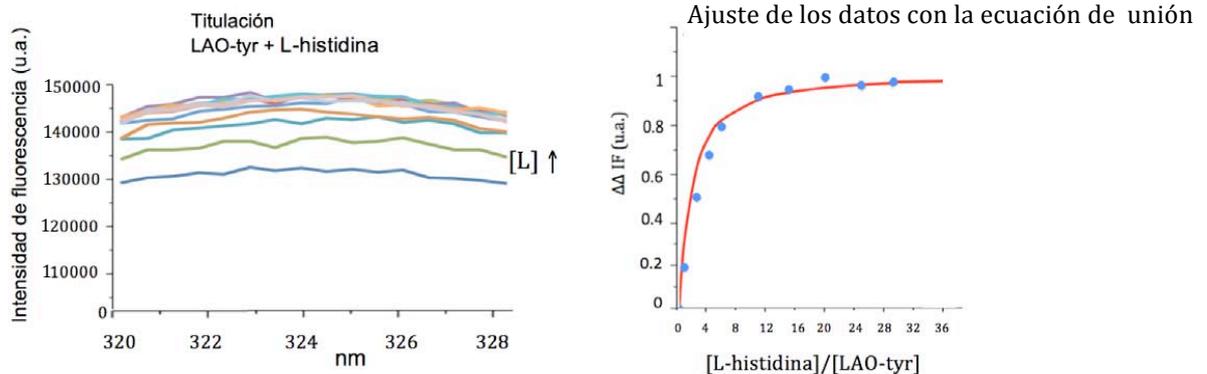


Figura 28. Unión de L-histidina a la proteína LAO-tyr.

A la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la proteína LAO-tyr a diferentes concentraciones de L-Histidina ( $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 315\text{--}325 \text{ nm}$  con pasos de luz (slits) de 1mm y 2mm respectivamente a  $25^\circ\text{C}$ ). A la derecha Titulación en fluorescencia con L-Histidina. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos con una  $K_d = 12.7 \mu\text{M}$ .

Al igual que en el experimento con L-arginina, el aumento en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 324nm fue utilizada para seguir la unión de ligandos de la proteína LAO-tyr en experimentos de titulación al equilibrio (figura 28).

### **Análisis espectroscópico del ligando L-tirosina**

El aminoácido L-tirosina, al ser fluoróforo, absorbe luz y además en un rango muy cercano al cual se excitan los aminoácidos L-triptófanos y L-fenilalaninas de las proteínas, dichos aminoácidos nos permiten monitorear el cambio conformacional en LAO-tyr por lo cual es importante monitorear su comportamiento aislado para descartar que en los experimentos con L-tirosina los cambios en las intensidades de fluorescencia sean debidos a la adición del ligando y no al cambio de conformación en LAO-tyr. A 295 nm, el espectro de emisión del triptófano es dominante sobre la fluorescencia tirosina y la fluorescencia fenilalanina, por lo cual experimentos con L-tirosina fueron esa  $\lambda_{\text{ex}}=295_{\text{nm}}$ . Las diferencias en las curvas fueron utilizadas para corregir el error por dilución (figura 29).

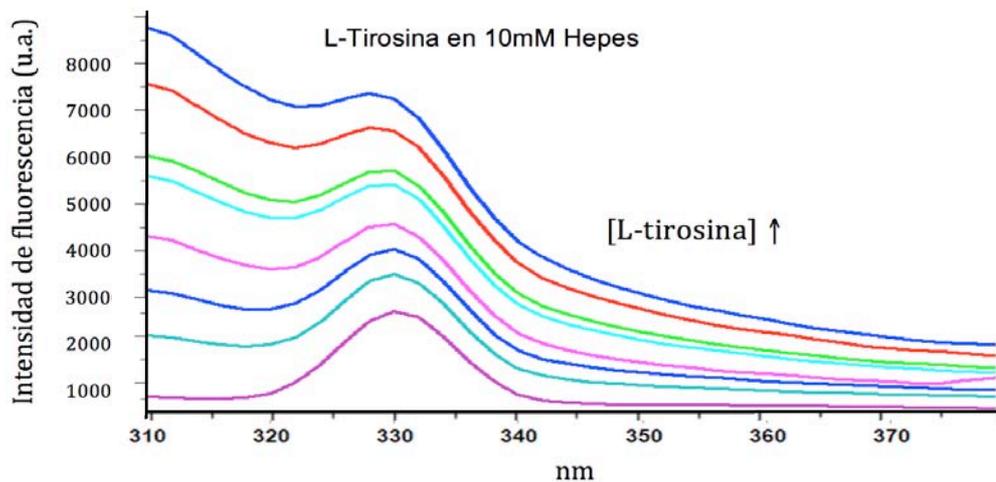


Figura 29. Espectros de fluorescencia de L-tirosina (sin LAO) utilizados para realizar corrección por dilución

