



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE LA ESTABILIDAD  
CONFORMACIONAL DE LA SUBUNIDAD  $\beta$  DE LA  
ATP SINTASA DE LA BACTERIA TERMOFILICA  
Bacillus PS3

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
**D E N I S E M A R T I N E Z Z A P I E N**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ  
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION 2004AR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA 14  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Denise Martínez

Zapién

FECHA: 12 de mayo de 2004

FIRMA: *Denise Martínez Zapién*

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización de la estabilidad conformacional de la subunidad beta de la ATP sintasa de la bacteria termofílica Bacillus PS3"

realizado por Denise Martínez Zapién

con número de cuenta 9754597-2

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Enrique García Hernández *Enrique García Hernández*

Co-Director de Tesis

Propietario Dr. Edgar Vázquez Contreras *Edgar Vázquez Contreras*

Propietario Dra. María Elena Cháñez Cárdenas *María Elena Cháñez Cárdenas*

Suplente Dr. Alejandro Sosa Peinado *Alejandro Sosa Peinado*

Suplente Dra. Georgina Garza Ramos *Georgina Garza Ramos*

**Consejo Departamental de Biología**

*Juan Manuel Rodríguez Chávez*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández y el Dr. Edgar Vázquez Contreras en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, en colaboración con los laboratorios 104 y 105 oriente del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Agradezco las becas otorgadas por los proyectos de CONACyT (No. 34303E) y DGAPA (No. IN220601). Este proyecto fue financiado en parte por DGAPA (No. IN220601) y CONACyT (No. 41328Q y 34303E).

*A mis padres y a mi hermana*

# *Agradecimientos*

Al Dr. Gerardo Pérez Hernández por su invaluable participación y asesoría en esta tesis.

A la Dra. Marietta Tuena y al Dr. Armando Gómez Puyou por recibirme tan cálidamente en su laboratorio y permitirme participar en él.

Al Dr. Enrique García Hernández y al Dr. Edgar Vázquez Contreras por iniciarme en este campo de estudio y dirigirme con dedicación y paciencia.

A la Q.F.B. María Concepción José Núñez por su valiosa ayuda en la purificación de la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3*.

A la Dra. Marietta Tuena, Dra. Georgina Garza Ramos, Dra. María Elena Cháñez Cárdenas, Dr. Alejandro Sosa Peinado, Dr. Edgar Vázquez Contreras y Dr. Enrique García Hernández por sus revisiones, correcciones y comentarios al presente trabajo.

Al laboratorio 104 y 105 oriente del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por el uso de sus recursos y equipo. Asimismo, a la Sra. María Elena Orduña Santana por el apoyo técnico en el aprovisionamiento de material para los experimentos.

Al laboratorio de Físicoquímica de Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM, por permitirme realizar los experimentos de dicroísmo circular, así como al laboratorio de Termofísica de la Facultad de Química, UNAM, por permitirme realizar los experimentos de calorimetría.

A todos mis compañeros de laboratorio del Instituto de Fisiología Celular y del Instituto de Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

---

# ÍNDICE GENERAL

Índice General	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
Resumen	v
Capítulo I: Introducción	1
1. Las proteínas	1
1.1. Estructura de las proteínas	2
2. El plegamiento	4
2.1. Aspecto termodinámico del plegamiento	6
2.2. Estabilidad y equilibrio	7
2.3. Modelos de mecanismos de plegamiento	13
3. El sistema de estudio: la ATP sintasa	18
3.1. Estructura de la ATP sintasa	18
3.2. Mecanismo catalítico de la ATP sintasa	20
3.3. La subunidad $\beta$ de la ATP sintasa de <i>Bacillus PS3</i>	21
Capítulo II: Antecedentes	23
Capítulo III: Objetivos	26
Capítulo IV: Métodos	27



---

1. Crecimiento y cosecha de células	27
2. Purificación de T $\beta$	28
3. Estudios de fluorescencia intrínseca	29
4. Estudios de Dicroísmo Circular	30
5. Estudios calorimétricos	31
Capítulo V: Resultados y Discusión	32
1. Sobreexpresión y purificación de T $\beta$	32
2. Estudios de desplegamiento térmico de T $\beta$ : Dicroísmo Circular	36
3. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca por unión de nucleótido	43
4. Estudios de desplegamiento térmico de T $\beta$ : Calorimetría	47
Capítulo VI: Conclusiones	52
Capítulo VII: Perspectivas	54
Apéndice A	56
Apéndice B	60
Referencias	70

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

1. Niveles de organización estructural de la ATP sintasa	3
2. Cambio del $\Delta G_{\text{desplegamiento}}$ como función de la temperatura	9
3. Modelos de mecanismos de plegamiento	14
4. Embudos de plegamiento	17
5. Esquema de la estructura de la ATP sintasa	19
6. Estructura de la subunidad $\beta$ de la ATP sintasa de <i>Bacillus PS3</i>	22
7. Sobreexpresión de $T\beta$	33
8. Perfil de elusión de $T\beta$	34
9. Purificación de $T\beta$	35
10. Espectros de DC de $T\beta$	36
11. Desplegamiento térmico de $T\beta$ seguido por DC	37
12. Desplegamiento de $T\beta$ a dos velocidades de calentamiento	38
13. Espectros de DC de $T\beta$ a diferentes temperaturas	39
14. Análisis de estructura secundaria de $T\beta$	41
15. Cambio promedio de estructura secundaria en $T\beta$	42
16. Localización de los residuos de tirosina en $T\beta$	43
17. Espectros de emisión de $T\beta$ nativa	44
18. Espectros de emisión de $T\beta$ renaturalizada	45
19. Reversibilidad del desplegamiento de $T\beta$ por fluorescencia	45
20. Desplegamiento térmico de $T\beta$ seguido por DSC	47
21. Curva de DSC de $T\beta$	48
22. Tratamiento de los datos de DSC	49
23. Reversibilidad del desplegamiento de $T\beta$ por DSC	50

---

# ÍNDICE DE TABLAS

1. Composición molecular de una célula promedio de <i>E. coli</i>	1
2. Taxonomía de <i>Bacillus PS3</i>	21
3. Proteínas monoméricas de más de 300 aminoácidos que exhiben un desplegamiento reversible estudiado por DSC	24
4. Rendimiento de proteína durante el protocolo de purificación	35
5. Parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de T $\beta$ : DSC	49

---

# RESUMEN

El estudio termodinámico del proceso de plegamiento de una proteína nos da una aproximación de cuáles son las fuerzas que participan en la estabilidad de dicha proteína y cuál es la contribución de cada una de ellas. Esto posee una importancia inherente, ya que el entendimiento de las fuerzas que operan en la estabilidad y función de las proteínas hará posible el diseñar proteínas con distintas características funcionales y predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos.

La subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3* ( $T\beta$ ) es una proteína monomérica de 473 aminoácidos, constituida por tres dominios estructurales y que contiene la mayor parte del sitio catalítico para la síntesis de ATP. En el presente trabajo se estudió el desplegamiento térmico de  $T\beta$ . El proceso se monitoreó mediante técnicas de dicroísmo circular (DC) y de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las conclusiones más sobresalientes de este trabajo son: 1) el desplegamiento térmico de  $T\beta$  fue reversible bajo las condiciones estudiadas, lo cual es poco común en proteínas con características como las de  $T\beta$ ; 2)  $T\beta$  renaturalizada posee una capacidad de unión de ATP semejante al de la proteína nativa; 3) el proceso de desplegamiento se lleva a cabo mediante dos transiciones, donde cada una de estas transiciones se ajusta a un modelo de dos estados; 4) las hélices  $\alpha$  parecen ser las primeras estructuras que desaparecen durante el desplegamiento térmico; y 5) de acuerdo a los datos obtenidos se sugiere que el mecanismo de plegamiento de  $T\beta$  consta de una primera transición que corresponde al desplegamiento concertado del dominio C-terminal y el dominio de unión al nucleótido de  $T\beta$ , seguida de una segunda transición que corresponde al desplegamiento del dominio N-terminal.

---

## Capítulo I

# INTRODUCCIÓN

## 1. Las Proteínas

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes en las células <sup>(1)</sup> y constituyen más de la mitad del peso seco en la mayoría de ellas (Tabla 1) <sup>(2, 3, 4, 5)</sup>. Estas macromoléculas tienen un papel central tanto en el ensamblaje como en las funciones de la célula. Las proteínas estructurales representan un factor importante en la forma y la estructura celular; las proteínas membranales son transportadoras de solutos entre compartimentos, o bien receptores de señales intra y extracelulares; las proteínas contráctiles participan en el movimiento de la célula. Otras proteínas actúan como los instrumentos de reconocimiento molecular y como parte esencial de las vías de transducción de señales. Por otro lado, las proteínas globulares, conocidas como enzimas, participan activamente en el metabolismo celular al catalizar diversas reacciones químicas <sup>(2, 4)</sup>.

**Tabla 1. Composición molecular de una célula promedio de *E. coli* <sup>(5)</sup>**

<b>Componente</b>	<b>% total de peso seco</b>
Proteína	55.0
RNA	20.5
DNA	3.1
Lípidos	9.1
Peptidoglucanos	2.5
Glucógeno	2.5
Otras moléculas orgánicas	3.8
Metabolitos, iones, cofactores	3.5

Esta gran variabilidad de funciones se puede concebir al considerar que las proteínas están formadas por un conjunto de 20 aminoácidos diferentes, cada uno de los cuales presenta una personalidad química

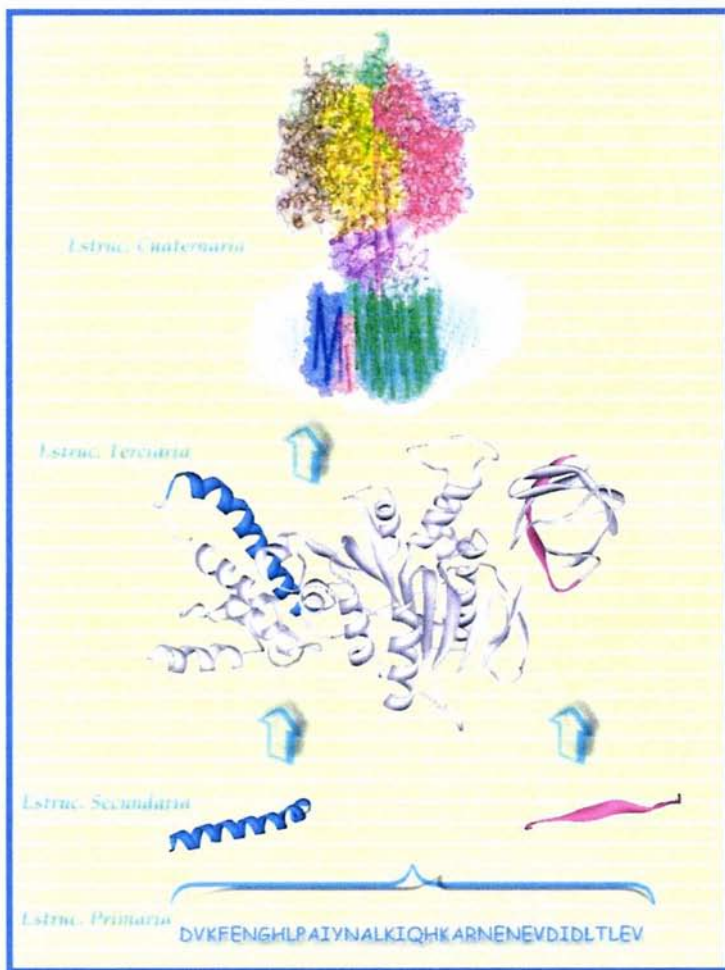
distinta <sup>(2)</sup>. Así, por ejemplo, para construir una proteína de 200 residuos de aminoácidos se pueden hacer combinaciones de los 20 aminoácidos posibles para generar  $20^{200}$  moléculas distintas, cada una con una secuencia específica y, por lo tanto, con una estructura química única <sup>(4)</sup>. Esto explica el origen de la enorme versatilidad de las propiedades observadas en las diversas proteínas, lo que a su vez sugiere por qué, durante la evolución, las proteínas fueron seleccionadas para mediar la mayoría de las reacciones celulares <sup>(2)</sup>.

### **1.1 Estructura de las Proteínas**

Al describir la estructura de las proteínas, se pueden reconocer los siguientes niveles de organización <sup>(2, 4, 6, 7)</sup> (Figura 1):

- Estructura primaria, constituida por la secuencia de aminoácidos de la proteína.
- Estructura secundaria, que se refiere al arreglo local de la cadena polipeptídica. Algunos de estos arreglos son de naturaleza regular originando estructuras periódicas conocidas como hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$ .
- Estructura supersecundaria, que define la disposición tridimensional de los elementos de la estructura secundaria;
- Estructura terciaria, que se refiere a la localización en el espacio tridimensional de cada uno de los átomos que conforman a la proteína.
- Estructura cuaternaria, la cual implica sólo a proteínas formadas por más de una cadena polipeptídica o que requieren de algún otro componente de naturaleza no aminoacídica para alcanzar su estado funcional, y que trata de la disposición que toman estos diferentes constituyentes cuando se asocian entre sí.

Todas las proteínas, como producto final de los genes, comienzan su existencia en un ribosoma como una cadena lineal de residuos de aminoácidos. A medida que se va sintetizando esta cadena polipeptídica, va quedando expuesta al solvente, donde, a través del proceso de plegamiento, alcanza su estructura funcional <sup>(1)</sup>.



**Figura 1. Niveles de organización estructural de la ATP sintasa.** En esta figura se muestran únicamente la estructura primaria, secundaria y terciaria de la subunidad  $\beta$ , así como la estructura cuaternaria de la ATP sintasa.

## 2. El Plegamiento

La función de una proteína está determinada por la disposición espacial definida de su secuencia de aminoácidos. A esta conformación tridimensional capaz de realizar una función biológica se le denomina estructura nativa <sup>(8)</sup>. Aunque cualquier molécula proteica puede, en principio, adoptar un número virtualmente astronómico de conformaciones tridimensionales diferentes, cada proteína tiene una estructura nativa única <sup>(1, 2)</sup>, o mejor dicho, un número limitado de conformaciones preferidas que fluctúan rápidamente entre ellas. Esta estructura nativa se adquiere mediante el proceso conocido como plegamiento <sup>(3)</sup>. Posterior al plegamiento, algunas proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales, así como un proceso de asociación de diferentes subunidades, para alcanzar su estado funcional <sup>(3, 8)</sup>. Hasta nuestros días, el mecanismo de plegamiento no es entendido a detalle.

El principal interés en el estudio del plegamiento radica en poder predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Si adicionalmente a esto se conociera como interactúa dicha estructura con otras moléculas, es decir, como funcionan las proteínas, se podría llegar a diseñar proteínas con distintas características funcionales, lo cual tendría una enorme aplicación en muy diversas áreas.

La posibilidad de estudiar el proceso de plegamiento de las proteínas *in vitro* nació en 1957 con los trabajos clásicos de Christian Anfinsen <sup>(9)</sup>. En estos trabajos se mostró que la ribonucleasa se pliega espontáneamente en solución acuosa con la completa recuperación de su actividad enzimática. Esta observación aportó evidencias claras de que la secuencia de aminoácidos de una proteína contiene la información necesaria para determinar la estructura tridimensional de la misma <sup>(3, 5)</sup>. A su vez, estos experimentos mostraron que las proteínas podían plegarse reversiblemente, implicando que su estructura nativa es la conformación termodinámicamente más estable <sup>(10)</sup>. Sin embargo, en 1968, Cyrus Levinthal sugirió la existencia de rutas preferenciales de plegamiento <sup>(8, 11)</sup>, argumentando que la cadena polipeptídica encuentra su estructura nativa en un periodo de tiempo extremadamente corto, comparado con el tiempo predicho para un mecanismo de búsqueda aleatoria <sup>(3)</sup>. Su argumento fue: si consideramos una cadena polipeptídica de 100 residuos de aminoácidos y si cada residuo puede tomar en promedio 10 conformaciones distintas,



entonces esta cadena polipeptídica podrá formar  $10^{100}$  conformaciones diferentes. Si el tiempo que tarda en cambiar la cadena polipeptídica de una conformación a otra es de  $10^{-13}$  segundos, el tiempo promedio requerido para muestrear todas las conformaciones posibles sería de  $10^{77}$  años. Sin embargo, se ha observado que las proteínas se pliegan en un tiempo de  $10^{-3}$  a  $10^3$  segundos, ya sea *in vivo* o *in vitro* <sup>(12)</sup>. A esto se le conoce como la “Paradoja de Levinthal”.

Los dos trabajos mencionados evidenciaron las dos finalidades con las que debe cumplir el plegamiento: 1) encontrar la conformación con menor energía libre y 2) hacerlo en un tiempo biológicamente relevante. Esto generó dos visiones diferentes acerca del plegamiento. Por un lado, es posible que la proteína alcance la conformación con un mínimo global en energía, sin importar el tiempo que esto tome. Esto implica que el plegamiento es independiente de la vía, es decir, que la estructura nativa está determinada sólo por las condiciones nativas finales y no por las condiciones desnaturalizantes iniciales, lo cual significa que el plegamiento se encuentra bajo control termodinámico. Por otro lado, debido a que el número de conformaciones accesibles es enorme y a que para explorar todas ellas la proteína requeriría un lapso de tiempo superior al observado en la naturaleza, es posible que el plegamiento esté bajo control cinético. Esto es, el plegamiento ocurre rápidamente debido a que depende de la vía, pues debe haber algún evento inicial o una secuencia de eventos bien definida en el proceso de plegamiento, con barreras de energía libre, que hacen a ciertos eventos irreversibles, lo cual permite explorar otras conformaciones. Por lo tanto, la proteína alcanza solo óptimos locales, ya que el mínimo de energía libre global no es necesariamente accesible en un tiempo biológicamente relevante <sup>(10, 13, 14)</sup>.

Posiblemente como consecuencia de esta discusión, el estudio del plegamiento se ha enfocado a dos aspectos diferentes del mismo: uno es cinético en carácter y trata del estudio del mecanismo por el cual una proteína desnaturalizada se pliega en la conformación nativa en solución o *in vivo* en un tiempo razonable; el otro es termodinámico en carácter y trata del estudio de la estabilidad de la estructura nativa de una proteína <sup>(15)</sup>.

En la actualidad existe una nueva visión que resuelve la paradoja de Levinthal y que surgió con la aparición de nuevos modelos basados en mecánica estadística y en simulaciones por computadora. La nueva visión reemplaza el concepto de vía de eventos secuenciales por el concepto de

embudo de eventos paralelos (ver *Modelos de mecanismos de plegamiento* más adelante). De esta manera, un conjunto de moléculas pueden alcanzar el mínimo global de energía libre (satisfaciendo la hipótesis termodinámica de Anfinsen) y hacerlo rápidamente (satisfaciendo la inquietud de Levinthal) siempre y cuando cada cadena siga su propia ruta y no una vía única <sup>(10)</sup>.

## **2.1 Aspecto Termodinámico del Plegamiento**

### ***Relevancia de la termodinámica para los fenómenos biológicos***

Los sistemas biológicos obedecen las leyes naturales de la física y la química <sup>(14)</sup>. Esto es cierto, puesto que la materia viviente está hecha por los mismos elementos que el mundo inanimado y la ley de la conservación de la energía es igualmente válida para los procesos que ocurren en la materia viviente como para todos aquellos del mundo inanimado <sup>(16)</sup>. Existe una enorme cantidad de información sobre los eventos que tienen lugar a nivel molecular en los sistemas vivos. Sin embargo, mucha de esta información es cualitativa y descriptiva, aún cuando los componentes involucrados son conocidos y las estructuras de muchos de ellos (proteínas y ácidos nucleicos) han sido determinadas. Muchos experimentos ingeniosos han sido realizados para establecer cuáles fenómenos se llevan a cabo, pero la mayoría de ellos no explican por qué los eventos biológicos suceden de la forma en que acontecen. Aquí es donde las ciencias físicas, incluyendo la termodinámica, pueden hacer una contribución esencial a la biología <sup>(14)</sup>.

Al aplicar las hipótesis termodinámicas a los procesos biológicos parecen surgir diferencias aparentemente irreconciliables entre éstos y los procesos físicos tradicionalmente descritos. Esto es, los sistemas simples rápidamente evolucionan hacia el equilibrio, el cual para un sistema aislado está caracterizado por una entropía máxima. En contraste, los sistemas vivos nunca alcanzan el equilibrio y en muchos casos evolucionan hacia estados de entropía decreciente, es decir, los procesos biológicos parecerían violar la segunda ley de la termodinámica. Esta aparente discrepancia tiene su origen al olvidar que un sistema biológico es un sistema abierto (donde ocurre intercambio de materia y energía) que se mantiene alejado del equilibrio. Así, aunque la entropía disminuye en los sistemas biológicos, la entropía del universo se incrementa. A un nivel microscópico, es probable que los procesos individuales en una célula

evolucionen hacia el equilibrio, pero éste no se alcanza debido a que las condiciones externas cambian constantemente, por lo que el punto de equilibrio también se desplaza a otro estado <sup>(14)</sup>.

A pesar de que los procesos biológicos no ocurren bajo condiciones de equilibrio, el equilibrio termodinámico ha sido ampliamente usado en la Bioquímica. Los bioquímicos han aislado procesos celulares específicos y los han estudiado *in vitro* bajo condiciones de equilibrio. Estas mediciones pueden ser muy útiles y relevantes para la situación *in vivo* porque, a pesar de la falta de equilibrio general en la célula, puede existir un equilibrio parcial, ya sea temporal o espacial <sup>(14)</sup>.

### ***El estudio termodinámico del plegamiento equivale al estudio de la estabilidad de las proteínas***

Uno de los procesos que ha estado sujeto a una caracterización termodinámica detallada es el plegamiento de proteínas. Es posible explorar termodinámicamente este proceso mediante el estudio clásico de la reacción de plegamiento-desplegamiento que, como ya se mencionó, se inició con los trabajos de Anfinsen <sup>(9)</sup>. El desplegamiento de una proteína puede ser inducido por cambios en la temperatura, en la presión, en el pH o por la adición de agentes desnaturizantes como urea y sales de guanidina. La transición entre el estado nativo y el estado desplegado puede ser estudiada utilizando métodos sensibles a la conformación de las proteínas. Los parámetros termodinámicos obtenidos de la exploración de las reacciones de plegamiento-desplegamiento de las proteínas nos permite conocer las fuerzas y factores que determinan la formación de la estructura nativa y, por lo tanto, representan una caracterización cuantitativa de la estabilidad de una proteína. Efectivamente, las fuerzas que dirigen el plegamiento de las proteínas son las mismas responsables de su estabilización, ya que a lo largo de la vía de plegamiento la cadena polipeptídica va incrementando su estabilidad <sup>(17)</sup>. Por ello, a continuación se describe el estudio de la estabilidad de las proteínas, que se sustenta en la caracterización termodinámica de su proceso de plegamiento.

