

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

---

---

---

T E S I S

“El papel de la región de bisagra en la afinidad de la  
proteína de unión LAO”

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

Alan Viguera Ceballos.

DIRECTOR DE TESIS Dr. Alejandro Sosa Peinado



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Sosa Peinado en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en conjunto con el posgrado de ciencias bioquímicas de la facultad de química de la UNAM, con el apoyo de la beca de CONACyT para estudiantes de posgrado nacional.

Quiero dedicar esta tesis a mi familia que siempre me ha apoyado en todo lo que emprendo.

A mi Padre Gerardo, por su constante apoyo y por ser el mejor amigo que puedo tener.

A mi Madre Claudette, por su amor y por apoyarme en todo momento.

A mi hermana Clau y a mi hermano Gerardo por ser siempre un ejemplo y por todas las cosas que me han enseñando.

A mis sobrinas Carmen, Rafaela y Camila, por impulsarme a seguir luchando. Al bebe que viene en camino.

A Fredrick Hall y Patricia López.

A Azul del Olmo por ser una gran amiga y estar en los momentos que más la he necesitado.

También quiero dedicar esta tesis a Alejandra Yépez por ser una persona muy importante para mí. A los incondicionales Manuel Prieto, Javier Govea y Alejandro Vázquez. A los que están lejos Cristina Ornelas, Rafael Peña, Rogelio Lanning, Luis Urias, Ayari Fuentes y Guadalupe Name. A mis amigos de biología José Ávila, Rodrigo Chacón, Ricardo Mariño, Ricardo Cruz, Fabiola Villela, Raúl Luna, Diana Guzmán y Lili Sánchez. A mis amigos del labo Daniel Silva, Martin González, Luis Blancas, Luis Téllez, Antonio Anaya, Haven López, Verónica Zavala. A mis Amigos de la Maestría Cristian Cárdenaz, Daniela Araiza, Natllely García.

Muy especialmente al Dr. Alejandro Sosa Peinado por siempre creer en mí.

## Agradecimientos

A mi comité tutorial de Maestría Dr. Alejandro Sosa Peinado, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al posgrado de ciencias bioquímicas de la Facultad de Química y al Laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la facultad de medicina.

A Martin González y Daniel Silva

# Índice

	Página
Introducción	9
Relación estructura función en proteínas.	9
Plegamiento y función de las proteínas de unión.	11
Proteínas periplásmicas de unión (PBP).	13
LAO como modelo para estudiar las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas.	15
Sitio de reconocimiento de aminoácidos.	18
Sitio de interacción con el complejo de membrana.	20
El papel de los cambios conformacionales en proteínas de unión.	21
Unión de ligando en proteínas de unión.	24
Constante de disociación $K_d$ .	25
Como estudiar las interacciones y las reacciones de unión al ligando mediante la modificación de la bisagra de la proteína LAO.	28
Hipótesis.	30
Objetivo general.	30
Objetivos Particulares.	30
Métodos.	31
Construcción de mutantes.	31
Purificación de proteína.	35
Modificación química de las mutantes.	37

Determinación de fluorescencia y medición de la Kd.	37
Resultados.	40
Construcción de mutantes.	40
Purificación de proteína.	41
Cambios en la constante de disociación Kd.	43
Cambios en la constante de disociación para las mutantes.	44
Variaciones en la afinidad al realizar la perturbación en cada mutante derivatizada.	51
Discusión general.	54
Análisis de los contactos.	55
Conclusiones.	58
Perspectivas.	60
Referencias.	61

# Índice de figuras

	Página
Figura 1. Unión proteína-ligando.	11
Figura 2. Proteínas periplásmicas de unión.	14
Figura 3. Topología de la proteína de unión (LAO).	16
Figura 4. Proteína de unión de L-lisina, L-arginina y L-ornitina (LAO).	18
Figura 5. Sitio de unión de ligando.	19
Figura 6. Sitio de interacción con el complejo de membrana.	21
Figura 7. Mutantes en la proteína de unión a maltosa.	23
Figura 8 Modificantes Químicos.	29
Figura 9 Secuencia del Gene ArgT de <i>Salmonella typhimurium</i> .	31
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de la proteína periplásmica de unión LAO.	32
Figura 11. Perfil cromatográfico de la columna Source-S.	36
Figura 12. Perfil cromatográfico de la columna Source Q.	36
Figura 13. Gel de acrilamida SDS-PAGE 12%.	41
Figura 14 cromatograma de las columnas <i>Source S</i> y <i>Source Q</i> .	42
Figura 15. Titulación de la proteína LAO silvestre.	44
Figura 16. Ajuste de datos.	44
Figura 17. Graficas del ajuste para obtener la Kd para la mutante A89C.	46
Figura 18. Espectro de transferencia de energía.	46
Figura 19. Graficas del ajuste para obtener la Kd para la mutante E162C.	47
Figura 20 Espectro de transferencia de energía.	48
Figura 21. Graficas del ajuste para obtener la Kd para la mutante E167C.	49
Figura 22 Espectro de transferencia de energía.	49
Figura 23. Graficas del ajuste para obtener la Kd para la mutante Y190C.	50
Figura 24 Espectro de transferencia de energía.	51
Figura 25. Posición de los residuos cambiados por cisteína.	52
Figura 26. Correlación entre el volumen $\text{Å}^3$ y los cambios en la afinidad.	53

## Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Grupos de la familia de las proteínas periplásmicas de unión.	15
Tabla2 oligonucleótidos.	32
Tabla 3. Reacción de PCR.	33
Tabla4 condiciones de termociclador.	33
Tabla 5 X <i>Blast</i> de los oligonucleótidos mandados a sintetizar.	40
Tabla 6 Cambios en la constante de afinidad Kd.	45
Tabla 7. Escaneo por Alaninas.	54
Tabla 8. Análisis de los contactos.	57

## Introducción

**Relación estructura función en proteínas; ¿Qué tanto podemos predecir la interacción proteína-ligando?**

Entender las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas es uno de los grandes retos en la biología estructural, los avances en este tópico tendrán enormes repercusiones en campos como genética, bioquímica, ingeniería de proteínas y bioinformática entre otros. Gracias a que la evolución ha experimentado con una serie de variantes funcionales para un misma estructura proteica o diferentes estructuras con funciones similares, se han desarrollado diversos algoritmos que analizan la evolución de las secuencias en proteínas con la idea de obtener correlaciones entre la diversidad de estructuras y funciones asociadas a las proteínas.

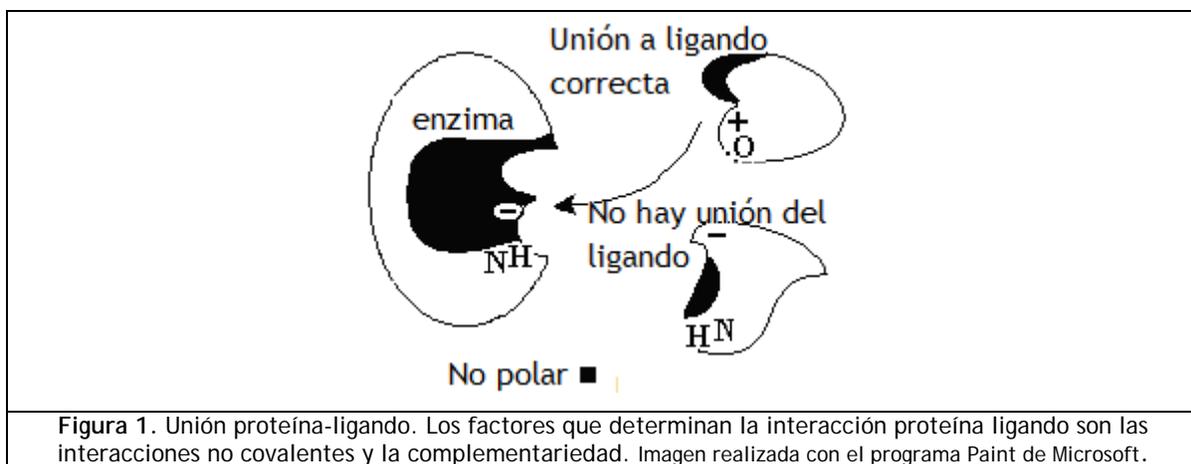
Otros enfoques experimentales analizan en detalle las interacciones de las proteínas y sus funciones por diversas técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia, difracción de cristales con Rayos X, con el fin de aportar evidencias de las bases moleculares de las interacciones.

Corresponde a la estructura primaria o secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica determinar la estructura secundaria y terciaria (16); el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados en la traducción directa de la secuencia de codones en el ARN (17). La cadena polipeptídica es capaz de adoptar conformaciones de menor energía libre -más estables- originando estructuras periódicas de disposición tridimensional como hélices alfa

y hebras beta (16), así la disposición tridimensional de todos los átomos que componen a una proteína, es responsable directa de sus propiedades biológicas, y su interacción con los diversos ligandos o con otras proteínas (18), inclusive se ha encontrado que para un tipo de estructura existen las variantes monoméricas u oligoméricas, lo que originan diversos mecanismos de regulación o de la función para un mismo motivo estructural (17).

En la unión y reconocimiento de moléculas participan las interacciones no covalentes causantes de la estructura proteica, permitiendo la unión de cualquier otra molécula a las proteínas (17). Para tal motivo se requiere que las interacciones mantengan el plegamiento y la complementariedad entre la proteína y la molécula a unir, por lo que el plegamiento es muy específico y sirve como mecanismo de reconocimiento molecular; por otra parte, se ha observado que incluso las proteínas nativamente no estructuradas adquieren una conformación en presencia de ligandos (17). El plegamiento de una proteína se produce cuando los parches no polares en la superficie de la proteína se unen por el efecto hidrofóbico, mientras que la forma complementaria de los amino ácidos cercanos maximiza los contactos por los efectos de van der Waals, los grupos cargados o unidos a  $H^+$  se alinean con sus compañeros complementarios (16), por ejemplo: Las proteínas que unen otra molécula del mismo tipo para formar complejos multiprotéicos, presentando estructura cuaternaria; otro ejemplo son las enzimas que unen e identifican otras moléculas catalizando una reacción en particular, mientras que los anticuerpos son proteínas que unen y reconocen moléculas, los cuales son marcados para ser atacados por otros componentes del

sistema inmune (17). Las proteínas tienen formas muy diversas, lo que las hace ideales para formar regiones en superficie que empujan y complementan una molécula blanco específica, ya sea uniendo otra molécula donde las interacciones son no covalentes y usualmente reversible, o haciendo uniones covalentes entre dos partes de la molécula generalmente no reversible (18) (véase Figura 1).



### Plegamiento y función de las proteínas de unión.

Durante el proceso de plegamiento de proteínas, la información necesaria para que la cadena polipeptídica adquiera estructura tridimensional se encuentra codificada en la secuencia de aminoácidos (21), pero cada proteína tiene una estructura nativa única excepto, cuando cambian de conformación como parte de su función biológica (19). El sistema de plegamiento más simple que puede considerarse es de dos estados: El estado desnaturalizado en el que la cadena lineal de aminoácidos no cuenta con una estructura tridimensional definida, y el

estado nativo, donde la cadena polipeptídica se ha plegado para adquirir una estructura tridimensional específica(18). A partir de éste proceso y mediante estudios cristalográficos basados en los dos principales criterios de análisis -la estructura terciaria y la similitud de secuencia- se conoce la función específica de cada proteína. Se postula que cada plegamiento o conformación nativa determina la función a desempeñar, desde las más sencillas como las proteínas estructurales, las enzimas que catalizan las reacciones químicas y las de transporte, que pueden acarrear compuestos a través de las diversas membranas de las células (17).

Las proteínas de transporte tienen dos funciones básicas: atrapar una molécula y llevarla a un destino específico (21). Existen moléculas que necesitan ser transportadas de manera independiente, para esto los transportadores interactúan con proteínas receptoras en solución, en las que se incluye a las proteínas periplásmicas de unión (PBP por sus siglas en inglés) (22), las cuales son capaces de atrapar un ligando de manera covalente y liberarlo sólo a través de la interacción con los receptores de membrana (22). Las PBP participan en interacciones proteína-proteína y proteína-ligando.

La preferencia de las proteínas por los compuestos depende de la concentración de la proteína y del ligando, éste hecho se expresa a través de la constante de disociación o  $K_d$  de la proteína (23). Es decir, un compuesto de alta afinidad ( $K_d$  pequeña) necesita menor concentración de ligando para unirse a la proteína que uno de baja afinidad ( $K_d$  grande).

**Proteínas periplásmicas de unión (PBP).**

En el espacio entre la membrana exterior y la pared celular de las bacterias gram negativas se encuentra el espacio periplásmico (21), el cual es ocupado por proteínas secretadas desde el interior de la célula, donde existen varios fenómenos de reconocimiento a nivel de membrana exterior, como la quimio-recepción y el transporte transmembranal (21). Dentro de este reconocimiento participan las proteínas periplásmicas de unión (PBP), en las cuales, por un cambio conformacional inducido por la unión del ligando, se facilita la interacción con el quimiorreceptor y las proteínas de transporte asociadas a membrana (23).

Tanto del análisis cristalográfico así como de la comparación de secuencias de varias proteínas de unión se han obtenido características en común, como la estructura bilobular, la arquitectura similar  $\alpha/\beta$ , la unión de los lóbulos por dos o tres segmentos del péptido (bisagra), la posición del sitio de unión a ligandos en la interfaz de los dos dominios, y un origen evolutivo común (1) que comparten la mayoría de los miembros de las PBP; así como los miembros de una clase de proteínas de unión que están relacionados en secuencia, estructura y origen evolutivo, con proteínas bacterianas de unión a ADN(3) (véase Figura 2).

Se propone que ésta familia evolucionó para unir diferentes ligandos, conservando la misma estructura bilobular (24); esto se fundamenta en la posición conservada del sitio de unión al ligando -en la interfase entre los dos dominios- permitiendo una gran apertura entre los lóbulos y así acomodar diferentes moléculas que varían en tamaño y forma, cerrándose por el movimiento de la bisagra -que se encuentra en la parte posterior de la proteína-,

accionada por la unión del ligando (24). Las interacciones en la región de bisagra se rompen, formando nuevas interacciones en la comisura entre los lóbulos, todo esto gracias al cambio conformacional mediado por la unión del ligando, donde se podrían encontrar más soluciones a las interacciones proteína-ligando que en las de un cuerpo rígido (2), dando lugar a la evolución de nuevos sitios de unión.

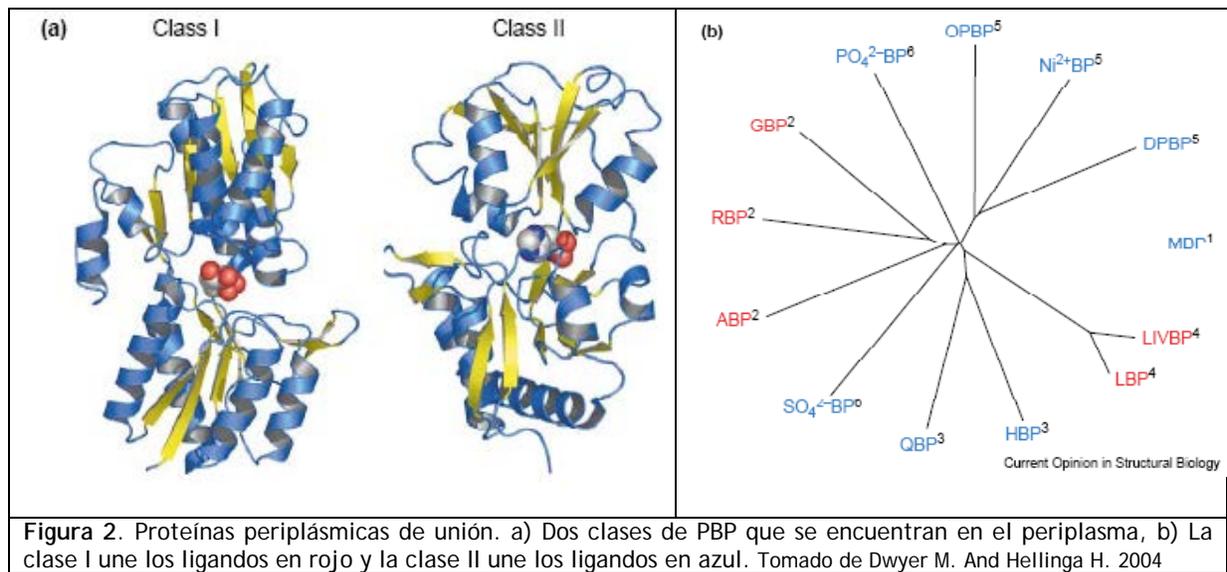


Figura 2. Proteínas periplásmicas de unión. a) Dos clases de PBP que se encuentran en el periplasma, b) La clase I une los ligandos en rojo y la clase II une los ligandos en azul. Tomado de Dwyer M. And Hellinga H. 2004

Basado en similitud de secuencia, las familias de las proteínas de unión se pueden clasificar en ocho diferentes grupos (3) (véase Tabla 1). Los miembros de cada uno de estos grupos de proteínas de unión, conservan la secuencia en el dominio N-terminal y una secuencia característica para cada familia (3). El grupo 3, que es específico para aminoácidos polares y opinas, tiene un intervalo de tamaño de 248 a 283 residuos (3), dos de los miembros de esta familia unen aminoácidos básicos HisJ une histidina y LAO une lisina, arginina y ornitina, dos unen glutamina GlnEco y GlnBst y dos unen moléculas que pertenecen al grupo de las opinas OccAtu une octapina y NocAcu une nopalina (3).