### Sistema LAO-tyr + L-tirosina

Los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína LAO-tyr sin ligando muestran que la proteína sin ligando disminuye la intensidad de la fluorescencia al adicionarle L-tirosina en una condición saturante, contrario al efecto de la L-tirosina disuelta únicamente en buffer. (figura 30)

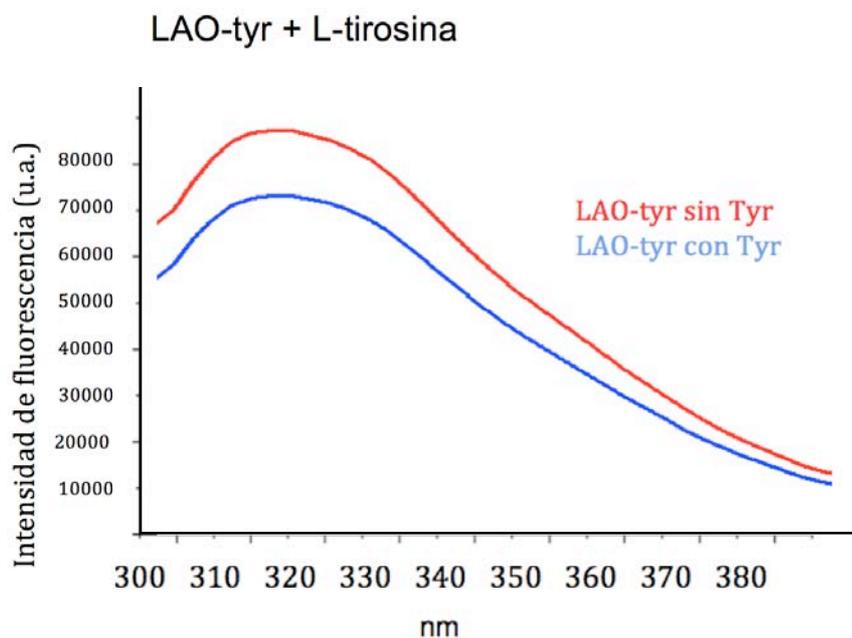


Figura 30. Espectro de emisión LAO-tyr + L-tirosina. El espectro de la proteína Lao-tyr disminuye al agregar l-tirosina en una condición saturante. Estas disminuciones se pueden utilizar para realizar titulaciones al equilibrio

Las disminuciones en las intensidades de fluorescencia de LAO-tyr se utilizaron para realizar titulaciones al equilibrio y obtener la  $K_d$  LAO-tyr para L-tirosina .

Para el caso de la titulación con L-tirosina, la disminución en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda a 329nm fue utilizada para seguir la unión de ligandos de la proteína LAO-tyr en experimentos de titulación al equilibrio (figura 31).