## **2.2 Estabilidad y Equilibrio**

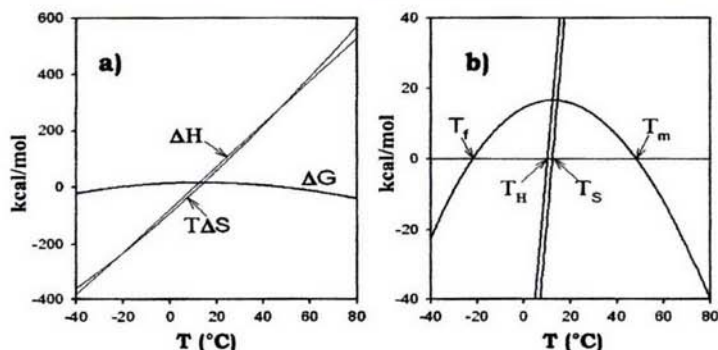
El conocimiento del origen de la estabilidad de las proteínas es esencial para el entendimiento de la estructura y función de estas macromoléculas. La estabilidad de una proteína se define como el trabajo necesario para

romper (o formar) su estructura tridimensional funcional, lo cual corresponde a la diferencia entre la energía libre de Gibbs de la proteína en estado nativo y la energía libre de Gibbs de la proteína en estado desplegado ( $\Delta G_{\text{estabilidad}}$ ) <sup>(18)</sup>. Esta estabilidad debe ser suficiente para que la proteína alcance su conformación nativa y se mantenga en relación a otras conformaciones posibles. No obstante, la estabilidad no debe ser muy grande, debe tener una magnitud tal que permita cambios conformacionales o ajustes en la estructura que son parte integral de la función de las proteínas <sup>(19)</sup>. Por ello es que, al parecer, las proteínas son sólo marginalmente estables, con un  $\Delta G$  de estabilidad típico de -5 a -20 kcal/mol <sup>(20)</sup>. Esta pequeña diferencia de energía libre entre el estado plegado y el desplegado es producto de un delicado balance entre los cambios, relativamente grandes, de la entalpía y la entropía del proceso ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) <sup>(12)</sup>. Por esta razón, todas las interacciones moleculares, aún las más pequeñas, pueden contribuir significativamente (positiva o negativamente) a la estabilidad. Estas interacciones incluyen tanto a las que suceden entre los grupos que forman a la proteína como aquellas que suceden entre estos grupos y las moléculas de agua que los rodean <sup>(21)</sup>. Las contribuciones entálpicas favorables más importantes para la estabilidad de las proteínas se originan a partir de las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas que compensan el incremento desfavorable de entropía conformacional durante el plegamiento <sup>(20, 22)</sup>. A la estabilidad de las proteínas también pueden contribuir factores extrínsecos tales como iones, cofactores, ligandos, metabolitos, solutos compatibles y covalentes conjugados <sup>(17)</sup>.

### ***Efecto de la temperatura en la estabilidad de las proteínas***

La estabilidad de una proteína varía con la temperatura, siendo máxima en el intervalo de 10 a 30°C para la mayoría de las proteínas globulares investigadas y decrece a cero tanto a altas como a bajas temperaturas <sup>(21)</sup>. Este comportamiento de la estabilidad de las proteínas con respecto a la temperatura puede predecirse a partir de la capacidad calorífica (cantidad de energía calorífica que requiere una sustancia para elevar su temperatura,  $C_p$ ) <sup>(23)</sup> del proceso de desplegamiento, que corresponde a la diferencia entre la capacidad calorífica de la proteína en su estado nativo y la de su estado desplegado <sup>(23, 24)</sup>. Este cambio en la capacidad calorífica,  $\Delta C_p$ , es grande y positivo y se debe principalmente a que, durante el

despliegamiento, se exponen al solvente grupos no polares que se encontraban ocultos en la estructura nativa (12, 21, 23). El  $\Delta C_p$  de despliegamiento determina que la entalpía y entropía sean fuertemente dependientes de la temperatura, pero ya que la entropía y la entalpía varían de forma similar con la temperatura y se compensan mutuamente, su efecto en el  $\Delta G$  no es tan acentuado (12). Esto causa una curvatura en la dependencia del  $\Delta G$  de estabilidad con la temperatura (Figura 2), que lleva a la existencia de una temperatura a la cual la estabilidad del estado plegado es máxima y a que esta estabilidad disminuya a altas y a bajas temperaturas, lo que resulta en la posibilidad de desplegar a las proteínas tanto por calor como por frío (12, 19). La desnaturalización por calor se da porque, a medida que la temperatura se eleva, la entropía tiende a crecer hasta un punto en el que la entalpía no puede compensarla más, resultando en la desnaturalización de la proteína. La desnaturalización por frío, por el contrario, ocurre debido a que el agua adopta una estructura más ordenada a bajas temperaturas, reduciendo así la magnitud del efecto hidrofóbico (25) (ver más adelante en *Fuerzas que estabilizan a las proteínas*).



**Figura 2. Cambio del  $\Delta G$  de despliegamiento como función de la temperatura.** a) Se observa como  $\Delta H$  y  $T\Delta S$  cambian notablemente con la temperatura, mientras que  $\Delta G$  de despliegamiento cambia sólo ligeramente. Este comportamiento del  $\Delta G$  se debe a que el  $\Delta H$  y el  $T\Delta S$  se compensan mutuamente puesto que esta curva se deriva de la variación de la  $\Delta H$  y  $\Delta S$  de despliegamiento como función de la temperatura. b) acercamiento de la gráfica a) para hacer más evidente el comportamiento del  $\Delta G$ , el cual tiene un máximo alrededor de los 20°C y disminuye tanto a altas como a bajas temperaturas.  $T_f$  y  $T_m$  corresponden a las temperaturas de despliegamiento por frío y por calor, respectivamente, donde  $\Delta G$  es igual a cero.  $T_H$  y  $T_S$  corresponden, respectivamente a las temperaturas a las cuales el  $\Delta H$  y el  $\Delta S$  son igual a cero.

### **Fuerzas que estabilizan a las proteínas**

Ya que las propiedades termodinámicas de las proteínas son el reflejo de la suma de las diferentes fuerzas que contribuyen a su estabilidad, es ilustrativo mencionar cuáles son estas fuerzas y lo que se conoce al respecto de su contribución a la energía de estabilidad.

#### **a) Puentes de hidrógeno**

Un puente de hidrógeno ocurre cuando un átomo de hidrógeno es compartido por, generalmente, dos átomos electronegativos. La fuerza del puente de hidrógeno depende de las electronegatividades y orientación de los átomos participantes en el enlace y es del orden de 2 a 10 kcal/mol <sup>(20)</sup>. En las proteínas, los puentes de hidrógeno pueden originarse tanto entre cadenas laterales como entre los grupos carbonilo y amida del esqueleto peptídico <sup>(20)</sup>.

La importancia de los puentes de hidrógeno en la estabilidad de las proteínas se hizo evidente por los trabajos de Pauling al proponer las estructuras modelo hélice  $\alpha$  y hoja plegada  $\beta$ , en las cuales los puentes de hidrógeno estabilizan y juegan un papel crucial de complementariedad estereoquímica. La existencia de estas estructuras fue pronto confirmada en estudios de rayos X de proteínas, apoyando la suposición de que los puentes de hidrógeno desempeñan un papel formativo en el plegamiento y la estabilidad de las proteínas <sup>(27)</sup>.

Una forma en la cual los puentes de hidrógeno pueden contribuir a la estabilidad de las proteínas es si éstos son más fuertes dentro de la proteína plegada que aquellos que se forman entre la proteína desplegada y el agua. Esta situación es posible ya que los puentes de hidrógeno en la proteína son intramoleculares y pueden ser especialmente estables si comprenden un sistema cooperativo debido a la presencia simultánea de muchos de ellos. Adicionalmente, ya que los tiempos de residencia de los puentes de hidrógeno dentro de la proteína son mayores que aquellos entre la proteína y el agua, y debido a que la constante dieléctrica en el interior de la proteína es mucho menor que la del solvente, los puentes de hidrógeno que se forman en el interior de la proteína pueden ser más energéticos que los que se forman entre la proteína desplegada y el agua <sup>(12, 26)</sup>.

Sin embargo, se ha sugerido que los puentes de hidrógeno sólo contribuyen a la unicidad de la estructura nativa, pero no a su estabilidad,

es decir, la estructura tiene que ser tal que todos los puentes de hidrógeno potenciales entre grupos polares queden compensados <sup>(22)</sup>.

### **b) Pares iónicos**

Existen dos formas diferentes en las cuales las interacciones electrostáticas pueden afectar la estabilidad de una proteína. La primera son repulsiones no específicas que se originan cuando la proteína está altamente cargada, como por ejemplo a valores extremos de pH. De esta manera, al incrementarse la repulsión por carga, la proteína tenderá a desplegarse, ya que la densidad de carga en la molécula plegada es mayor que en la molécula desplegada. La segunda forma se refiere a interacciones de carga más específicas, como los pares iónicos o puentes salinos que ocurren entre las cargas opuestas de dos cadenas laterales de aminoácidos cercanas. Se ha observado que los pares iónicos son comunes en la superficie de las proteínas y que pueden contribuir a su estabilidad. De la misma forma, si estos pares iónicos se encuentran en el interior de la proteína pueden afectar su estabilidad <sup>(20)</sup>. La contribución de los pares iónicos a la estabilidad de las proteínas ha sido estudiada experimentalmente mediante proteínas a las cuales se les ha creado o removido un par iónico por medio de experimentos de mutagénesis dirigida. Se ha estimado que la contribución de un par iónico en la superficie de una proteína es de 0 a 1 kcal/mol y que la de un par iónico en el interior de la proteína es de 2.4 a 4.8 kcal/mol. Debido a que uno de cada cinco pares iónicos se encuentran en el interior de la proteína, su contribución a la estabilidad de las proteínas es pequeña <sup>(26)</sup>.

### **c) Interacciones de van der Waals y Empaquetamiento**

Las fuerzas de van der Waals son asociaciones no covalentes entre moléculas eléctricamente neutras. Estas ocurren debido a que las moléculas neutras poseen momentos dipolares oscilantes como consecuencia de la fluctuación rápida de sus electrones. Este momento dipolar transitorio polariza a los electrones del grupo vecino y provoca la aparición de un momento dipolar tal que, en sus distancias de contacto de van der Waals, los grupos se atraen entre sí. Aunque su magnitud es muy pequeña, el gran número de contactos interatómicos que se establecen en una proteína debido a su densidad de empaquetamiento (equiparable a aquella de cristales de pequeñas moléculas orgánicas) las convierten en una fuerza importante para la estabilidad de las proteínas <sup>(6)</sup>. Por otro lado,

esta densidad de empaquetamiento provoca que las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en el interior de las proteínas se ajusten con una complementariedad extraordinaria <sup>(27)</sup>.

#### **d) Interacciones Hidrofóbicas**

El efecto hidrofóbico se refiere a la tendencia de las moléculas no polares a agruparse para minimizar sus contactos con el agua. Esto se debe en parte a que estas moléculas no pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, por lo que las moléculas de agua tienden a ordenarse alrededor de ellas para maximizar la formación de puentes de hidrógeno con otras moléculas de agua. Este ordenamiento del agua produce una disminución de la entropía, por lo que resulta entrópicamente favorable que las moléculas hidrofóbicas se agrupen entre sí, ya que al hacerlo la superficie no polar en contacto con el agua será menor y se liberarán algunas de las moléculas de agua que se encontraban ordenadas alrededor de ellas <sup>(26)</sup>.

Desde la década de los 50's Kauzmann sugirió que la formación de una interacción hidrofóbica durante el plegamiento involucra la ganancia de un puente de hidrógeno completo entre las moléculas de agua que rodean a la proteína, lo cual debería ser más importante que el simple cambio de fuerza de un puente de hidrógeno durante el plegamiento si los puentes de hidrógeno fueran la fuerza dominante en este proceso. Algunas de las evidencias que son consistentes con este punto son: 1) solventes no polares desnaturalizan a las proteínas; y 2) estudios cristalográficos muestran que en las proteínas globulares, la mayoría de los residuos no polares están secuestrados en el interior de la proteína donde evitan el contacto con el agua <sup>(20)</sup>.

Además, algo a favor de que las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas principales que estabilizan a las proteínas es que el  $\Delta C_p$  de transferencia de un soluto no polar desde su estado líquido puro al agua es grande y positivo. Esto implica que la entalpía y la entropía varían fuertemente como función de la temperatura, y que la dependencia del  $\Delta G$  de solubilidad de una molécula no polar con la temperatura es una curva, por lo que existe una temperatura a la cual la solubilidad de especies no polares en agua es mínima y crece a altas y a bajas temperaturas. Este comportamiento coincide con el  $\Delta G$  de estabilidad de las proteínas (Figura 2) donde su máximo coincide con el mínimo de solubilidad, donde el efecto hidrofóbico es máximo, y disminuye a altas y a bajas temperaturas donde la solubilidad aumenta y el efecto hidrofóbico disminuye <sup>(20)</sup>.



## 2.3 Modelos de Mecanismos de Plegamiento

Existen diferentes modelos que han sido propuestos para describir el proceso de plegamiento de proteínas (Figura 3). Estos incluyen:

### a) Modelo del Colapso Hidrofóbico

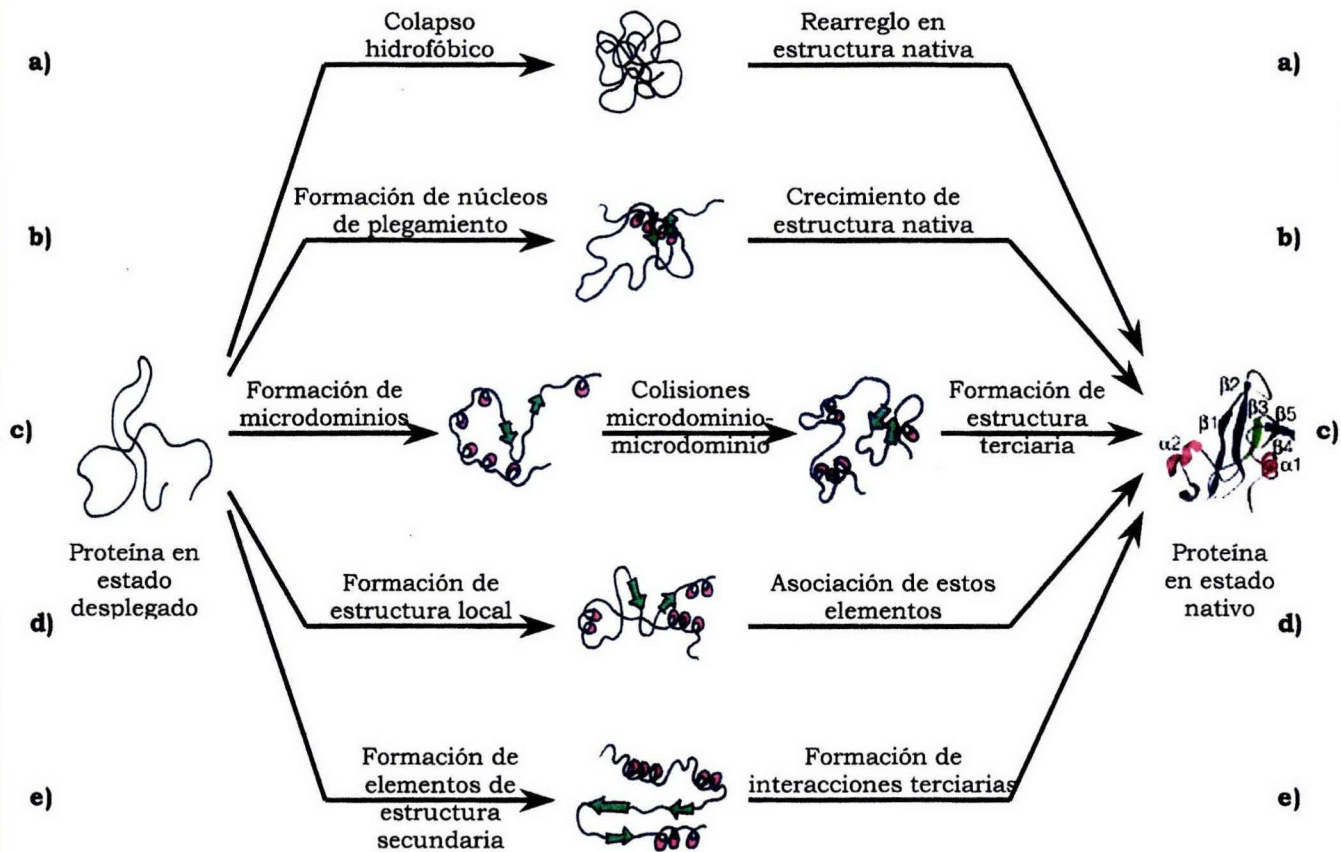
Este modelo fue originalmente postulado por Kauzmann en 1959 <sup>(28)</sup> y se ha seguido desarrollando hasta la actualidad (Figura 3a). De acuerdo a este modelo, el plegamiento está caracterizado por un proceso de dos pasos: un evento inicial que consiste en un colapso rápido, relativamente uniforme de la proteína, dirigido principalmente por el efecto hidrofóbico y que tomaría lugar antes de la formación de una estructura específica. Este evento reduce significativamente el número de conformaciones en el estado colapsado ya que el estado globular descarta la mayoría de las conformaciones prohibidas por impedimento estérico. Posterior a este colapso, existe un rearreglo en el cual la estructura secundaria estable comienza a crecer. Este proceso de crecimiento de estructura secundaria estaría dirigido por interacciones terciarias de tipo nativo y sobretudo por las interacciones con el solvente <sup>(13, 15, 29)</sup>.

### b) Mecanismo de Nucleación

Este mecanismo de plegamiento fue postulado inicialmente por Wetlaufer en 1973 <sup>(30)</sup> y desde entonces se ha ido modificando (Figura 3b). En su versión más reciente, conocida como el mecanismo de nucleación-condensación, se sugiere la existencia de un núcleo de plegamiento formado por residuos vecinos tanto en la estructura secundaria local como en las interacciones terciarias de largo alcance (en secuencia, no en espacio). Estas interacciones de largo alcance son requeridas para estabilizar el núcleo. Este núcleo se forma debido a que la cadena polipeptídica se pliega en las regiones con más alta probabilidad de formar la estructura nativa. Estas regiones dominan en el proceso de búsqueda y actúan como puntos de inicio para el plegamiento. Posteriormente y de manera acoplada, la estructura nativa de la proteína va creciendo a partir de este núcleo <sup>(31)</sup>.

### c) Modelo de Difusión-Colisión

En 1976 Karplus y Weaver introdujeron este modelo <sup>(32)</sup> (Figura 3c) en el cual proponían que el plegamiento de una proteína se da a través de la



**Figura 3. Modelos de mecanismos de plegamiento.** Representación esquemática de algunos modelos de mecanismos de plegamiento: **a)** colapso hidrofóbico, **b)** nucleación, **c)** difusión-colisión, **d)** jerárquico y **e)** "framework".

formación de microdominios los cuales son lo suficientemente cortos en secuencia como para que todas las alternativas conformacionales sean buscadas de manera rápida. Estos microdominios son sólo marginalmente estables y se mueven difusamente bajo la influencia de fuerzas internas y de fuerzas aleatorias externas. Colisiones microdominio-microdominio tienen lugar y llevan a la fusión en multimicrodominios intermediarios. Para que esto suceda, ambos microdominios deben tener parte de su estructura secundaria formada y una orientación apropiada. El paso final del proceso de plegamiento en este modelo es la formación de la estructura terciaria exacta, incluyendo el empaquetamiento cercano de las cadenas laterales. Aquí se considera que el plegamiento puede proceder como una serie de pasos con un orden único (una sola vía de plegamiento) o que pueden existir posibilidades de plegamiento paralelas (múltiples vías), cuyos componentes dominantes dependen de la secuencia de aminoácidos de la proteína y de las condiciones del solvente que la rodea <sup>(15)</sup>.

#### **d) Modelo Jerárquico**

En el modelo jerárquico (Figura 3d), postulado por Rose y Lesk en 1981 <sup>(33)</sup>, el plegamiento comienza con estructuras locales en secuencia y marginales en estabilidad, es decir, con elementos plegados transitoriamente que no son necesariamente estables pero que tienen mayores tiempos de población que las otras conformaciones alternativas. Estas estructuras interactúan, asociándose y estabilizándose mutuamente, para producir intermediarios cada vez más complejos que crecen hasta finalmente formar la estructura nativa <sup>(34, 35)</sup>. Este modelo propone que la incompatibilidad estérica entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos discrimina entre los diferentes tipos de estructura secundaria, dirigiendo así el proceso de plegamiento. Esto es, segmentos estéricamente dirigidos de estructura secundaria emergen en el estado desplegado permitiendo la formación de puentes de hidrógeno y de interacciones hidrofóbicas, estabilizando así dicha conformación y guiando los eventos de plegamiento subsecuentes <sup>(35)</sup>.