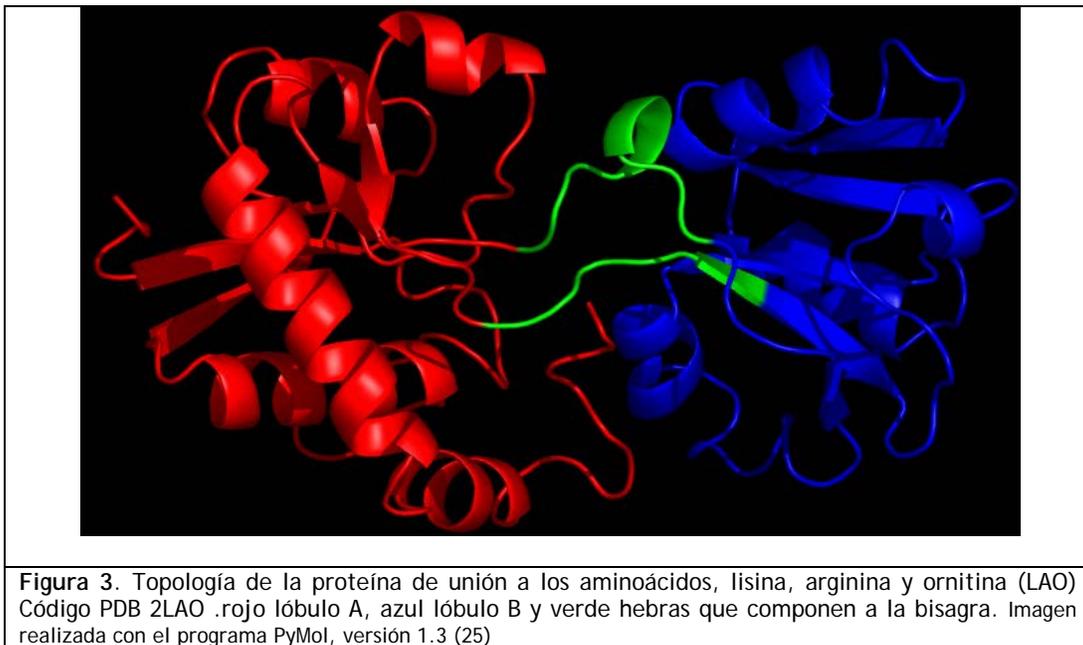
Grupo	Especificidad	Proteínas de unión a:	Numero de residuos
1	Oligosacáridos, azúcares	Maltosa, $\alpha$ -glicerol fosfato, hierro	390 $\pm$ 37
2	Hexosas y Pentosas	Ribosa, Arabinosa, Galactosa	291 $\pm$ 26
3	<b>Aminoácidos Polares y opinas</b>	<b>Histidina, LAO, glutamina</b>	<b>265<math>\pm</math> 12</b>
4	Aminoácidos Alifáticos y amidas	Leucina, LIV	368 $\pm$ 15
5	Péptidos y Níquel	Oligopéptido, Dipéptido, Níquel	533 $\pm$ 18
6	Poli aniones inorgánicos	Sulfato, tío-sulfato, Fosfato	335 $\pm$ 16
7	Poli aniones orgánicos	Di-carboxilato, Citrato,	318 $\pm$ 21
8	Complejos de hierro y vitamina B12	Hidroxamato de hierro, vitamina B12	309 $\pm$ 13

Tabla 1. Grupos de la familia de las proteínas periplásmicas de unión. Tomado de Tam R. and Saier M. H., Jr. (1993)

### LAO como modelo para estudiar las relaciones entre la estructura y la función de las proteínas.

El sistema de transporte periplásmico en bacterias incluye un receptor soluble de la permeasa, el cual es la proteína LAO, que une a los aminoácidos L-lisina, L-arginina y L-ornitina, su estructura tridimensional se encuentra resuelta a 2.7 Å de resolución (4), en su forma abierta sin ligandos y en conformación cerrada en presencia de los cuatro diferentes ligandos de alta afinidad (5). LAO es una proteína de 238 aminoácidos, que pertenece a la familia de la clase II de las proteínas de unión (24). LAO, al igual que los demás miembros de esta familia, se compone de dos lóbulos que se encuentran conectados por una región de bisagra. En LAO esta región abarca las asas de los residuos 88-93 y 186-194. También en LAO el carboxilo terminal no está conectado al resto de la proteína por la tercera hebra como las demás proteínas de unión y presenta un puente disulfuro entre los residuos 38 y 45 -el cual no es reactivo- (5). LAO además presenta cinco

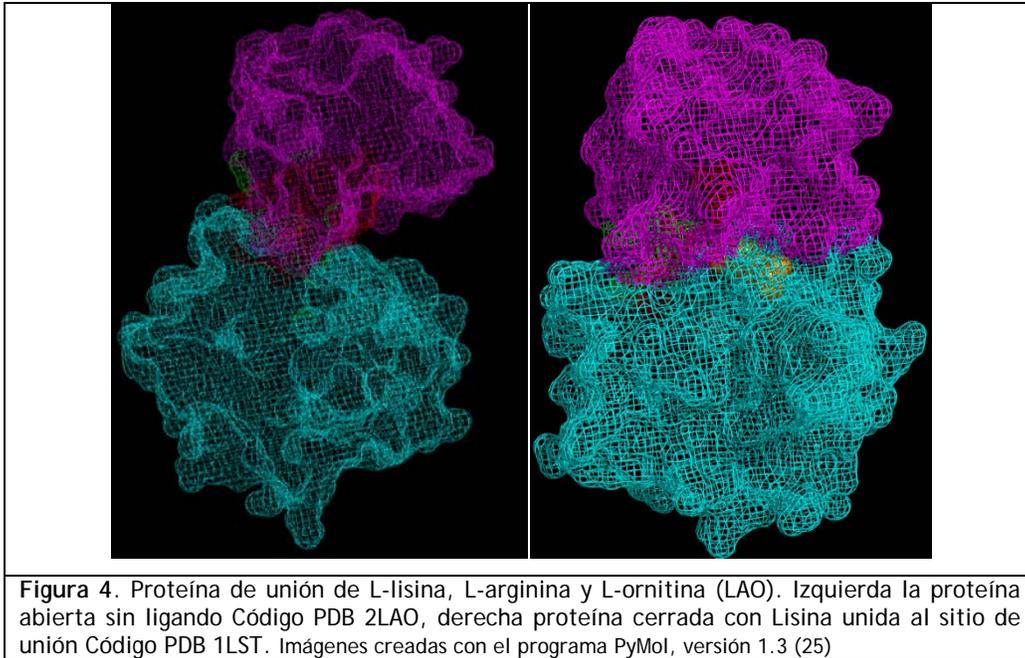
hebras- $\beta$  y cuatro  $\alpha$ -hélices en cada lóbulo, que es una característica común de la clase II (24) (véase figura 2). El dominio A (o lóbulo II) contiene 90 residuos del extremo amino-terminal y 48 del extremo del carboxilo-terminal, el cual se localiza cerca de la bisagra entre los dos lóbulos, mientras que el dominio B (o lóbulo I), contiene los residuos 91-190. Todas las hebras  $\beta$  son paralelas en cada uno de los lóbulos, a excepción de una que es anti-paralela (6) (véase Figura 3).



La proteína LAO tiene gran afinidad a los ligandos L-arginina, L-lisina, L ornitina y L-histidina, con constantes de disociación de 14, 15, 30 y 500 nano molar (nM) respectivamente (1); sin embargo, se han probado compuestos similares a estos aminoácidos como el ácido L-arginínico, la L-glutamina y los enantiómeros D de los ligandos de alta afinidad, los cuales presentan una menor afinidad de al menos tres órdenes de magnitud (1). Esto indica que el reconocimiento del ligando está determinado no sólo por interacciones polares, sino también por su

tamaño, forma y sus propiedades estereoquímicas, que son complementarias a las de la proteína. Las propiedades espectrales de LAO han sido estudiadas parcialmente y se han encontrado diferencias en los espectros entre la proteína sin ligando (estado abierto) y la proteína con ligando (estado cerrado) (véase Figura 4). Estas diferencias pueden ser parcialmente explicadas por los datos de las distintas estructuras tridimensionales de LAO con sus cuatro ligandos de alta afinidad (7).

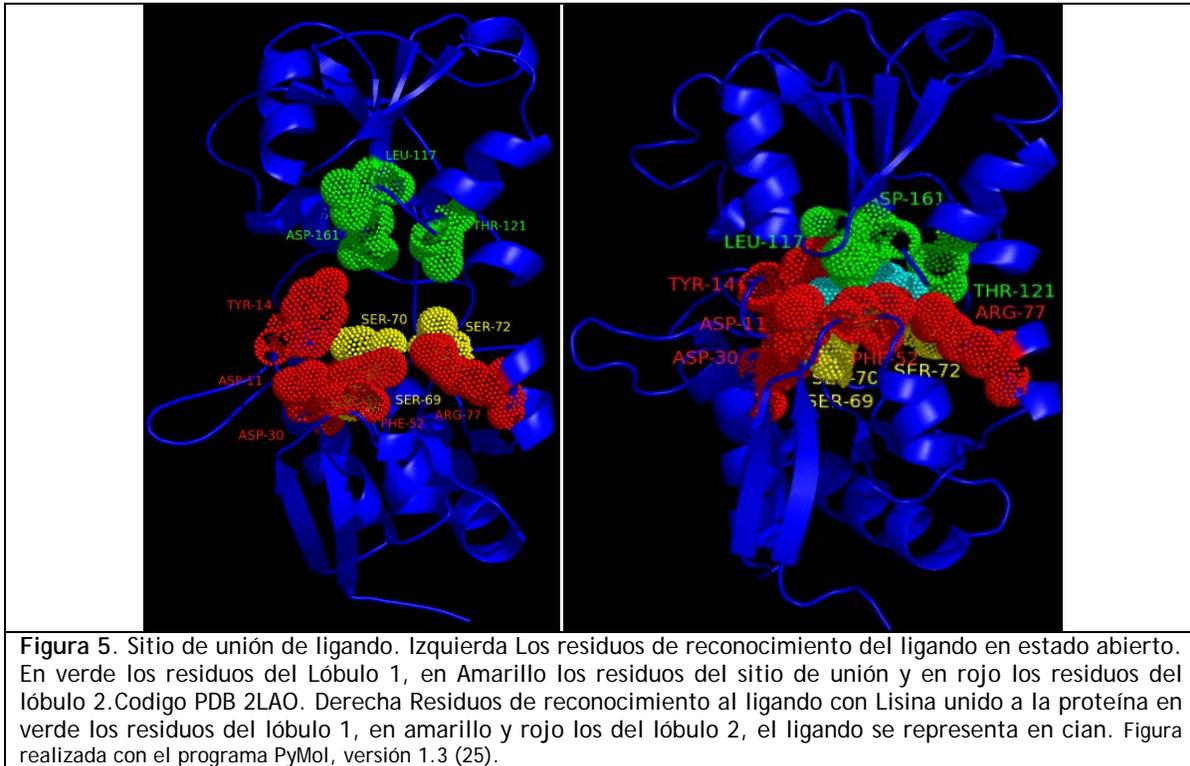
Al comparar las cuatro estructuras tridimensionales de LAO resueltas a 2.7 Å (4) con los ligandos de alta afinidad, la desviación estándar en la posición atómica (*Root Mean Square Deviation* o r.m.s.d.) de los carbonos alfa ( $C\alpha$ ) es menor a 0.18 Å entre los residuos 5-235 (7). La superposición de los  $C\alpha$  de estas cuatro estructuras muestra que los grupos amino y carboxilo están posicionados esencialmente de manera idéntica. Por lo tanto, globalmente la conformación de LAO en el estado cerrado, es la misma para las cuatro estructuras con ligando (7). Otros estudios plantean que esta proteína debería presentar una plasticidad conformacional durante la unión de ligandos y a su receptor de membrana, ya que la fluorescencia intrínseca presenta diferencias cuando se titulan a cada uno de los ligandos, y ha dejado una gran discordancia entre la información estructural y funcional (7).



### Sitio de reconocimiento de aminoácidos

La proteína de unión a histidina HisJ y LAO son capaces de unir ligandos específicos con diferentes afinidades (8,9). El sitio de reconocimiento de aminoácidos se encuentra dentro de la cavidad entre los dos dominios (9) (véase Figura 5). Los factores que determinan la unión del ligando son: la habilidad de esta cavidad de acomodar la larga cadena hidrofílica de los ligandos y la modificación del tamaño del sitio de unión al alinearse los aminoácidos durante el reconocimiento de los diferentes ligandos (9), las posiciones involucradas al alinear las secuencias de HisJ y LAO, son: La fenilalanina 52 en LAO, leucina 52 en HisJ; la serina 120 en LAO, treonina 120 en HisJ; la tirosina 190 en LAO, leucina 190 en HisJ; y el ácido aspártico 193 en LAO, valina 193 en HisJ (8). Se reportan dos quimeras con fragmentos de HisJ y LAO, proporcionando más información

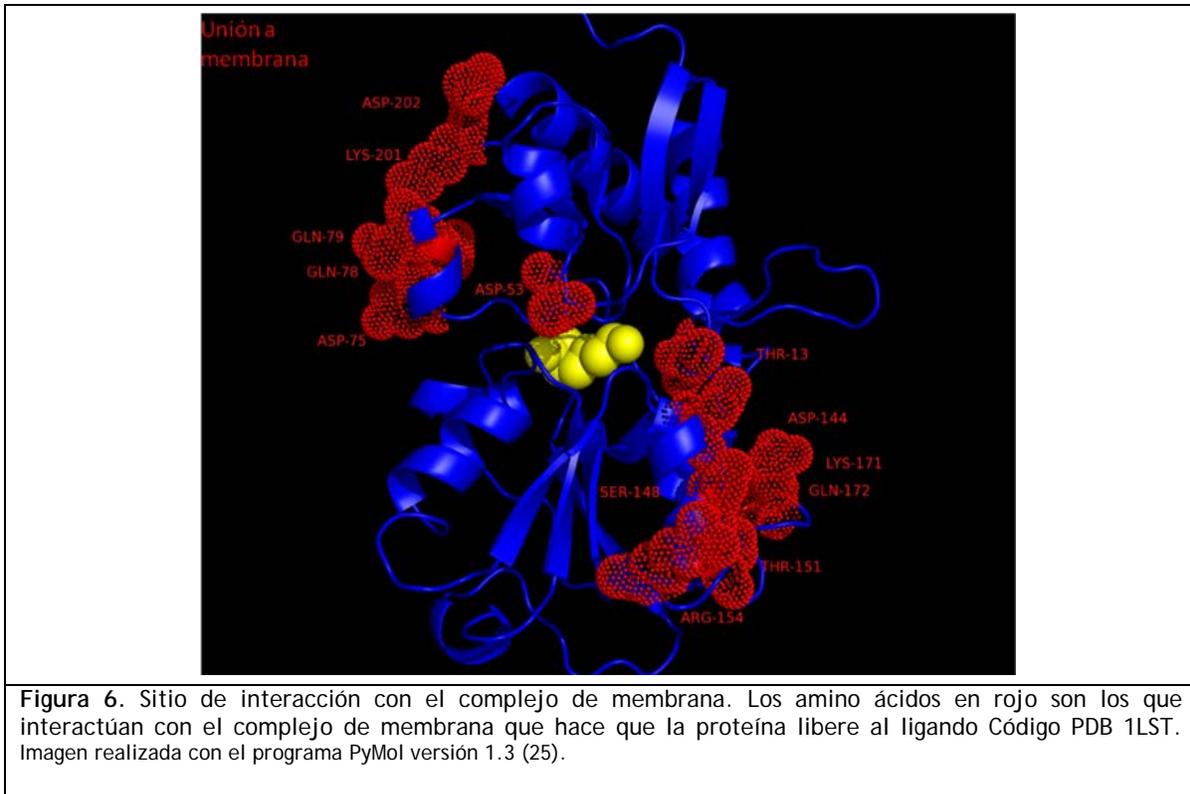
sobre la naturaleza de los residuos involucrados, específicamente en el reconocimiento de arginina (6).