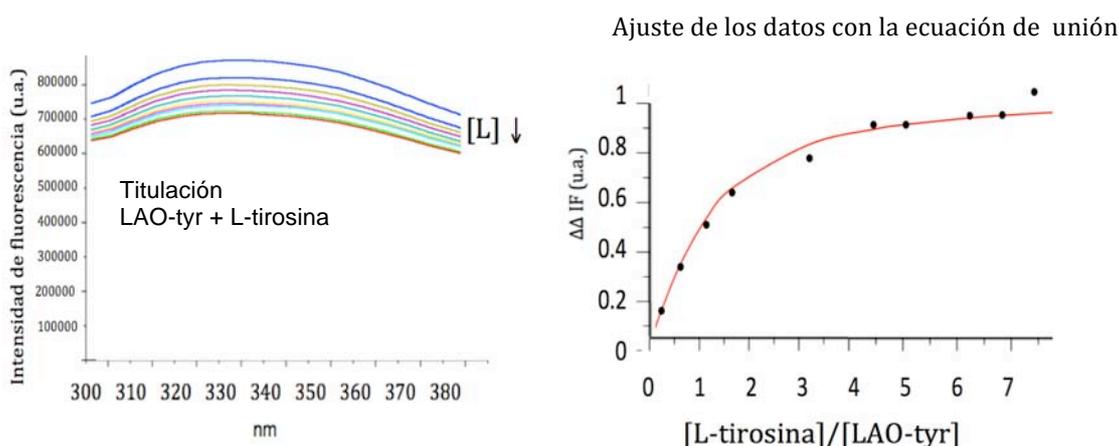


Figura 31. Unión de L-tirosina a la proteína LAO-tyr

A la izquierda se muestran los espectros de fluorescencia de la proteína LAO-tyr a diferentes concentraciones de L-Tirosina. A la derecha Titulación en fluorescencia con L-Tirosina. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos con una  $K_d=100\mu\text{Mnm}$ . ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 315\text{--}340 \text{ nm}$  con pasos de luz (slits) de .5mm y 1mm respectivamente a  $25^\circ\text{C}$  .

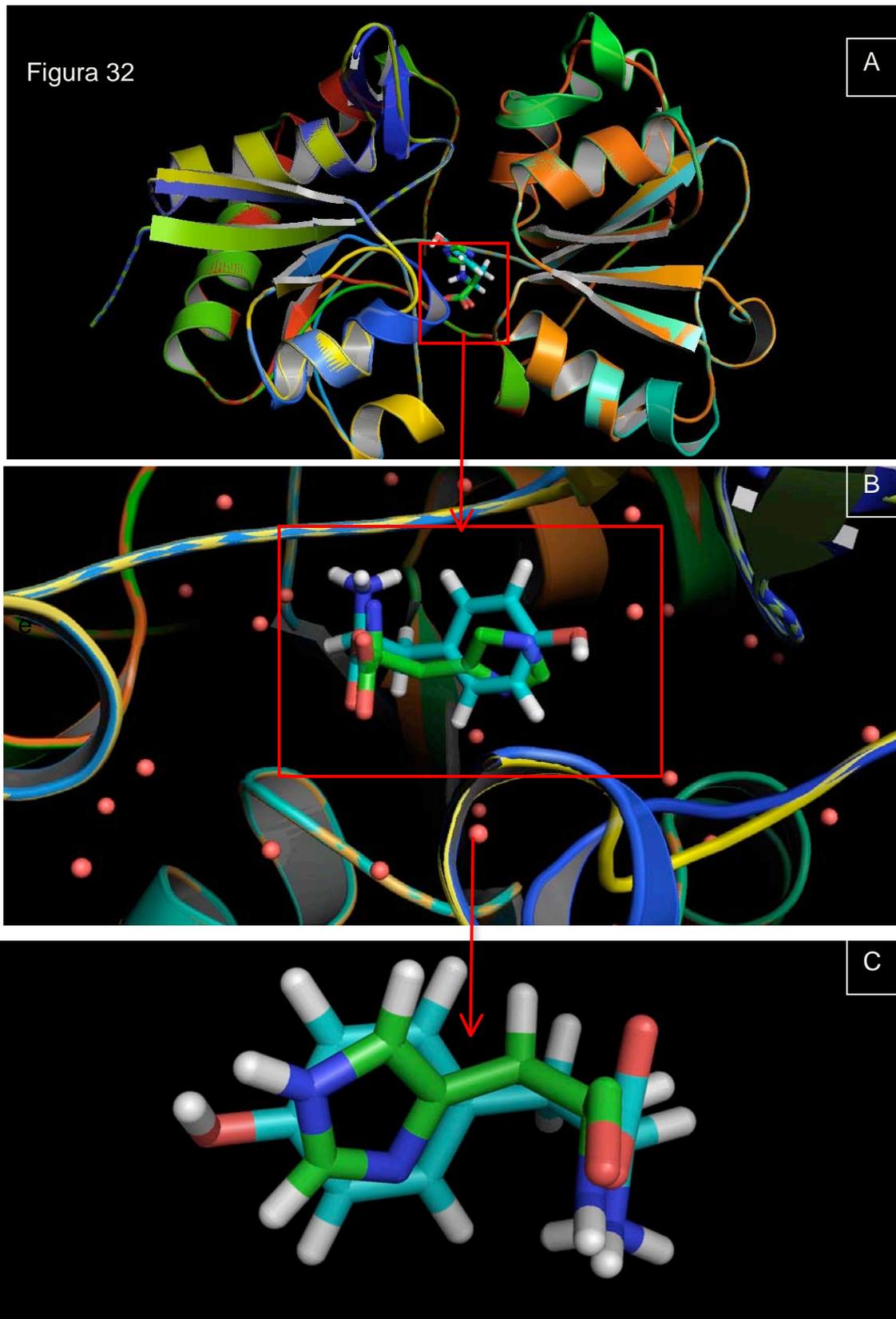
En el caso de la titulación con L-tirosina el volumen final que alcanzo la muestra, fue cercano al 10% del volumen total de la celda al iniciar el experimento (debido al límite de solubilidad de la tirosina). Sin embargo, se realizaron las correcciones por dilución de la muestra. Y se concluyó, que el apagamiento no es debido a la dilución de la muestra. Es por ello que es muy probable que haya un cambio de la conformación de LAO-tyr, el cual. Es importante hacer notar que los cambios en las señales de las intensidades de fluorescencia, pueden ser debidos a orígenes moleculares diversos y requerimos de otra técnica para confirmar esta interacción.