#### **e) Modelo "Framework"**

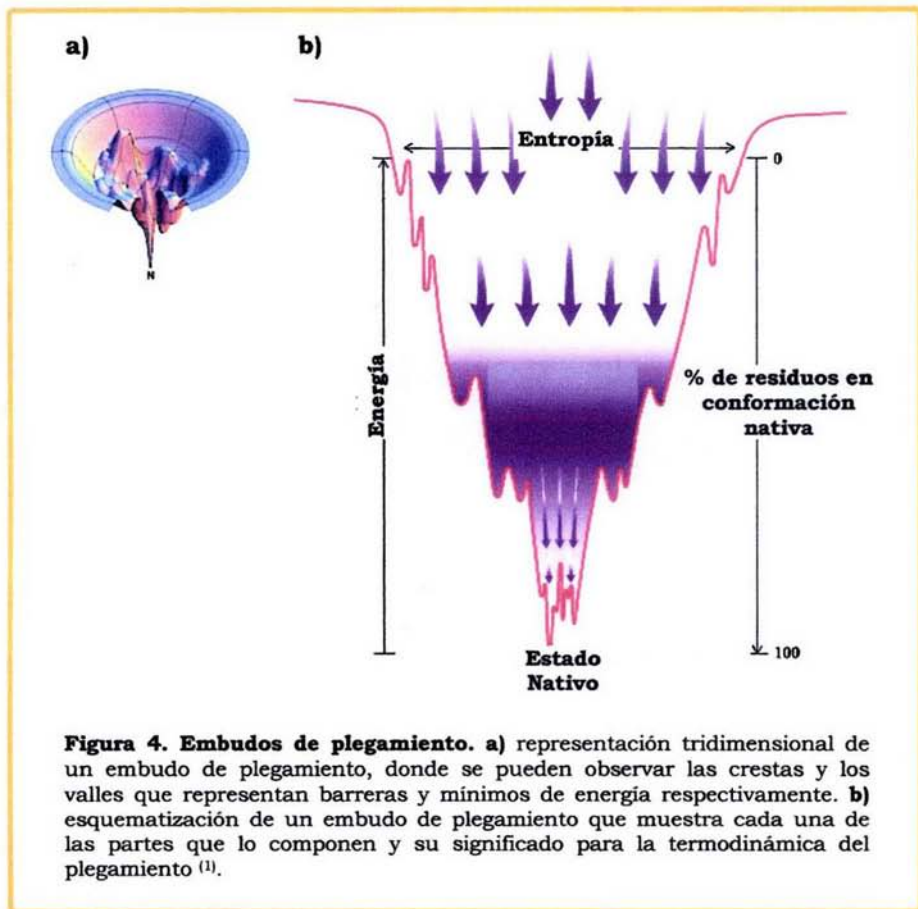
En este modelo (Figura 3e), propuesto por Kim y Baldwin en 1982 <sup>(36)</sup>, el plegamiento es secuencial y está dirigido a lo largo de una o unas pocas vías con intermediarios estructurales únicos. Comienza con la formación de elementos con una estructura secundaria estable basada en puentes de

hidrógeno, la cual es presumiblemente estabilizada por un pequeño número de interacciones terciarias específicas. El desarrollo subsiguiente de interacciones adicionales lleva a la formación de la estructura terciaria nativa de la proteína <sup>(29, 37)</sup>.

#### **f) Modelo del Embudo de Plegamiento**

Además del uso de modelos fenomenológicos, otro intento para examinar los detalles del mecanismo de plegamiento está basado en simulaciones. Un ejemplo de este tipo de modelos es el modelo de embudos de plegamiento, introducido en 1992 por Leopold, Montal y Onuchic <sup>(38)</sup>. Mientras los modelos fenomenológicos usan un solo tipo conformacional para representar cada uno de los estados desnaturalizado, de transición o intermediario, este modelo reconoce que tales estados macroscópicos son en realidad distribuciones o conjuntos de conformaciones individuales. Además, reemplaza el concepto de vía de plegamiento de eventos secuenciales por el concepto de embudo de plegamiento de eventos paralelos. Un embudo de plegamiento (Figura 4) representa las múltiples vías de plegamiento que puede tomar una proteína determinada bajo una condición en particular. El paisaje de energía (la superficie del embudo) corresponde a la energía libre de cada conformación en función de sus grados de libertad y puede tener una amplia cantidad de formas diferentes, con colinas, valles, canales, planos, fosos, etc., que representan barreras de energía, trampas cinéticas o caminos más directos al estado nativo. El eje vertical del embudo representa la energía libre interna de una configuración dada, es decir, la suma de las energías libres de los puentes de hidrógeno, pares iónicos, interacciones hidrofóbicas, solvatación, etc., para una cadena en una conformación particular. El área lateral de un paisaje de energía a una profundidad dada representa el número de conformaciones (o energía conformacional) que tiene la cadena polipeptídica con esa energía libre. Cada conformación está representada por un punto en esta superficie de energía multidimensional. La forma del embudo de plegamiento depende tanto de la secuencia de aminoácidos de la proteína, como de las condiciones externas, determinando el mecanismo de plegamiento. El proceso cinético de plegamiento o desplegamiento de una proteína puede ser comparado con un balón rodando por el embudo de plegamiento cuesta abajo. Así, la proteína tiende a cambiar su conformación de manera que su energía libre disminuya, ya sea desarrollando núcleos hidrofóbicos, formando puentes de hidrógeno y

salinos, etc., a la vez que las opciones conformacionales de la cadena comienzan a ser cada vez menos, hasta alcanzar el estado nativo. Cada molécula proteica individual corresponde a un balón rodando por el paisaje de energía siguiendo alguna trayectoria particular <sup>(10)</sup>.



### **3. El Sistema de Estudio: la ATP sintasa.**

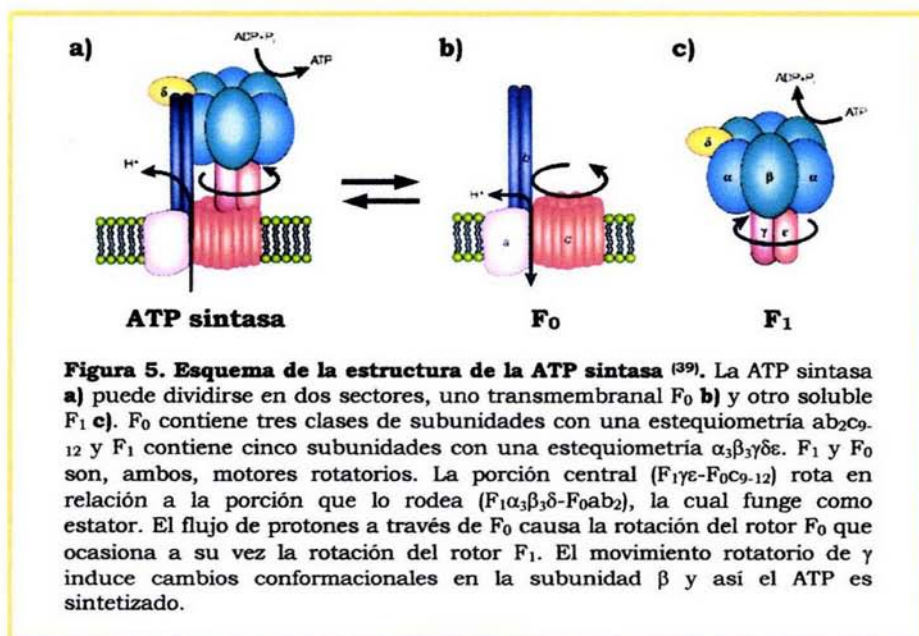
La ATP sintasa –también llamada  $F_1F_0$  ATP sintasa o  $F_1F_0$  ATPasa<sup>(39)</sup>- es una enzima ampliamente distribuida y altamente conservada en la naturaleza<sup>(40)</sup>. Está localizada en la membrana interna de las mitocondrias, en los tilacoides de los cloroplastos y en la membrana plasmática de las bacterias<sup>(41)</sup>. Esta enzima juega un papel central en el proceso de transducción de energía de todos los organismos vivos, pues es la encargada de catalizar la síntesis de ATP (adenosín trifosfato) a partir de ADP (adenosín difosfato) y fósforo inorgánico en presencia de  $Mg^{2+}$  y utilizando la energía derivada del gradiente de potencial electroquímico de protones a través de la membrana<sup>(40)</sup>. Este potencial es generado por la cadena de transporte de electrones en la respiración o en la fotosíntesis, la cual bombea protones en contra de un gradiente<sup>(39)</sup>.

Esta enzima ha generado un gran interés entre los bioquímicos. Su estudio, a la fecha, ha dado lugar a tres premios Nobel. Este interés en la ATP sintasa se debe principalmente a dos razones. La primera es porque el ATP impulsa una gran parte de las actividades celulares que requieren energía, por lo que su síntesis catalizada por la ATP sintasa, es de gran relevancia. La segunda, porque esta enzima utiliza la rotación física de sus propias subunidades como un paso para promover la catálisis, un mecanismo novedoso y diferente a aquellos comúnmente utilizados por otras enzimas conocidas<sup>(39)</sup>.

#### **3.1 Estructura de la ATP sintasa**

La ATP sintasa es un gran complejo proteico formado de aproximadamente 3500 aminoácidos (500 kDa)<sup>(39)</sup> compuesto de dos sectores discretos, designados  $F_0$  y  $F_1$  (Figura 5a).  $F_0$  está embebido en la membrana; comprende subunidades muy hidrofóbicas y provee la vía por la cual pasan los protones a favor del gradiente electroquímico<sup>(42)</sup>. Está compuesto por tres subunidades con una estequiometría probable  $ab_2c_{9-12}$ <sup>(42)</sup>, donde las subunidades  $c$  se encuentran formando un anillo (Figura 5b).  $F_1$  es el sector catalítico, el cual actúa como una ATPasa soluble cuando es separado de  $F_0$ . Está compuesto por cinco subunidades con una estequiometría  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  (Figura 5c), donde  $\alpha$  y  $\beta$  se alternan formando un

cilindro, el cual contiene seis sitios de unión a nucleótido localizados en las interfases  $\alpha\beta$ , tres de ellos son catalíticos y residen predominantemente en las subunidades  $\beta$ . Estos sitios alternan con tres no catalíticos que residen predominantemente en las subunidades  $\alpha$  (40). La subunidad  $\gamma$  ocupa el centro del cilindro (43) y las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$  se encuentran en su periferia. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están altamente conservadas entre las diferentes especies y su secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional son similares debido a que son homólogas entre sí. De hecho, se supone que evolucionaron probablemente por duplicación de un gen ancestral (42, 44).



**Figura 5. Esquema de la estructura de la ATP sintasa** (39). La ATP sintasa **a)** puede dividirse en dos sectores, uno transmembranal **F<sub>0</sub>** **b)** y otro soluble **F<sub>1</sub>** **c)**. **F<sub>0</sub>** contiene tres clases de subunidades con una estequiometría  $ab_2c_9$ .  $12$  y **F<sub>1</sub>** contiene cinco subunidades con una estequiometría  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . **F<sub>1</sub>** y **F<sub>0</sub>** son, ambos, motores rotatorios. La porción central (**F<sub>1</sub>** $\alpha_3\beta_3\delta$ -**F<sub>0</sub>** $ab_2$ ) rota en relación a la porción que lo rodea (**F<sub>1</sub>** $\alpha_3\beta_3\delta$ -**F<sub>0</sub>** $ab_2$ ), la cual funge como estator. El flujo de protones a través de **F<sub>0</sub>** causa la rotación del rotor **F<sub>0</sub>** que ocasiona a su vez la rotación del rotor **F<sub>1</sub>**. El movimiento rotatorio de  $\gamma$  induce cambios conformacionales en la subunidad  $\beta$  y así el ATP es sintetizado.

El arreglo estructural de la ATP sintasa más sencillo se observa en bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus sp.*, aumentando en complejidad en los organismos eucariontes.

En la bacteria termofílica *Bacillus PS3*, los genes que codifican para las ocho subunidades están organizados en un solo operón de 7500 pares de bases de longitud, el cual contiene un total de nueve genes en el orden  $Iacbd\alpha\gamma\beta\epsilon$ . (43, 45) El papel del gen *I* es controversial debido a que su producto no se ha encontrado en la enzima (45).

### 3.2 Mecanismo catalítico de la ATP sintasa

Como se mencionó, una particularidad de esta enzima es que usa la rotación física de sus propias subunidades como un paso de catálisis <sup>(39)</sup>. El modelo general más aceptado de cómo la enzima sintetiza ATP puede ser resumido de la siguiente manera: los protones (de tres a cuatro) se mueven a través de la membrana a favor del gradiente electroquímico “uniéndose” con un carboxilo en el interior de la subunidad c <sup>(42)</sup>. Esta subunidad actúa como un transductor de energía en  $F_0$  atrapando la energía del gradiente de protones y transformándola en energía mecánica al causar la rotación del anillo de subunidades c <sup>(39, 42)</sup>. Este movimiento rotatorio se transmite a la subunidad  $\gamma$  que también rota <sup>(39)</sup>. Las interacciones diferenciales (ver más adelante) de la subunidad  $\gamma$  con las tres subunidades  $\beta$  debidas a este movimiento rotatorio conducen a transiciones de conformación de las subunidades  $\beta$  <sup>(39, 46)</sup>. Cada subunidad  $\beta$  actúa a su vez como un transductor de energía en  $F_1$  ya que su cambio de conformación y, por lo tanto, su cambio en el estado de unión al nucleótido, resultan en la síntesis del ATP <sup>(39, 42)</sup>.

Las afinidades de unión de las subunidades  $\beta$  catalíticas por el sustrato o los productos están moduladas por su contacto con la subunidad  $\gamma$  <sup>(47)</sup>. Durante la catálisis cada subunidad  $\beta$  pasa a través de tres estados conocidos como “abierto”, “semiabierto” y “cerrado” y, a un tiempo dado, el estado conformacional de una subunidad  $\beta$  es diferente a los otros dos sitios, de acuerdo con el “mecanismo de cambio de unión” de la síntesis de ATP propuesto por Boyer en 1977 <sup>(43, 47, 48)</sup>. Acorde con este mecanismo, durante el ciclo de síntesis de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa, una rotación de  $120^\circ$  convierte un sitio abierto, con baja afinidad por el sustrato o producto, en un estado de unión al sustrato semiabierto. Una rotación más de  $120^\circ$  convierte el estado semiabierto en estado cerrado donde el producto ATP es formado. Otra rotación de  $120^\circ$  genera un giro completo y convierte al estado cerrado de vuelta al estado abierto, al liberar el ATP producido <sup>(47)</sup>. De la misma forma, existen evidencias que indican que la unión del nucleótido está ligada a cambios conformacionales en la subunidad  $\beta$  <sup>(44)</sup>. Los cambios conformacionales más notables de la subunidad  $\beta$  consisten en el desplazamiento hacia abajo y hacia arriba del motivo DELSEED (secuencia en el dominio C-terminal de la subunidad  $\beta$  que agrupa varios residuos ácidos que hacen contacto con la subunidad  $\gamma$ , ver Figura 6), lo que lleva al desplazamiento



de todo el dominio C-terminal del que forma parte, abriendo y cerrando así el sitio de unión al nucleótido. Las subunidades  $\alpha$  son importantes para la integridad estructural del complejo, ya que actúan como espaciadores entre las subunidades  $\beta$ , además de posicionarlas de tal manera que lleven a cabo los cambios conformacionales requeridos en respuesta a la rotación de la subunidad  $\gamma$  (47).

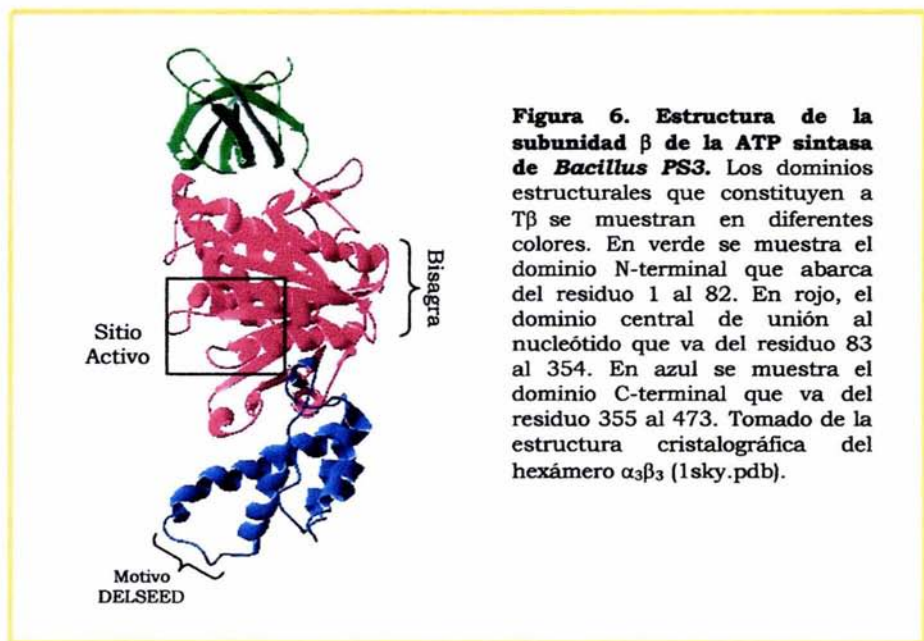
De acuerdo con la estructura cristalográfica de la  $F_1$ -ATPasa mitocondrial (49), cada subunidad  $\beta$  se encuentra ocupada por un ligando diferente: la llamada  $\beta_{TP}$  une AMP-PNP (un análogo no hidrolizable del ATP), la  $\beta_{DP}$  une ADP, mientras que en  $\beta_E$  el sitio de unión a nucleótido está vacío. Estudios de unión (“docking”) han permitido asignar a cada una de estas tres conformaciones de los sitios de unión catalíticos uno de los estados “abierto”, “semiabierto” y “cerrado” de acuerdo al mecanismo de cambio de unión (43). De esta manera se ha identificado al sitio de unión  $\beta_{DP}$  como el “cerrado”, el  $\beta_{TP}$  como el “semiabierto” y  $\beta_E$  como el sitio de unión “abierto”. Esto permite concluir que la secuencia de estados que un sitio de unión adopta durante la síntesis de ATP es abierto-cerrado-semiabierto (43).

### 3.3 La subunidad $\beta$ de la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3*

La bacteria termofílica *Bacillus PS3* (Tabla 2) fue aislada por primera vez en 1975 de un geiser de Mine en la provincia de Shizuoka, Japón. La temperatura de este geiser fluctúa entre los 80 y los 85°C.

<b>Tabla 2. Taxonomía de <i>Bacillus PS3</i></b>	
<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Reino</b>	Monera
<b>Phylum</b>	Bacteria
<b>Clase</b>	Firmicutes
<b>Orden</b>	Bacillales
<b>Familia</b>	Bacillaceae
<b>Género</b>	Bacillus
<b>Especie</b>	<i>Bacillus PS3</i>

La subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de esta bacteria ( $T\beta$ ) es una proteína monomérica de 473 aminoácidos con un peso molecular de 52 kDa. Consiste de tres dominios (Figura 6): un dominio N-terminal formado por un barril  $\beta$  de seis hebras, un dominio central de unión al nucleótido formado por nueve hebras de hojas  $\beta$  rodeadas por ocho hélices  $\alpha$  y un dominio C-terminal formado por un ramillete de seis hélices  $\alpha$ . En la cumbre de  $F_1$ , los seis dominios N-terminal de  $\alpha$  y  $\beta$  están unidos, formando una corona, lo que parece conferir estabilidad a toda la estructura. Además, en comparación a las subunidades  $\beta$  de otros organismos,  $T\beta$  tiene una inserción de siete residuos en su dominio N-terminal, lo que refuerza los contactos intersubunidades al interactuar con el barril  $\beta$  de las subunidades  $\alpha$  adyacentes <sup>(50)</sup>.



---

## CAPÍTULO II

# ANTECEDENTES

Esta tesis tiene como finalidad aportar datos termodinámicos que ayuden a conocer algunas de las contribuciones que diferentes fuerzas ejercen sobre la estabilidad de las proteínas, y en particular a la estabilidad de proteínas multidominio de más de 300 aminoácidos. La información sobre la termodinámica de estabilidad de proteínas con estas características es escasa, ya que para realizar este tipo de estudios se requiere que el proceso de desplegamiento de la proteína estudiada sea reversible. Esto suele ser raramente el caso, debido a que las probabilidades de que sucedan interacciones no específicas e irreversibles durante el replegamiento aumentan con el número de aminoácidos. Además, la cantidad de proteínas que exhiben un proceso de desplegamiento reversible disminuye cuando el desplegamiento es inducido por temperatura. Este método de perturbación tiene la ventaja de que el proceso puede ser estudiado mediante métodos calorimétricos (ver Apéndice B-3) donde los parámetros pueden ser deducidos directamente <sup>(18)</sup>. En la Tabla 3 se muestran algunas proteínas de más de 300 residuos que presentan un desplegamiento inducido por temperatura reversible y los parámetros termodinámicos obtenidos del proceso.

En cuanto a la ATP sintasa, se ha investigado el desplegamiento térmico de la porción  $F_1$  mitocondrial <sup>(62)</sup> y de cloroplasto <sup>(63)</sup> y de la  $F_0F_1$  ATP sintasa de *Bacillus PS3* <sup>(64)</sup>. El desplegamiento térmico de la  $F_1$  mitocondrial <sup>(62)</sup> fue irreversible y cinéticamente controlado, con una  $T_m$  de 53°C. El desplegamiento térmico de la  $F_1$  ATP sintasa de cloroplasto <sup>(63)</sup> también fue irreversible y con una  $T_m$  de 57.5°C, ligeramente mayor a la mitocondrial. Asimismo, los estudios de desplegamiento térmico de la  $F_0F_1$  ATP sintasa de *Bacillus PS3* <sup>(64)</sup> mostraron que el proceso es irreversible y cinéticamente controlado. La  $T_m$  fue de 81.7°C. La temperatura de desnaturalización de la  $F_0F_1$  ATP sintasa de *Bacillus PS3* es muy alta

**Tabla 3. Proteínas monoméricas de más de 300 residuos que exhiben un plegamiento reversible estudiado por DSC**

Proteína	Fuente	Peso (kDa)	# Res	# Dom	% Rev	# trns obs	pH exp	Tm (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔCp (kcal/mol °K)	ΔG (kcal/mol)	Modelo de ajuste
Myosina II rod <sup>(51)</sup>	<i>A. castellanii</i>	74.4	663	ND	ND	1	7.5	40.5	660.0	10.0	ND	Dos estados
HSA-BS <sup>(52)</sup>	<i>H. sapiens</i>	69.4	585	3	ND	1	7.4	66.4	101.5	ND	ND	Dos estados
Flagelina <sup>(53)</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i>	51.6	494	4	97	1	7.0	1) 43.8 2) 46.7 3) 46.4	78.9 210.5 283.9	1.2 4.1 4.8	4.1 11.2 15.5 (a 25°C)	Cuatro estados
α-amilasa <sup>(54)</sup>	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	49.3	453	3	99	1	7.2	43.7	238.0	8.47	0.02 (a 17°C)	Dos estados
Estrepto-cinasa <sup>(55)</sup>	<i>S. equisimilis</i>	47	414	3	ND	2	8.0	1) 57.0 2) 45.9 3) 69.9	64.6 86.8 46.4	ND	ND	Tres transiciones de dos estados
Fosfoglicerato cinasa <sup>(56)</sup>	<i>Thermotoga maritima</i>	43	399	2	98	1	3.4	1) 64.8 2) 74.6 3) 77.7	51.7 75.7 94.0	2.1 1.7 2.1	ND	Cuatro estados
Pepsinogeno <sup>(57)</sup>	<i>Sus scrofa</i>	40	386	3	ND	1	6.0	66.0	270.8	6.1	8.1 (a 25°C)	Dos unidades cooperativas
MPB <sup>(58)</sup>	<i>E. coli</i>	43	370	2	91	1	7.4	63.0	241.4	5.8	10.7 (a 34°C)	Dos estados
BSF <sup>(59)</sup>	<i>Bos taurus</i>	48	359	3	ND	2	6.0	1) 59.5 2) 91.5	87.7 45.7	2.66 0.78	4.0 3.3 (a 25°C)	Dos transiciones de dos estados
Tmod(N39) <sup>(60)</sup>	<i>G. gallus</i>	39.7	344	2	ND	1	3.0	39.6	91.6	ND	ND	Dos estados
RAP <sup>(61)</sup>	<i>H. sapiens</i>	39	323	ND	ND	2	8.7	1) 41.0 2) 51.2 3) 60.4 4) 65.9	47.0 39.0 41.0 43.0	ND	ND	Cuatro transiciones de dos estados

DSC, calorimetría de barrido diferencial (ver Apéndice B); # Res, número de residuos; # Dom, número de dominios; % Rev, porcentaje de reversibilidad; # trns obs, número de transiciones observadas en el termograma (ver Apéndice B); pH exp, pH experimental; ND, no determinado

comparada con sus homólogas de cloroplasto y mitocondria, lo que obviamente es consecuencia de la termoestabilidad del organismo. Dada la irreversibilidad de la  $F_1F_0$  ATP sintasa, una estrategia para estudiar la estabilidad de la ATP sintasa es descomponerla en partes más simples. El entender las bases energéticas y estructurales de cada una de sus subunidades ayudará a entender la contribución de éstas a la estabilidad de toda la enzima.