La quimera His9084 está compuesta por los residuos 1-27 de HisJ y 28-al amino terminal de LAO. La quimera His5043 es resultado de un evento de entrecruzamiento entre el amino terminal de LAO y el carboxilo terminal de HisJ (8), fusionándose en la posición 200 de las secuencias alineadas, las dos proteínas quiméricas son funcionales en el transporte y se comportan como LAO al unir el ligando (9); en ambas proteínas quiméricas, los residuos responsables del reconocimiento específico de los ligandos son las posiciones: ácido aspártico-11, tirosina-14, ácido aspártico-30, fenilalanina-52, serina-69, serina-70, serina-72, arginina-77, leucina-117, triptofano-121 y aspártico-161 (9) (véase Figura 5).

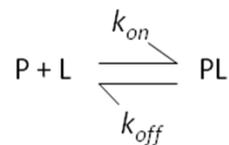
## Sitio de interacción con el complejo de membrana

LAO y la proteína de unión a histidina HisJ son productos de la duplicación en tándem del gen ArgT de *Salmonella typhimurium* (10), comparten la misma estructura pero muestran diferencias en el sitio de unión al ligando. La conservación de aminoácidos entre estas dos proteínas se atribuye a que ambas interactúan con el mismo complejo de membrana, es decir, comparten los residuos que interactúan con él (11), así como también los residuos que reconocen el carboxilo y amino terminal de los aminoácidos de alta afinidad (histidina, lisina, arginina y ornitina); también comparten los residuos esenciales para el plegamiento común (12). Los segmentos 53-94 y 146-173 son 92 % idénticos y están involucrados en formar los dominios responsables de la interacción con el complejo de membrana (1). Del análisis cristalográfico de la estructura de estas dos proteínas, se puede identificar el sitio de interacción con el complejo de membrana, utilizando dos criterios: el sitio de reconocimiento debe estar muy expuesto y los residuos de reconocimiento deben estar conservados en ambas proteínas; catorce residuos satisfacen los criterios anteriormente señalados: treonina-13, ácido aspártico-53, ácido aspártico-75, lisina-76, glutamina-78, glutamina-79, aspártico-144, serina-148, treonina-151, arginina-154, lisina-171, glutamina-172, lisina-201 y glutámico-202 (véase Figura 6). Estos residuos se encuentran en la superficie de los dos dominios, pero sólo del lado de la entrada del sitio de unión y pueden reconocer los dos componentes de membrana HisQ e HisM (1).



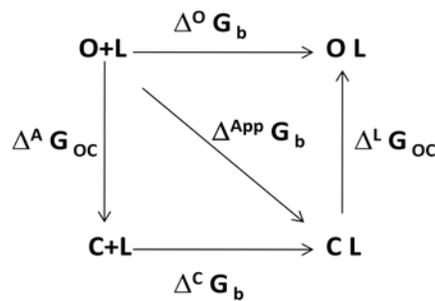
### El papel de los cambios conformacionales en proteínas de unión.

La tasa de asociación bio-molecular es la medida del tiempo mínimo de respuesta para la unión del ligando, mientras que la tasa de disociación define la velocidad máxima posible para el sistema de transporte correspondiente. El cociente de la tasa de unión y liberación (afinidad) determina la sensibilidad de las dos funciones fisiológicas representada en el esquema 1.



Esquema 1. Donde P es la proteína L es el Ligando  $k_{on}$  es la tasa de asociación y  $k_{off}$  es la tasa de disociación.

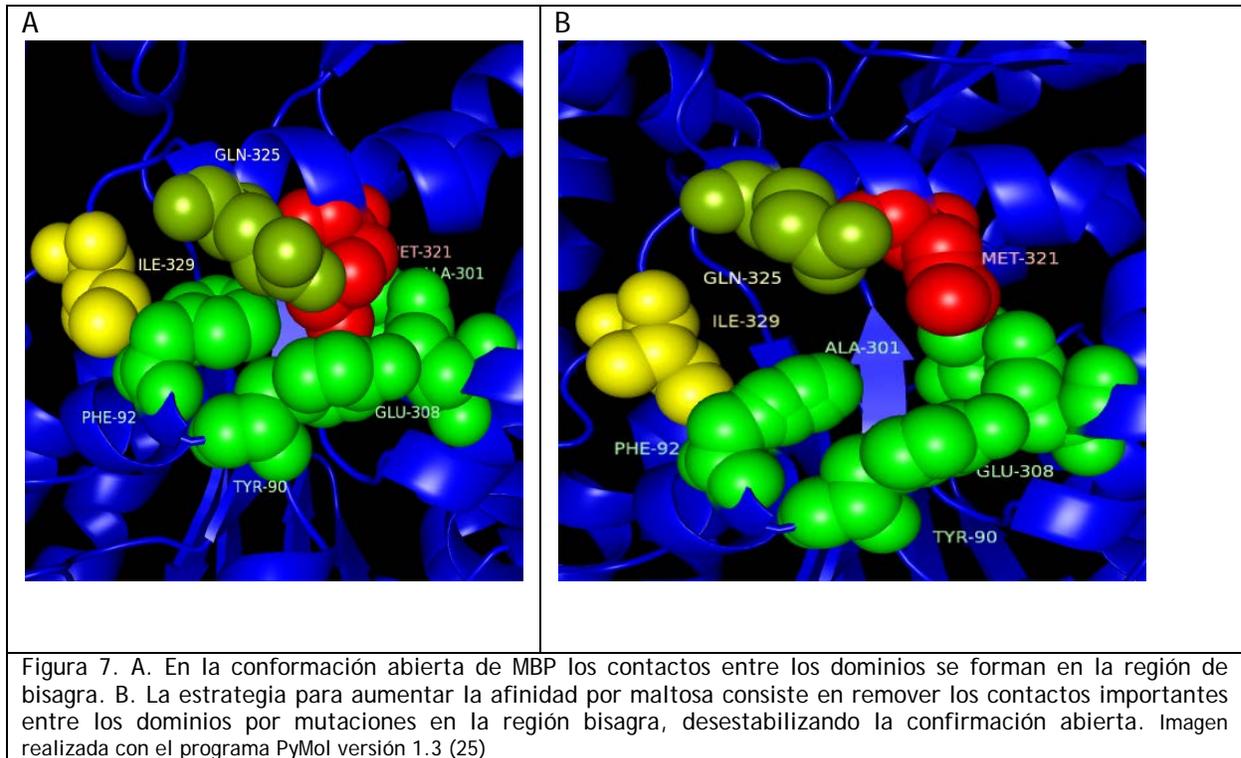
La afinidad a ligando en las proteína de unión se puede manipular alterando el equilibrio intrínseco entre el estado abierto y el estado cerrado (2), la relación termodinámica del equilibrio entre el estado abierto y cerrado en presencia y ausencia de ligando, está dado por la afinidad total que brinda el sustrato ( $\Delta^A G_{oc}$ ), ( $\Delta^{App} G_b$ ) es la suma del equilibrio intrínseco entre las formas abiertas y cerradas de la apo-proteína ( $\Delta^A G_{oc}$ ), y la afinidad del estado cerrado por el sustrato ( $\Delta^C G_b$ ) (2), como se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. O es el estado abierto L es el ligando C es el estado cerrado. Tomado de Marvin, J. S., and Hellinga, H. W. (2001)

Al modificar el equilibrio conformacional, la afinidad a los ligandos debe de cambiar, en vez de manipular las interacciones directas entre la proteína y su ligando. Un ejemplo de esto fueron los trabajos de mutaciones puntuales en la región de bisagra de la proteína de unión a maltosa (*maltose binding protein*, MBP por sus siglas en inglés) que Telmer y Shilton realizaron en 2003 (13). Sus trabajos reportaron cambios en los residuos M321A/Q325A, gracias a que la Metionina 321 del dominio Carboxilo terminal hace contacto con un parche hidrofóbico que incluye a los residuos tirosina-90, fenilalanina-92, glutámico-308 y alanina-301 del dominio amino terminal en el estado abierto de MBP; pero en

presencia de ligando se rompen estas interacciones y la metionina-321 se expone al solvente (13) (véase Figura 7).



De manera independiente, el grupo de Telmer y Shilton realizó la eliminación de los residuos ácido glutámico-172, asparagina-173, lisina-175 y tirosina-176 que se localizan alrededor de la glicina-174; todos estos residuos se encontraban en el giro  $\beta$  de una de las asas de la región de bisagra, lo que produjo un incremento en la afinidad por maltosa (13). Estas dos mutantes se hicieron de manera independiente y se realizó una tercera modificando conjuntando los cambios por alanina y la eliminación de los residuos del asa; ésta mutante también incremento la afinidad por el sustrato (13)

## Unión de ligando en proteínas de unión

En las diferentes proteínas de unión es muy común el motivo estructural de dos dominios conectados por dos o tres segmentos polipeptídicos, éstas actúan como bisagra permitiendo a los dominios moverse en tres direcciones: vertical, horizontal y longitudinal. Los tres movimientos están involucrados en la apertura y el cierre de la molécula, pero al mismo tiempo en la unión del ligando mientras se cierra la proteína (14). El estado cerrado necesita de otra proteína para poder liberar el ligando y así provocar el regreso al estado donde puede atrapar nuevamente al ligando; cuando el ligando entra en la hendidura entre los dominios -donde se encuentra el sitio de unión- los ángulos de torsión en la región de bisagra cambian para unir a los dominios al atrapar al ligando y pasar a la conformación cerrada (14).

En la mayoría de las proteínas de unión la constante de disociación  $K_d$  está en el orden de micro molar (3), las fuerzas que intervienen para la unión del ligando son los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals. Para el caso específico de LAO, la constante de disociación se encuentra en el orden de nano molar se mide por fluorescencia de triptófanos excitando a una longitud de onda de 295nm, y determinando la emisión en el intervalo de 310 a 410nm.

## Constante de disociación $K_d$

Para una proteína (P), que sólo tiene un sitio de unión para unir un ligando (L), cualquier molécula de esa proteína puede estar libre o unida al ligando, por lo

cual cualquier molécula del ligando puede estar libre o unida a la proteína, llevándonos a las ecuaciones de conservación de masa (27):

$$[P] = [PL] + [P]_f$$

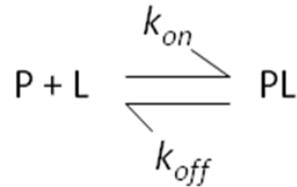
$$[L] = [PL] + [L]_f$$

Donde  $[P]$  y  $[L]$  son la concentración total de proteína y ligando respectivamente,  $[P]_f$  y  $[L]_f$  son la concentración libre de las dos moléculas, mientras que  $[PL]$  es la concentración del complejo proteína-ligando en solución; se establecerá un equilibrio entre la forma libre y la forma con ligando de la proteína, el equilibrio se cuantifica comúnmente en términos de la constante de disociación  $K_d$ , para el complejo binario al equilibrio (27).

$$K_d = \frac{[P]_f [L]_f}{[PL]}$$

La afinidad relativa de diferentes complejos proteína-ligando es inversamente proporcional a los valores de  $K_d$ ; entre más fuerte se une el ligando, el valor de la constante de disociación es menor. Las constantes de disociación son utilizadas para comparar la afinidad de diferentes ligandos por un proteína en particular, así mismo para comparar la afinidad de diferentes proteínas por un ligando común. Cuando dos moléculas P y L se unen reversiblemente en solución para formar un complejo binario PL (sin pasos subsecuentes), el equilibrio entre los componentes libres P, L y el complejo binario PL estará gobernado por las tasa de formación del complejo (asociación del complejo) y por la tasa de disociación

del complejo formado, definiendo así la constante de segundo orden para la asociación del complejo como  $k_{on}$  y la constante de primer orden para la disociación del complejo como  $k_{off}$  (27).



La constante de disociación para el complejo está dada por la relación de la  $k_{off}$  a la  $k_{on}$  (27).

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

En la mayoría de los casos, la fuerza de interacción (afinidad) entre la proteína y el ligando es tal que se requiere de un exceso en la concentración de ligando para tener efecto significativo en la unión a la proteína. Por lo tanto, la formación del complejo bimolecular procede con un pequeño cambio en la concentración de ligando libre -casi bajo cualquier condición experimental- y así la reacción de asociación procede con una cinética de pseudo primer orden (27).

$$[PL]_t = [PL]_{eq} [1 - \exp(-k_{obs}t)]$$

Donde  $[PL]_t$  es la concentración del complejo binario al tiempo  $t$ ,  $[PL]_{eq}$  es la concentración del complejo bimolecular al equilibrio y la  $k_{obs}$  es el valor determinado experimentalmente de la constante de pseudo primer orden que

está cerca al equilibrio. Para la unión reversible se puede demostrar que los valores de  $k_{obs}$  son directamente proporcionales a la concentración del ligando y se puede representar de la siguiente manera (27):

$$k_{obs} = k_{on} [L]_f + k_{off}$$

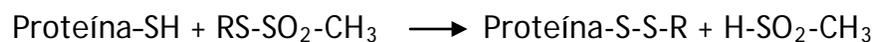
Por lo tanto, se puede determinar el valor de  $k_{obs}$  como una serie de concentraciones de ligando a partir de experimentos que se ajustan a una función exponencial. Un re gráfico de la  $k_{obs}$ , como función de la concentración de ligando, se ajustará a una línea recta cuya pendiente es igual a la  $k_{on}$  y la intercepción con el eje Y es igual a la  $k_{off}$  (27).