## **Análisis computacional**

Se obtuvieron imágenes con el software de visualización molecular MacPyMOL para la estructura tridimensional de LAO-wt en presencia de histidina. Esta estructura se obtuvo de la base de datos estructurales PDB (1LAG). 1LAG se comparó con la estructura de LAO-tyr obtenida por docking molecular, en los estudios de diseño molecular de la tesis de maestría de Daniel Silva.

En la figura 32 se muestra la estructura tridimensional de LAO-wt superpuesta con la estructura de LAO-tyr, como se puede observar, las dos estructuras son prácticamente iguales en cuanto al acomodo tridimensional, esto se puede entender porque poseen un 98% de identidad entre sí, y por lo tanto sugerimos que las mutaciones que se realizaron en el sitio activo no solo no modifican los mecanismos generales por los cuales LAO une a sus ligandos (ver además resultados de fluorescencia) sino que LAO-tyr también conserva los parámetros globales de su plegamiento y estructura nativa.

En la figura 30 se trata de evidenciar el ambiente en el que los ligandos se encuentran en forma unida a la proteína (LAO-wt o LAO-tyr). Las esferas rojas representan moléculas de agua (aguas estructurales) involucradas en la estabilidad de la proteína. La molécula verde dentro del cuadro rojo representa una L-histidina y la molécula azul una L-tirosina, las cuales se observan con más detalle en la figura 28. Un aspecto importante a considerar es la orientación de los ligandos en el sitio activo de LAO.



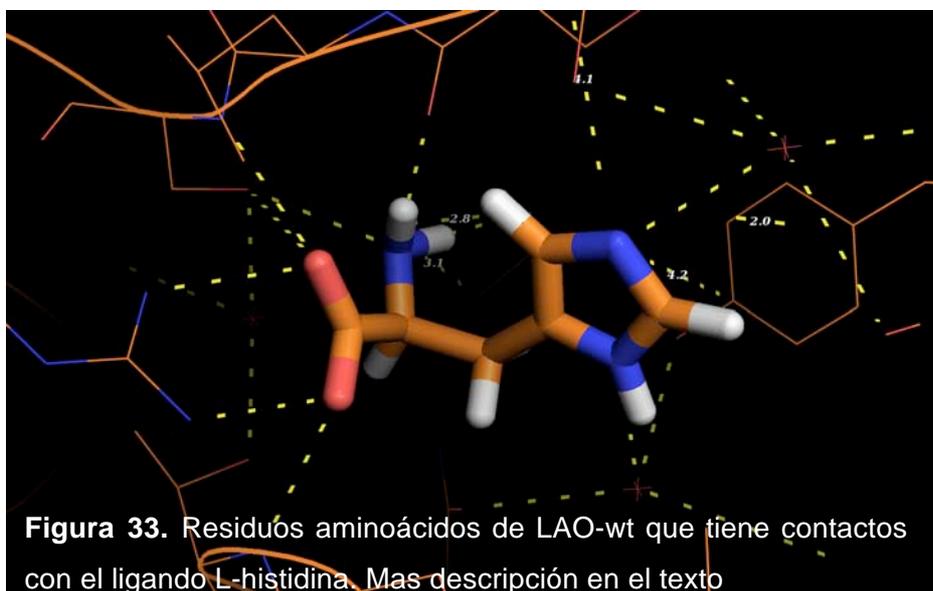
**Figura 32. A.** Estructurales tridimensionales de LAO-wt y LAO-tyr superpuestas con 2 ligandos (L-tirosina en azul y L-histidina en verde). **B y C.** Acercamientos .  
Imágenes con el software de visualización MacPyMOI