En el presente trabajo se estudió el proceso de desplegamiento de la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de *Bacillus PS3* que, además de cumplir con las características de proteínas grandes y multidominio, cuenta con la ventaja de pertenecer a un organismo termofílico, lo que probablemente aumenta la probabilidad de que dicho proceso sea reversible al ser inducido por temperatura.

---

## CAPÍTULO III

# OBJETIVOS

## 1. Objetivo General

- Caracterizar la estabilidad conformacional de la subunidad  $\beta$  aislada de la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3* ( $T\beta$ ).

## 2. Objetivos Particulares

- Sobreexpresar y purificar  $T\beta$ .
- Explorar las condiciones de reversibilidad para el desplegamiento de  $T\beta$  inducido por temperatura.
- Determinar los parámetros termodinámicos de desplegamiento de  $T\beta$  mediante estudios calorimétricos.
- Elucidar el mecanismo de desplegamiento de  $T\beta$ .

# MÉTODOS

## 1. Crecimiento y Cosecha de Células

- a) **Cultivo en medio sólido.** Células de *Escherichia coli* de la cepa DK8 que contienen el plásmido C95-I se crecieron a partir de placas de medio LB-agar-ampicilina (ver Apéndice A).
- b) **Precultivo.** A partir de células del cultivo en medio sólido a), se inocularon 50 mL de medio líquido LB estéril, el cual contenía 100 µg/mL de ampicilina, y se incubaron a 37°C y con una agitación de 250 rpm.
- c) **Cultivo.** Se inoculó con 40 mL del precultivo b), 1 L de medio líquido LB con 100 µg/mL de ampicilina y se dejaron crecer a 37°C y con una agitación de 250 rpm por 8 horas, tiempo en el cual se alcanzó la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660nm} \geq 0.6$ ).
- d) **Sobreexpresión.** Al cabo de 8 horas, se indujo la sobreexpresión con 1 mM del inductor IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) y se adicionaron 100 µg más de ampicilina por mL de medio. El proceso se mantuvo por 5 horas a 37°C y con una agitación de 250 rpm.
- e) **Cosecha de células.** Las células se centrifugaron a 3 840xg durante 10 minutos. Se cuantificó el peso húmedo. A partir de 2 L de cultivo, se obtuvieron 6 g de células, las cuales se resuspendieron en 200 mL de amortiguador de lisis (ver Apéndice A). Se aplicó una segunda centrifugación a la misma velocidad y las células se resuspendieron nuevamente en 100 mL de amortiguador de lisis.

## 2. Purificación de T $\beta$

Para cada paso, el grado de pureza de T $\beta$  se determinó por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes empleando el método de Laemmli <sup>(65)</sup> teñidos con azul Coomassie (ver Apéndice A). Además, se determinó la concentración de proteína en cada paso mediante el método del ácido bicinónico <sup>(66)</sup> (ver Apéndice A) para valorar el rendimiento.

- a) **Fragmentación de células.** Las células resuspendidas en amortiguador de lisis se rompieron por cambio de presión a 1500 psi en una prensa de French.
- b) **Primera separación: ultracentrifugación.** Las células fragmentadas (55 mL) se ultracentrifugaron a 100 000xg durante 70 minutos a 4°C.
- c) **Segunda separación: precipitación con sulfato de amonio.** El sobrenadante resultante de b) se llevó a una concentración saturante de 2.0 M de sulfato de amonio. Se dejó incubar durante toda una noche y se centrifugó a 27 200xg por 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante de la centrifugación se resuspendió en 7 mL del amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.3.
- d) **Tercera separación: cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25).** El volumen resuspendido se aplicó a una columna de Sephadex G-25 (90 x 1.5 cm) previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7.3 y se eluyó con el mismo amortiguador con un flujo de 0.240 mL/min.
- e) **Cuarta separación: cromatografía de intercambio aniónico (Mono-Q).** Las fracciones ricas en T $\beta$  se concentraron y se pasaron por la columna de Mono-Q/HR-10 de intercambio aniónico (montada en HPLC) previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7.3. La elusión de T $\beta$  se hizo con un gradiente de NaCl de 0 a 1.0 M empleando el programa 1 (ver Apéndice A).



### **3. Estudios de Fluorescencia Intrínseca**

Las proteínas con fluorescencia intrínseca poseen un espectro de emisión característico, reflejo de su contenido de residuos aromáticos y de la posición de éstos dentro de su estructura. Esta fluorescencia puede ser utilizada para cuantificar la unión de ligandos y los cambios conformacionales en dichas proteínas. Por ello, la espectroscopia de fluorescencia (ver Apéndice B-1) es una herramienta que resulta útil al evaluar la integridad de una proteína.

#### **Protocolo Experimental**

Con el fin de evaluar la integridad de la proteína purificada ( $T\beta$ ) se monitorearon los cambios en el espectro de emisión de fluorescencia usando un espectrofluorofotómetro ISS PCI Photon Counting Spectrofluorometer ISS. Se utilizó como blanco un amortiguador de Tricina-NaOH 2.0 mM pH 8.0, mismo que se empleó en todo el experimento. Las condiciones experimentales para todos los casos fueron 0.5 nm de paso de luz en excitación y 1.0 nm en emisión, excitación en 275 nm y el espectro de emisión se cuantificó de 295 a 400 nm a 25°C. Se utilizó una celda de cuarzo con tapón hermético (Starna) con un paso de luz de 4 mm de forma rectangular y de 600  $\mu$ L de capacidad. La concentración de  $T\beta$  fue de 0.125 mg/mL. Primero, se obtuvo el espectro de emisión de  $T\beta$ . Posteriormente, se obtuvo el cambio en el espectro de emisión incubando la proteína con 25, 100, 220, 340, 450, 570 y 780  $\mu$ M de ATP. El experimento se llevó a cabo tanto para la proteína nativa como para la renaturalizada.

## 4. Estudios de Dicroísmo Circular

El Dicroísmo Circular (DC, ver Apéndice B-2) ha sido ampliamente utilizado para determinar el contenido de estructura secundaria y supersecundaria de las proteínas. Por ello, las perturbaciones de este tipo de estructuras proteicas debidas, por ejemplo, a la unión de ligandos o a cambios térmicos, pueden ser monitoreadas mediante esta técnica.

### Protocolo Experimental

Con el fin de explorar las condiciones experimentales de reversibilidad para la reacción de desplegamiento-plegamiento de T $\beta$ , se realizó una prueba de desnaturalización térmica siguiendo la señal de DC en un espectropolarímetro Jasco J-750. T $\beta$  a 0.283 mg/mL, previamente desalada y equilibrada con Tricina-NaOH 20 mM pH 8.07 en la columna de Sephadex G-25, se colocó en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz.

La desnaturalización térmica de T $\beta$  se registró utilizando la señal de DC a 220 nm con un incremento de temperatura a diferentes velocidades en un intervalo de temperatura de 25 a 85°C. Se obtuvieron los espectros de DC a 25 y a 85°C con un intervalo de longitud de onda de 200 a 250 nm.

En un segundo tipo de experimento, se realizó un barrido de temperatura de 25 a 85°C a una velocidad de 1°C/min y se obtuvieron los espectros de DC de T $\beta$  a diferentes temperaturas a lo largo del barrido. El equipo se programó para detenerse automáticamente a una temperatura determinada y tomar un espectro de 250 a 200 nm de longitud de onda. La concentración de T $\beta$  para este experimento fue de 0.432 mg/mL y el amortiguador fue Tricina-NaOH 2.0 mM pH 8.0.

## 5. Estudios Calorimétricos

La calorimetría de barrido diferencial (DSC, ver Apéndice B-3) ha sido ampliamente utilizada para determinar datos termodinámicos del proceso de desplegamiento de las proteínas. Los parámetros termodinámicos que resultan de estos estudios permiten caracterizar cuantitativamente la estabilidad de dichas proteínas.

### Protocolo Experimental

Para explorar la estabilidad conformacional de T $\beta$  aislada se realizaron experimentos de desnaturalización por DSC en un calorímetro de barrido diferencial VP-DSC (Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimeter) de Microcal Inc. T $\beta$  se filtró con una columna de Sephadex G-25 en amortiguador de Tricina-NaOH 20 mM pH 8.0. Posteriormente, la solución fue degasificada y filtrada (0.45  $\mu$ m). La concentración de la proteína fue de 0.483 mg/mL y fue determinada espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción de 15 360 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 280 nm.

Las celdas del calorímetro, con capacidad de 0.5 mL, se lavaron exhaustivamente con agua y después con amortiguador. La línea base instrumental se trazó llenando ambas celdas con amortiguador y realizando tres barridos consecutivos de 20 a 100°C a una velocidad de 1.5°C/min, condiciones idénticas a las experimentales, asegurándose de esta manera la reproducibilidad de la línea base. Una vez terminada la adquisición de la línea base, la celda de muestra se llenó con la solución de T $\beta$  y se inició la corrida experimental. Terminado el primer barrido con la proteína, se llevó a la proteína nuevamente a 20°C con una velocidad de 1.5°C/min. Posteriormente, se registró otro barrido sin extraer la muestra de la celda con el fin de probar la reversibilidad de la desnaturalización de T $\beta$ .

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Sobreexpresión y Purificación de T $\beta$

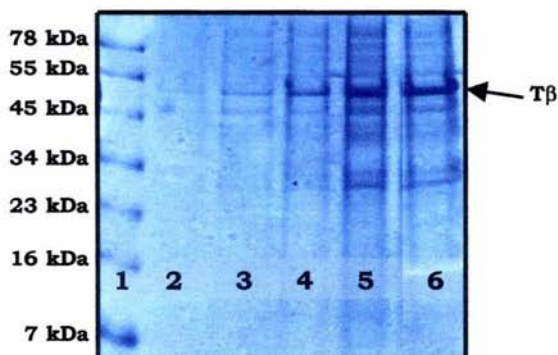
La subunidad  $\beta$  de *Bacillus PS3* (T $\beta$ ) fue sobreexpresada en células de *E. coli* DK8 transformadas con el plásmido C95-I que contiene el gen de T $\beta$  (donado por el Dr. Masasuke Yoshida). Para evitar la copurificación de las subunidades de la ATP sintasa de *E. coli*, las células de la cepa DK8 tienen una supresión total del operón *unc*, el cual codifica para la ATP sintasa <sup>(71)</sup>.

El crecimiento poblacional de esta cepa es lento. Esto se debe a que, al carecer de la ATP sintasa, las bacterias sólo puede obtener el ATP necesario para su crecimiento mediante glucólisis anaerobia y no mediante fosforilación oxidativa como normalmente lo hacen.

Por otro lado, se observó que a tiempos largos de incubación existe un incremento de actividad de proteasas que fragmentan a T $\beta$ . Por ello, después de 8 horas de crecimiento (densidad óptica de 0.521 a 600 nm) se indujo la sobreexpresión de T $\beta$  con IPTG y se dejó crecer a las células durante 4 horas más (Figura 7). Después de 4 horas no se encontraron diferencias significativas en la sobreexpresión de T $\beta$ , por lo que, también para evitar la exposición a la acción de las proteasas, sólo se dejó inducir la sobreexpresión de T $\beta$  durante estas 4 horas.

Como se puede observar en la Figura 7, existe una pequeña sobreexpresión basal de T $\beta$ , pues después de 4 horas de crecimiento se comienza a observar la presencia de esta proteína. Sin embargo, es hasta 2 horas después de inducir con IPTG, que se comienza a sobreexpresar significativamente T $\beta$ . 5 horas después de la sobreexpresión, no se observan diferencias en la cantidad de proteína sobreexpresada. A pesar de que se intentó agregar la misma cantidad de proteína a cada carril del gel, esto no fue completamente posible, ya que las proteínas provenían de

muestras con diferentes concentraciones de células que fueron fragmentadas con SDS y temperatura.



**Figura 7. Sobreexpresión de T $\beta$ .** Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método de Laemmli teñido con azul Coomassie donde se muestra la sobreexpresión de T $\beta$  a tiempos de 2 horas (carril 2), 4 horas (carril 3), 6 horas (carril 4), 2 horas después de inducir con IPTG (carril 5) y 5 horas después (carril 6). En el carril 1 se muestran los estándares de peso molecular (SeeBlue Pre-Stained Standard LC5625, Invitrogen). Se agregaron aproximadamente 10  $\mu$ g de proteína totales en cada uno de los carriles. Ver texto para más detalles.

A partir de 6 g de células, las cuales se rompieron usando una prensa de French, se realizó una primera separación de proteínas por ultracentrifugación diferencial. En esta primera separación, se separaron las proteínas solubles, entre las cuales se encuentra T $\beta$ , de restos celulares.

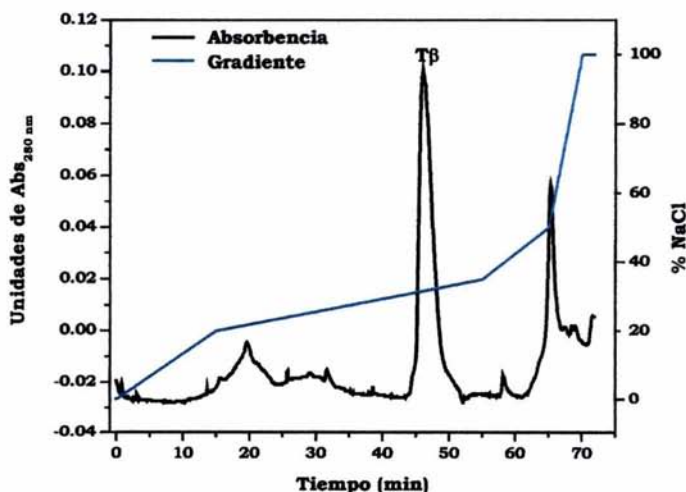
En una segunda separación, la fase soluble de la centrifugación se precipitó con sulfato de amonio (2.0 M), donde precipita T $\beta$ .

La tercera separación por cromatografía en Sephadex G-25 tuvo dos propósitos, el primero separar a T $\beta$  de proteínas de mayor y menor tamaño en pesos moleculares y el segundo separarla del sulfato de amonio.

Posteriormente las fracciones ricas en T $\beta$  se pasaron por la columna Mono-Q previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7.3. Debido a que T $\beta$  tiene un punto isoeléctrico de pH 4.6, a un pH de 7.3 se encuentra cargada negativamente y se unió a la resina de la columna de intercambio aniónico Mono-Q. Se utilizó un gradiente de 0 a 1.0 M de NaCl para eluir de forma diferencial a proteínas con diferentes afinidades por la resina.

En la Figura 8 se muestra el cromatograma resultante de la separación por cromatografía en Mono-Q. Se puede notar en el cromatograma un pico principal y bien definido que corresponde a T $\beta$ , que eluyó aproximadamente a 300 mM de NaCl.

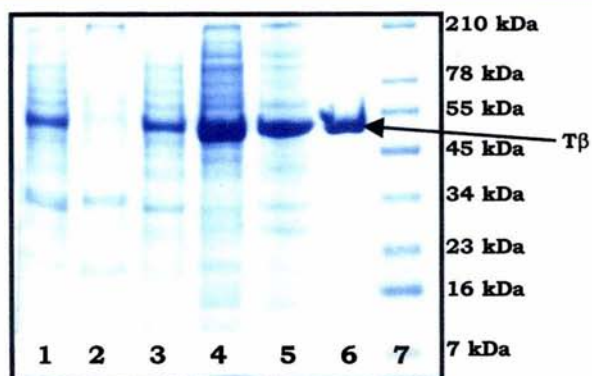
Como se muestra en el gel de acrilamida de la Figura 9, T $\beta$  resultó prácticamente pura siguiendo este protocolo de purificación. En el carril 1 de la Figura 9 se puede notar que la ruptura mecánica de las células se llevó a cabo satisfactoriamente. Después de la ultracentrifugación de las células fragmentadas se eliminaron las proteínas membranales (carril 2). Por otro lado, las proteínas solubles, donde T $\beta$  se encuentra, se muestran en el carril 3. Se puede observar cómo en cada carril se va purificando T $\beta$  (carriles 3 a 6) y después de pasarla por la columna Mono-Q está completamente pura (carril 6).



**Figura 8. Perfil de elución de T $\beta$ .** El experimento se realizó en un sistema HPLC utilizando una columna Mono-Q/HR-10. Se muestra el pico de absorbancia de T $\beta$  a 280 nm y el gradiente de NaCl. T $\beta$  eluye a aproximadamente 300 mM de NaCl.

Finalmente, en la Tabla 4 se resume el rendimiento de proteína que se logra al seguir este protocolo de purificación. Como se puede observar, el extracto crudo que se obtuvo a partir de 6 g de células contenía 432 mg de proteínas totales de los cuales se obtuvieron 8.7 mg de T $\beta$  purificada, lo

cual representa únicamente alrededor del 2% de las proteínas totales. Se puede notar también que la precipitación con sulfato de amonio logró separar la mayor proporción de proteínas de T $\beta$ .



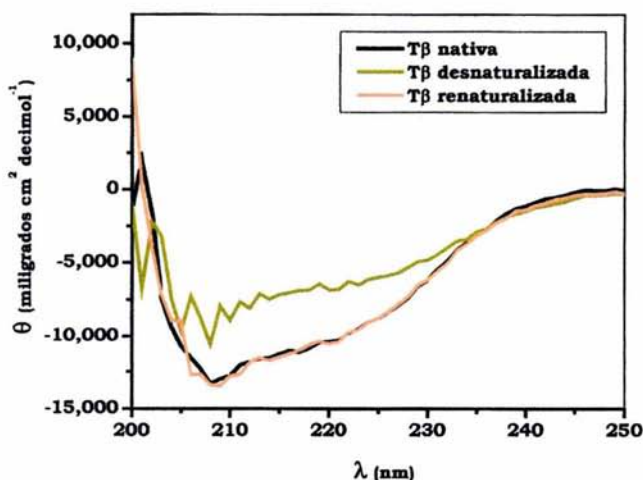
**Figura 9. Purificación de T $\beta$ .** Gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS de acuerdo al método de Laemmli. Tinción hecha con azul Coomassie. Muestras resultantes de cada paso de la purificación: (1) extracto crudo de las células fragmentadas, (2) proteínas membranales que precipitaron tras la ultracentrifugación, (3) proteínas del sobrenadante tras la ultracentrifugación, (4) proteínas precipitadas con sulfato de amonio, (5) fracción rica en T $\beta$  de la columna Sephadex, (6) T $\beta$  pura de la columna Mono Q, (7) estándares de peso molecular (SeeBlue Pre-Stained Standard LC5625, Invitrogen). Se colocaron 10  $\mu$ g de proteína en cada carril determinados por el método de BCA.

**Tabla 4. Rendimiento de proteína durante el protocolo de purificación**

<b>Etapa de purificación</b>	<b>mg de proteína totales</b>	<b>Rendimiento %</b>
Células fragmentadas	432.3	100
Sobrenadante de ultracentrifugación	291.0	67.3
Precipitado con sulfato de amonio	60.6	14.0
Cromatografía en Sephadex	40.6	9.4
Cromatografía en Mono-Q	8.7	2.0

## 2. Estudios del Desplegamiento Térmico de T $\beta$ : Dicroísmo Circular

Una condición indispensable para establecer parámetros termodinámicos a partir del estudio de desplegamiento de las proteínas, es que el proceso sea reversible. Por ello, para explorar las condiciones experimentales de reversibilidad para la reacción de desplegamiento-plegamiento de T $\beta$  se siguió la señal de DC. En la Figura 10 se muestra el espectro de DC de T $\beta$  nativa a 25°C (trazo negro), a un intervalo de longitud de onda de 200 a 250 nm, el cual corresponde a la región del UV lejano. En esta región, la señal de DC se atribuye al contenido de estructura secundaria de las proteínas. Se puede observar que el espectro de DC de T $\beta$  es el de una proteína típica constituida tanto por hélices  $\alpha$  como por hojas  $\beta$ , lo que coincide con el contenido de estructura secundaria de T $\beta$  (Figura 6).