### **Como estudiar las interacciones y las reacciones de unión al ligando mediante la modificación de la bisagra de la proteína LAO**

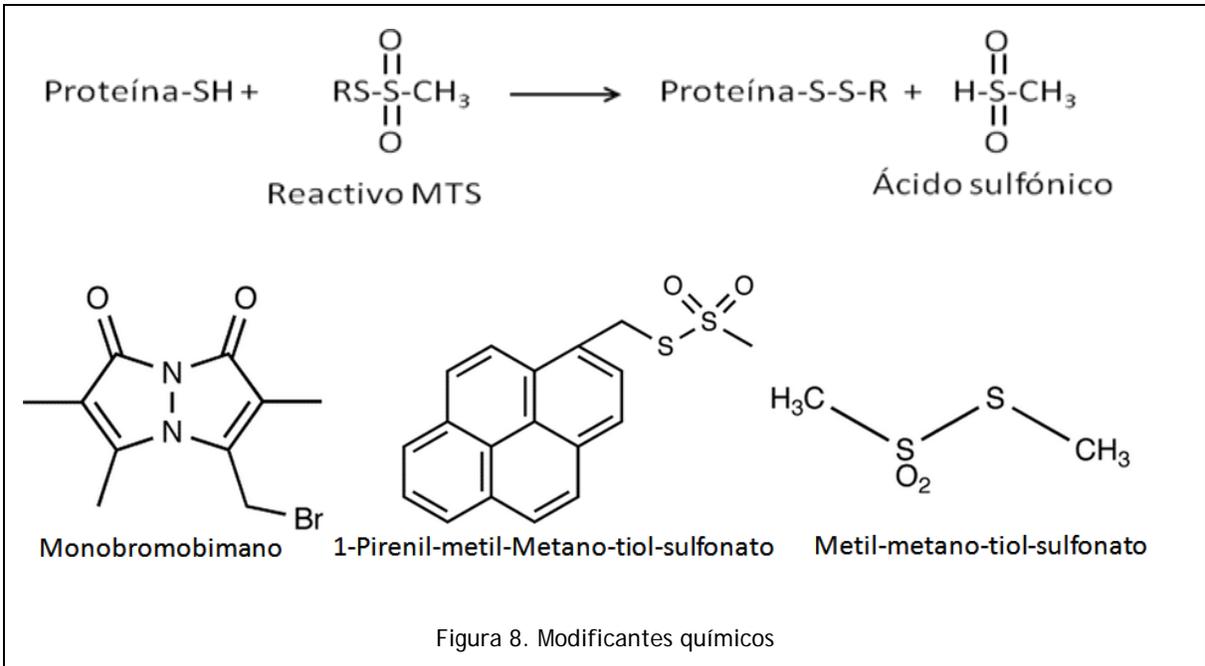
Las reacciones de unión a diferentes ligandos pueden aportar detalles moleculares del funcionamiento de las proteínas, así como sobre las interacciones proteína-proteína, proteína-ligando, transporte molecular y muchos otros aspectos fundamentales de la bioquímica. Para nuestro modelo de estudio, el papel que desempeña la bisagra para la unión del ligando, así como para el cambio conformacional inducido por dicha unión, es sumamente relevante, debido a que en esta región se lleva a cabo el movimiento de los lóbulos durante el cambio conformacional inducido por ligando durante la apertura y cierre de la proteína. De tal manera que para poder estudiar estas interacciones proteína-ligando, se utilizó como estrategia general, el realizar

mutaciones puntuales dentro de la bisagra y en regiones cercanas a ella, utilizando la introducción de cisteínas en las posiciones seleccionadas para posteriormente introducir grupos perturbadores de diferentes tamaños y volúmenes. Las posiciones fueron seleccionadas por su ubicación dentro de la estructura tridimensional de la proteína teniendo como base las dos asas de los residuos 88-93 y 186-194 que componen a la bisagra, dentro de estas asas se encuentran la alanina 89 y la tirosina 190, también se seleccionó un aminoácido cercano a la bisagra el ácido glutámico 162 y un aminoácido de la comisura de la entrada del sitio de unión el ácido glutámico 167.

Los modificadores químicos que se seleccionaron para la perturbación son reactivos metano tiol sulfonato (MTS) (26). Este tipo de reactivos reaccionan con los grupos SH de las cisteínas introducidas y por el grupo RS de tiol en un ambiente reductor (28).



Y el resto del reactivo queda unido a la cisteína (28), Los reactivos MTS para tal motivo fueron Metil-metano-tiol-sulfonato con un volumen para el metilo de 6.5 Å<sup>3</sup>, mono bromo-bimano con un volumen para el bimano de 138 Å<sup>3</sup> y 1-pyrenil-metil-metano-tiol-sulfonato con un volumen de 186 Å<sup>3</sup> para el pireno (Figura 8). Estos reactivos MTS se utilizaron como perturbadores de la región de bisagra por su volumen y no por sus características químicas.





## Resumen

La proteína periplásmica de unión a los aminoácidos lisina, arginina y ornitina (LAO), es una proteína soluble que pertenece a la familia de las proteínas periplásmica de unión (PBP). Las PBP son proteínas bilobuladas, con homología estructural y constituyen el primer paso en el reconocimiento de ligandos transportados a través de la membrana de bacterias. La topología de las PBP está compuesta por dos dominios  $\alpha/\beta$  unidos por una región de bisagra y el sitio de unión al ligando se encuentra en la interfaz de los dos dominios. La estructura cristalográfica obtenida para la proteína periplásmica de unión LAO, muestra dos estados conformacionales: cerrada en presencia del ligando y abierta en ausencia del ligando. (Esta proteína presenta una gran afinidad), los valores de las constantes de afinidad por sus ligandos son 15 nM para lisina, 14 nM para arginina y 30 nM para ornitina.

La afinidad por los ligandos puede ser manipulada alterando el equilibrio intrínseco entre el estado abierto/cerrado, -un ejemplo de esto fueron los trabajos realizados con la proteína de unión a maltosa por Telmer y Shilton en 2003 (13)-, perturbando residuos cercanos a la bisagra, al introducir grupos químicos con diferentes características de volumen y carga, sin alterar las interacciones directas entre la proteína y sus ligandos, sin interferir en el sitio de unión.

En este trabajo modificamos residuos cercanos a la bisagra de LAO por mutagénesis dirigida y encontramos cambios en la afinidad de la proteína por sus ligandos. Estudios espectroscópicos muestran que estos cambios en la afinidad están asociados a los cambios en el equilibrio entre la apertura y cierre de la proteína.

## **Hipótesis**

Si la proteína LAO presenta un equilibrio entre la forma abierta y cerrada, entonces cualquier perturbación en la región de bisagra de la proteína presentará un cambio en la afinidad por el ligando.

## **Objetivo general**

Estudiar los factores moleculares de la interacción de la proteína LAO con el ligando y el papel de la región de bisagra para la afinidad.

## **Objetivos Particulares**

Introducción de grupos funcionales a través de mutagénesis sitio específica por residuos de cisteína y su modificación química.

Determinar la constante de disociación ( $K_d$ ) por fluorescencia intrínseca, tanto para la proteína silvestre como para las mutantes químicamente modificadas.



## Métodos

### Construcción de mutantes

El gene ArgT (Figura 9) de *Salmonella typhimurium*, que codifica para la proteína de unión LAO, se encuentra clonado en el plásmido pET-12b (*el gen clonado en el plásmido pET-12b fue donado por el Dr. Martin González y el Dr. Alejandro Sosa del laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la facultad de medicina de la UNAM*).

```
1   atgaagaaga ccgttctcgc tttgtctttg ctgataggtc tgggcgcgac ggcggccagt
61  tacgcccgcg tcccgcgaaac gggttcgtatt ggaacagata ccacctacgc gcctttctca
121 tcaaaagatg ccaaaggcga gtttattggc tttgatatcg atctcggtaa tgaaatgtgt
181 aagcgtatgc aggtgaaatg tacctgggtc gccagcgact ttgatgcgct tattccctca
241 ctaaaagcga aaaaaattga tgccattatt tcatcgctct ctatcaccga taaacgccag
301 caagaaattg cgttttccga caaactttac gcggcggatt cacgcctgat tgcggcaaaa
361 gggctctccg ttcagccgac gctggaatcg ctgaaaggca agcatgtcgg cgtgctgcaa
421 gggctccacgc aagaggctta cgccaatgat aactggcgca ctaaagggtgt ggatgtgggtg
481 gcttatgcca accaggatct tatctattcc gatttaaccg ccggtcgtct ggatgccgca
541 ttacaggatg aagtcgccgc cagcgaaggt ttocctgaagc agccagcggg caaagagtat
601 gcgtttgccg gtccttccgt gaaggataaa aaatatthttg gcgacggggac ggggggttggg
661 ctgcgtaaaag atgataaccga gctaaaagcc gcgthttgata aagcgtgac cgaactgcgc
721 caggacggaa cttacgacaa aatggccaaa aagtacttcg atthttaatgt ttacggcgat
781 tga
```

Figura 9 Secuencia del Gene ArgT de *Salmonella typhimurium*. No. de referencia Genbank NC\_003197 gi: 16763390.

Para la obtención del plásmido con el gen clonado se transformaron células quimio competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Las células se descongelaron a 4°C durante 15 minutos y se les agregó 1 $\mu$ L del plásmido concentrado pET-12b-ArgT, después de dejarlas reposar por 5 minutos a 4°C, se aplicó un choque térmico de 42°C por 1 minuto y se dejó reposar por 2 minutos a 4°C. Una vez que se realizó el primer tratamiento térmico, las células se colocaron en 600  $\mu$ L de medio LB líquido y se incubaron a 37°C, con agitación a 250rpm, durante una hora. Posteriormente se sembraron en un medio sólido LB con ampicilina y se incubaron de nuevo a 37°C

en un periodo de 12 a 16 horas. A partir de las células tratadas se tomó una colonia aislada, misma que se transfirió a 10 mL de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm. El DNA plasmídico se purificó mediante el *QIAprep Spin Miniprep Kit* de QIAGEN una vez que fue purificado se determinó la concentración diluyendo 2µL del pET-12b-ArgT en 198µL de agua, monitoreando la densidad óptica a 260nm. Las muestras se pasaron por electroforesis de geles de agarosa al 1%.

A partir de la secuencia del gen ArgT, se diseñaron oligonucleótidos en la cadena principal y en la complementaria, para realizar mutaciones puntuales por cisteínas en los residuos 89, 162, 167 y 190, (Figura 10). Dichos oligos (tabla 2) se sintetizaron por la compañía "*Invitrogene*", y se determinó su concentración con base en la medición de la densidad óptica a 260 nm, de igual forma se les practicó un análisis X\_BLAST.

1	alpqtvrigt	dttyapfssk	dakgefigfd	idlgnemckr	mqvktwvas	dfdalipslk
61	akkidaiiss	lsitdkrqe	iafsdkly <sup>a</sup>	dsrliaakgs	piqptleslk	gkhvlgvlggs
121	tqeyandnw	rtkgvdvvay	anqdliysdl	tagrldaalq	de <sup>a</sup> vaase <sup>a</sup> gfl	kqpagkeyaf
181	agpsvkdkky	fgdgtgvglr	kddtelkaaf	dkaltelrqd	gtydkmakky	fdfnvygd

Figura 10.1 Secuencia de aminoácidos de la proteína periplásmica de unión LAO; en amarillo los residuos de la bisagra por modificar

Nombre	Secuencia
A89CFOR	5' GACAAACTTTACGCGTGTGATTCACGCCTG3'
A89CREV	5' CAGGCGTGAATCACACGCGTAAAGTTTGTC3'
E162CFOR	5' GCCGCATTACAGGATTGTGTCGCCGCCAGC3'
E162CREV	5' GCTGGCGGCGACACAATCCTGTAATGCGGC3'
E167CFOR	5' CCTTCCGTGAAGGATTGTAATATTTTGGCGAC3'
E167CREV	5' GTCGCCAAAATATTTACAATCCTTCACGGAAGG3'
Y190CFOR	5' GTGAAGGATAAAAAATGTTTTGGCGACGGG3'
Y190CREV	5' CCCGTCGCCAAAACATTTTTATCCTTCAC3'

Tabla2 oligonucleótidos para mutagénesis dirigida para la región de bisagra.

Con cada par de oligonucleótidos se llevaron a cabo reacciones en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de acuerdo al siguiente protocolo (Tabla 3):

		A90C	E162C	Y190C	E167C
Buffer 10X	2mM Mg	5,00	5,00	5,00	5,00
pET12b-argT	100ng	1,00	1,00	1,00	1,00
Oligo FW	125ng	3,17	2,23	3,03	3,76
Oligo REV	125ng	2,40	2,18	2,30	3,07
dNTP`s 10X	2.5mM	5,00	5,00	5,00	5,00
Agua		33,44	34,59	33,67	32,17
PFU		2,00	2,00	2,00	2,00

Tabla 3. Reacción de PCR

que incluyeron solución amortiguadora 10x con 2 mM de  $MgSO_4$ , 100 ng de plásmido pET12b con el gen ArgT clonado, 125 ng de oligo *forward*, 125 ng de oligo *reverse*, dNTPS 10x 2.5 mM,  $H_2O$  cuanto baste para 50  $\mu L$  y 2  $\mu L$  de enzima Pfu. Para cada mutante, la reacción en cadena de la polimerasa se trabajó bajo las siguientes condiciones experimentales (Tabla 4):

	T (°C)	T(min)
1 Calentar	95	2
2 Desnaturalizar	95	1
3 Annealing	45	1
4 Escalera	60	5(seg)
5Amplificar	68	10
Repetir	2 a 5	30
Amplificar	68	10

Tabla4 condiciones de termociclador

Se calentó durante 2 minutos a 95°C, posteriormente, se desnaturalizó por un minuto a 95°C; para el *annealing* se realizó una escalera de cinco segundos a

0.2°C/s partiendo de 45°C hasta llegar a 60°C, una vez terminado este proceso se llevó a cabo una amplificación de 10 minutos a 60°C durante 25 ciclos y, para completar la amplificación, otros 10 minutos a 60°C. Cada producto de PCR se corrió en electroforesis en geles de agarosa al 1%, las células competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$  se transformaron al agregar 5  $\mu$ L del producto de PCR para cada mezcla, sujetando a choque térmico a 42°C, durante un minuto. Al término del proceso las células se transfirieron a 600  $\mu$ L de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C con agitación de 250 rpm por una hora. Las células se sembraron en medio sólido LB con ampicilina y se incubaron a 37°C en un periodo de 12 a 16 horas.

A partir de las células tratadas se tomó una colonia que fue aislada, misma que se transfirió a 10 mL de medio LB líquido, crecieron a 37 °C con una agitación a 250 rpm. El DNA se purificó mediante el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* de QIAGEN; una vez purificado se determinó la concentración diluyendo 2  $\mu$ L del Pet-12b-ArgT con la mutación en 198  $\mu$ L de agua, tomando la lectura de la densidad óptica a 260 nm. Las muestras se secuenciaron en la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Una vez que se obtuvieron las secuencias, se comprobaron las mutaciones con el programa *Bioedit*. Se transformaron por medio de choque térmico células competentes de *E. coli* BL21-AI con el plásmido mutante. Las células transformadas crecieron en medio sólido LB con ampicilina en un periodo de 12 a 16 horas, al término del proceso se tomó una colonia que se resembró en otra caja con medio LB sólido y ampicilina por un periodo igual, de 12 a 16 horas.

**Purificación de proteína**

De la transformación de *E. coli* BL21-AI por choque térmico con el gen mutado, se recuperaron todas las células presentes en la placa y se transfirieron a 250 ml de medio líquido LB con ampicilina, crecieron a 37°C con agitación durante una hora. El cultivo entero se pasó a un litro de medio LB con ampicilina y se incubó a 37°C con una agitación de 250 rpm, hasta alcanzar la densidad óptica de entre 0.8 y 1 a 550 nm. Al alcanzar la densidad óptica, el cultivo se indujo con 0.2% de arabinosa durante 4 horas. Éstas células se cosecharon y se centrifugaron a 4650 G durante 15 minutos, al resuspenderlas se aplicó un choque osmótico con 20% de sacarosa; nuevamente, las células fueron centrifugadas a 4650 G y resuspendidas en 80 mL de solución amortiguadora de acetato de potasio 10 mM con 5 mM de sulfato de magnesio a pH 5.1; para terminar con ésta parte de la purificación, las células se volvieron a centrifugar pero con una velocidad de 18000 G para recuperar el sobrenadante. Al periplasma se le realizó una diálisis en amortiguador de acetato de potasio 10 mM pH 5.1, durante un periodo de 12 a 16 horas. La fracción ya equilibrada a pH 5.1, se corrió en la columna *Source-S* previamente equilibrada en amortiguador de acetato de potasio 10 mM a pH 5.1; para eluir a la proteína se aplicó un gradiente de 0 a 40% de cloruro de sodio 500 mM, separando la proteína LAO del resto de las proteínas periplásmicas (Figura 11). Las fracciones con proteína se concentraron en tubos *Amicon* Ultra-15 y se lavaron con solución amortiguadora Bis-tris propanol 5mM pH 8.5. La proteína concentrada se pasó por la columna *Source-Q* y se aplicó un gradiente de 0 a 40% de cloruro de sodio 250 mM, lo que eluyó a la proteína y se obtuvieron las fracciones de proteína LAO con ligando y sin ligando (Figura 12). Las fracciones

con proteína se concentraron en tubos *Amicon* Ultra-15 y se midió la concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) (29).