A continuación se muestran los residuos aminoácidos que se propone estabilizan la interacción proteína-ligando. En la tabla de abajo se muestra una lista resumida de las interacciones de LAO-wt con el ligando L-histidina, así como de LAO-tyr con L-tirosina.

<b>LAO-WT</b>				
Residuo		Distancia (Å)	Superficie (Å)	Numero de contactos
ASP	11	4.3	4.9	1
TYR	14	3.7	40.1	15
PHE	52	3.9	18.5	9
SER	69	2.9	20.8	3
SER	70	2.9	51.8	5
LEU	71	3.6	2.3	1
SER	72	2.8	45	4
ARG	77	2.9	33	5
ALA	90	4.8	0.6	1
LEU	117	3.4	32.2	3
SER	120	4	7.7	4
THR	121	3.8	22.3	4
GLN	122	3.7	23.8	3
ASP	161	3	29.4	6
<b>LAO-TYR 95</b>				
Residuo		Distancia (Å)	Superficie (Å)	Numero de contactos
CYS	14	4.8	19.4	3
PHE	52	4	22.7	6
SER	69	3	27.2	4
GLY	70	2.8	38.6	7
LEU	71	3.8	1.2	2
SER	72	2.7	47	4
ARG	77	2.9	19.1	5
ASP	90	2.8	32.7	4
LEU	117	3.5	15.4	2
SER	120	4	22	2
THR	121	2.9	41.4	5
GLN	122	3.8	7.3	4
GLN	143	3.8	11.8	4
PRO	161	4	19.1	4
THR	195	4.4	0.2	1

Tabla 2. Resumen de las interacciones en LAO-wt y LAO-tyr. Datos obtenidos *in silico*

Los residuos aminoácidos que hacen algún tipo de contacto con su ligando ya sea para el caso de LAO-wt o LAO-tyr pueden agruparse en dos clusters: el primero que incluye residuos 69, 71, 72, 77, 90, 117, 120, 121, 122 (solo una mutación de las 5 que se realizaron, y se encuentra del lado del amino y carboxilo del ligando). El siguiente grupo de residuos aminoácidos se encuentra con mayor proximidad al grupo R del ligando e involucra más cantidad de mutaciones (11, 14, 52, 70, 143, 160, 161, 195).



En la figura 33 también obtenida con el software de visualización MacPyMOL se muestra el esqueleto de LAO-wt (línea delgada naranja) con su ligado L-histidina (líneas gruesas) y los residuos con los que hay contactos (mostrados en varillas). Las distancias ocurren de acuerdo a lo señalado con líneas amarillas punteadas. Si la figura 33 se compara con la figura 34 se observa que la región que contiene los residuos aminoácidos que unen el lado amino-carboxilo terminal del aminoácido-ligando es mucho mas parecida en secuencia y estructura que la región que contiene los residuos aminoácidos que interactúan con grupo R del aminoácido-ligando. En la Figura 33 se muestran los residuos aminoácidos de LAO-tyr (líneas delgadas) que tiene contactos con el ligando L-tirosina (mostrado en líneas gruesas), el cual tiene un carácter químico diferente al de los ligandos de mayor afinidad de LAO.

En la tabla 3 se resumen las constantes de afinidad para LAO-wt y LAO-tyr:

Constante de disociación aparente ( $K_d$ )	LAO-wt	LAO-tyr
L-arginina	9 nM	270 nM
L-histidina	500 nM	12.7 $\mu$ M
L-tirosina	Valor no reportado	100 $\mu$ M

Tabla 3. Resultados comparativos de las  $K_d$  obtenidas experimentalmente.

## DISCUSIÓN

Las proteínas periplásmicas de unión a sustratos (PBP's) pertenecientes a bacterias gram negativas tales como LAO-wt han sido estudiadas y rediseñadas por el programa Rosetta recientemente [40-42]. El desarrollo de metodologías basadas en algoritmos de cómputo para calcular la energética de la interacción de LAO-wt con sus ligandos a partir de su estructura tridimensional han generado importantes avances [43]. No obstante un cuestionamiento sobre el alcance del rediseño de proteínas, es saber ¿Qué tanto podemos mejorar un diseño?, en términos energéticos ¿Qué tanto podemos optimizar un diseño?