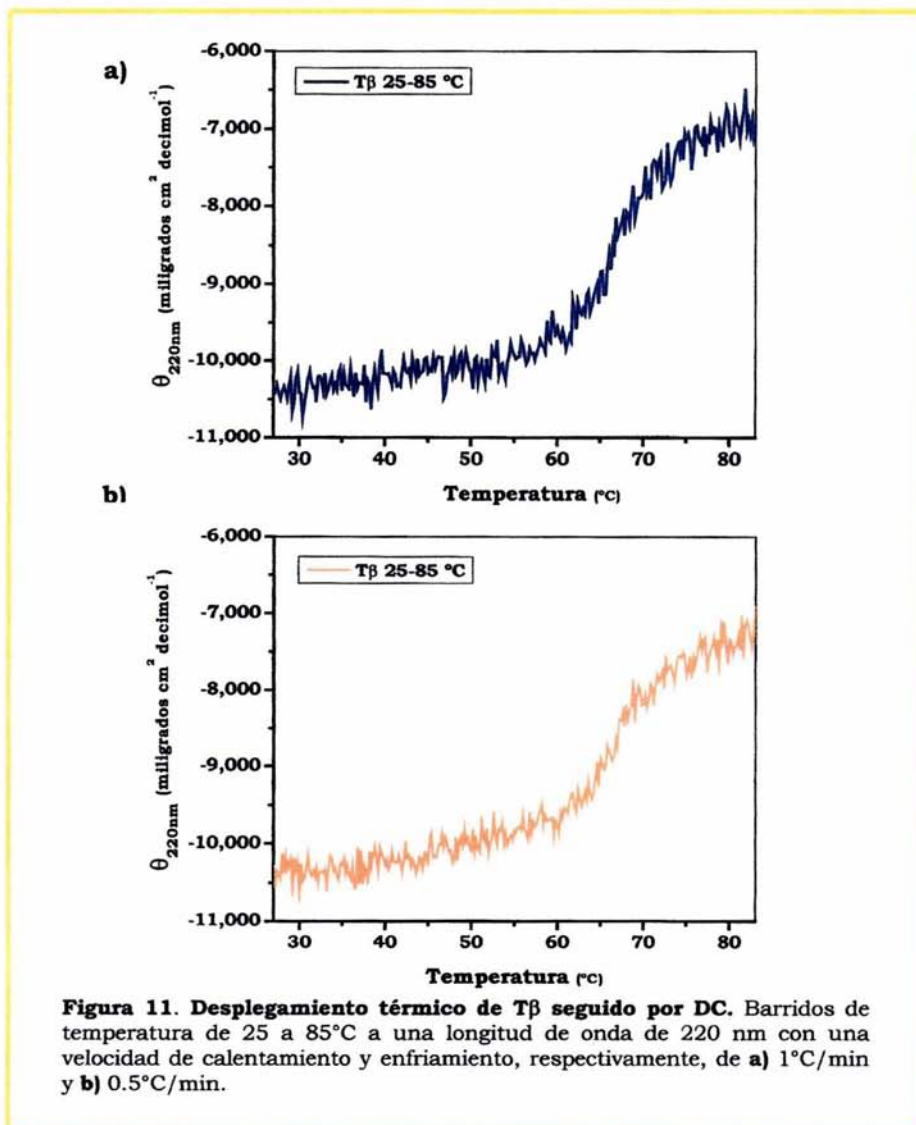


**Figura 10. Espectros de DC de T $\beta$ .** Las condiciones experimentales se describen en la sección de *Métodos*.

Para seguir la desnaturalización térmica comúnmente se elige la longitud de onda donde la señal de DC tiene un mínimo. Para la desnaturalización de T $\beta$  se eligió seguir la señal de DC a 220 nm, donde la señal refleja la estructura de hélice  $\alpha$  (Figura BIV de Apéndice B-2). En la



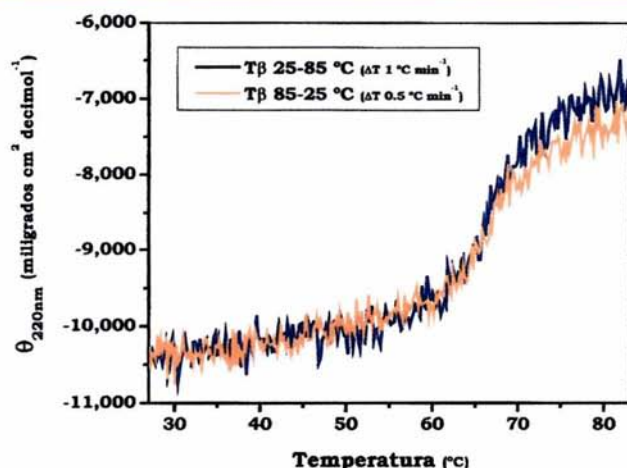
Figura 11a se muestran el barrido de temperatura de T $\beta$  de 25 a 85°C a una longitud de onda de 220 nm y una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La curva muestra una sola transición durante el desplegamiento de T $\beta$  con una T $m$  aparente de 66.8°C. Sin embargo, no se logró observar una asíntota clara de la señal de DC que indique que la transición se ha completado.



El análisis espectral de DC de T $\beta$  de la Figura 10, muestra una clara disminución de la señal de DC de T $\beta$  a 85°C (trazo verde), lo que indica una pérdida de la estructura secundaria de la proteína a esta temperatura, aunque parece conservar estructura secundaria residual.

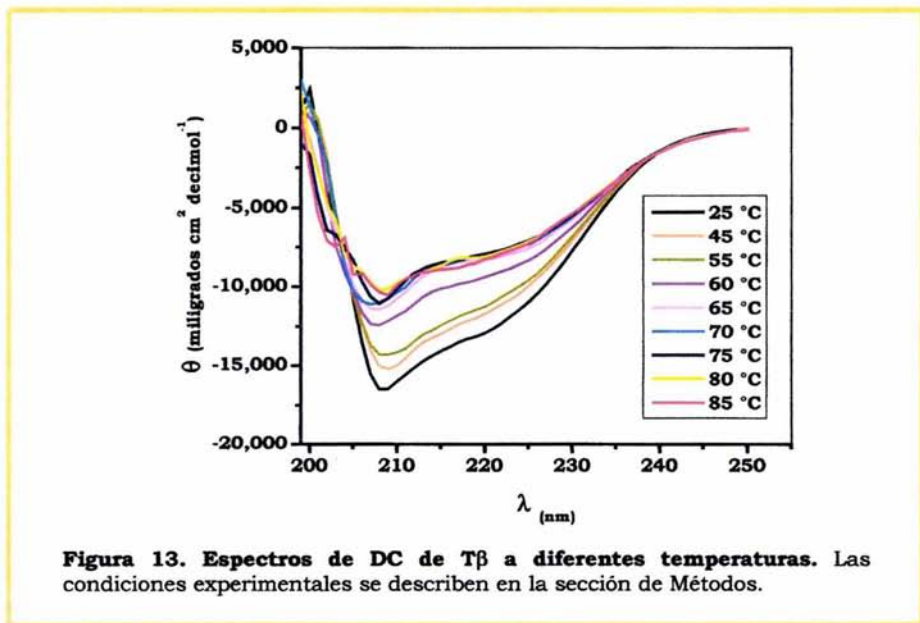
Para explorar si el proceso de desplegamiento térmico de T $\beta$  es reversible se enfrió la muestra hasta alcanzar nuevamente los 25°C con la misma velocidad de cambio de temperatura (1°C/min). En la Figura 10 se muestra el espectro de DC de la proteína renaturalizada a 25°C (trazo naranja) que al compararse con el espectro de DC de T $\beta$  nativa a 25°C (trazo negro), se puede observar una clara superposición de ambos espectros, lo cual sustenta que el proceso de desplegamiento térmico de T $\beta$  es reversible bajo las condiciones experimentales observadas.

En un segundo experimento, se desplegó a T $\beta$  pero con una velocidad de calentamiento de 0.5°C/min (Figura 11b). La curva muestra nuevamente una sola transición con una T $m$  aparente de 66.9°C. Si se sobreponen ambas gráficas (Figura 12), se observa que las curvas de desplegamiento a ambas velocidades se sobreponen muy aceptablemente (trazo azul para 1°C/min y naranja para 0.5°C/min), lo que indica que el proceso de desplegamiento térmico de T $\beta$  se encuentra en equilibrio.



**Figura 12. Desplegamiento de T $\beta$  a dos velocidades de calentamiento seguido por DC.** Sobreposición de barridos de temperatura de 25 a 85°C a dos velocidades de calentamiento diferentes, 1.0°C/min para el trazo azul y 0.5°C/min para el trazo naranja, a una longitud de onda fija de 220 nm.

Dada la reversibilidad del proceso de desplegamiento térmico de T $\beta$  se optó por hacer un nuevo experimento tomando su espectro de DC a diferentes temperaturas para sondear los cambios de estructura secundaria durante el proceso de desplegamiento térmico. En la Figura 13 se observa que entre los 25°C (trazo negro) y los 55°C (trazo verde), con una diferencia de 30°C, existe una pérdida progresiva de estructura secundaria. Sin embargo, entre los 55°C (trazo verde) y los 60°C (trazo púrpura), con una diferencia de 5°C, existe una pérdida abrupta de estructura secundaria lo que sugiere que entre esas dos temperaturas ocurre una transición cooperativa durante el proceso de desplegamiento. De los 65°C (trazo rosa) a los 85°C (trazo rojo) existe una pérdida aparentemente moderada de estructura secundaria. A los 85°C parece existir estructura secundaria residual, como se mencionó, que requiere más energía calorífica para desestabilizarla.



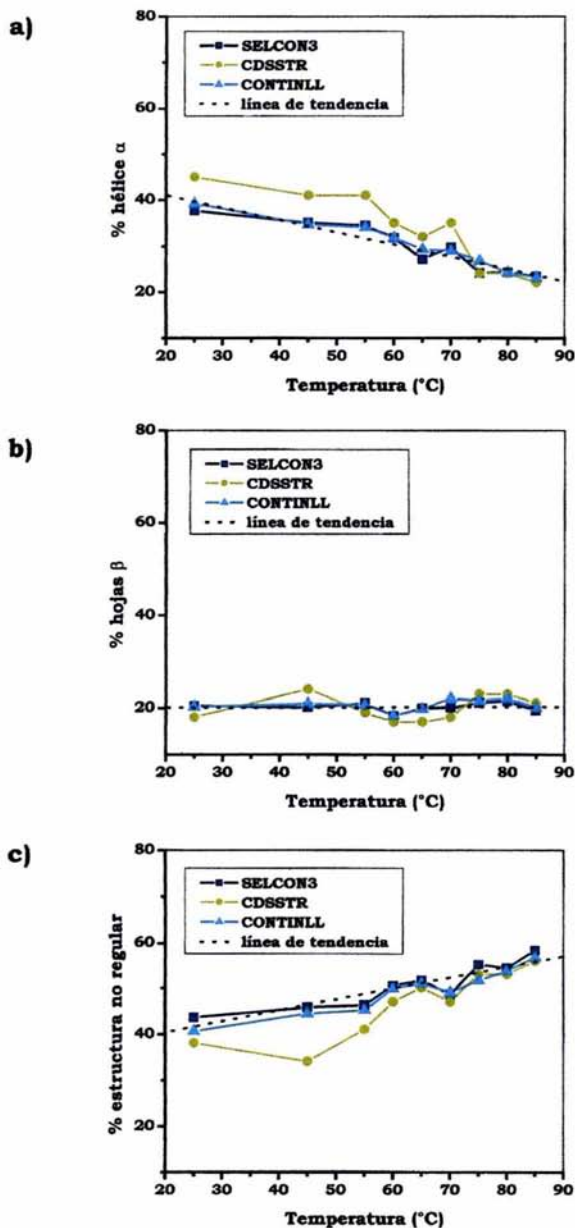
A partir de la estructura cristalográfica del hexámero  $\alpha_3\beta_3$  (1sky.pdb) se calculó la cantidad de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  de T $\beta$ . Se encontró que T $\beta$  está conformada por un 42% de hélices  $\alpha$  y un 25% de hojas  $\beta$ . El 33% restante corresponde a cualquier otro tipo de estructura secundaria. Estos valores fueron evaluados utilizando el programa DSSP <sup>(73)</sup>. Algo que resulta notorio

de la organización estructural de T $\beta$  es que su dominio N-terminal está conformado casi en su totalidad por hebras  $\beta$  careciendo por completo de hélices  $\alpha$ . En contraste, el dominio C-terminal está compuesto casi exclusivamente por hélices  $\alpha$  careciendo de hebras  $\beta$ . El dominio central, por su parte, es una combinación de ambos tipos de estructura secundaria.

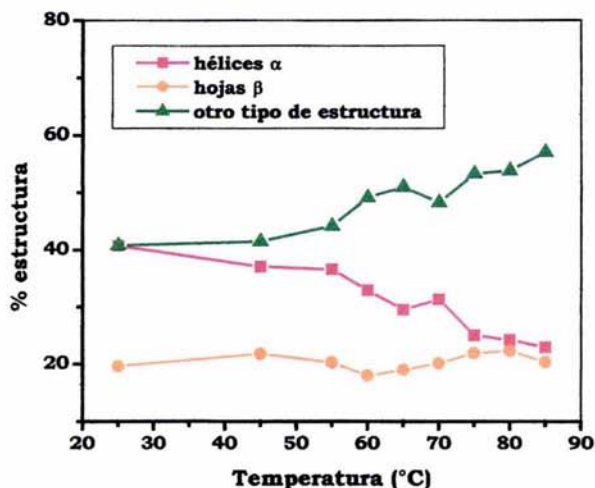
La deconvolución de los espectros de DC para estimar la estructura secundaria a diferentes temperaturas se muestra en la Figura 14, donde se utilizaron tres métodos diferentes <sup>(74)</sup>: Selcon3 (trazo azul), Continll (trazo cian) y Cdsstr (trazo verde). Se puede observar que los resultados obtenidos con los tres programas son semejantes entre sí y, aunque no son totalmente coincidentes, comparten la misma tendencia. A medida que la temperatura se incrementa, la cantidad de estructura hélice  $\alpha$  tiende a disminuir (Figura 14a). En general, la cantidad de hojas  $\beta$  se mantiene sin cambio a lo largo de todo el intervalo de temperatura aunque con algunas ligeras variaciones (Figura 14b). El resto de la estructura, la cual incluye asas, giros, estructura no regular y estructura en estado desplegado, se incrementa al aumentar la temperatura (Figura 14c).

La confiabilidad del análisis puede ser optimizada considerando las soluciones a partir de los tres métodos <sup>(74)</sup>. Una forma de hacerlo es promediando las tres soluciones obtenidas a partir de los tres métodos utilizados. En la Figura 15 se muestra el resultado de este promedio. Se observa que a 25°C T $\beta$  contiene alrededor de un 40% de hélices  $\alpha$ , 20% de hojas  $\beta$  y 40% de cualquier otro tipo de estructura, valores cercanos a los calculados a partir de la estructura cristalográfica. Asimismo, se observa un decremento progresivo de hélices  $\alpha$  (trazo rojo) de 25 a 55°C. Sin embargo, de 55 a 65°C existe una pérdida abrupta de hélices  $\alpha$ , haciendo más evidente lo observado en la Figura 13. A los 70°C pareciera existir una pequeña recuperación de estructura hélice  $\alpha$ , pero ésta probablemente se encuentra dentro del error experimental. Así, de manera general, la estructura hélice  $\alpha$  continúa cayendo hasta alcanzar aproximadamente un 20% a los 85°C. Las hojas  $\beta$  (trazo naranja), por su parte, parecen mantenerse sin cambio. Así, a 85°C, T $\beta$  contiene alrededor de 20% de hélices  $\alpha$ , 20% de hojas  $\beta$  y 60% de cualquier otro tipo de estructura.

El que no exista un cambio significativo de hojas  $\beta$  sugiere que este tipo de estructura secundaria en T $\beta$  puede ser más estable. Sin embargo, resulta poco común que un solo tipo de estructura secundaria se



**Figura 14. Análisis de estructura secundaria de T $\beta$ .** Deconvolución de los espectros de DC de la Figura 13 utilizando tres métodos diferentes y la base de datos 6 de CDPro <sup>(74)</sup>: **a)** hélices  $\alpha$ , **b)** hojas  $\beta$  y **c)** estructura no regular.



**Figura 15. Cambio promedio de la estructura secundaria de T $\beta$ .**  
Promedio de los datos de DC de la Figura 14.

mantenga sin cambio, por lo que esta sugerencia debe tomarse con reservas. Asimismo, esto abre la pregunta de cuáles son los factores que estabilizan a las hojas  $\beta$  en T $\beta$  y si estas hojas  $\beta$  pertenecen exclusivamente al dominio N-terminal o es una combinación entre éstas y aquellas hojas  $\beta$  del dominio central de unión al nucleótido.

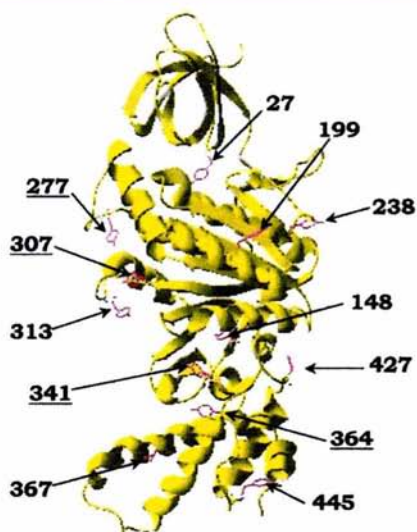
Finalmente, estos resultados no son concluyentes para establecer un modelo de la vía de desplegamiento de T $\beta$ , pero si proporcionan una idea de los cambios estructurales que suceden durante este proceso. A continuación se muestran estudios de fluorescencia y de calorimetría diferencial de barrido que pueden ayudar a elucidar el posible modelo de plegamiento de T $\beta$ .

### 3. Cambio De La Fluorescencia Intrínseca Por Unión De Nucleótido

Una de las técnicas empleadas para evaluar la integridad de las proteínas es la espectroscopia de fluorescencia. Esto se debe a que la intensidad y energía con la cual fluorescen los fluoróforos son muy sensibles al ambiente que los rodea.

T $\beta$  contiene 12 tirosinas distribuidas a lo largo de toda su secuencia, de las cuales Tyr<sup>277</sup>, Tyr<sup>307</sup>, Tyr<sup>341</sup> y Tyr<sup>364</sup> están conservadas en la secuencia primaria de las subunidades  $\beta$  de todas las F<sub>1</sub>-ATPasa conocidas (Figura 16) (72).

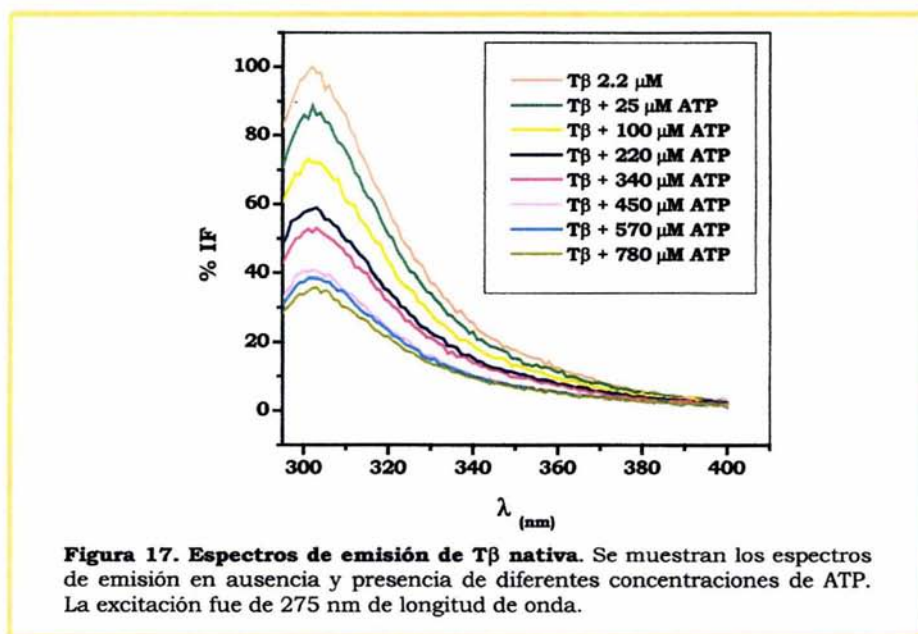
**Figura 16. Localización de los residuos de tirosina en T $\beta$ .** En esta figura se muestran todos los residuos de tirosina de T $\beta$  resaltados en rojo y sus posiciones en la secuencia de la proteína. Las posiciones de los residuos de tirosinas conservados en todas las subunidades  $\beta$  conocidas se muestran subrayadas. Tomado de la estructura cristalográfica del hexámero  $\alpha_3\beta_3$  (1sky.pdb).



Debido a que la fluorescencia intrínseca de T $\beta$  está dada únicamente por las tirosinas, ya que no contiene triptofanos y las fenilalaninas no contribuyen significativamente a la fluorescencia, la longitud de onda de máxima emisión para esta proteína debe estar alrededor de los 305 nm al excitar con una longitud de onda de 275 nm (12). En la Figura 17 se muestra que T $\beta$  tiene su máximo a 302 nm.

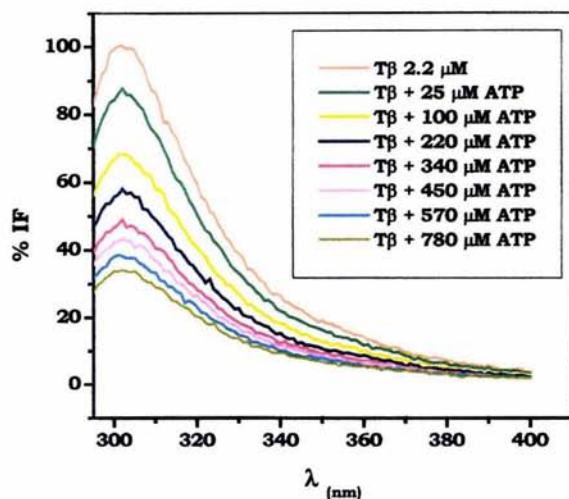
Se ha reportado una disminución >60 % de la fluorescencia para la subunidad  $\beta$  de *E. coli* tras la unión de ATP, excitando con una longitud de onda de 280 nm <sup>(44)</sup>. Este apagamiento se explica por los cambios conformacionales que lleva a cabo esta subunidad al unir nucleótido lo que provoca un cambio en el ambiente de sus fluoróforos. De esta forma, resulta práctico evaluar la integridad del sitio activo de T $\beta$  evaluando los cambios de su intensidad de fluorescencia en presencia de ATP.

En la Figura 17 se muestra el espectro de emisión de T $\beta$  nativa en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ATP. La excitación fue de 275 nm de longitud de onda. Se observa un apagamiento de la intensidad de fluorescencia inducido por la unión de ATP.