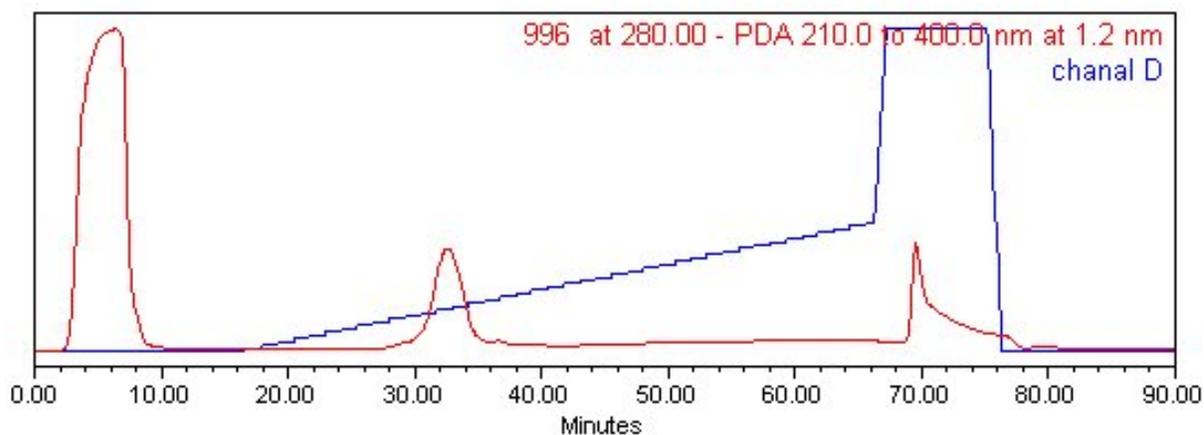


Figura 11. Perfil cromatográfico de la columna Source-S con un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 40% en esta columna las fracciones de las dos formas de LAO salen juntas a los 30 min.

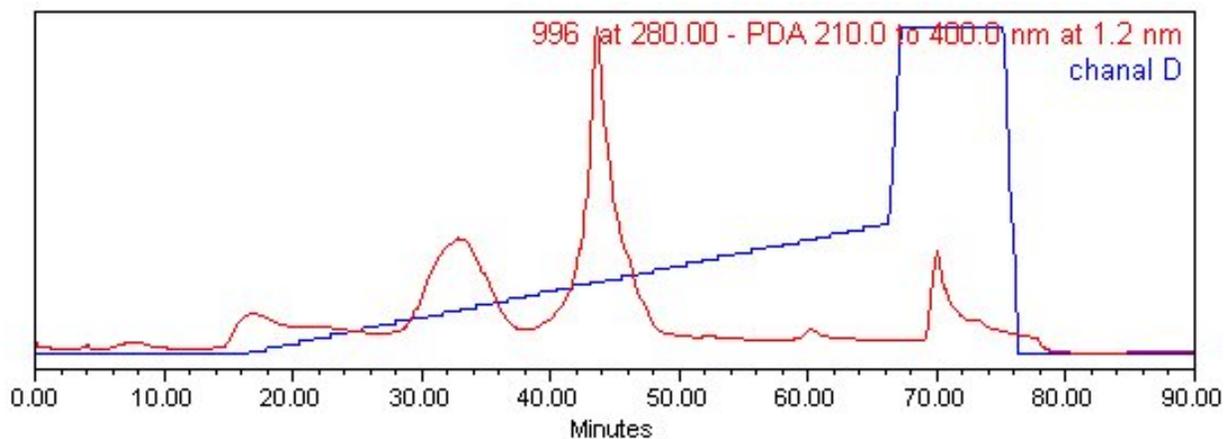


Figura 12. Perfil cromatográfico de la columna Source-Q con un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 40%. En esta columna a los 30 min sale la fracción de la forma de LAO con ligando y a los 40 min sale la forma sin ligando de LAO.

### Modificación química de las mutantes

Para las mutantes se utilizó el mismo método de purificación de la proteína silvestre, pero con un gen modificado. A éstas se les agregó ditiotreitól (DTT) para reducir las cisteínas reactivas una vez purificada; después se pasaron por la

columna de desalado *hit trap* para retirar el DTT y se agregaron los modificantes químicos reactivos Metil-metano-tiol-sulfonato, Monobromobimano y 1-Pyrenil-metil-Metano-tiol-sulfonato a las cisteínas reducidas. Las fracciones modificadas se concentraron en tubos *Amicon* Ultra-15 y se midió la concentración por BCA (29).

A las proteínas mutantes obtenidas y modificadas, se les realizaron ensayos de fluorescencia intrínseca mediante la titulación con el ligando L-arginina, al agregar 1  $\mu\text{L}$  de arginina 100  $\mu\text{M}$  a 2  $\mu\text{M}$  de la proteína modificada, en un volumen total de 2000  $\mu\text{L}$  con amortiguador Tris 50 mM a pH 7.5.

#### **Determinación de fluorescencia y medición de la Kd**

La medición de la emisión de fluorescencia se llevó a cabo en un espectrofluorómetro ISS PC1 (ISS *inc.*, *Champaign, IL*) a 30°C, utilizando una concentración final de proteína de 2  $\mu\text{M}$ , en Tris-HCl 50  $\mu\text{M}$ , pH 7.5. La titulación del ligando para la proteína silvestre y las mutantes marcadas fueron determinadas siguiendo los cambios de emisión de fluorescencia intrínseca con una  $\lambda$  Max de excitación de 295 nm, con un tiempo de integración de un segundo y una abertura de paso de 0.5 nm. Los cambios en la intensidad de fluorescencia máxima se analizaron por regresión no lineal del programa *Origin 7 (MicroCal software, inc. Northampton MA)*, y los datos experimentales de la titulación del ligando para estimar la Kd se ajustaron con la ecuación:

$$V_0 = \frac{\left( \frac{1 + K_D}{P_0} + \frac{L_0}{P_0} \right) - \sqrt{\left( \frac{1 + K_D}{P_0} + \frac{L_0}{P_0} \right)^2 - \frac{4L_0}{P_0}}}{2}$$

Si una proteína P une un ligando L, y forma el equilibrio



Donde p y L están en estado libre y PL es el complejo proteína ligando.

Si existe una proporción entre las especies libres P, L y el complejo proteína ligando PL y en ciertas condiciones dadas esta proporción ajusta a:

$$K_d = [P] [L] / [PL]$$

Donde P puede ser llamado  $P_{\text{libre}}$  y L puede ser llamado  $L_{\text{libre}}$ , entonces

$$K_d = [P_{\text{libre}}] [L_{\text{libre}}] / [PL]$$

Si la cantidad total de proteína se divide en los campos: proteína libre y proteína-Ligando al igual que la cantidad total de ligando se divide en dos campos: Ligando libre y proteína-ligando entonces

$$[P_{\text{total}}] = [P_{\text{libre}}] + [PL] \text{ rescribiendo } [P_{\text{libre}}] = [P_{\text{total}}] - [PL]$$

$$[L_{\text{total}}] = [L_{\text{libre}}] + [PL] \text{ rescribiendo } [L_{\text{libre}}] = [L_{\text{total}}] - [PL]$$

Por lo tanto

$$K_d = ([P_{\text{total}}] - [PL]) ([L_{\text{total}}] - [PL]) / [PL]$$

$$K_d [PL] = ([P_{\text{total}}] - [PL]) ([L_{\text{total}}] - [PL])$$

$$K_d [PL] = ([P_{\text{total}}] [L_{\text{total}}]) - ([L_{\text{total}}] [PL] - [P_{\text{total}}] [PL]) + [PL]^2$$

$$0 = [PL]^2 - ([L_{\text{total}}] [PL] - [P_{\text{total}}] [PL]) - K_d [PL] + ([P_{\text{total}}] [L_{\text{total}}])$$

$$0 = [PL]^2 - ([L_{\text{total}}] + [P_{\text{total}}] + K_d) [PL] + ([P_{\text{total}}] [L_{\text{total}}])$$

Por la formula cuadrática si  $ax^2 + bx + c = 0$

Entonces

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

Por lo tanto

$$[PL] = \frac{\{([P_{total}] + [L_{total}] + Kd) \pm \sqrt{([P_{total}] + [L_{total}] + Kd)^2 - 4([P_{total}] [L_{total}])}\}}{2}$$



## Resultados

### Construcción de mutantes

El diseño y la orientación de los oligonucleótidos se comprobó mediante un *blast* contra la base de datos del “*National Center for Biotechnology Information*” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, todos los cebadores diseñados tuvieron coincidencia con el gen ArgT de *S. typhimurium*, excepto por el codón de la mutación (Tabla 5). El diseño de los oligonucleótidos pretende cambiar el aminoácido de la posición en cuestión por cisteína, utilizando el grupo SH para la modificación química mediante un grupo tiol.

A89C FOR Tm 63°C	A89C REV Tm 63°C
Identities = 27/30 (90%),Gaps = 0/30(0%) Strand=Plus/Plus 1 GACAAACTTTACGCGTGTGATTCACGCCTG 30 319 .....GCG..... 348	Identities = 27/30 (90%),Gaps = 0/30(0%) Strand=Plus/Minus 1 CAGGCGTGAATCACACGCGTAAAGTTTGTC 30 348.....CGC..... 319
E162C FOR Tm 68°C	E162C REV Tm 68°C
Identities = 27/30 (90%),Gaps = 0/30(0%) Strand=Plus/Plus 1 GCCGCATTACAGGATTGTGTCCGCCAGC 30 535.....GAA..... 564	Identities = 27/30 (90%),Gaps = 0/30(0%) Strand=Plus/Minus 1 GCTGGCGGCGACACAATCCTGTAATGCGGC 30 564.....TTC..... 535
E167C FOR Tm 62°C	E167C REV Tm 62°C
Identities = 30/33 (90%),Gaps = 0/33(0%) Strand=Plus/Plus 1 CCTTCCGTGAAGGATTGTAAATATTTTGCGAC 33 541.....GAA.....572	Identities = 30/33 (90%),Gaps = 0/33(0%) Strand=Plus/Minus 1 GTCGCCAAAATATTTACAATCCTTCACGGAAGG 33 572.....TTC.....541
Y190C FOR Tm 60°C	Y190C REV Tm 60°C
Identities = 29/30 (96%),Gaps = 0/30(0%) Strand=Plus/Plus 1 GTGAAGGATAAAAAATGTTTTGGCGACGGG30 619.....A..... 648	Identities = 29/30 (96%),Gaps = 0/30(0%) Strand=Plus/Minus 1 CCCGTCGCCAAAACATTTTTATCCTTCAC30 648.....T.....619
Tabla 5 X Blast de los oligonucleótidos mandados a sintetizar. Las letras en rojo representan el codón de la mutación.	

El peso molecular de la reacción en cadena de la polimerasa de las mutantes corresponde al peso esperado, de acuerdo al número de bases de la secuencia del plásmido que se compone de 4674 pb. (Pares de base), mientras el gen silvestre cuenta con 783 pb. para un total de 5457 pb. Se mandó secuenciar el gen mutado verificándose con el programa *BioEdit*; Se obtuvieron tres muestras de cada producto de PCR, de las mutantes 89, 162, 167 y 190.

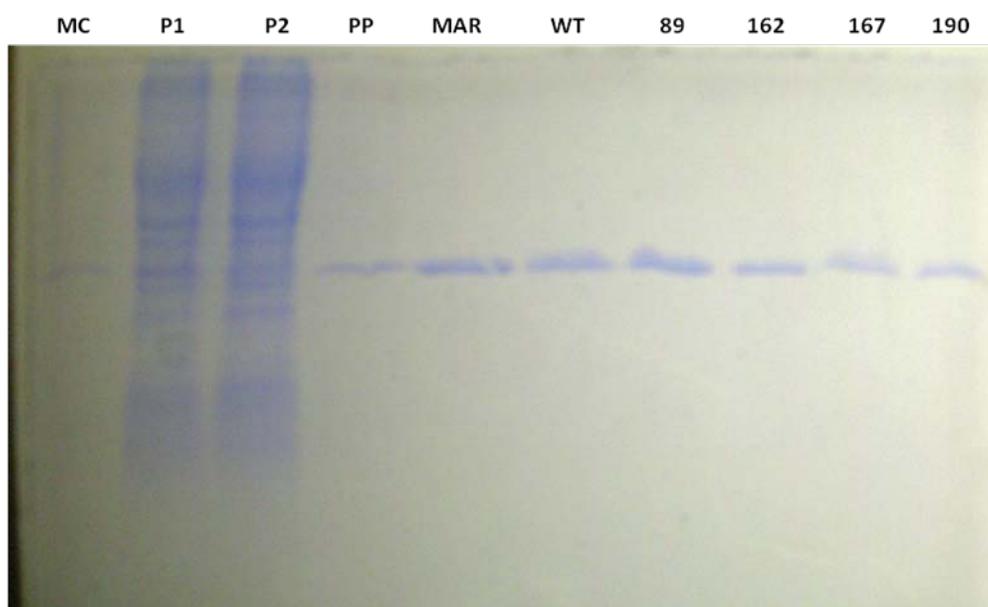
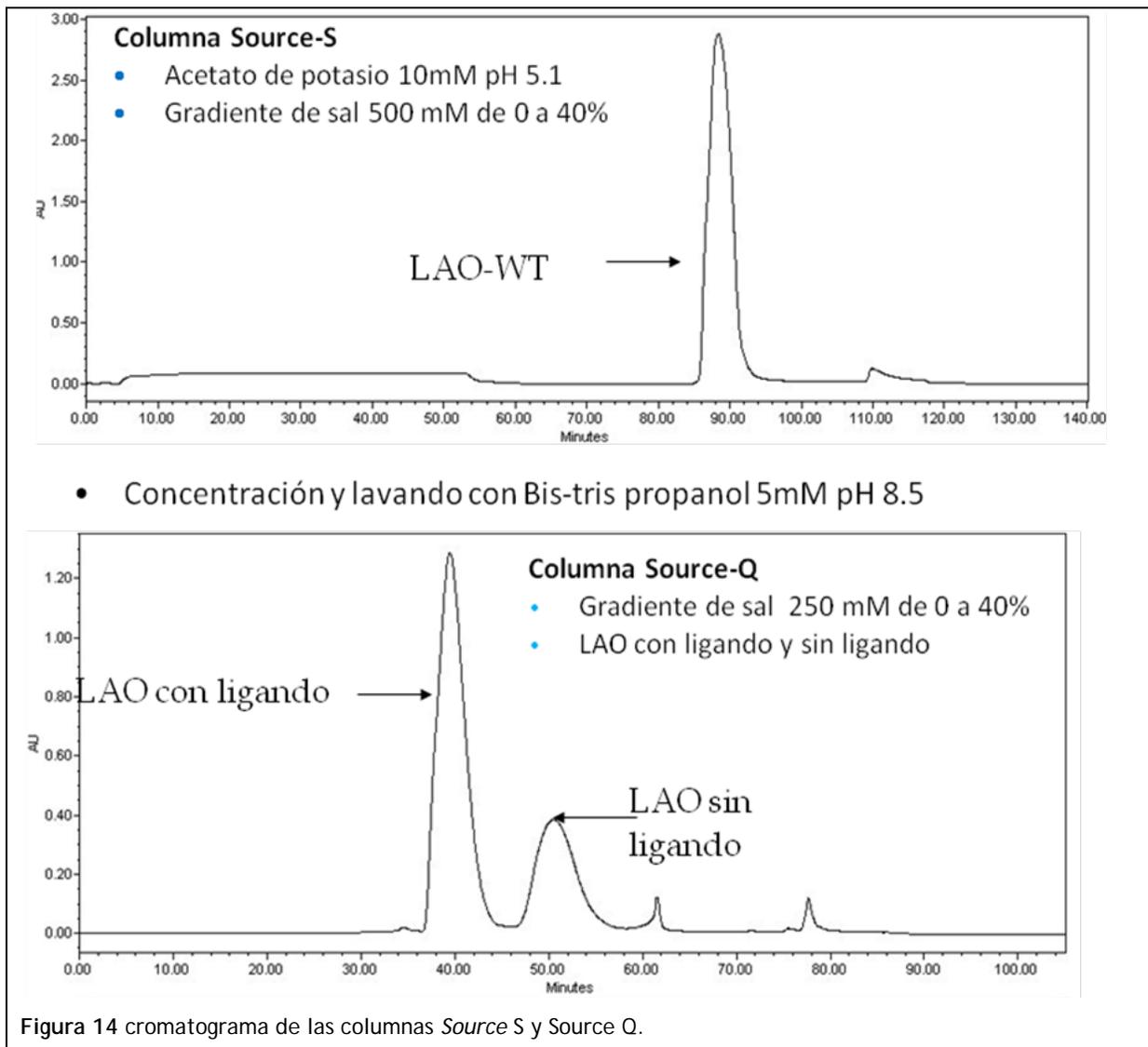


Figura 13. Gel de acrilamida SDS-PAGE 12%. MC= medio de cultivo, P1= proteína total del precipitado 1, P2= proteína total del precipitado 2, PP= periplasma, MAR= marcador LAO, WT= LAO silvestre, 89= LAO A89C= 162 = LAO E162C, 167= E167C, 190=Y190C.