Cuando se re-diseña una proteína, para realizar una “función nueva” utilizamos templados (proteínas silvestres) que la evolución ha seleccionado para una función muy específica, si queremos utilizar un templado muy especializado probablemente no sea tan moldeable para lograr una función deseada. Uno de los retos como diseñador es conocer si existen estructuras proteicas con funciones específicas que la evolución simplemente ha omitido [44].

### **Discusiones sobre el complejo LAO-wt / LAO-tyr y sus ligandos:**

**LAO-wt y LAO-tyr con L-arginina:** En los experimentos de fluorescencia de LAO-tyr con el ligando L-arginina, se puede observar que los cambios en las intensidades de fluorescencia mientras se realizaba la titulación al equilibrio

son mas pequeños que los cambios en las intensidades de florescencia cuando se tituló LAO-wt, estas diferencias se pueden entender como una menor fracción de la proteína LAO-tyr uniendo el ligando L-tirosina que LAO-wt, lo cual se interpreta a su vez como una disminución en la afinidad [34]. La disminución de afinidad puede ocurrir por 2 razones, ya sea por cuestiones de orden entrópico y/o entálpico cuyos valores pueden ser esclarecidos mediante herramientas computacionales y más experimentos con técnicas como ITC [33,35].

**LAO-wt y LAO-tyr con L-histidina:** En los experimentos de fluorescencia de LAO-tyr con el ligando L-histidina, se puede observar que los cambios en las intensidades de fluorescencia mientras se realizaba la titulación al equilibrio son mas pequeños que los cambios en las intensidades de florescencia cuando se tituló LAO-wt, estos cambios se pueden entender como una menor fracción de la proteína LAO-tyr uniendo el ligando L-histidina que LAO-wt, lo cual se interpreta a su vez como una disminución en la afinidad. La disminución de afinidad puede ocurrir por 2 razones, ya sea por cuestiones de orden entrópico y/o entálpico cuyos valores pueden ser esclarecidos mediante herramientas de cómputo y más experimentos con técnicas como ITC [33,35].

**LAO-wt y LAO-tyr con L-tirosina:**

En los experimentos de fluorescencia de LAO-tyr con el ligando L-tirosina, se puede observar que existen cambios en las intensidades de fluorescencia mientras se realizaba la titulación al equilibrio.

A pesar de que los cambios son pequeños, estos cambios se pueden entender como una pequeña fracción de la proteína LAO-tyr uniendo el ligando L-tirosina, lo que no ocurre en LAO-wt al intentar titular con L-tirosina, lo cual se interpreta en el mejor de los casos como generación *de novo* de afinidad por el aa L-tirosina, sin embargo es importante caracterizar más las interacciones que se propone generan esta afinidad para conocer si obedece a razones entrópicas o entálpicas cuyos cálculos habría que revisar mediante herramientas computacionales [33,35].

En los experimentos con el sistema LAO-tyr se encontró que a diferencia de aminoácidos como L-arginina, L-histidina o L-lisina, la señal obtenida por fluorescencia al agregar ligando, era decreciente. Lo cual se puede atribuir a que el cambio conformacional de LAO-tyr, que ocurre presencia de L-tirosina, es diferente al cambio conformacional previamente reportado apertura-cierre en LAO-wt. Es probable que la L-tirosina no conduzca en LAO un desplazamiento de su forma abierta a su forma cerrada, si no a una conformación semi-cerrada. Por lo cual no podemos descartar un mecanismo de unión diferente, o bien cambios moleculares diferentes, con respecto a la forma silvestre de la proteína [38].