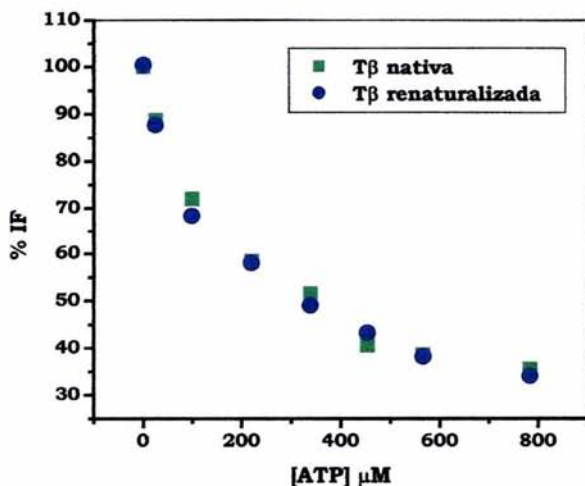


En la Figura 18 se muestra el espectro de emisión de T $\beta$  renaturalizada, es decir, de la proteína que fue llevada de 25 a 85°C y de regreso a 25°C durante los estudios de DC, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ATP. Si se compara el espectro de fluorescencia de T $\beta$  nativa y de T $\beta$  renaturalizada en ausencia de ATP ambos mantienen la longitud de máxima emisión a 302 nm y la misma intensidad de fluorescencia. Asimismo, el espectro de emisión de T $\beta$  renaturalizada muestra el mismo comportamiento de unión de ATP.





**Figura 18. Espectros de emisión de Tβ renaturalizada.** Se muestran los espectros de emisión en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ATP. La excitación fue de 275 nm de longitud de onda. El 100% de IF (intensidad de fluorescencia) se calculó con respecto al 100% de Tβ nativa.



**Figura 19. Reversibilidad del desplegamiento de Tβ por fluorescencia.** Cambio de la intensidad de fluorescencia de Tβ nativa y Tβ renaturalizada en función de la concentración de ATP. Se graficó la intensidad de fluorescencia de la longitud de máxima emisión (302 nm).

Regraficando la emisión a 302 nm con respecto a la concentración de ATP (Figura 19) se puede observar que la unión de ATP no cambia después de la desnaturalización y renaturalización de T $\beta$ . Esto demuestra que el sitio activo se reestructura completamente como el estado nativo. Esto indica que el proceso de desplegamiento térmico de T $\beta$  es reversible. De esta manera, podemos concluir que T $\beta$  se encuentra íntegra y correctamente plegada antes y después de inducir el desplegamiento térmico, es decir, el proceso es totalmente reversible.

## 5. Estudios de Desplegamiento Térmico de T $\beta$ : Calorimetría

El estudio del desplegamiento de algunas proteínas de microorganismos termofílicos puede ayudar a entender el problema de la estabilidad de las proteínas y las estrategias adaptativas que permiten el funcionamiento de éstas en condiciones extremas <sup>(17)</sup>. Como se mencionó, el estudio termodinámico del proceso de desplegamiento permite explorar cuáles son las contribuciones de las fuerzas involucradas en la estabilización de las proteínas. En este punto, los métodos calorimétricos constituyen una herramienta importante, ya que con éstos los parámetros termodinámicos pueden ser deducidos directamente.

La Figura 20 muestra la curva de DSC del desplegamiento térmico de T $\beta$  en Tricina 20 mM pH 8.0 (datos crudos). Se puede observar una primera transición en el intervalo de temperatura de 50 a 69°C seguida por una segunda transición en el intervalo de 69 a 88°C.

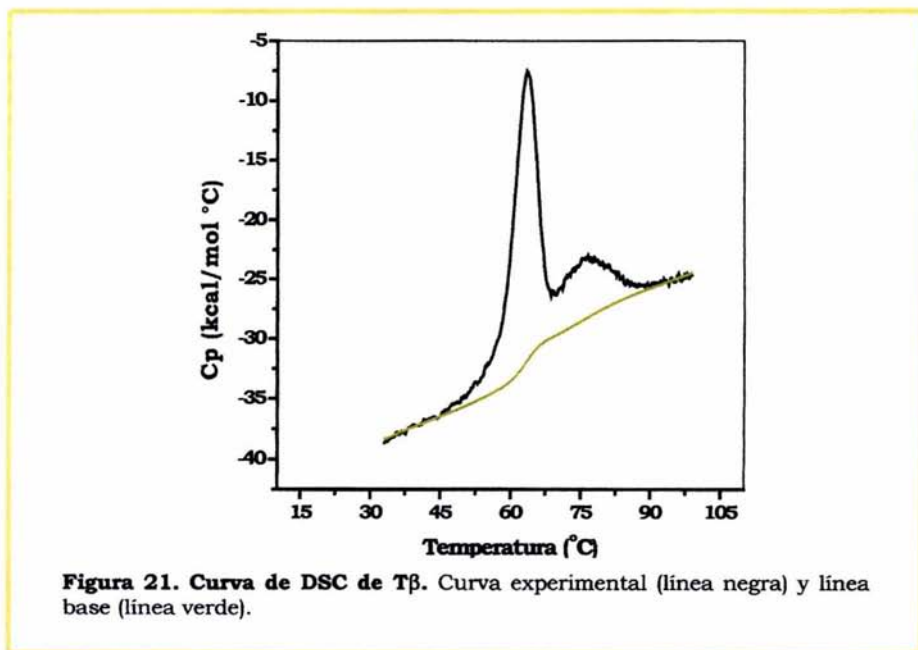
El gráfico muestra la capacidad calorífica (Cp) en kcal/mol °C en el eje vertical (rango de -45 a -5) frente a la temperatura en °C en el eje horizontal (rango de 15 a 105). La curva comienza a elevarse desde 15°C, mostrando una transición principal entre 50°C y 69°C, y una segunda transición entre 69°C y 88°C.

Temperatura (°C)	Cp (kcal/mol °C)
15	-42
30	-38
45	-35
60	-25
69	-10
75	-25
90	-25
105	-25

**Figura 20. Desplegamiento térmico de T $\beta$  (datos crudos).** El experimento fue realizado en Tricina 20 mM pH 8.0. La concentración de proteína fue de 0.483 mg/mL. La velocidad de barrido fue de 90°C/h.

47

Posteriormente, se restó la contribución del amortiguador a la curva calorimétrica del desplegamiento de T $\beta$ . Para el análisis de la deconvolución de los datos se trazó la línea base, que trata de modelar la contribución del  $\Delta C_p$  de desplegamiento con respecto a la temperatura (o grado de avance de la reacción). Se consideró que la mejor representación de este cambio de capacidad calorífica era trazando una línea base progresiva (Figura 21).

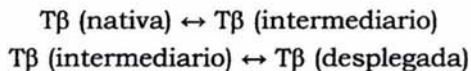


La deconvolución se realizó ajustando la curva a un modelo de dos transiciones de dos estados después de sustraer la línea base progresiva. Los resultados del ajuste se ilustran en la Figura 22 y los parámetros termodinámicos obtenidos de este ajuste en la Tabla 5. Un análisis termodinámico confiable del DSC requiere que el proceso de desplegamiento sea reversible y no cinéticamente controlado. La reversibilidad del proceso de desplegamiento de T $\beta$  en DSC fue demostrada tras dos barridos consecutivos, mostrando un 89% de recuperación del  $\Delta H_{cal}$ , es decir, de la entalpía de desnaturalización calorimétrica calculada del área bajo el pico de absorción de calor (Figura 23).

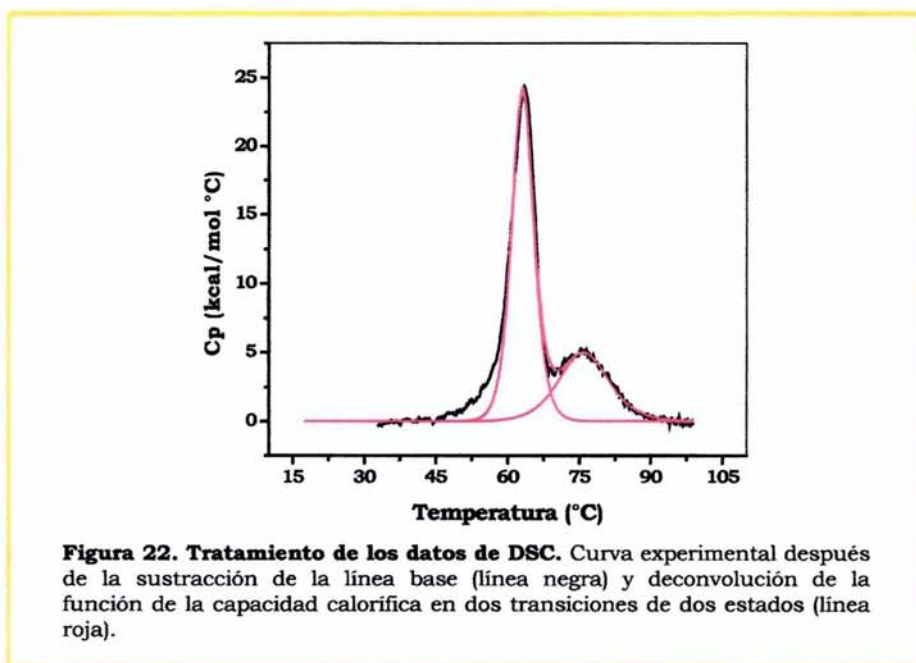
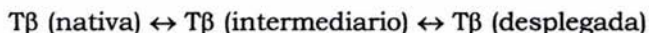
El ajuste de la curva calorimétrica de T $\beta$  muestra dos transiciones. La primera transición tiene una T $m$  de 63.1°C con un  $\Delta H$  de 146 kcal/mol.

La segunda transición ocurre a mayor temperatura con una  $T_m$  de 75.9°C y un  $\Delta H$  de 69.3 kcal/mol (Tabla 5).

Cada transición ajusta a un modelo de dos estados:



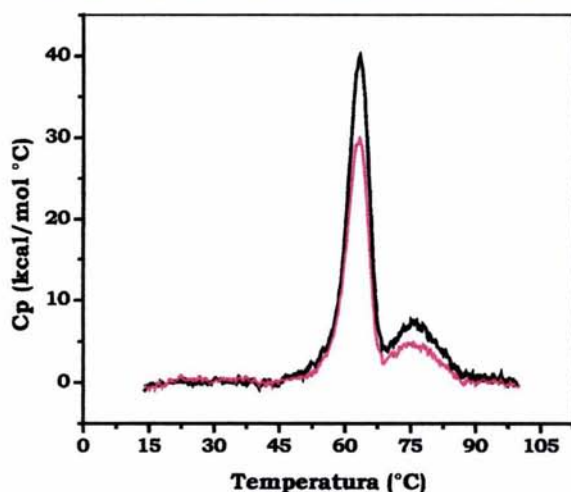
Resultando un mecanismo completo de:



<b>Tabla 5. Parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de Tβ: DSC</b>			
<b>T<sub>m1</sub></b> (°C)	<b>ΔH1</b> (kcal/mol)	<b>T<sub>m2</sub></b> (°C)	<b>ΔH2</b> (kcal/mol)
63.12 ± 0.02	146 ± 0.5	75.94 ± 0.14	69.3 ± 0.7

El signo positivo del  $\Delta H$  de desplegamiento sugiere que cuando  $\Delta G$  es igual a cero, es decir, a la  $T_m$ , la entalpía es favorable (de signo negativo)

para el proceso de plegamiento y la entropía, por lo tanto, es desfavorable. Esto sugiere que las interacciones de tipo polar son las principales fuerzas que estabilizan a T $\beta$ . Estas interacciones incluyen a los puentes de hidrógeno y a los puentes salinos. De hecho, se ha observado que en proteínas termofilicas existe un incremento de interacciones de tipo polar que proporciona una contribución extra a su estabilidad <sup>(17)</sup>. Por su parte, la entropía conformacional parece ser la principal fuerza que se opone al plegamiento de T $\beta$ .



**Figura 23. Reversibilidad del desplegamiento de T $\beta$  por DSC.** Dos endotermas consecutivas de DSC, la primera en el trazo negro y la segunda en el trazo rojo, muestran la reversibilidad del desplegamiento de T $\beta$ .

Por otra parte, como se pudo observar, la primera transición del desplegamiento de T $\beta$  tiene una T $m$  de 63°C. Sin embargo, la bacteria *Bacillus PS3* habita a una temperatura de aproximadamente 80°C, donde T $\beta$  se encontraría desplegada y, por lo tanto, no funcional. No obstante, se ha observado que las interacciones cuaternarias y factores extrínsecos como ligandos y cofactores contribuyen a la estabilidad de las proteínas <sup>(17)</sup>. Así, estudios del desplegamiento térmico de la F $_0$ F $_1$  ATP sintasa de *Bacillus PS3* <sup>(64)</sup> mostraron que este complejo enzimático tiene una T $m$  de 81.7°C y alcanza temperaturas ligeramente mayores en presencia de nucleótidos y de Mg $^{2+}$ . Lo anterior representa 24°C de diferencia entre la T $m$  de la subunidad  $\beta$  aislada y aquella del complejo oligomérico. Esto

sugiere que la oligomerización proporciona un incremento en la estabilidad de T $\beta$ , al igual que la unión del ligando, permitiendo el plegamiento y el funcionamiento correcto de la enzima a la temperatura a la cual habita el organismo.

Finalmente, uno de los objetivos de estudiar el desplegamiento térmico de T $\beta$  mediante calorimetría es el de elucidar el mecanismo de plegamiento de esta proteína con la menor ambigüedad posible. Por su lado, los estudios espectroscópicos reportan cambios estructurales en la proteína durante y después del desplegamiento térmico. Con base en los resultados obtenidos a partir de los estudios calorimétricos, un probable mecanismo de plegamiento para T $\beta$  sería a través de dos transiciones, cada una de dos estados. Ya que las dos transiciones térmicas se encuentran separadas, se sugiere la existencia de un estado intermediario altamente poblado a una temperatura entre las dos transiciones, alrededor de los 70°C. La estructura cristalográfica de T $\beta$  <sup>(50)</sup> muestra tres dominios estructurales. Sin embargo, los resultados por DSC muestran dos dominios cooperativos de plegamiento. Por lo tanto, se puede asumir que los dos dominios estructurales se despliegan concertadamente, conformando un solo dominio de plegamiento, mientras que el tercer dominio estructural se despliega independientemente conformando otro dominio de desplegamiento. Existen dos escenarios posibles de acuerdo a esta suposición: el primero es que el dominio N-terminal y el dominio central se estén desplegando concertadamente, el segundo es que el dominio central y el C-terminal sean los que se estén desplegando concertadamente. De acuerdo a lo observado en los estudios de DC, a 70°C T $\beta$  ha sufrido una pérdida notable de estructura hélice  $\alpha$ , en tanto que no se aprecian cambios drásticos en el contenido de hebras  $\beta$ . Por ello, se sugiere que el intermediario que reside a 70°C posee el dominio N-terminal, formado por el barril de hojas  $\beta$ , plegado, mientras que el dominio central de unión al nucleótido y el dominio C-terminal se encuentran en su mayor parte desplegados.

En resumen, con base en los resultados de DC y DSC obtenidos en el presente trabajo, se propone que el mecanismo de desplegamiento más probable para T $\beta$  consiste en una primera transición en la cual el dominio central de unión al nucleótido y el dominio C-terminal se despliegan cooperativamente. Después de esta primera transición sigue una segunda, en la que el dominio N-terminal comienza a desplegarse, hasta que T $\beta$  alcanza su estado desplegado.

---

## Capítulo VI

# CONCLUSIONES

1. El proceso de desplegamiento térmico de la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3* ( $T\beta$ ) es reversible bajo las condiciones experimentales encontradas. Lo anterior se comprobó mediante estudios de dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca y calorimetría de barrido diferencial. La reversibilidad del desplegamiento térmico de  $T\beta$  la convierte en un modelo de estudio interesante dadas las características que presenta, *i.e.* 473 residuos de aminoácidos y tres dominios estructurales.
2. La  $T\beta$  renaturalizada tiene la misma capacidad de unión al ATP que la enzima nativa, lo que sugiere que el sitio de unión de  $T\beta$  se reestructura completamente al renaturalizarla tras su desplegamiento térmico.
3. La deconvolución de los datos de dicroísmo circular del desplegamiento térmico de  $T\beta$  muestra una transición cooperativa a 55°C. Esta transición parece estar caracterizada por una pérdida de estructura secundaria de hélice  $\alpha$ .
4. El estudio calorimétrico del desplegamiento térmico de  $T\beta$  muestra que este proceso está constituido por dos transiciones, cada una de las cuales se ajusta a un modelo de dos estados. La primera transición está caracterizada por una  $T_m$  de 63.1°C y un  $\Delta H$  de 146 kcal/mol, mientras la segunda tiene una  $T_m$  de 75.9°C y un  $\Delta H$  de 69.3 kcal/mol.
5. Debido a que el  $\Delta H$  a la  $T_m$  es positivo para el desplegamiento, es de signo negativo para el plegamiento y, por lo tanto, favorable a este



último proceso. Por ello se sugiere que las interacciones polares son las principales fuerzas encargadas de estabilizar a T $\beta$ .

6. A partir de los resultados obtenidos, se sugiere que el mecanismo de plegamiento de T $\beta$  involucra una primera transición que corresponde al desplegamiento concertado del dominio C-terminal y del dominio de unión al nucleótido, seguida de una segunda transición que corresponde al desplegamiento del dominio N-terminal.

---

## Capítulo VII

# PERSPECTIVAS

Como se puede observar en el capítulo de *Resultados y Discusión*, el rendimiento final de T $\beta$  durante el protocolo de purificación fue bajo, tan sólo del 2% del total de la proteína. Por esta razón, sería conveniente optimizar tanto la sobreexpresión, así como el protocolo de purificación de T $\beta$ .

Por otro lado, en los estudios de desplegamiento térmico seguido por la señal de dicroísmo circular (DC) se observó que, a 85°C, T $\beta$  aún contiene una cantidad importante de estructura secundaria. Por ello, resultaría interesante seguir la señal de DC hasta que se observe que el proceso de desplegamiento ha llegado a su fin, es decir, hasta que se observe una asíntota en la señal de DC. Una estrategia adicional para desestabilizar la estructura secundaria residual de T $\beta$  podría consistir en realizar el experimento bajo otras condiciones experimentales, por ejemplo, cambiando el pH de la solución amortiguadora. Igualmente, resultaría interesante realizar las pruebas de fluorescencia en la T $\beta$  que proviene de los estudios calorimétricos. De esta forma, se podría evaluar la reestructuración del sitio activo de T $\beta$  renaturalizada después de llevarla a 100°C, temperatura a la cual ha finalizado el proceso de desplegamiento según lo observado en los experimentos de calorimetría.

Un requisito fundamental para caracterizar termodinámicamente la estabilidad conformacional de T $\beta$  es conocer el  $\Delta C_p$  de desplegamiento. El  $\Delta C_p$  es necesario para calcular con menor ambigüedad el  $\Delta G$  de estabilidad de una proteína a cualquier temperatura y, por lo tanto, para calcular el  $\Delta G$  de máxima estabilidad. Por ello, un paso incuestionable a seguir es el de explorar las condiciones experimentales que permitan obtener el  $\Delta C_p$  de desplegamiento de T $\beta$ . Una estrategia para conseguirlo consiste en obtener el  $\Delta H$  de desplegamiento a diferentes pH. Al graficar estos  $\Delta H$  como función de la  $T_m$ , de la pendiente se obtendría el  $\Delta C_p$ .

En la presente tesis se logró únicamente un primer acercamiento para conocer el mecanismo de desplegamiento de T $\beta$ . Sin embargo, para establecerlo con una mayor confiabilidad, sería interesante realizar estudios calorimétricos de cada uno de los dominios estructurales aislados de T $\beta$ . De esta manera se podrían responder algunas preguntas como: ¿cuál es la participación de cada uno de los dominios en la estabilidad de T $\beta$ ?, ¿cuál es el dominio más estable?, ¿cada dominio tiene la capacidad de replegarse independientemente? y/o ¿cuál es el posible mecanismo de desplegamiento de T $\beta$ ?. Asimismo, sería interesante realizar estudios calorimétricos del desplegamiento térmico de T $\beta$  en presencia de nucleótidos y en presencia de Mg<sup>2+</sup> para conocer cuál es la contribución de estas moléculas a la estabilidad de esta proteína, ya que se ha observado que, en general, la unión de ligandos aumenta la estabilidad de las proteínas.

Finalmente, hasta la fecha no existen otros estudios de desplegamiento térmico de la subunidad  $\beta$  aislada, cualquiera que sea el organismo al que pertenezca. Como consecuencia, no existen datos con los cuales se puedan comparar los obtenidos en el presente trabajo. Por ello, otra de las perspectivas de esta tesis sería la de realizar estudios de desplegamiento térmico de subunidades mesofilicas homólogas a T $\beta$  y comparar los resultados con aquellos obtenidos para el desplegamiento térmico de T $\beta$ . Así, podrían sugerirse cuales son las estrategias evolutivas utilizadas en T $\beta$  para que ésta trabaje a altas temperaturas.

---

# APÉNDICE A

## Medio Luria-Broth (LB)

Agar	5 g
Tripton-Difco	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g
Ampicilina	200 µg/mL

Los medios líquidos LB no contienen agar.

Se aforó a 1L y se esterilizó en una autoclave a 120°C durante 20 minutos.

## Amortiguador de Lisis

Glicerol	10 %
Tris-HSO <sub>4</sub> pH 8.0	50 mM
p-aminobenzamidina	6 mM
EDTA	0.1 mM
NaCl	100 mM

## Programa 1 (columna Mono-Q en HPLC)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Tris-HCl 20 mM pH 7.3 + 1 M NaCl	% Tris-HCl 20 mM pH 7.3
0	1	0	100
1	1	0	100
15	1	20	80
55	1	50	50
70	1	100	0
85	1	100	0
100	1	0	100

## Geles de poliacrilamida. Laemmli <sup>(65)</sup>.

### Amortiguador gel separador

Tris base	1.5 M
SDS	14 mM

Se ajustó a pH 8.8 con HCl.

### Amortiguador gel concentrador

Tris base	0.5 M
SDS	14 mM

Se ajustó a pH 6.8 con HCl.

### Acrilamida/Bis (30%/0.8%)

Acrilamida	4.3 M
Bis-acrilamida	52 mM

Posteriormente se filtró con un filtro Whatman #1 (11 µm).