### Purificación de proteína

Se purificaron las proteína LAO silvestre y las mutantes A89C, E167C, E162C y Y190C (véase Figura 13) con el sistema de inducción con arabinosa *E. coli*. BL21-AI (*invitogene, USA*), con algunas ligeras variaciones en el protocolo de purificación para las mutantes al reducir las cisteínas introducidas al haber adicionado, 5 Mm de  $\beta$ -mercapto etanol a las soluciones amortiguadoras, a partir

del rompimiento de la pared periplásmica de las células de *E. coli*. Los cromatogramas de las mutantes (véase Figura 14) pueden variar dependiendo las condiciones de la mutación, se debe tener particular cuidado con el pH de las fases móviles de las columnas de purificación como también en la concentración del amortiguador y del agente reductor, ya que influyen directamente en el rendimiento y en la resolución de los picos de los cromatogramas.



**Cambios en la constante de disociación  $K_d$**

Las variaciones en los valores de la constante de disociación están asociadas a la forma en que el ligando se une a las proteínas de unión, no es tarea fácil modificar la afinidad de la proteína por su ligando de manera racional -a partir de la estructura molecular- y dado que esta proteína presenta un proceso de apertura y cierre entre sus lóbulos, entonces estudiamos el posible papel de la bisagra en este proceso, al constatar que las modificaciones en la bisagra afectan el cambio conformacional de la proteína. (Figura 19 y 20). Los cambios en la  $K_d$  que se presentan a continuación están asociados a la introducción de grupos más voluminosos y/o perturbación de contactos estéricos requeridos en la bisagra.

La proteína LAO silvestre presenta un aumento en las unidades de fluorescencia al realizar la titulación con Arginina (véase Figura 15), donde se aprecia que la primer línea trazada se encuentra en las 80000 unidades de fluorescencia, teniendo un aumento según se agregó mas ligando, hasta que el cambio en la fluorescencia se satura cerca de las 100000 unidades de fluorescencia. Esto indica que la proteína poco a poco se fue saturando a raíz de la adición de ligando, hasta el punto donde la proteína no puede atrapar mas ligando y como resultado no hay cambio en la fluorescencia (véase figura 15). Al realizar el ajuste de los datos tomados a 322 nm, de la titulación de la proteína LAO silvestre con Arginina, el valor de la  $K_d$  es de  $2.77 \pm 0.73$  nM, presentando un comportamiento de alta afinidad por el ligando véase (figura 16).

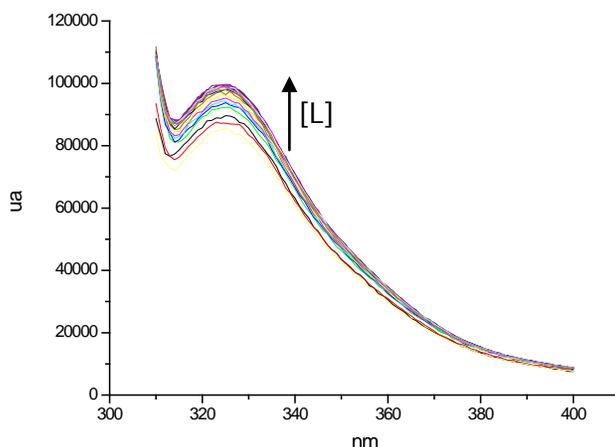


Figura 15. Titulación de la proteína LAO silvestre con 2 nM de arginina por cada medición de fluorescencia,

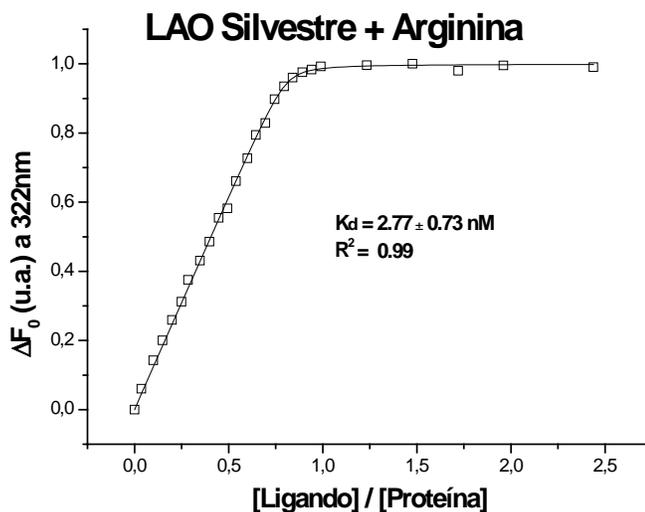


Figura 16. De la titulación con arginina se tomaron los datos a 322nm para realizar el ajuste con el programa *origin* con la fórmula mencionada en los métodos y así obtener el  $\Delta F_0$  a 322nm de la proteína LAO silvestre de donde se extrajo la constante de afinidad  $K_d$ .

### Cambios en la constante de disociación para las mutantes

Los valores de las constantes de afinidad para cada mutante, y los efectos que tiene el modificador químico en estos valores (Tabla 6), se puede explicar por la diferencia del volumen de los tres modificadores introducidos. Se observó una correlación entre el volumen del grupo funcional introducido (metilo  $6.5 \text{ \AA}^3$ ,

bimano 138 Å<sup>3</sup> y pireno 186 Å<sup>3</sup>) con una disminución de la afinidad de la proteína por el ligando, en donde, mayor sea el valor de la Kd, menor es la afinidad de la proteína por el ligando.

	A89C	E162C	E167C	Y190C
Cisteína	8.14 ± 1.4 nM,	11.57 ± 2nM	13.54 ± 1.4 nM	15.52 ± 1.7nM
C+MMTS	14.78 ± 4.1nM	32.18 ± 1.5 nM	26.85 ± 4.4nM	26.76 ± 8.3nM
C+Bimano	71.71 ± 13.8 nM	61.51 ± 13.8 nM	52.92 ± 6.7nM	74.87 ± 7nM
C+Pireno	557.4 ± 6.5 nM	332.08 ± 35.5nM	96.33 ±10.6nM	517.21 ± 18nM

Tabla 6 Cambios en la constante de afinidad Kd para las diferentes mutantes modificadas con .tiol-metilo (6.5 Å<sup>3</sup>), Bimano (138 Å<sup>3</sup>) y pireno (186 Å<sup>3</sup>)

En la mutante A89C, la gran disminución en la afinidad por la arginina (véase Figura17), se debe a que se encuentra dentro de una de las hebras de la bisagra, también a la perturbación del movimiento de apertura y cierre entre los lóbulos, que dificulta a la proteína atrapar el ligando. Dentro de esta mutante modificada con pireno existe la transferencia de energía de la fluorescencia intrínseca del triptófano 130 al pireno introducido en la posición 89, en donde el aumento en las unidades de fluorescencia en la región de los 400 nm, (véase Figura 18), representa un sitio reportero fluorescente para los cambios conformacionales de la proteína, gracias a que se conocen los cambios en la Kd de la proteína mutada y modificada químicamente.

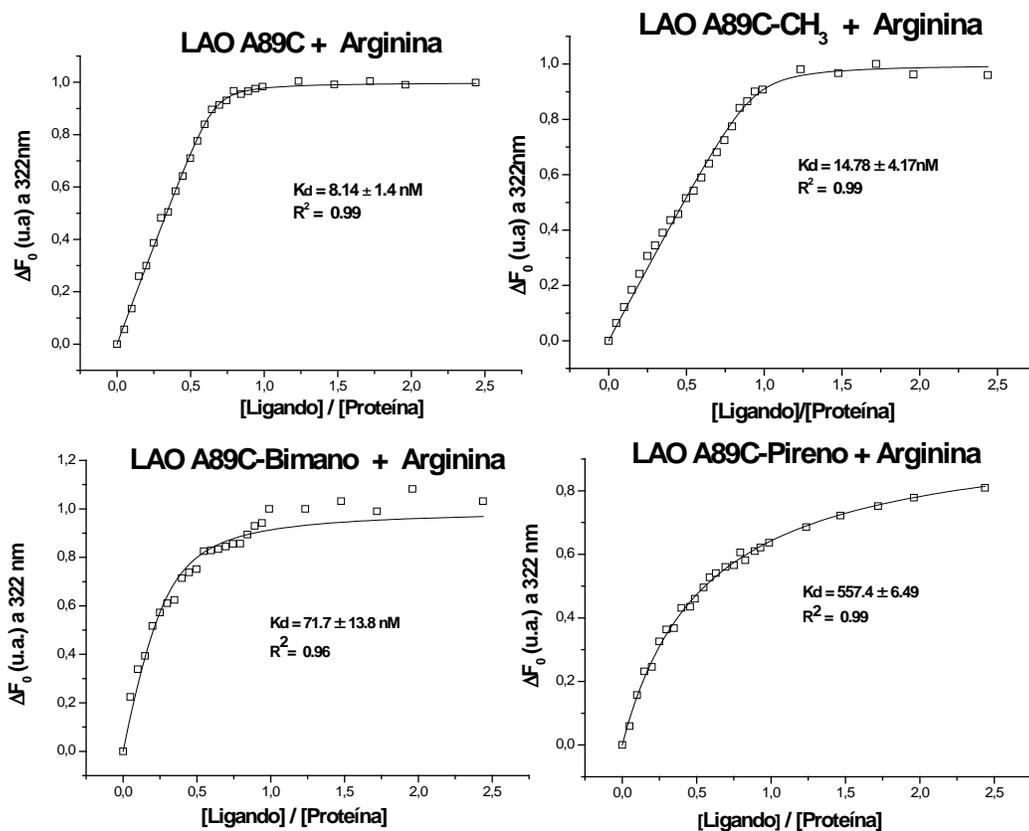


Figura 17. Graficas del ajuste para obtener la constante de afinidad para la mutante A89C. En el cuadro superior izquierdo la curva para la mutante sin Derivatizar, superior derecho derivatizada con CH<sub>3</sub> inferior izquierdo derivatizada con bimano e inferior derecho derivatizada con metilo

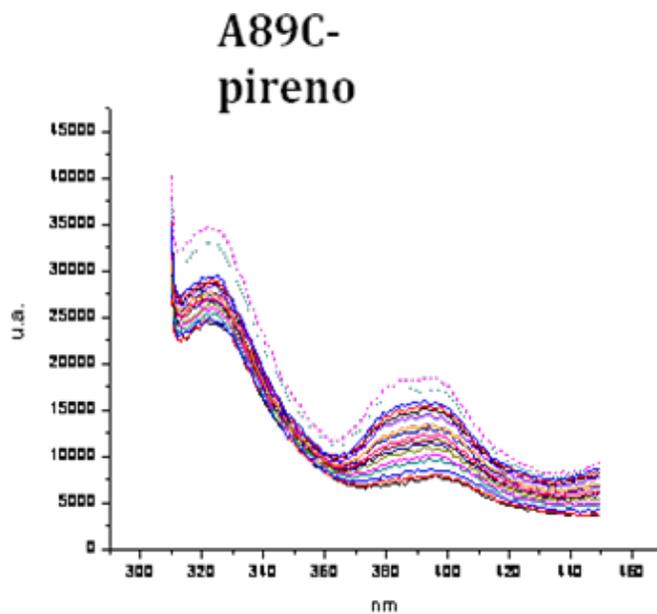


Figura 18. Espectro de transferencia de energía de la fluorescencia intrínseca del triptófano 130 al pireno que se encuentra en la posición 89, el cual presentó un aumento en las unidades de fluorescencia en la región de los 400 nm

La mutante E162C, (véase Figura 19) que contiene un ácido glutámico en la proteína silvestre, se encuentra ubicada en la región cercana a la bisagra por lo cual no tiene una participación directa en la apertura y cierre de la proteína, por la ubicación en la que se encuentra, se comprueba que las modificaciones dentro de la bisagra presentan una mayor perturbación del movimiento global de la proteína. Esto se debe a que la posición de la mutación tiene mayor exposición al solvente y al mismo tiempo no interviene en el movimiento global en el cambio conformacional activado por el ligando, pero aun así presenta fluorescencia con posibilidades de ser utilizada como grupo reportero para cuando no se quiere modificar la bisagra ni los contactos directos con el ligando (figura 20).

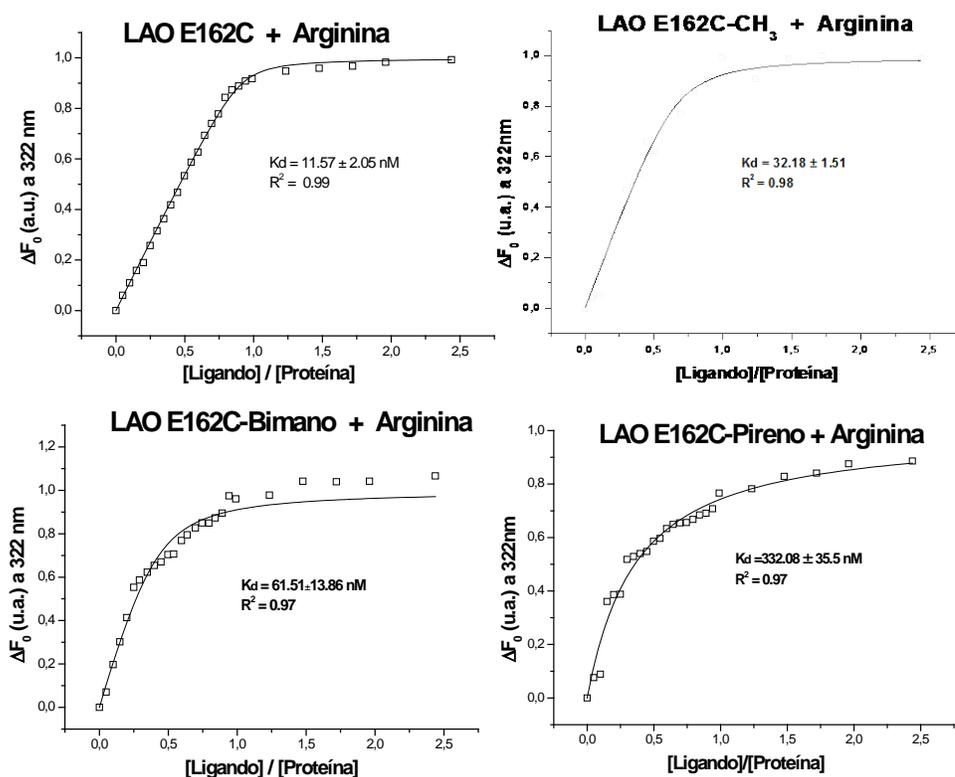


Figura 19. Graficas del ajuste para obtener la constante de afinidad para la mutante E162C. En el cuadro superior izquierdo la curva para la mutante sin Derivatizar, superior derecho derivatizada con CH<sub>3</sub> inferior izquierdo derivatizada con bimano e inferior derecho derivatizada con pireno

## E162C-pireno

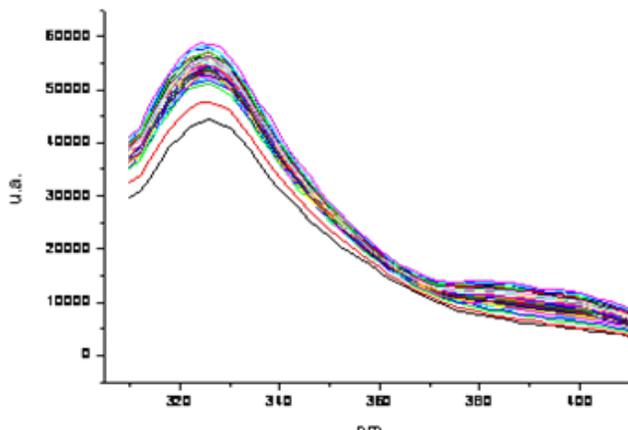


Figura 20 Espectro de transferencia de energía de la fluorescencia intrínseca del triptófano 130 al pireno que se encuentra en la posición 162, el cual no presentó un aumento en las unidades de fluorescencia en la región de los 400 nm

A pesar de que hay una variación en los valores de la  $K_d$  en la mutante E167C (véase Figura 21) el cambio no tiene la magnitud observada en el resto de las mutantes, por lo que se deduce que esta posición no afecta a la apertura y cierre de la molécula aunque se encuentre en la boca de la cavidad del sitio de unión del ligando. En ésta posición no se presentó fluorescencia en la región del pireno a 400nm, esto es posible que se debiera a la posición del residuo 167 ya que al estar en la comisura de la bisagra está demasiado expuesta al solvente generando el apagamiento en la señal del pireno y evitando la transferencia de energía por parte del triptófano 130, el cual se localiza del otro lado de la proteína (véase Figura 22). Esta mutante es un buen candidato para realizar estudios en flujo detenido gracias al comportamiento exponencial al titular la afinidad en presencia de ligando, la cual representa una curva con características similares a las de la línea basal en fluorescencia de flujo detenido.