Por información dinámica realizada en la tesis de Daniel Silva, LAO-tyr + L-tirosina, partiendo del estado cerrado, muestran una ligera desestabilización de la conformación cerrada. y al observar a LAO-tyr + L-tirosina en las dinámicas que parten del estado abierto, se alcanza un estado semi-cerrado, con desestabilización del ligando en el estado abierto. Una diferencia que se

encontró en todos los experimentos con LAO-tyr, con respecto a LAO-wt, es un apagamiento en la señal, el cual ocurre en tiempos que podrían llegar a ser experimentalmente relevantes, razón por la cual las titulaciones se llevaron a cabo en el menor tiempo posible, capturando datos solo en el rango de 315-330 nm. El apagamiento de la señal es una variable que podría afectar las titulaciones en casos donde los cambios de las intensidades entre el espectro de la proteína sin ligando y el espectro de la proteína saturada de ligando son muy pequeños, lamentablemente no se tiene un control absoluto sobre fenómenos de esta naturaleza. Una alternativa más a este problema podría ser realizar experimentos con calorimetría isotérmica de titulación, ya que el mecanismo por el cual obtenemos información de unión se obtiene por un principio físico diferente.

## CONCLUSIONES:

### Conclusiones finales:

La manipulación molecular del gen ArgT-Y es viable en los vectores pUC-54 (plásmido-vector de subclonación) y pET-12 (plásmido-vector de expresión), esto dentro de las cepas de bacterias *E. coli* BL21 A1 y DH5a.

El mecanismo de inducción empleado para expresar LAO-tyr con L-arabinosa se mantiene funcional con respecto a LAO-wt (pequeñas modificaciones en las condiciones experimentales).

La proteína LAO-tyr es estable para trabajar con ella: Dos meses almacenada en el refrigerador a 4 °C no genera cambios en sus señales de fluorescencia.

Dadas las características de la manipulación tanto *in silico* como experimental, el modelo de estudio LAO ha demostrado ser un buen modelo para continuar sus líneas de investigación.

En la búsqueda de obtener afinidad *de novo* en la proteína LAO-wt por el aa L-tirosina, las constantes de disociación para otros aminoácidos aumentaron 2 o 3 órdenes de magnitud. Para el aa L-tirosina sí se generó afinidad *de novo*, no obstante el diseño aun no es lo suficiente específico como el modelo computacional lo predice.

## **PERSPECTIVAS**

En una primera etapa, con la finalidad de generar mas evidencia sobre las interacciones que LAO-tyr hace con sus ligandos, sería bueno seguir caracterizando más esta mutante con otros ligandos mediante la realización de experimentos con las técnicas empleadas en esta tesis así con calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

Ya que se conoce un poco más sobre el diseño de la proteína LAO, se podrían probar experimentalmente más diseños que ahora no solo basen sus mutaciones racionales alrededor del sitio de unión, sino en regiones que influyan en movimientos conformacionales que desplacen el equilibrio de LAO entre formas abiertas a formas cerradas. Para esto, se pueden probar diseños que incluyan algoritmos de co-dependencia evolutiva de aminoácidos, por mencionar algún enfoque.

## REFERENCIAS

1. Alberts Bruce (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition: The Shape and Structure of Proteins New York: Garland Science.
2. Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Macmillan Publishers.
3. Kreil, G. (1997) D-Aminoacids in animal peptides. *Annual Review of Biochemistry* 66, p 337-345.
4. García, J. F. L. & Merchant L. H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Education,
5. Branden, C., & Tooze, J. (1991). *Introduction to protein structure* (Vol. 2). New York: Garland.
6. Creighton, T.E. (1992) *Proteins: Structures and molecular properties*. New York: W. H. Freeman and Company.
7. Ramachandran, G. N. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 23, p 283.
8. Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D., & Wolynes, P. G. (1995). Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 21(3), 167-195.
9. Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z., & Wolynes, P. G. (1997). Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual review of physical chemistry*, 48(1), 545-600.
10. Olivares-Quiroz, L., & García-Colín, L. S. (2004). Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Rev. Soc. Quím Méx*, 48, 95-105.
11. Kondo, H. X., Okimoto, N., Morimoto, G., & Taiji, M. (2011). Free-energy landscapes of protein domain movements upon ligand binding. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(23), 7629-7636.
12. O'Connor, C. M., Adams, J. U., & Fairman, J. (2010). *Essentials of cell biology*. NPG Education, Cambridge. Recuperado el 10 de febrero de 2014 de: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/protein-function-14123348>
13. Alberts Bruce (2002) *Molecular Biology of the Cell*. B Cell & Antibodies: Recuperado el 10 de febrero de 2014 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>
14. Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22
15. Maurel, C., & Chrispeels, M. J. (2001). Aquaporins. A Molecular Entry into Plant Water Relations. *Plant Physiology*, 125(1), 135–138.
16. Brandt, A., Montembault, A., Cameron-Mills, V., & Rasmussen, S. K. (1985). Primary structure of a B1 hordein gene from barley. *Carlsberg research communications*, 50(6), 333-345.
17. Whittaker, M., Wilson-Kubalek, E. M., Smith, J. E., Faust, L., Milligan, R. A., & Sweeney, H. L. (1995). A 35-Å movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature*, 378(6558), 748-751.