### Gel separador 12 %

Mezclar

Agua	2.5 mL
Acrilamida/Bis (30%/0.8%)	3.0 mL
Amortiguador gel separador	1.9 mL
Persulfato de amonio 10 %	112 µL
TEMED	5.0 µL

### Gel concentrador 5 %

Mezclar

Agua	1.0 mL
Acrilamida 30 %	444 µL
Amortiguador gel concentrador	300 µL
Persulfato de amonio 10 %	28 µL
TEMED	5.0 µL

## Amortiguadores de corrida para electroforesis

### Amortiguador del ánodo (-)

Tris base	200 mM
-----------	--------

Se ajustó a pH 8.4 con HCl.

**Amortiguador del cátodo (+)**

Tris base	100 mM
Tricina	100 mM
SDS 10 %	0.35 mM

Se ajustó a pH 8.25 con HCl.

**Mezcla de digestión**

Glicerol	1.1 M
SDS	69.4 mM
Azul de bromofenol	0.3 mM
Amortiguador gel concentrador	1.25 %

Adicionar 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol por 20  $\mu$ L de solución.

**Azul de Coomassie para teñir geles**

Azul de coomassie G-250	585 $\mu$ M
Isopropanol	10.8 M
Ácido acético	4.1 M

Posteriormente se filtró.

El gel concentrador se corrió a 80 V y 50 mA por 20 minutos. El gel separador se corrió entre 100-120 V y 50 mA.

**Determinación de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA) <sup>(66)</sup>****Reactivo A**

BCA- $\text{Na}_2$	1.0 %
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.0 %
Tartrato $\text{Na}_2$	0.16 %
NaOH	0.4 %
$\text{NaHCO}_3$	0.95 %

**Reactivo B**

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.0 %
---	-------

Se mezclaron 100 volúmenes de reactivo A con 2 volúmenes de reactivo B. Para realizar el ensayo, se mezcló 1 volumen de muestra con 20 volúmenes de la mezcla anterior y se incubó durante 30 minutos a 30°C. La absorbencia se cuantificó a 562 nm.

## Geles de Poliacrilamida. Condiciones Nativas.

### Gel separador

Mezclar

Agua	2.4 mL
Acrilamida/Bis (30%/0.8%)	1.35 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.25 mL
Persulfato de amonio 10 %	50 $\mu$ L
TEMED	5.0 $\mu$ L

### Gel concentrador

Mezclar

Agua	1.15 mL
Acrilamida/Bis (30%/0.8%)	335 $\mu$ L
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	500 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10 %	30 $\mu$ L
TEMED	5.0 $\mu$ L

### Amortiguador de corrida

Tris	25 mM
Glicina	192 mM

Se ajustó a pH 8.8 con NaOH

---

# APÉNDICE B

## 1. Fluorescencia

### 1.1 Introducción

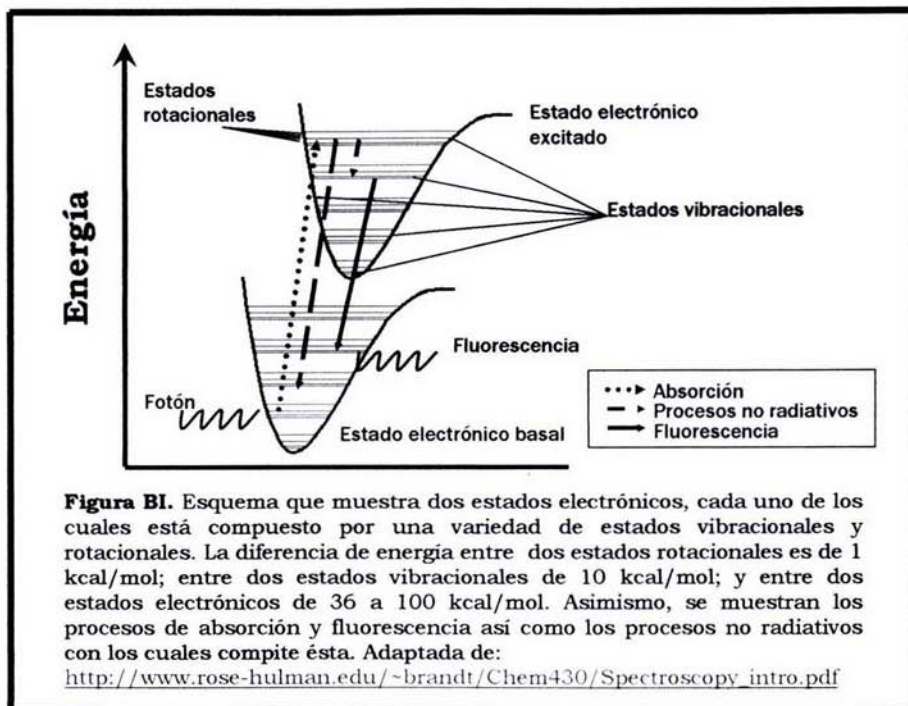
La luz es una radiación electromagnética y puede ser generada con un amplio intervalo de longitudes de onda, las cuales tienen diferentes energías e interactúan con las moléculas en formas distintas. Mientras menor sea su longitud de onda, la radiación será más energética.

Para comprender la interacción de la radiación electromagnética con la materia es necesario considerar un concepto fundamental de la mecánica cuántica, el cual es la base de la espectroscopía de absorción y emisión: los estados de energía están cuantizados, es decir, cualquier sistema tiene un cierto valor o nivel de energía <sup>(67)</sup>. Los niveles de energía representan los estados característicos de una molécula: el estado basal está definido como el estado de menor energía y los estados de mayor energía son llamados estados excitados. La energía que posee una molécula puede ser clasificada en diferentes tipos: traslacional, rotacional, vibracional, electrónica y la asociada con las orientaciones que un spin nuclear o electrónico puede tomar en un campo magnético <sup>(67)</sup>. En el fenómeno de fluorescencia únicamente participan la energía rotacional, la vibracional y la electrónica, ya que en las demás las diferencias entre los niveles de energía son tan pequeñas que pueden ser despreciadas (Figura B1).

A temperatura estándar (25°C), una molécula se encuentra en su estado electrónico basal y en el nivel vibracional mínimo. La absorción de energía apropiada resulta en un estado excitado y niveles vibracionales superiores. En muchos casos, para regresar a su estado basal, esta energía se pierde en forma de calor o cualquier otro proceso no radiativo, pero en algunos otros casos ocurre una rerradiación espontánea. La fluorescencia es uno de esos procesos en los que ocurre una emisión de radiación cuando una molécula en un estado electrónico excitado regresa

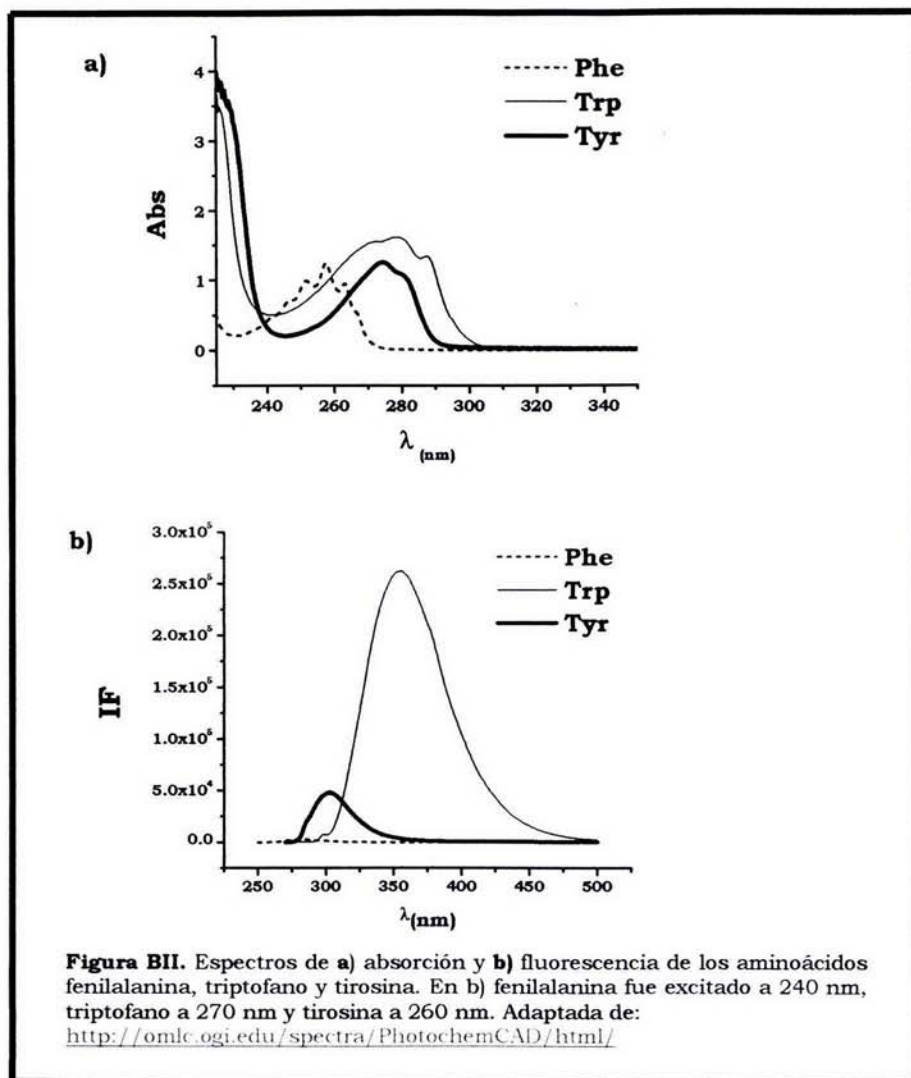


a su estado basal. Los grupos moleculares que le dan origen se denominan fluoróforos. En el fenómeno de fluorescencia, la luz emitida es de una frecuencia menor que la luz incidente, pues los procesos no radiativos que compiten con la fluorescencia para despoblar el estado excitado ocasionan una disminución en la energía de éste <sup>(67)</sup>.



Existen fluoróforos naturales como el NADH y la clorofila, entre otros; las proteínas, por su parte, deben su fluorescencia intrínseca a la presencia de aminoácidos aromáticos que son los fluoróforos triptofano, tirosina y fenilalanina <sup>(67)</sup>. En la Figura BII se muestran los espectros de absorción y de emisión típicos de estos aminoácidos.

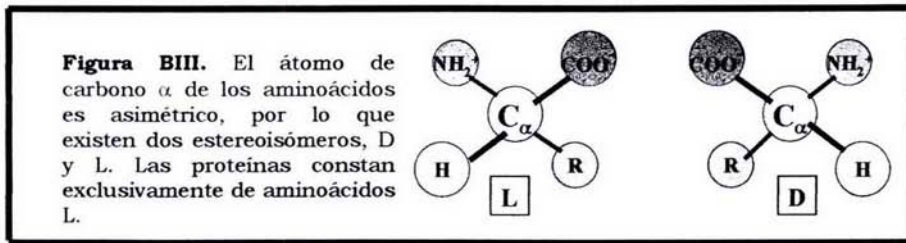
La fluorescencia es muy sensible al ambiente del fluoróforo y, por tanto, los varios parámetros cuantificables (espectros de emisión y excitación, la intensidad y el tiempo de vida) pueden ser afectados de diferentes formas. Por ello, dentro del estudio de las proteínas, la fluorescencia ha sido empleada ampliamente para medir la unión de ligandos y los cambios conformacionales de las proteínas, entre otros <sup>(67)</sup>.



## 2. Dicroísmo Circular

### 2.1 Introducción

El Dicroísmo Circular (DC) tiene una aplicación particularmente importante en el estudio de los sistemas bioquímicos ya que es una técnica espectroscópica sensible a la actividad óptica de las moléculas. La actividad óptica es una característica de las moléculas quirales, que son aquellas que poseen uno o más átomos asimétricos. Este es el caso de los aminoácidos (con excepción de la glicina) por lo que, consecuentemente, las proteínas, macromoléculas formadas por ellos, también son asimétricas y poseen la propiedad de la actividad óptica (Figura BIII). Cada tipo de estructura presente en las proteínas, al tener diferentes conformaciones, tienen distintas propiedades de DC (Figura BVI) <sup>(68)</sup>.

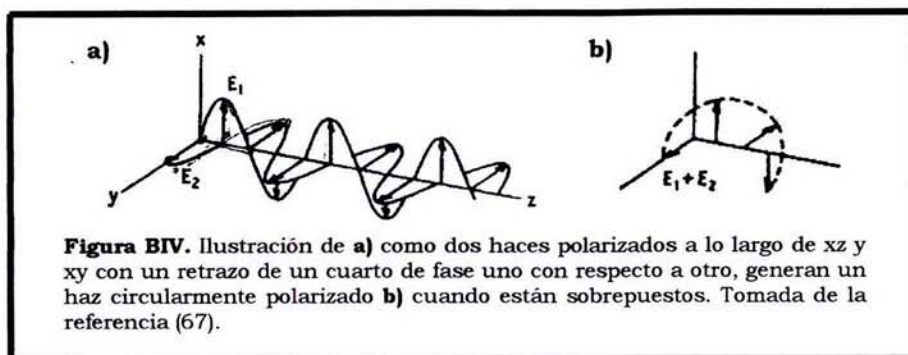


Para explicar los orígenes de los fenómenos que dan lugar a las propiedades experimentalmente observables de DC nuevamente es necesario considerar algunos aspectos de la naturaleza de la luz y su interacción con la materia. La luz es una radiación electromagnética y está caracterizada por un campo eléctrico oscilatorio y un campo magnético, los cuales son siempre perpendiculares entre sí <sup>(67, 68)</sup>. La interacción de la luz con la materia se da mediante el efecto de estos campos en la distribución de los electrones en el armazón molecular <sup>(68)</sup>.

La radiación electromagnética puede oscilar en cualquier dirección perpendicular a la dirección de propagación. Sin embargo la luz puede ser polarizada en un solo plano, es decir, la dirección de sus oscilaciones está restringida a un solo ángulo <sup>(67, 68)</sup>.

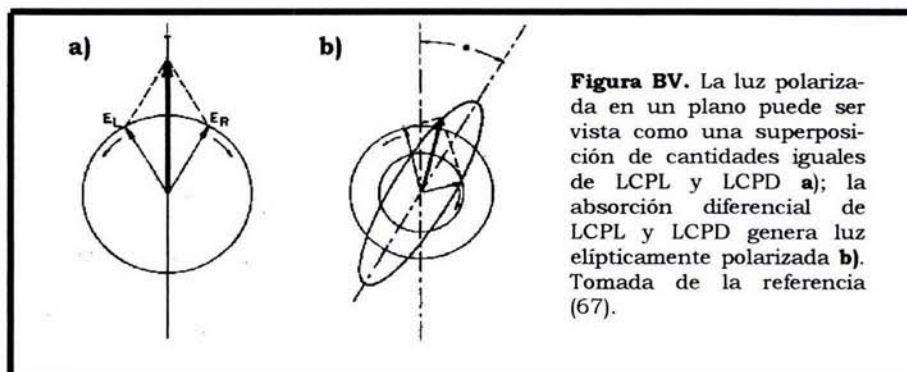
La luz circularmente polarizada se genera si dos haces de luz polarizados viajan mutuamente perpendiculares y una de las ondas de luz tiene un retraso de un cuarto de fase de longitud de onda con respecto a la

otra onda de luz (Figura BIV). Si el signo del retraso se invierte, el sentido hacia el cual la luz emergente gira también se invierte <sup>(68)</sup>.



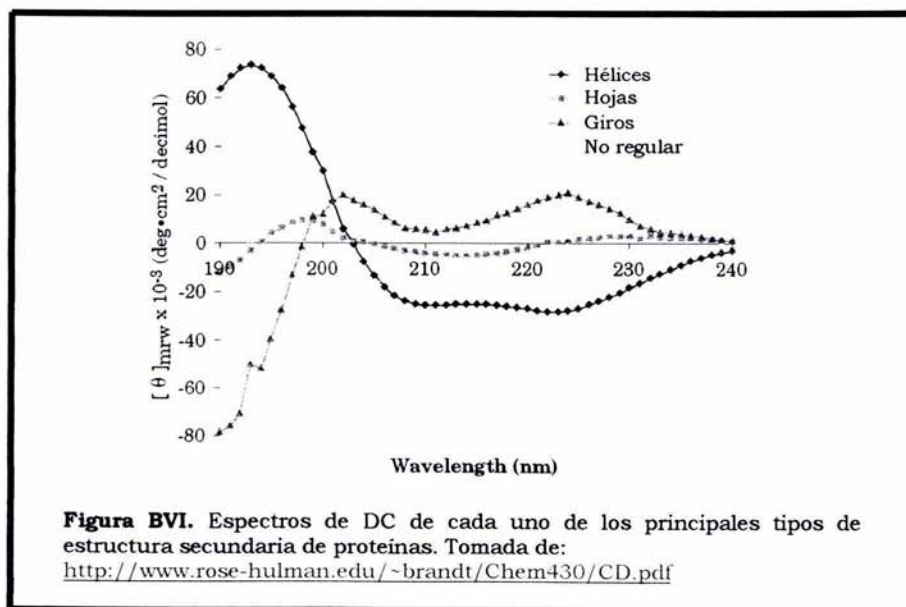
**Figura BIV.** Ilustración de **a)** como dos haces polarizados a lo largo de  $xz$  y  $xy$  con un retraso de un cuarto de fase uno con respecto a otro, generan un haz circularmente polarizado **b)** cuando están superpuestos. Tomada de la referencia (67).

La combinación de cantidades iguales de luz circularmente polarizada con sentido levógiro (LCPL) y luz circularmente polarizada con sentido dextrógiro (LCPD) genera luz polarizada en un solo plano <sup>(68)</sup>. Cuando una molécula es ópticamente activa, interactúa de manera distinta con LCPL y con LCPD. Esta interacción es detectada ya sea como un cambio en la velocidad de los dos rayos a través de la muestra o bien, si la molécula con actividad óptica es a su vez un cromóforo, es detectada como una absorción diferencial de cada rayo. Este último caso es el que produce el fenómeno de DC <sup>(67)</sup>. Debido a que el rayo de luz que emerge en el DC está compuesto de cantidades distintas de LCPL y LCPD, se genera luz elípticamente polarizada (Figura BV) <sup>(68)</sup>.



**Figura BV.** La luz polarizada en un plano puede ser vista como una superposición de cantidades iguales de LCPL y LCPD **a)**; la absorción diferencial de LCPL y LCPD genera luz elípticamente polarizada **b)**. Tomada de la referencia (67).

Debe notarse que el fenómeno de DC ocurre sólo en la región de las bandas de absorción. Por otro lado, la actividad óptica sólo es observada cuando el ambiente en el cual una transición ocurre es asimétrico. Muy pocos cromóforos tienen actividad óptica intrínseca. En proteínas, el enlace peptídico es un cromóforo (el cual absorbe a una longitud de onda <240 nm) que no posee actividad óptica intrínseca; sin embargo, pueden modificar sus propiedades ópticas dependiendo del arreglo espacial que adopten, como hélices, hojas o giros. Gracias a esto se han podido desarrollar métodos para estimar el contenido de estructura secundaria en una proteína de acuerdo a su espectro en el ultravioleta lejano (Figura BVI). La actividad óptica de cromóforos inherentemente simétricos como las cadenas laterales aromáticas (que absorben a 250-310 nm) es inducida y resulta de interacciones con grupos vecinos colocados asimétricamente, relación que es única para cada proteína, por lo que un espectro en el ultravioleta cercano puede ser considerado como una “huella digital” de la proteína <sup>(67)</sup>.

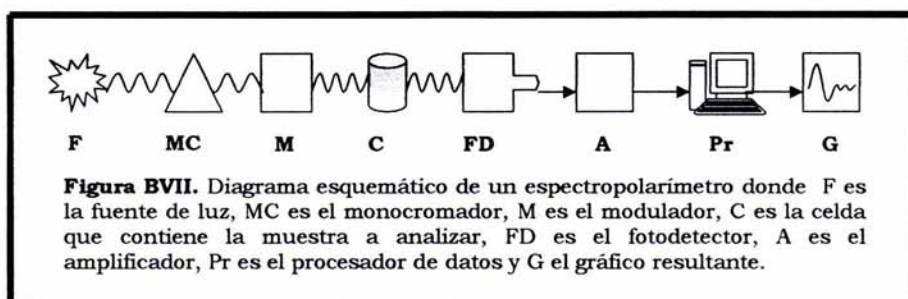


La fórmula utilizada para convertir los datos de DC a elipticidad molar ( $\theta$ ) es:

$$\text{Elipticidad molar } (\theta) = \frac{\theta \text{ (en miligrados)} \cdot \text{peso promedio por residuo} \cdot 100}{[\text{proteína (mg/mL)}] \cdot \text{paso de luz de la celda (cm)} \cdot 1000}$$

## 2.2 Instrumentación

El espectropolarímetro de DC consiste en una fuente luminosa de alta intensidad cuya luz pasa a través de un monocromador, con el que se selecciona la longitud de onda. Posteriormente pasa por un modulador que planopolariza el haz de luz monocromático y que contiene un elemento óptico, el cual actúa como un retardador de fase. Este modulador tiene además la capacidad de alternar periódicamente LCPL y LCPD en función del tipo de señal eléctrica que recibe del sistema electrónico. La LCPL y la LCPD son absorbidas de manera diferencial si se hacen pasar por una muestra circularmente dicroica. El haz de luz que emerge de la muestra llega a un fotodetector y después a un amplificador. Posteriormente los datos son procesados para generar una gráfica de  $\Delta$ Absorbencia contra longitud de onda <sup>(68)</sup> (Figura BVII).



# 3. Calorimetría

## 3.1 Introducción

La calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés) es una técnica experimental que cuantifica la energía en forma de calor consumida para mantener una solución muestra y una solución de referencia a la misma temperatura durante el incremento (o decremento) en la temperatura a una velocidad de barrido determinada. Esta técnica puede ser usada para determinar datos termodinámicos de transiciones y cambios conformacionales en varias clases de sistemas, entre ellos los biológicos <sup>(24)</sup>.