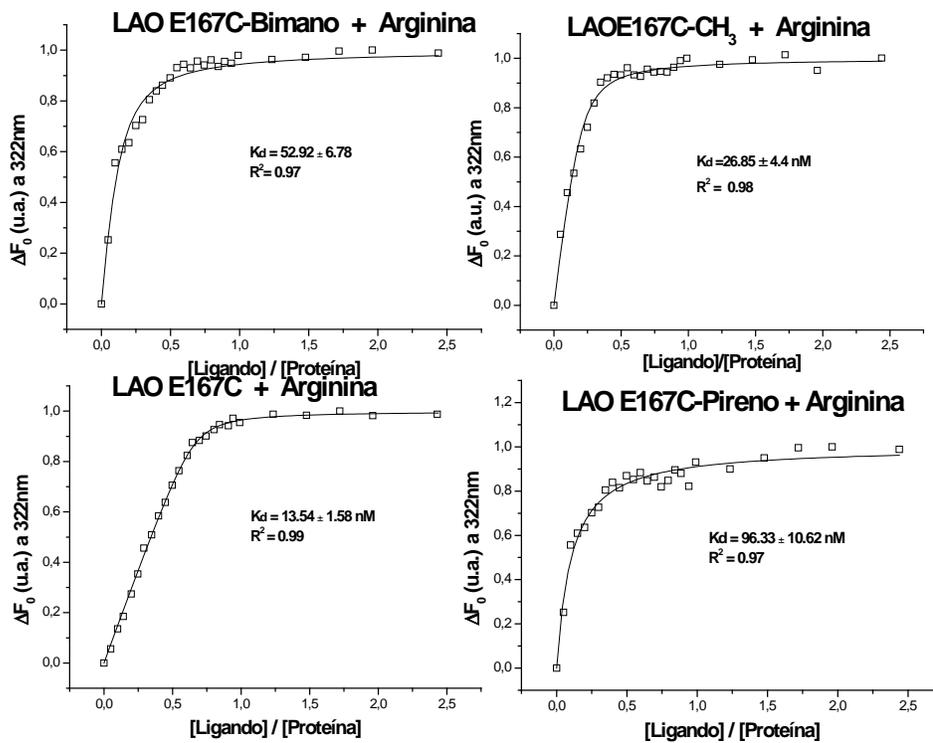


Figura 21. Graficas del ajuste para obtener la constante de afinidad para la mutante E167C. En el cuadro superior izquierdo la curva para la mutante sin Derivatizar, superior derecho derivatizada con CH<sub>3</sub> inferior izquierdo derivatizada con bimano e inferior derecho derivatizada con pireno.

### E167C-pireno

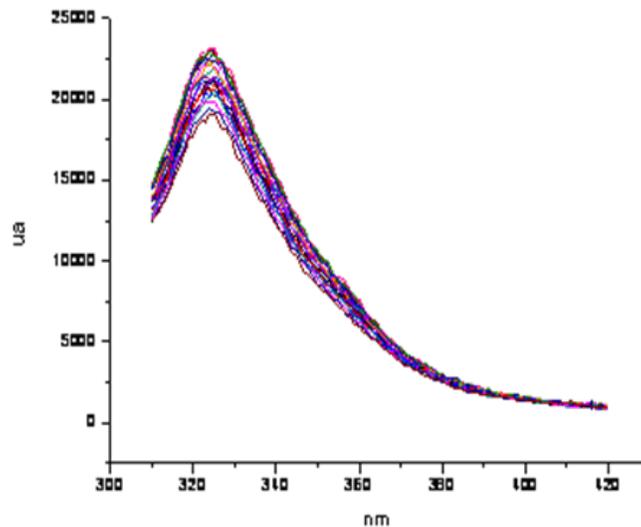


Figura 22 Espectro de transferencia de energía de la fluorescencia intrínseca del triptófano 130 al pireno que se encuentra en la posición 167, el cual no presentó un aumento en las unidades de fluorescencia en la región de los 400 nm.

En la mutante Y190C la tirosina se encuentra en un giro alfa de la bisagra de LAO en la proteína silvestre, éste giro es sumamente importante en los movimientos

de la apertura y cierre de la molécula, el cambio en los valores de la  $K_d$  (véase Figura 23) es el segundo más grande después de la mutante A89C, lo que indica que los cambios generados dentro de las dos bisagras interfieren con el buen desempeño de la proteína para unir al ligando; al impedir el libre movimiento de apertura y cierre de la bisagra, esto repercute en la interacción directa con el ligando y es necesario la presencia de mayores cantidades de ligando para que la proteína lo pueda unir (véase Figura 24).

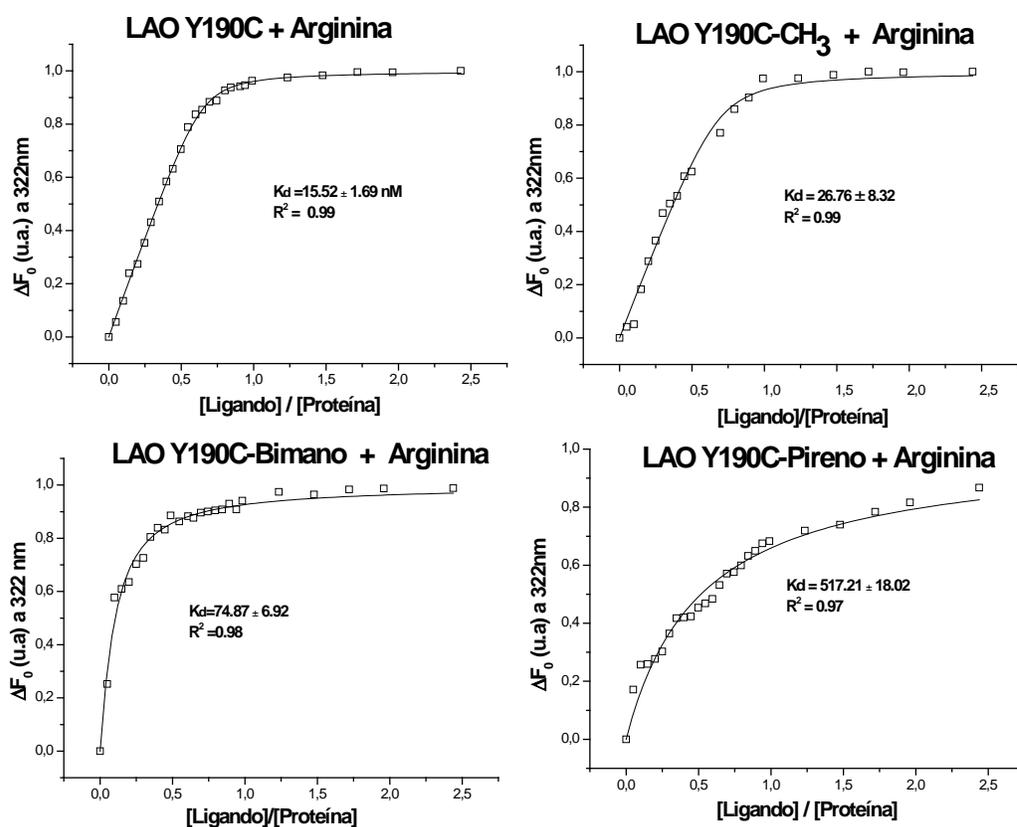


Figura 23. Graficas del ajuste para obtener la constante de afinidad para la mutante Y190C. En el cuadro superior izquierdo la curva para la mutante sin Derivatizar, superior derecho derivatizada con CH<sub>3</sub> inferior izquierdo derivatizada con bimano e inferior derecho derivatizada con pireno

## Y190C-pireno

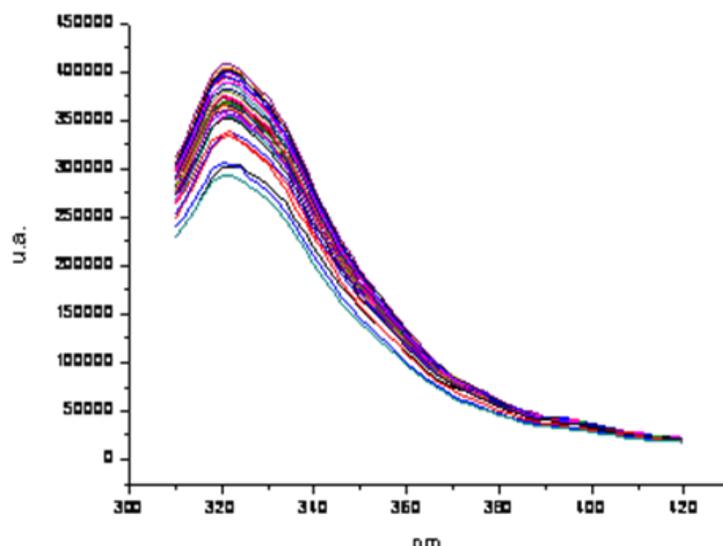


Figura 24 Espectro de transferencia de energía de la fluorescencia intrínseca del triptófano 130 al pireno que se encuentra en la posición 190, el cual no presentó un aumento en las unidades de fluorescencia en la región de los 400 nm.

**Variaciones en la afinidad al realizar la perturbación en cada mutante derivatizada.**

Con las perturbaciones realizadas a cada mutante derivatizada se lograron plantear cuatro diferentes escenarios, los cuales modifican el funcionamiento natural de la bisagra en la proteína LAO, esto debido a los cambios en las constantes de afinidad  $K_d$  para cada uno de los grupos planteados: Alanina 89, Glutámico 162, Glutámico 167 y Tirosina 190.(figura 25 y 26). En el primer escenario, donde la molécula se intercambia con cisteína, la proteína no presenta dificultades para unir al ligando, ya que los valores de la  $K_d$  se mantienen entre los 8 y 16 nm.

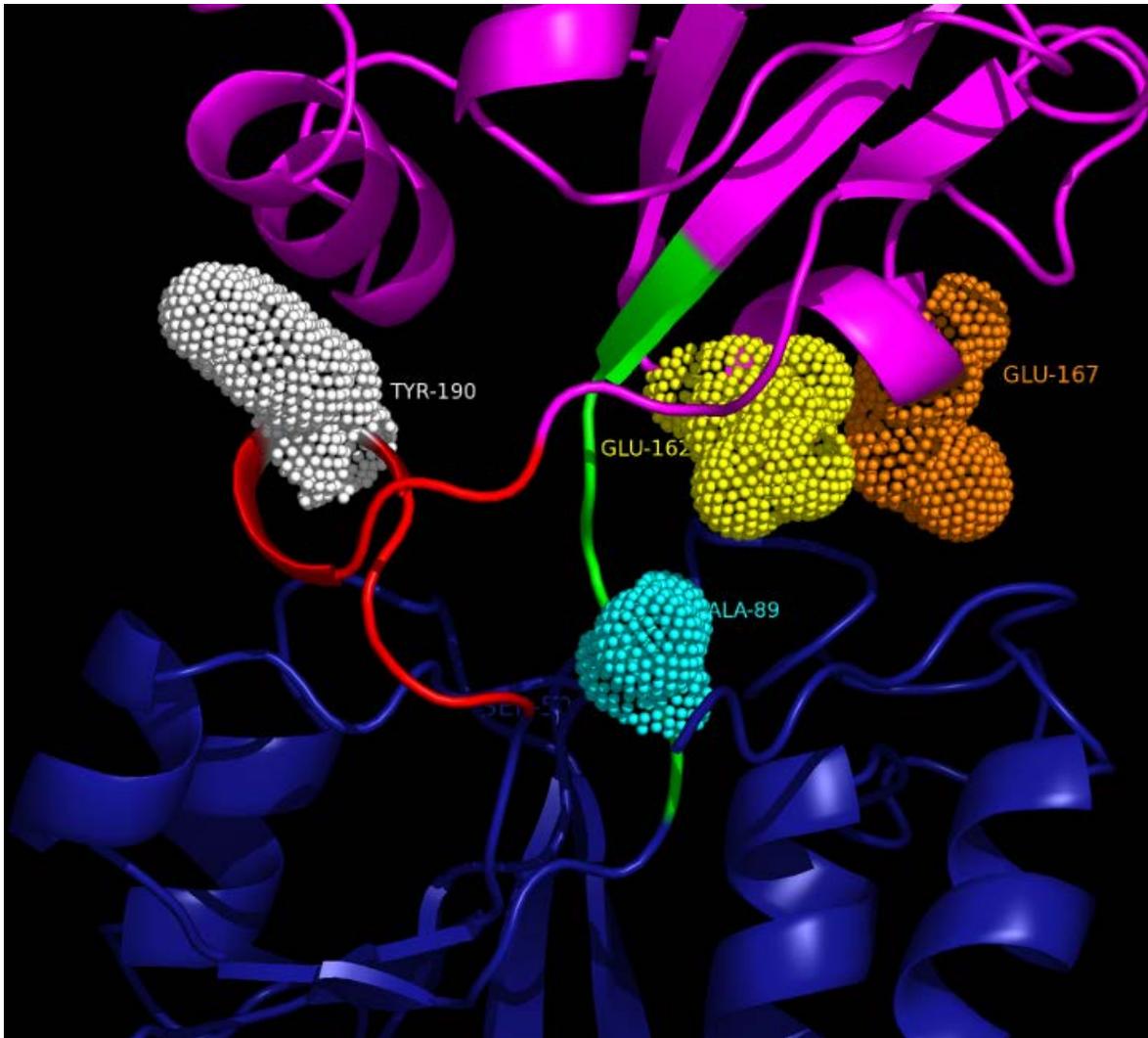


Figura 25. Posición de los residuos cambiados por cisteína A89C (cian), E162C (amarillo), E167C (naranja) y Y190C (blanco) de la proteína LAO (el resto de la proteína se representa en magenta y azul). Código PDB 2LAO. Figura realizada con el programa PyMol, versión 1.3 (25).

En el segundo escenario, el cual se modifica con metilo, las variaciones en la constante de afinidad no son significativas por lo que la acción del volumen del tiol-metilo no afecta al movimiento global de la proteína, esto ocasiona que la  $K_d$  se encuentre entre los 14 y 32 nM. En el tercero, donde se perturba con bimano, la proteína presenta mayor dificultad para cerrarse por la acción del volumen del modificador, provocando un aumento de la  $K_d$  a 75 nM. El cuarto escenario que se presenta es donde, al perturbar la molécula con pireno la

proteína se mantiene en un estado casi cerrado y no permite la unión del ligando ya que la afinidad por el mismo es muy pequeña y la  $K_d$  varía entre 96 y 558 nM. Otra de las variables que puede afectar la unión de la proteína con el ligando, así como la flexibilidad de la misma es que el modificador se pegue a la bisagra o quede hacia el interior de la cavidad, de igual forma que se encuentre expuesto al solvente, compitiendo así por la unión del ligando.