18. Pain, R. H., Hames, B. D., & Glover, D. M. (Eds.). (1994). Mechanisms of protein folding (p. 112). Oxford: IRL Press.
19. Lumry, R., & Eyring, H. (1954). Conformation changes of proteins. *The Journal of Physical Chemistry*, 58(2), 110-120.
20. Krichevsky, O., & Bonnet, G. (2002). Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics*, 65(2), 251.
21. Richarme, G., & Caldas, T. D. (1997). Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 15607-15612.
22. Berntsson, R. P. A., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J., & Poolman, B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS letters*, 584(12), 2606-2617.
23. Kang, C. H., Shin, W. C., Yamagata, Y., Gokcen, S., Ames, G. F., & Kim, S. H. (1991). Crystal structure of thylisine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium* at 2.7-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 266(35), 23893-23899.
24. Oh, B. H., Pandit, J.A.Y.V.A.R.D.H.A.N., Kang, C. H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F., & Kim, S. H. (1993). Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 11348-11355.
25. Quijcho, F. A. (1990) Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high affinity active transport systems in bacteria, *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 326, 341-351; discussion 351-342
26. Maya Ramírez, Karina Marisol, sustentante Filogenia molecular de proteínas periplásmicas de unión a aminoácidos como herramienta de estudio de la interacción proteína ligando / 2014
27. Lippow, S. M., & Tidor, B. (2007). Progress in computational protein design. *Current opinion in biotechnology*, 18(4), 305-311.
28. Kortemme, T., & Baker, D. (2004). Computational design of protein–protein interactions. *Current opinion in chemical biology*, 8(1), 91-97.
29. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4), 409-443.
30. Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction using Rosetta. *Methods in enzymology*, 383, 66-93.
31. Drenth, J. (2007). *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer.
32. Wuthrich, K. (1986). *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley.

33. Leavitt, S., & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology*, 11(5), 560-566.
34. Harding, S. E., & Chowdhry, B. Z. (Eds.). (2001). *Protein-ligand interactions, structure and spectroscopy: a practical approach* (No. 243). Oxford University Press
35. Lakowicz, J. R. (Ed.). (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
36. Hüfner, S. (2013). *Photoelectron spectroscopy: principles and applications* (Vol. 82). Springer Science & Business Media.
37. Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919.
38. Silva Manzano, Daniel Adriano sustentante *Diseño computacional del sitio de union de la proteinaperiplasmica LAO / 2007*
39. Chen, Y., Müller, J. D., Tetin, S. Y., Tyner, J. D., & Gratton, E. (2000) Probing ligand protein binding equilibria with fluorescence spectroscopy
40. Medintz, I. L., & Deschamps, J. R. (2006). Maltose-binding protein: a versatile platform for prototyping biosensing. *Current opinion in biotechnology*, 17(1), 17-27.
41. Sakaguchi-Mikami, A., Taneoka, A., Yamoto, R., Ferri, S., & Sode, K. (2008). Engineering of ligand specificity of periplasmic binding protein for glucose sensing. *Biotechnology letters*, 30(8), 1453-1460.
42. Amiss, T. J., Sherman, D. B., Nycz, C. M., Andaluz, S. A., & Pitner, J. B. (2007). Engineering and rapid selection of a low-affinity glucose/galactose-binding protein for a glucose biosensor. *Protein Science*, 16(11), 2350-2359.
43. Dwyer, M. A., & Hellinga, H. W. (2004). Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Current opinion in structural biology*, 14(4), 495-504.
44. Investigadores utilizan computadoras para rediseñar el plegamiento de proteínas (29 de junio de 2001) Recuperado el 19 de abril de 2015 del sitio Howard Hugdes Medical Institute (HHMI): <http://www.hhmi.org/news/investigadores-utilizan-computadoras-para-redise-ar-el-plegamiento-de-prote-nas>
45. Beckett, Dorothy, Chapter one- Measurements and Analysis of Equilibrium Binding