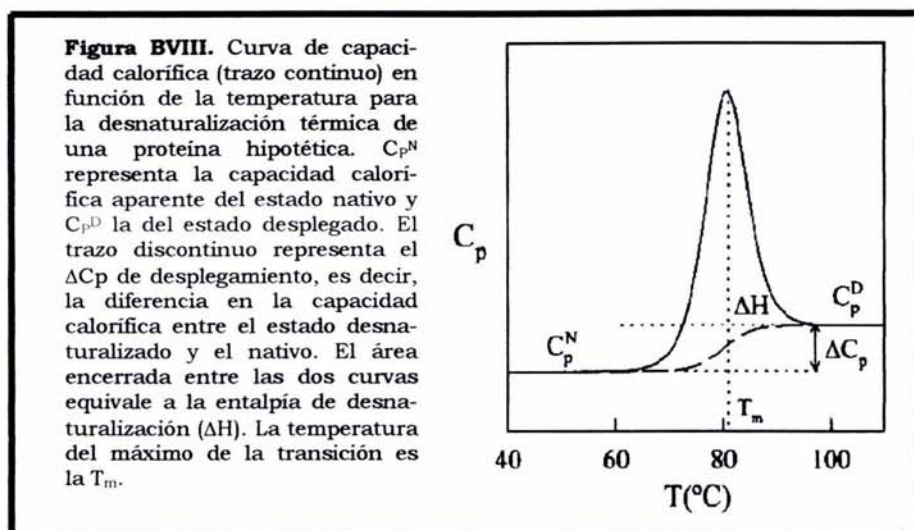
En particular, la DSC se ha empleado ampliamente para obtener información fundamental acerca de la naturaleza del desplegamiento de las proteínas y de las fuerzas involucradas en estabilizar las estructuras de las proteínas. Al realizar estudios mediante DSC en el caso de desplegamiento de proteínas, los siguientes parámetros pueden ser determinados a partir de un barrido diferencial <sup>(69)</sup>:

- La entalpía de transición o calorimétrica ( $\Delta H_{cal}$ ), la cual es la diferencia de capacidad calorífica entre la muestra y la línea base integrada en el intervalo de temperatura de la transición por la cantidad de proteína que lleva a cabo la transición en gramos o en moles.
- La temperatura donde la mitad de la población de proteínas están en estado desplegado y la mitad en estado nativo, es decir, la temperatura donde el  $\Delta G$  de desplegamiento es igual a cero ( $T_m$ ).
- La diferencia entre la capacidad calorífica de la proteína nativa y la de la proteína desplegada ( $\Delta_{trs}C_p$ ), la cual se obtiene de la diferencia entre las líneas base pre y postransicionales extrapoladas a la temperatura del punto medio de la transición.
- El mecanismo de desplegamiento.

La señal que se obtiene en la DSC se denomina comúnmente termograma y muestra la capacidad calorífica en exceso ( $C_p$  de la muestra menos el de la referencia) como función de la temperatura (Figura BVIII). Este termograma comprende tres regiones: la línea base pretransicional, la transición de desplegamiento y la línea base postransicional. A temperaturas por debajo del desplegamiento térmico, el  $C_p$  simplemente refleja la diferencia en la capacidad calorífica entre la proteína y el amortiguador. Generalmente, la línea base pretransicional muestra una

ligera pendiente positiva que refleja el cambio en la capacidad calorífica con la temperatura. Cuando la proteína comienza a desplegarse, el  $C_p$  aumenta a medida que más energía en forma de calor es consumida para el desplegamiento de la proteína, alcanzando su máximo en el punto medio del proceso. La línea base postransicional representa el  $C_p$  de la proteína desnaturalizada, la cual usualmente es mayor a la de la proteína nativa <sup>(24)</sup>.

La entalpía calorimétrica ( $\Delta H_{cal}$ ) es el área total integrada bajo el pico del termograma, la cual representa la energía calorífica total consumida por la muestra para llevar a cabo la transición <sup>(24)</sup>.

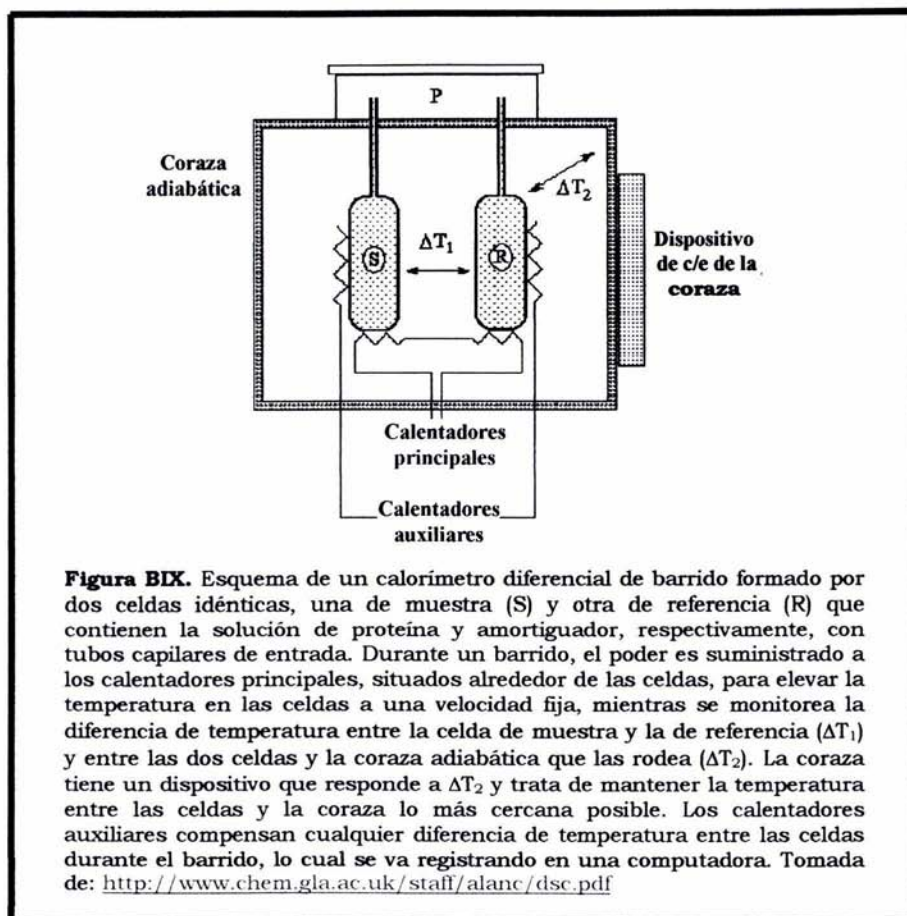


### 3.2 Instrumentación

Un calorímetro de barrido diferencial (Figura BIX) contiene dos celdas gemelas situadas simétricamente dentro de una chaqueta metálica diseñada para crear un entorno adiabático alrededor de la celda de referencia y la celda de muestra. La primera contiene el solvente mientras la segunda contiene el solvente más la muestra a ser analizada. Ambas son calentadas de manera progresiva. Cuando un proceso inducido por temperatura toma lugar en la celda de muestra, el calorímetro compensa con más o menos potencia eléctrica (dependiendo si el proceso es endotérmico o exotérmico) a la celda muestra, mediante unas resistencias



apropiadas, para mantenerla a la misma temperatura que la celda de referencia. El calorímetro registra la diferencia en la potencia eléctrica, la cual es proporcional a la diferencia en la capacidad calorífica, de las celdas de referencia y la de muestra, como función de la temperatura <sup>(70)</sup>.



**Figura BIX.** Esquema de un calorímetro diferencial de barrido formado por dos celdas idénticas, una de muestra (S) y otra de referencia (R) que contienen la solución de proteína y amortiguador, respectivamente, con tubos capilares de entrada. Durante un barrido, el poder es suministrado a los calentadores principales, situados alrededor de las celdas, para elevar la temperatura en las celdas a una velocidad fija, mientras se monitorea la diferencia de temperatura entre la celda de muestra y la de referencia ( $\Delta T_1$ ) y entre las dos celdas y la coraza adiabática que las rodea ( $\Delta T_2$ ). La coraza tiene un dispositivo que responde a  $\Delta T_2$  y trata de mantener la temperatura entre las celdas y la coraza lo más cercana posible. Los calentadores auxiliares compensan cualquier diferencia de temperatura entre las celdas durante el barrido, lo cual se va registrando en una computadora. Tomada de: <http://www.chem.gla.ac.uk/staff/alanc/dsc.pdf>

---

# REFERENCIAS

- 1) Nelson D. L. y M. M. Cox. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3ra. edición. Editorial Worth. Nueva York, E.U.A. 1152 pp.
- 2) Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y J. D. Watson. 1996. **Biología Molecular de la Célula**. 3ra. edición. Editorial Omega. Barcelona, España. 1387 pp.
- 3) Jaenicke R. 1987. **Folding and Association of Proteins**. Prog. Biophysical And Molecular Biology. 49, 117-237.
- 4) Klug W. S. y M. R. Cummings. 1999. **Conceptos de Genética**. 5ta. edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 840 pp.
- 5) Neidhardt F. C. 1987. **Chemical Composition of Escherichia coli**. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Celular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt (ed). American Society For Microbiology. Washington, E. U. A.
- 6) Voet D. y J. G. Voet. 1992. **Bioquímica**. Editorial Omega. Barcelona, España. 1315 pp.
- 7) Stryer L. 1993. **Bioquímica**. 3ra. edición. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- 8) Vázquez-Contreras E. 2000. **Caracterización del Patrón de Plegamiento y Asociación de la Triosa Fosfato Isomerasa de S. cerevisiae**. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina, UNAM.
- 9) Anfinsen C. B. 1973. **Principles that Govern the Folding of Protein Chains**. Science. 181, 223-230.
- 10) Dill K. A. y H. S. Chan. 1997. **From Levinthal to Pathways to Funnels**. Nature Structural Biology. 4, 10-19.
- 11) Levinthal C. 1968. **Are there Pathways for Protein Folding?** J. Chim. Phys. 65, 44-45.

- 12) Creighton T. E. 1996. **Proteins: Structure and Molecular Properties**. 2da. edición. Editorial W. H. Freeman and Company. New York, E. U. A. 507 pp.
- 13) Dill K. A. 1985. **Theory for the Folding and Stability of Globular Proteins**. *Biochemistry*. 24, 1501-1509.
- 14) Lazaridis T. y M. Karplus. 2003. **Thermodynamics of Protein Folding: A Microscopic View**. *Biophysical Chemistry*. 100, 367-395.
- 15) Karplus M. y D. L. Weaver. 1994. **Protein Folding Dynamics: The Diffusion-Collision Model and Experimental Data**. *Protein Science*. 3, 650-668.
- 16) Delbrück M. 1949. **Un Físico se Asoma a la Biología**. En: *Antología de Biología Molecular*, M. Castañeda (ed.), 1985. UNAM. México, D. F. 274 pp.
- 17) Jaenicke R. 2000. **Stability and Stabilization of Globular Proteins in Solution**. *Journal of Biotechnology*. 79, 193-203.
- 18) Privalov P. L. 1979. **Stability of Proteins: Small Globular Proteins**. *Advances in Protein Chemistry*. 33, 167-241.
- 19) Bechtel W. J. y J. A. Schellman. 1987. **Protein Stability Curves**. *Biopolymers*. 26, 1859-1877.
- 20) Dill K. 1990. **Dominant Forces in Protein Folding**. *Biochemistry*. 29, 7133-7155.
- 21) Makhatadze G. I. y P. L. Privalov. 1993. **Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics: I. The Enthalpy of Hydration**. *Journal of Molecular Biology*. 232, 639-659.
- 22) Lazaridis T., Archontis G. y M. Karplus. 1995. **Enthalpic Contribution to Protein Stability: Insights from Atom-Based Calculations and Statistical Mechanics**. *Advances in Protein Chemistry*. 47, 231-306.
- 23) Gómez J., Hilser V. J., Xie D. y E. Freire. 1995. **The Heat Capacity of Proteins**. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 22, 404-412.

- 24) Cooper A., Nutley M. A. y A. Wadood. 2000. **Differential Scanning Microcalorimetry**. En: Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry. S. E. Harding y B. Z. Chowdhry (eds.). Oxford University Press. Nueva York, E. U. A.
- 25) Konermann L. 2003. **Protein Unfolding and Denaturants**. Encyclopedia of Life Sciences. En: <http://www.els.net/>
- 26) Pace N. y G. R. Grimsley. 2003. **Protein Stability**. Encyclopedia of Life Sciences. En: <http://www.els.net/>
- 27) Rose G. D. y R. Wolfenden. 1993. **Hydrogen Bonding, Hydrophobicity, Packing, and Protein Folding**. Annual Reviews of Biophysical and Biomolecular Structure. 22, 381-415.
- 28) Kauzmann W. 1959. **Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation**. Adv. Protein Chem. 14, 1-63.
- 29) Nolting B. y K. Andert. 2000. **Mechanism of Protein Folding**. Proteins: Structure, Function and Genetics. 41, 288-298.
- 30) Wetlaufer D. B. 1973. **Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins**. PNAS. 70, 697-701.
- 31) Fersht A. R. 1997. **Nucleation Mechanisms in Protein Folding**. Current Opinion in Structural Biology. 7, 3-9.
- 32) Karplus M. y Weaver D. L. 1976. **Protein-Folding Dynamics**. Nature. 260, 404-406.
- 33) Lesk A. M. y G. D. Rose. 1981. **Folding Units in Globular Proteins**. PNAS. 78, 4304-4308.
- 34) Haspel N., Tsai C., Wolfson H. y R. Nussinov. 2003. **Hierarchical Protein Folding Pathways: A Computational Study of Protein Fragments**. Proteins: Structure, Function and Genetics. 51, 203-215.
- 35) Baldwin R. L. y G. D. Rose. 1999. **Is Protein Folding Hierarchic? I. Local Structure and Peptide Folding**. Trends in Biological Science. 24, 26-33.
- 36) Kim P. S. y R. L. Baldwin. 1982. **Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding**. Annu. Rev. Biochem. 59, 631-660.

- 37) Udgaonkar J. B. y R. L. Baldwin. 1988. **NMR Evidence for an Early Framework Intermediate on the Folding Pathway of Ribonuclease A**. *Nature*. 335, 694-699.
- 38) Leopold P. E., Montal M. y J. N. Onuchic. 1992. **Protein Folding Funnels: A Kinetic Approach to the Sequence-Structure Relationship**. *PNAS*. 89, 8721-8725.
- 39) Yoshida M., Muneyuki E. y T. Hisabori. 2001. **ATP synthase –A Marvellous Rotatory Engine of the Cell**. *Nature Reviews*. 2, 669-677.
- 40) Du Z. y Z. Gromet-Elhanan. 1999. **Refolding of Recombinant  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of the *Rhodospirillum rubrum*  $F_0F_1$  ATP synthase into Functional Monomers that Reconstitute an Active  $\alpha\beta$ -Dimer**. *Eur. J. Biochem*. 263, 430-437.
- 41) Vignais P. V. et al. 1992. **The ATP Synthase ( $F_0F_1$ ) Complex in Oxidative Phosphorilation**. *Experientia*. 48, 351-362.
- 42) Weber J. y A. E. Senior. 1997. **Catalytic Mechanism of  $F_1$ -ATPase**. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1319, 19-58.
- 43) Steinbrecher T, Hucke O., Steigmiller S., Borsch M. y A. Labahn. 2002. **Binding Affinities and Protein Ligand Complex Geometries of Nucleotides at the  $F_1$  Part of the Mitochondrial ATP Synthase Obtained by Ligand Docking Calculations**. *FEBS Letters*. 530, 99-103.
- 44) Nájera Peña H., Vázquez-Contreras E., Tuena de Gómez-Poyou M. y G. Pérez-Hernández. 1999. **Nucleotide Binding Drives Conformational Changes in the Isolated  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of the  $F_1$ -ATPase from *Escherichia coli***. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 266, 58-61.
- 45) Ohta S., Yohda M., Ishizuka M., Hirata H., Hamamoto T., Otawara-Hamamoto Y., Matsuda K. y Y. Kagawa. 1988. **Sequence and Over-expression of Subunits of ATP Synthase in Thermophilic Bacterium PS3**. *Biochimica et Biophysica Acta*. 933, 141-155.
- 46) Rastogi V. K. y M. E. Girvin. 1999. **Structural Changes Linked to Proton Translocation by Subunit C of the ATP Synthase**. *Nature*. 402, 263-268.

- 47) Ma J., Flynn T. C., Cui Q., Leslie A. G. W., Walker J. E. y M. Karplus. 2002. **A Dynamic Analysis of Rotation Mechanism for Conformational Change in F<sub>1</sub>-ATPase**. *Structure*. 10, 921-931.
- 48) Kayalar C., Rosing J. A. N. y P. D. Boyer. 1977. **An Alternating Site Sequence for Oxidative Phosphorylation Suggested by Measurement of Substrate Binding Patterns and Exchange Reaction Inhibitions**. *J. Biol. Chem.* 252, 2486-2491.
- 49) Abrahams J. P., Leslie A. G. W., Lutter R. y J. E. Walker. 1994. **Structure at 2.8Å Resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from Bovine Heart Mitochondria**. *Nature*. 370, 621-628.
- 50) Shirakihara Y., Leslie A. G. W., Abrahams J. P., Walker J. E., Ueda T., Sekimoto Y., Kambara M., Saika K., Kagawa Y. y M. Yoshida. 1997. **The Crystal Structure of the Nucleotide-Free  $\alpha\beta\gamma$  Subcomplex of F<sub>1</sub>-ATPase from Thermophilic *Bacillus PS3* is a Symmetric Trimer**. *Structure*. 5, 825-836.
- 51) Zolkiewski M., M.J. Redowicz, E.D. Korn, J.A. Hammer y A. Ginsburg. 1997. **Two-State Thermal Unfolding of a Long Dimeric Coiled-Coil: the *Acanthamoeba* Myosin II Rod**. *Biochemistry*. 36, 7876-7883.
- 52) Farruggia B y Pico GA. 1995. **The Binding of 3,6-Disubstituted Bile Salts to Human Serum Albumin Induces Conformational Change on the Molecule of this Protein**. *Biochemistry*. 34, 3056-3065.
- 53) Honda S, Uedaira H, Vonderviszt F, Kidokoro S y Namba K. 1999. **Folding Energetics of a Multidomain Protein, Flagellin**. *J. Mol. Biol.* 293, 719-732.
- 54) Feller G, d'Amico D y Gerday C. 1999. **Thermodynamic Stability of a Cold-Active  $\alpha$ -Amylase from the Antarctic Bacterium *Alteromonas haloplanctis***. *Biochemistry*. 38, 4613-4619.
- 55) Azuaga AI, Dobson CM, Mateo PL y Conejero-Lara F. 2002. **Unfolding and Aggregation During the Thermal Denaturation of Streptokinase**. *Eur. J. Biochem.* 269, 4121-4133.
- 56) Zaiss K y Jaenicke R. 1999. **Thermodynamic Study of Phosphoglycerate Kinase from *Thermotoga maritima* and its Isolated Domains: Reversible Thermal Unfolding Monitored by Differential Scanning Calorimetry and Circular Dichroism Spectroscopy**. *Biochemistry*. 38, 4633-4639.

- 57) Mateo PL y PL Privalov. 1981. **Pepsinogen Denaturation is not a Two-State Transition**. FEBS Lett. 123, 189-192.
- 58) Ganesh C., A.N. Shah, C.P. Swaminathan, A. Surolia y R. Varadarajan. 1997. **Thermodynamic Characterization of the Reversible, Two-State Unfolding of Maltose Binding Protein, a Large Two-Domain Protein**. Biochemistry. 36, 5020-5028.
- 59) Wang C., I. Lascu y A. Giartosio. 1998. **Bovine Serum Fetuin is Unfolded Through a Molten Globule State**. Biochemistry. 37, 8457-8464.
- 60) Kostyukova AS, Tiktopulo EI y Maeda Y. 2001. **Folding Properties of Functional Domains of Tropomodulin**. Biophys. J. 81, 345-351.
- 61) Medved LV, Migliorini M, Mikhailenko I, Barrientos LG, Llinas M y Strickland DK. 1999. **Domain Organization of the 39-kDa Receptor-Associated Protein**. J. Biol. Chem. 274, 717-727.
- 62) Villaverde J., Cladera J., Hartog A., Berden J., Padros E. y M. Duñach. 1998. **Nucleotide and Mg<sup>2+</sup> Dependency of the Thermal Denaturation of Mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase**. Biophysical Journal. 75, 1980-1988.
- 63) Wang Z., Freire E. y R. E. McCarty. 1993. **Influence of Nucleotide Binding Site Occupancy on the Thermal Stability of the F<sub>1</sub> Portion of the Chloroplast ATP Synthase**. The Journal of Biological Chemistry. 268, 20785-20790.
- 64) Villaverde J., Cladera J., Padros E., Rigaud J. y M. Duñach. 1997. **Effect of Nucleotides on the Thermal Stability and on the Deuterium Kinetics of the Thermophilic F<sub>o</sub>F<sub>1</sub> ATP Synthase**. Eur. J. Biochem. 244, 441-448.
- 65) Laemmli U. K. 1970. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. Nature. 227, 680-685.
- 66) Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goetze N. M., Olson B. J. y D. C. Klenk. 1985. **Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid**. Analytical Biochemistry. 150, 76-85.
- 67) Campbell I. D. y R. A. Dwek. 1984. **Biological Spectroscopy**. Benjamin/Cummings Publishing Company. California, E. U. A. 405 pp.

- 68) Bayley P. 1980. **Circular Dichroism and Optical Rotation**. En: An Introduction to Spectroscopy for Biochemists. S. B. Brown (ed.). Academic Press. Nueva York, E. U. A.
- 69) Hinz H-J. y F. P. Schwarz. 2001. **Measurement and Análisis of Results Obtained on Biological Substances with Differential Scanning Calorimetry**. Pure and Applied Chemistry. 73, 745-749.
- 70) Chowdhry B. Z. y S. C. Cole. 1989. **Differential Scanning Calorimetry: Applications in Biotechnology**. TIBTECH. 7, 11-18.
- 71) Cain B. D. y R. D. Simoni. 1986. **Impaired Proton Conductivity Resulting from Mutations in the a Subunit of  $F_1F_0$  ATPase in *Escherichia coli***. The Journal of Biological Chemistry. 261, 10043-10050.
- 72) Yagi H., Tozawa K., Sekino N., Iwabuchi T., Yoshida M., y H. Akutsu. 1999. **Functional Conformation Changes in the  $TF_1$ -ATPase  $\beta$  Subunit Probed by 12 Tyrosine Residues**. Biophysical Journal. 77, 2175-2183.
- 73) Kabsch W. y C. Sander. 1983. **Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen Bonded and Geometric Features**. Biopolymers. 22, 2577-2637.
- 74) Sreerama N. y R. W. Woody. 2000. **Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set**. Analytical Biochemistry. 287, 252-260.