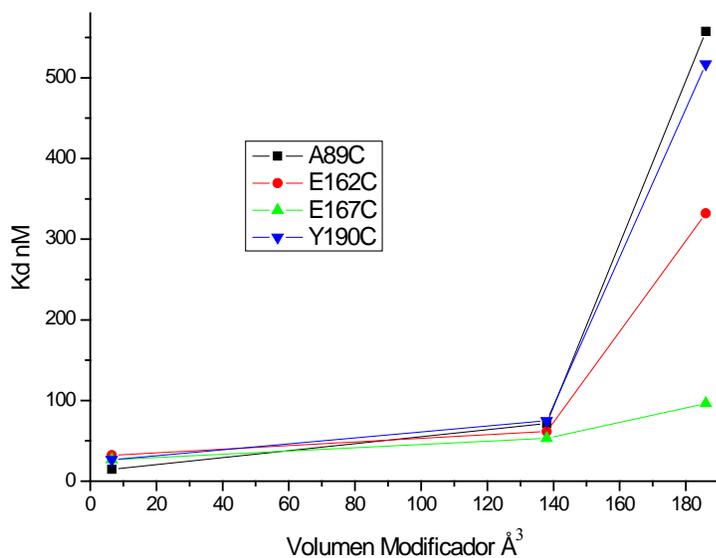


Figura 26. Correlación entre el volumen del modificador tiol-metilo  $6.5 \text{ \AA}^3$ , bimano  $138 \text{ \AA}^3$  y pireno  $186 \text{ \AA}^3$  y los cambios en la afinidad por el ligando

## Discusión general

En los cuatro sitios donde se introdujeron modificaciones químicas en la proteína LAO, la afinidad de la proteína por el ligando disminuyó a medida que se aumentó el tamaño del grupo funcional. Los cambios en la afinidad probablemente estén asociados a la desestabilización global de la proteína, ya sea por efecto de la introducción del grupo funcional y/o al tamaño, lo que además puede modificar contactos específicos ya sean puentes salinos o puentes de hidrogeno importantes para el estado cerrado. En este sentido sería útil conocer la contribución de cada amino acido de la bisagra a la estabilidad general de la proteína, por este motivo realizamos *in silico* la introducción de residuos de alanina en la región de bisagra (Tabla 7) con el programa FOLDX.

Mutante	$\Delta G$ kcal/mol	Mutante	$\Delta G$ kcal/mol
LEU 87 ALA	3.35962	VAL 185 ALA	1.96032
TYR 88 ALA	7.18506	LYS 186 ALA	-0.527982
ALA 89 ALA	0	ASP 187 ALA	0.772521
ALA 90 ALA	0	LYS 188 ALA	-0.0271589
ASP 91 ALA	-1.22689	LYS 189 ALA	0.253765
SER 92 ALA	-0.608555	TYR 190 ALA	3.12576
ARG 93 ALA	1.2636	PHE 191 ALA	4.008
LEU 94 ALA	3.80478	GLY 192 ALA	7.62952
ILE 95 ALA	3.00561	ASP 193 ALA	0.194518
Tabla 7. Escaneo por Alaninas			

En este tipo de estudios se calcula el  $\Delta G$  de perturbación por la introducción de la alanina. En la tabla no se observa una correlación entre el cambio energético en la estabilidad de la proteína ( $\Delta G$ ) promovido por la mutación *in silico* y la viabilidad de introducir los modificadores químicos, ya que en la posición 190, se presenta una desestabilización de  $\sim 3$  Kcal y sin embargo fue viable en las

mediciones, mientras que la posición 90 no fue viable la expresión de la proteína y la perturbación *in silico* es de 0 Kcal/mol

#### ANALISIS DE LOS CONTACTOS

Otro factor que analizamos fueron los contactos que forman los residuos 89, 162, 167 y 190 en el estado abierto 2lao (sin ligando) y cerrado con ligando 1l1st, a partir de las estructuras cristalográficas para ello utilizamos el programa LPC en línea (15) (véase Tabla 9). Las interacciones dentro de la bisagra no se llevan a cabo exclusivamente con residuos que pertenecen a la misma hebra de la bisagra, los enlaces se efectúan entre las hebras componentes de la bisagra así como con el asa de los últimos residuos (en secuencia) que se encuentra cercana a la bisagra. Por los trabajos de Telemer y Shilton (13) suponemos que, cuando existe un cambio en el equilibrio de apertura-cierre hacia el estado abierto la afinidad disminuye, y viceversa. En el caso específico de LAO, el cambio a nivel de los contactos en la región de la bisagra podría ocasionar variaciones en las interacciones requeridas en el estado cerrado, por la acción del grupo introducido.

Los residuos que interactúan con la bisagra juegan un papel importante en la apertura y cierre de la molécula, por lo que la desestabilización de estos contactos nos dan evidencias de que el equilibrio de apertura y cierre no solo es por la unión del ligando, también influyen los contactos de la parte posterior de la molécula donde se encuentra la bisagra.

Residuo	Dist	Surf	HB	Arom	Phob	DC
90 ALA	1.3	63.6	+	-	-	+
235 VAL	3.1	19.7	+	-	-	+
236 TYR	3.4	17.4	+	-	-	+
89, estado abierto, 2LAO			Contactos Específicos			
Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
86 LYS	4.6	4.5	-	-	+	+
90 ALA	1.3	59.8	+	-	-	+
235 VAL	3.0	16.5	+	-	-	+
236 TYR	3.5	17.3	+	-	-	+
162, estado cerrado, 1lst			Contactos Específicos			
Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
91 ASP	2.8	31.2	+	-	+	+
93 ARG	2.9	43.9	+	-	+	-
160 GLN	3.4	2.8	+	-	-	-
163 VAL	1.3	63.1	+	-	+	+
165 ALA	3.2	3.2	+	-	-	+
166 SER	2.9	29.7	+	-	-	-
180 PHE	3.5	24.0	-	-	+	-
184 SER	2.8	25.7	+	-	-	-
162, estado abierto, 2LAO			Contactos Específicos			
Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
91 ASP	2.9	28.4	+	-	-	+
93 ARG	2.8	43.6	+	-	+	-
160 GLN	3.5	3.2	+	-	-	-
163 VAL	1.3	66.0	+	-	+	+
166 SER	2.9	25.8	+	-	-	-
180 PHE	3.4	26.7	-	-	+	-
184 SER	3.7	16.1	+	-	-	-
233 PHE	3.7	32.8	-	-	+	-
167, estado cerrado, 1lst			Contactos Específicos			
Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
163 VAL	2.9	33.7	+	-	+	+
166 SER	1.3	80.1	+	-	-	+
168 GLY	1.3	58.7	+	-	-	+
169 PHE	3.6	0.2	+	-	-	-
171 LYS	3.0	39.8	+	-	-	+
172 GLN	2.9	28.9	+	-	-	+
231 PHE	4.3	6.7	-	-	+	-
233 PHE	4.0	17.6	-	-	+	-
167, estado abierto, 2LAO			Contactos Específicos			

Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
163 VAL	3.0	22.7	+	-	+	+
168 GLY	1.3	51.1	+	-	-	+
171 LYS	3.2	37.9	+	-	-	+
172 GLN	2.6	29.1	+	-	-	-

190, estado cerrado, 11st			Contactos Específicos			
Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
128 ASP	2.5	38.3	+	-	-	+
129 ASN	3.7	20.1	+	-	-	-
187 ASP	3.2	25.6	+	-	-	+
189 LYS	1.3	87.3	-	-	+	+
191 PHE	1.3	70.9	+	-	+	+

190, estado abierto, 2LAO			Contactos Específicos			
Residue	Dist	Surf	HB	Aroma	Hob	DC
124 ALA	3.8	21.5	-	-	+	-
125 TYR	3.5	37.9	-	+	+	-
128 ASP	2.8	37.7	+	-	-	+
129 ASN	3.6	11.7	+	-	-	-
187 ASP	3.0	25.7	+	-	-	+
189 LYS	1.3	111.9	+	-	+	+
191 PHE	1.3	81.3	+	-	+	+

Tabla 9. Análisis de los contactos que se presentan en los residuos mutados Alanina 89, ácido glutámico 162, ácido glutámico 167 y tirosina 190, tanto en el estado abierto como en el cerrado. Donde: Dist: Distancia más cercana (Å) entre átomos de dos residuos, Surf: contactos de superficie de área (Å<sup>2</sup>) entre dos residuos, HB: contactos hidrofóbicos-hidrofílicos puente de Hidrógeno, Arom: contacto aromático-aromático, Phob: contacto hidrofóbico-hidrofóbico, DC: contacto hidrofóbico-hidrofílico desestabilizante, +/-: indica presencia/ausencia de un contacto específico Ligando-Proteína. LPC software (Sobolev V., Sorokine A., Prilusky J., Abola E.E. and Edelman M. (1999) Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics*, 15, 327-332).

## Conclusiones

- Al perturbar las mutantes A89C, E162C, E167C, Y190, se modificó la constante de afinidad  $K_d$ , afectando el equilibrio de apertura y cierre para cada mutante Modificada químicamente.
- La perturbación de la región de bisagra de la proteína LAO está asociada a disminuir la afinidad de la proteína por la arginina. Donde a mayor volumen del modificador menor es la afinidad por el ligando.
- Los cambios generados dentro de las dos bisagras (posición 89 y Y190) interfirieron con el buen desempeño de la proteína para unir al ligando; esto repercute en la interacción directa con el ligando.
- Con las perturbaciones realizadas a cada mutante y debido a los cambios en las constantes de afinidad para cada uno de los grupos se concluye que:

El cambio por cisteína, la proteína no presenta dificultades para unir al ligando.

Los valores de la  $K_d$  se mantienen entre los 8 y 16 nM.

La modificación con tiol-metilo, la proteína mantiene la afinidad por el ligando los valores de  $K_d$  se encuentran entre los 14 y 32 nM.

La perturbación con bimano, la proteína presenta mayor dificultad para cerrarse por la acción del volumen del modificador, provocando un aumento de la  $K_d$  de hasta 75 nM.

Al perturbar la molécula con pireno, la proteína pierde la afinidad y dificultando la unión del ligando la  $K_d$  varía entre 96 y 558 nM.

- En la posición 89 modificada con pireno, la transferencia de energía de la fluorescencia intrínseca del triptófano 130 al pireno, generó un aumento en la fluorescencia en la región de los 400 nm.
- La posición 89 puede ser un buen sitio reportero fluorescente para los cambios conformacionales de la proteína, gracias a que se conocen los cambios en la  $K_d$  de la proteína mutada y modificada.
- Por su ubicación las modificaciones de la posición 162, presentan una mayor perturbación del movimiento global de la proteína. Gracias a la mayor exposición al solvente.
- La posición 162 presenta propiedades fluorescentes con posibilidades de ser utilizada como grupo reportero para cuando no se quiere modificar la bisagra ni los contactos directos con el ligando.
- La posición 162 no afecta la apertura y cierre de la molécula aunque se encuentre en la boca de la cavidad del sitio de unión.
- En la posición 162 no se presentó fluorescencia en la región del pireno a 400 nm, esta mutante es un buen candidato para realizar estudios con fluorescencia de flujo detenido, la cual representa una curva con características similares a las de la línea basal.
- La posición 190 presenta el segundo cambio más grande después de la mutante A89C en los valores de la  $K_d$  al derivartizarla con pireno.

## Perspectivas

Diseñar nuevos sitios de posibles blancos para la mutación y modificación química para la perturbación del equilibrio de apertura y cierre basándose en trabajos *in silico*.

Realizar estudios de fluorescencia de flujo detenido para obtener las velocidades de apertura y cierre de la proteína LAO silvestre así como de las mutantes A89C, E162C, E167C y Y190C.

Realizar las mutaciones y modificaciones químicas en la proteína de unión a histidina HisJ por ser una proteína muy similar a LAO, son productos de la duplicación en tándem del gen ArgT de *Salmonella typhimurium* (10), pueden reconocer los dos componentes de membrana HisQ e HisM (1).

Estudiar las interacciones proteína-proteína entre LAO y los componentes de membrana HisQ e HisM, y comparar estas interacciones con la Proteína de unión a histidina HisJ.

Diseñar basándose en alguna proteína periplásmica de unión bio-sensores para monitorear la presencia de alguna molécula específica.

Diseñar quimeras con proteínas fluorescentes y proteínas periplásmicas de unión que puedan ser utilizadas como bio-sensores.

## Referencias

1. Nikaido K. y Ames G. F. (1992) Purification and characterization of the periplasmic lysine, arginina, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium*, *The Journal of biological chemistry* 267, 20706-20712.
2. Marvin J. S. y Hellinga H. W. (2001) Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling, *Nature structural biology* 8, 795-798.
3. Tam R. y Saier M. H. Jr. (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria, *Microbiological reviews* 57, 320-346.
4. Kang C. H., Shin W. C., Yamagata Y., Gokcen S., Ames, G. F., y Kim S. H. (1991) Crystal structure of the lysine, arginine, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium* at 2.7-Å resolution, *The Journal of biological chemistry* 266, 23893-23899.
5. Oh B. H., Pandit J., Kang C. H., Nikaido K., Gokcen S., Ames G. F., and Kim S. H. (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand, *The Journal of biological chemistry* 268, 11348-11355.
6. Kang C. H., Gokcen S., y Ames G. F. (1992) Crystallization and preliminary X-ray studies of the liganded lysine, arginine, ornithine-binding protein from *Salmonella typhimurium*, *Journal of molecular biology* 225, 1123-1125.

7. Wolf A., Shaw E. W., Nikaido K., y Ames G. F. (1994) The histidine-binding protein undergoes conformational changes in the absence of ligand as analyzed with conformation-specific monoclonal antibodies, *The Journal of biological chemistry* 269, 23051-23058.
8. Oh B. H., Kang C. H., De Bondt H., Kim S. H., Nikaido K., Joshi A. K., y Ames G. F. (1994) The bacterial periplasmic histidine-binding protein. Structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins, *The Journal of biological chemistry* 269, 4135-4143.
9. Oh B. H., Ames G. F., y Kim S. H. (1994) Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine, arginine, ornithine-binding protein, *The Journal of biological chemistry* 269, 26323-26330.
10. Higgins C. F., y Ames G. F. (1981). Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 6038-6042.
11. Ames G. F., y Nikaido K. (1978) Identification of a membrane protein as a histidine transport component in *Salmonella typhimurium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 5447-5451.
12. Kustu S. G., McFarland N. C., Hui S. P., Esmon B., y Ames G. F. (1979) Nitrogen control of *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems, *Journal of bacteriology* 138, 218-234.

13. Telmer P. G., and Shilton B. H. (2003) Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants, *The Journal of biological chemistry* 278, 34555-34567.
14. Yang A. Y., and Mancera R. L. (2008) Molecular dynamics simulations of ligand-induced backbone conformational changes in the binding site of the periplasmic lysine, arginine, ornithine-binding protein, *Journal of computer-aided molecular design* 22, 799-814.
15. Sobolev V., Sorokine A., Prilusky J., Abola E.E. and Edelman M. (1999) Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* 15, 327-332.
16. Olivares-Quiroz L. y Garcia-Colin L. (2004) plegamiento de proteínas: Un problema interdisciplinario, *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48,95-105.
17. Creighton T. E. (1996). *Proteins: Structure and Molecular Properties*. 2da. Edición. Editorial W. H. Freeman and Company. New York, E. U. A.
18. Mathews CK, Hole K E, Ahem K G. (2002). *Bioquímica*. 3ra edición. Addison Wesley. 414.
19. Nelson D. L. y M. M. Cox. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ra. edición. Editorial Worth. Nueva York, E.U.A.
20. QIAprep Miniprep Handbook 03/2003.
21. Voet D. y J. G. Voet. (1992). *Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona, España.

- 22 Davidson A., Shuman S. y Nikaido H. (1992). Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: Transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Biochemistry*. 2360-2364,
- 23 Walmsley A., Shaw J. y Kelly D., (1992). Perturbation of the equilibrium between open and closed conformations of the periplasmic C4-dicarboxylate binding protein from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* 31, 11175-11181
- 24 Dwyer M., y Hellinga H. (2004). Periplasmic binding proteins a versatile superfamily for protein engineering. *Current opinion in structural Biology* 14, 495-504
- 25 The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.
- 26 Akabas M. H., y Karlin A. (1995). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the  $\alpha$ -subunit. *Biochemistry* 34, 12496-12500.
- 27 Copeland Robert A., (2000). *Enzymes A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*, second edition, editorial Wiley VCH
- 28 Dime D S. *Methanethiosulfonate Reagents: Application to the Study of Protein Topology and Ion Channels*, Toronto Research Chemicals Inc., [www.trc-canada.com/mts.doc](http://www.trc-canada.com/mts.doc)
- 29 Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. y Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.